

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI
SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE BIOMEDICHE
Direttore Prof. E. Tolu
INDIRIZZO ODONTOSTOMATOLOGIA PREVENTIVA
Coordinatore Prof. G. Chessa
XXI CICLO

**EFFICACIA DELL'AGENTE CETILPIRIDINIO CLORURO SUI
MICROORGANISMI ORALI CARIOGENI E PUTREFATTIVI. STUDIO
IN VIVO SULLA PREVENZIONE DELLA CARIE DENTALE E
DELL'ALITOSI DI ORIGINE ORALE**

Tutor:
Chiar.mo Prof. S. Abati

Tesi di Dottorato di
dott.ssa Jessica Isabella Pizzocri

Anno Accademico 2007 - 2008

A Gabriele, Lorenzo e Giorgia,

i miei tesori

INDICE

1 L'ECOSISTEMA ORALE	5
1.1 IL BIOFILM ORALE.....	5
1.1.1 Fasi della formazione del biofilm orale.....	6
1.1.2 Principali microrganismi.....	7
1.1.3 Placca dentale intesa come comunità	10
1.2 ULTRASTRUTTURA E COMPOSIZIONE CHIMICA DEL BIOFILM	12
1.3 ACQUISIZIONE DEL MICROBIOTA ORALE	13
2 LA CARIE DENTARIA.....	15
2.1 EZIOPATOGENESI	15
2.2 I DENTI	18
2.2 I DENTI	19
2.3 IL RUOLO DELLA SALIVA.....	20
2.4 I BATTERI.....	21
2.4.1 Cariogenicità.....	22
2.5 ALIMENTAZIONE.....	23
2.6 L'IMPORTANZA DELL'IGIENE ORALE.....	25
2.6.1 I collutori.....	26
3 LO STREPTOCOCCUS MUTANS	28
3.1 TASSONOMIA	29
3.1.1 Come isolare selettivamente lo <i>Streptococcus mutans</i>	30
3.2 STRUTTURA CELLULARE.....	31
3.3 FATTORI DI VIRULENZA	32
3.4 ACQUISIZIONE DEL BATTERE CARIOGENO	33
4 IL CETILPIRIDINIO CLORURO.....	34
4.1 COMPOSIZIONE E CARATTERISTICHE FISICO-CHIMICHE	34
4.2 MECCANISMI D'AZIONE	35

4.3 AZIONE ANTIPLACCA E ANTICARIE	36
4.4 CPC: GENGIVITE E SANGUINAMENTO	38
4.5 CPC E ALITOSI.....	39
4.6 EFFETTI COLLATERALI.....	40
5 SCOPO DELLA TESI.....	42
6 MATERIALI E METODI	43
6.1 PROTOCOLLO SPERIMENTALE	43
6.2 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE SALIVARE DI <i>S.</i> <i>MUTANS</i>	44
6.3 IL BANA-TEST.....	45
6.4 COME È STATO ESEGUITO IL BANA-TEST.....	47
7 ANALISI STATISTICA	49
8 RISULTATI	50
9 CONCLUSIONI.....	55
10 BIBLIOGRAFIA	56

1 - L'ECOSISTEMA ORALE

Il cavo orale è la prima sede dei processi digestivi e rappresenta il primo tratto dell'apparato respiratorio; viene coinvolto nel passaggio di alimenti, aria, microparticelle e microrganismi.

Rappresenta un habitat ottimale per la colonizzazione microbica grazie a fattori fisico-chimici, a fattori nutritivi e alle sue diverse superfici. E' in questi termini che si può parlare del cavo orale come di un ecosistema: un ambiente in cui i microrganismi trasformano e riciclano la materia.

Il cavo orale è costituito da diverse nicchie di colonizzazione, rappresentate dalla lingua, dalle mucose e dai denti. In particolare gli elementi dentali offrono numerose superfici per la vita dei microrganismi, quali le aree sopra e sottogengivali, le superfici occlusale, interprossimale, buccale, linguale [Teti e Mattina, 2002].

1.1 Il biofilm orale

L'aggregazione di microrganismi sulle superficie dentali viene definita con il termine di biofilm o biopellicola orale o più comunemente placca dentaria o placca batterica [Marsh, 2006].

La placca è strutturata in modo altamente complesso ed aderisce al dente come una pellicola; essa è composta da diverse specie batteriche incluse in una matrice formata sia da polimeri di origine batterica, sia da cellule dell'ospite [Marsh, 2006]. La molteplicità delle specie cui è composta e la sua struttura complessa apportano notevoli benefici all'intera comunità microbica, che incarna lo stile di vita comunitario favorendo la comparsa di patologie cariose e parodontali [Marsh, 2005].

La placca, in seguito alle normali manovre di igiene orale, viene a formarsi molto rapidamente presentando una composizione ed un'attività metabolica variabili in base alla localizzazione e al suo periodo di formazione [Wang *et al*, 2005].

Nell'arco di alcune settimane nella placca si formano i cosiddetti nuclei di mineralizzazione, situati nella matrice polimerica, che, assieme ad alcune proteine salivari, trasformano la placca in tartaro. Il tartaro può risultare composto da quattro differenti cristalli di fosfato di calcio in base al grado di maturazione [Lindhe, 1997].

La salute e la malattia dell'apparato stomatognatico dipendono da un delicato equilibrio tra le varie specie batteriche (saprofiti) e l'ospite.

L'interesse di molti ricercatori si è rivolto all'analisi dei meccanismi che regolano questo complesso ecosistema.

La placca dentaria, come già accennato, ha dei siti preferenziali di colonizzazione: siti stagnanti che offrono protezione da quelle che sono le forze di rimozione nel cavo orale come la deglutizione, l'espettorazione, i movimenti della lingua, le manovre di igiene orale, il potere dilavante della saliva e del fluido crevicolare.

L'attecchimento di una specie batterica ad una superficie orale avviene in diverse fasi [Bortolaia e Sbordone, 2002].

1.1.1 Fasi della formazione del biofilm orale

Immediatamente dopo l'eruzione di un dente o dopo aver pulito la superficie dentale [Al-Hashimi e Levine, 1989], si assiste alla formazione di una pellicola denominata pellicola acquisita, costituita da macromolecole e sostanze idrofobe: glicoproteine salivari e anticorpi che iniziano ad adsorbire alla superficie (FASE 1). Questa pellicola altera la carica della superficie e ciò favorisce l'aderenza batterica [Lindhe, 1997].

I microrganismi a loro volta sono in grado di attaccarsi tra loro mediante polimeri extracellulari e strutture specifiche chiamate fimbrie (FASE 2) [Lindhe, 1997].

Nel frattempo la massa batterica già adesa aumenta di volume (FASE 3), nuovi batteri aderiscono ad essa (FASE 4) e si viene a formare una biopellicola più spessa e complessa (moltiplicazione); si modificano anche gli scambi gassosi e nutritivi determinando una condizione di anaerobiosi negli strati più profondi [Lindhe, 1997].

Vediamo le diverse fasi nello specifico:

a) *Adsorbimento di molecole dell'ospite e di molecole batteriche alla superficie dentaria*: viene a formarsi la cosiddetta pellicola acquisita; durante l'adsorbimento le molecole possono presentare dei cambiamenti conformazionali [Vacca-Smith *et al*, 1996; Kopec *et al*, 2001];

b) *Trasporto passivo di batteri orali sulla superficie dentaria*: inizialmente le interazioni fisico-chimiche tra pellicola acquisita e superficie cellulare batterica sono deboli e a lungo raggio (forze di van der Waals) e ciò permette un'adesione

reversibile [Busscher e van der Mei, 1997]. In seguito le interazioni forti a corto raggio (forze elettrostatiche) tra molecole specifiche della superficie batterica (adesine) e recettori complementari della pellicola permettono un'adesione irreversibile che spiega il trofismo microbico per le superfici orali [Jenkinson e Lamont, 1997; Lamont e Jenkinson, 2000]. Generalmente i batteri orali, oltre a possedere vari tipi di adesine per le interazioni con l'ospite, posseggono le coadesine che permettono l'interazione con altri batteri [Marsh, 2004];

c) *Adesione degli ultimi colonizzatori sulle specie già presenti*: questo stadio coinvolge specifiche interazioni batteriche a livello recettore-adesina, ed incrementa la variabilità dei biofilm; inoltre porta alla formazione di strutture particolari simili a pannocchie di granturco e a coccarde [Kolenbrander *et al*, 2000]. Vi possono essere delle interazioni biochimiche sinergiche o antagoniste tra i microrganismi: viene aumentata la loro efficienza metabolica e, per le specie anaerobiche, la coadesione con batteri aerobi, garantisce loro la sopravvivenza [Bradshaw *et al*, 1998];

d) *Moltiplicazione dei microrganismi*;

e) *Distacco attivo*: ciò può permettere ai microrganismi di colonizzare altri siti [Cavedon e London, 1993; Lee, 1996].

1.1.2 Principali microrganismi

Il biofilm orale comprende in totale circa 1000 specie, di cui soltanto la metà risulta coltivabile in laboratorio. Queste specie non sono tutte contemporaneamente presenti nel cavo orale di un individuo, e occupano una precisa zona, la superficie del dente [Cate, 2006].

Secondo alcuni studi la placca risulta inizialmente composta da streptococchi, la specie "pioniera", successivamente aumentano gli actinomiceti: ora il biofilm acquisisce tutte le caratteristiche di una comunità "matura" con un'alta percentuale di organismi filamentosi Gram-negativi anaerobi [Rosan e Lamont, 2000].

Sono i "primi colonizzatori" con la loro crescita a fornire le condizioni ideali per la sopravvivenza delle altre specie definite "secondi colonizzatori".

I "primi colonizzatori" sono stati individuati ponendo dei frammenti di smalto nella cavità orale [Nyvad e Kilian, 1987], e sono rappresentati dal genere *Streptococcus* (60-90% del totale), *Eikenella* spp., *Haemophilus* spp., *Prevotella* spp.,

Capnocytophaga spp., *Propionibacterium* spp. e *Veillonella* spp.. Diversi studi su soggetti sani hanno riscontrato che a 2 ore dalla formazione del biofilm predominano le specie *Actinomyces* spp., mentre a 6 ore predominano *Streptococcus oralis* e *Streptococcus mitis* [Li et al, 2004].

Tra i “secondi colonizzatori” troviamo *A. actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Eubacterium* spp., *Treponema* spp. e *Porphyromonas gingivalis* [Kolenbrander et al, 2002].

Fusobacterium nucleatum funge da ponte tra i “primi colonizzatori” e i “secondi colonizzatori”.

Solitamente biofilm vecchi sono spesso correlati a patologie parodontali, presumibilmente dovute ad alti livelli di “secondi colonizzatori” [Cate, 2006].

Tab. 1.1: Principali specie del cavo orale [Teti e Mattina, 2002].

GENERE	SPECIE
<i>Streptococcus</i>	<i>sanguis, salivarius, mutans, mitis, mitior, milleri, intermedius, durans, morbillorum</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>viscosus, naeslundii, israeli, odontolyticus</i>
<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>
<i>Arachnia</i>	<i>propionica</i>
<i>Veillonella</i>	<i>parvula, alcalescens</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei, acidophilus, salivarius ed altre specie</i>
<i>Haemophilus</i>	<i>segnis ed altre specie</i>
<i>Bacteroides</i>	<i>asaccharolyticus, melaninogenicus ss. intermedius, melaninogenicus ss. melaninogenicus, oralis, capillosus</i>
<i>Fusobacterium</i>	<i>nucleatum, russi</i>
<i>Treponema</i>	<i>denticola, macrodentium, orale</i>
<i>Borrelia</i>	varie specie
<i>Propionibacterium</i>	<i>acnes, freudenreichii, jensenii</i>
<i>Neisseria</i>	<i>flavescens, mucosa ed altre specie</i>
<i>Capnocytophaga</i>	<i>ochracea, gingivalis</i>
<i>Campylobacter</i>	<i>sputorum</i>
<i>Selenomonas</i>	<i>sputigena</i>
<i>Eikenella</i>	<i>corrodens</i>
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>anaerobius, micron</i>
<i>Leptotrichia</i>	<i>buccalis</i>
<i>Actinobacillus</i>	<i>actinomycetecomitans</i>

1.1.3 Placca dentale intesa come comunità

I benefici di uno stile di vita di comunità sono molteplici:

a) il metabolismo dei colonizzatori primari altera l'ambiente locale fornendo condizioni appropriate per lo sviluppo dei secondi colonizzatori: le specie che consumano ossigeno, come *Neisseria* spp. creano condizioni ottimali per le specie anaerobiche obbligate (allo stesso modo le diverse condizioni di pH, ossigeno e potenziale di riduzione permettono la coesistenza di specie differenti tra loro) [Marsh, 2004];

b) un diverso e più efficiente metabolismo delle specie batteriche: le molecole che normalmente sono refrattarie al catabolismo da parte di singoli organismi possono essere spesso distrutte da gruppi di varie specie come in una catena alimentare [Carlsson, 2000];

c) un' aumentata resistenza agli stress ambientali, agli agenti antimicrobici e alle difese dell'ospite: le cellule suscettibili possono essere "difese" da cellule contigue di specie differenti che producono enzimi neutralizzanti come β -lattamasi, IgA proteasi, catalasi. La comunità microbica può permettersi anche una protezione di tipo fisico dalla fagocitosi grazie alla propria disposizione nello spazio;

d) aumentata capacità di provocare malattia: gli ascessi sono delle infezioni polimicrobiche che singole specie non sono in grado di provocare.

Tab. 1.2: Proprietà generali dei biofilm e delle comunità microbiche [Marsh, 2004].

PROPRIETÀ GENERALI	ESEMPIO
Architettura aperta	presenza di canali e spazi vuoti
Protezione dalle difese dell'ospite	produzione di una matrice extracellulare
Aumentata resistenza agli antimicrobici	come CHX e Antibiotici
Neutralizzazione degli inibitori	produzione di β -lattamasi
Nuova espressione genica	sintesi di nuove proteine
Risposta genica coordinata	produzione di cellule segnalatrici
Eterogenicità spaziale e ambientale	diversi gradienti di pH e ossigeno: coadesione
Più vasto spazio colonizzabile	anaerobi obbligati
Metabolismo più efficiente	catabolismo completo di complesse macromolecole dell'ospite (es. mucine) da parte della comunità
Aumentata virulenza	sinergismo patogenico negli ascessi e nella malattia parodontale

1.2 Ultrastruttura e composizione chimica del biofilm

Il biofilm orale, oltre a contenere cellule batteriche, contiene anche cellule epiteliali e polimorfonucleati dell'ospite, tenute insieme da una matrice organica che ne rappresenta il 30% del volume totale.

La placca è costituita per l'80% da acqua mentre il restante 20% da parte solida.

La parte solida viene divisa in:

- 1) componente proteica (45%): derivante soprattutto dalla saliva e dal siero, contiene gli enzimi amilasi, lisozima, lattoferrina, alcune proteasi ed immunoglobuline (Ig) salivari;
- 2) componente glucidica (15%): costituita da omopolisaccaridi come glucani e fruttani, sintetizzati dalla placca e in minima parte derivante dal metabolismo batterico;
- 3) componente lipidica (12%): derivante dalla lisi della parete batterica.

Per quanto concerne la composizione della microflora essa varia in base alle superfici colonizzate.

Tab. 1.3: Composizione della microflora in base al sito di colonizzazione [Marsh, 1999].

MICROORGANISMO	FESSURE	SUPERFICI INTERPROSSIMALI	MARGINE GENGIVALE
<i>Streptococcus</i>	++++	+++	+++
<i>Actinomyces</i>	+++	++++	+++
<i>Lactobacillus</i>	+/-	+/-	+/-
<i>Veillonella</i>	++++	+++	++
<i>Fusobacterium</i>	-	+	++
<i>Spirochaetes</i>	-	-	+
Gram - anaerobi	+/-	+	++

- : non presente

+/- : presente occasionalmente

+ : riscontrabile in basse proporzioni

++++ : presente in grandi proporzioni

Come si evince dalla tabella, la microflora delle fessure è principalmente di tipo Gram+ con predominanza di Streptococchi, in particolare la specie *mutans*, anche se

in tali zone non si riscontra un'evidenza clinica di carie. I Gram- anaerobi obbligati sono di numero ridotto, mentre nel margine gengivale sono presenti in numero significativo in concomitanza con altre specie. A livello interprossimale la composizione della placca batterica è altrettanto complessa e varia con predominanza di Streptococchi e Actinomyces [Marsh, 1999].

1.3 Acquisizione del microbiota orale

Durante la gravidanza, nell'utero materno il cavo orale del bambino risulta sterile; durante il processo della nascita esso viene contaminato, ma non colonizzato, da Lactobacilli, Micrococchi, Enterococchi, Streptococchi e Difteroidi, presenti a livello della vagina e del retto della madre. Al contrario lo *Streptococcus salivarius*, presente nella saliva delle persone che sono in immediato contatto col bambino, trova nel cavo orale del neonato una sede di colonizzazione stabile.

Successivamente alla colonizzazione dello *S. salivarius* si verifica l'insediamento stabile di germi anaerobi come *Veillonella*.

Bisogna aspettare l'eruzione dei primi denti, e quindi la formazione di nuovi microambienti, per assistere alla colonizzazione di *S. sanguis*, *S. mutans* e specie anaerobie come *Bacteroides* e *Fusobacterium*.

La flora del bambino dentulo tende ad assomigliare sempre più alla flora batterica dell'adulto ed in coincidenza con la pubertà nel solco gengivale fanno la loro comparsa le Spirochete [Teti e Mattina, 2002].

Tab. 1.4: Microrganismi presenti nel cavo orale prima e dopo l'eruzione dentaria [Marsh *et al.* 1989].

MICROORGANISMO	PRIMA DELL'ERUZIONE	DOPO L'ERUZIONE
<i>Streptococcus sanguis</i>	Non rilevabile	Costante
<i>Streptococcus mutans</i>	Non rilevabile	Frequente
<i>Bacteroides spp</i>	Raro	Frequente
<i>Fusobacterium spp</i>	Raro	Frequente
<i>Actinomyces spp</i>	Raro	Frequente
<i>Actinomyces viscosus</i>	Non rilevabile	Frequente

2 - LA CARIE DENTARIA

La carie dentaria è una malattia infettiva e trasmissibile, caratterizzata dal dissolvimento dei tessuti duri del dente da parte degli acidi prodotti dal metabolismo batterico [Center for Disease Control – CDC – 2001].

E' una delle malattie croniche più comuni al mondo ed i bambini rappresentano la categoria più a rischio [Pitts, 2004; Selwitz *et al*, 2007]; è la principale responsabile del dolore orale e della perdita di elementi dentari [US Department of Health and Human Services, 2000; Kidd *et al*, 2000].

2.1 Eziopatogenesi

La carie dentaria è la distruzione localizzata dei tessuti duri del dente ad opera di microrganismi endogeni come *S. mutans*, *S. sobrinus* e *Lactobacillus* spp [Fejerskov, 2004; Caufield e Griffen, 2000]. Questi metabolizzano i carboidrati fermentabili, introdotti con la dieta, producendo acidi organici; tali acidi provocano la caduta del pH causando la demineralizzazione dello smalto dei denti [Featherstone, 2000; Featherstone, 2004; Caufield e Griffen, 2000].

Nonostante i segni di tale patologia siano visibili clinicamente sul tessuto dentario, il processo ha origine all'interno del biofilm batterico che ricopre la superficie del dente. Le lesioni che si riscontrano clinicamente non sono altro che l'esito di una progressione di eventi che avvengono a livello molecolare [Pitts, 2004; Featherstone, 2004].

La carie rappresenta il risultato della rottura di un bilanciamento fisiologico tra minerali dentari e microflora orale [Fejerskov, 2004].

Negli stadi primari (lesione cariosa iniziale) la patologia può arrestarsi e/o regredire grazie all'apporto di ioni calcio, fosfato e fluoro, ma, in assenza di cure adeguate, essa progredisce (processo carioso: cavitazione) fino alla distruzione del dente [Fejerskov, 2003; Fejerskov, 1997; Pitts, 2004]. Il fatto che la carie possa arrestarsi, progredire e/o regredire dipende dall'equilibrio tra i processi di demineralizzazione e remineralizzazione che avvengono frequentemente nell'arco della giornata all'interno del cavo orale [Featherstone, 2004].

Il processo di remineralizzazione avviene principalmente ad opera della saliva, poiché essa veicola importanti molecole quali il bicarbonato, in grado di tamponare il pH acido, e ioni calcio, fosfato e fluoro che agiscono integrandosi nella struttura cristallina dello smalto, l'idrossiapatite, rendendola più resistente agli attacchi acidi [Axelsson 2000].

Da ciò si evince che nell'eziologia della patologia cariosa rientrano numerosi fattori sia intrinseci, i denti e la saliva, sia estrinseci, come i batteri, la dieta e l'igiene orale.

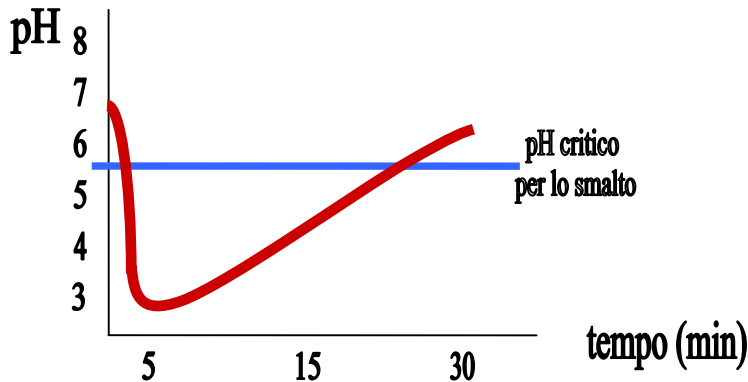
Nel 1890 Miller propose la *teoria chemioparassitaria* della carie.

Studi sugli animali e studi epidemiologici sull'uomo hanno confermato il ruolo essenziale della placca batterica nell'eziologia della carie. Nel 1954 Orland *et al.* allevarono ratti germ-free e li nutirono con una dieta cariogena: questi, diversamente dai ratti con una normale microflora orale, non svilupparono carie, dimostrando come la presenza di batteri orale fosse una *conditio sine qua non* per lo sviluppo della patologia cariosa [Strohmenger e Ferro 2003].

Gli studi epidemiologici svolti nell'isola di Tristan da Cunha mostrarono l'importanza giocata dalla dieta nell'eziopatogenesi della carie: negli anni '30, essendovi scarsi contatti per la popolazione con il resto del Mondo, la dieta era a basso contenuto di zuccheri; circa dieci anni più tardi vi fu un netto incremento della carie legato all'apertura di un negozio di generi alimentari che vendeva zucchero e altri alimenti che lo contenevano.

Negli anni '40 Stephan misurò per la prima volta la produzione di acido dal cibo ingerito con l'utilizzo di microelettrodi. Utilizzò una soluzione acquosa con glucosio al 10% e verificò nel tempo la variazione di pH dell'interfaccia smalto placca. Risultò che nel giro di 5 min il pH scende al di sotto del valore critico dello smalto che è intorno a 5.5, permettendo il processo di demineralizzazione dello smalto: l'idrossiapatite rilascia ioni calcio e fosfato. Dopo circa 30 minuti si ha il ripristino delle condizioni di normalità grazie all'aumento della concentrazione di bicarbonati nella saliva che fanno aumentare il pH fino a 7,8.

Fig. 2.3: Curva di Stephan.



Nel 1960 Keyes elaborò un modello sull'eziopatogenesi della carie rappresentato da tre cerchi che indicavano i fattori di rischio e la loro sovrapposizione avrebbe indicato il rischio di carie. Questo modello prende il nome di Cariogramma e i suoi fattori di rischio sono identificati con la placca batterica, la dieta e la suscettibilità individuale.

Fig. 2.1: Cariogramma proposto da Keyes.



Negli anni successivi vari Autori hanno proposto un proprio Cariogramma; uno dei più completi evidenzia sia fattori determinanti che cofattori, ossia delle variabili comportamentali.

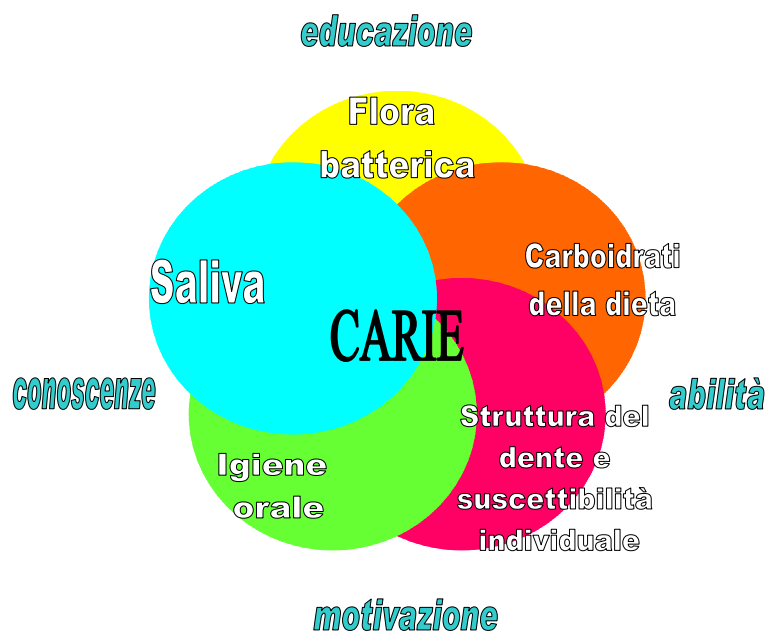
Tra i fattori determinanti sono annoverati :

- ◆ la flora cariogena;
- ◆ i carboidrati semplici introdotti con la dieta, loro quantità e frequenza di assunzione;
- ◆ la saliva con il suo potere dilavante, tamponante e antibatterico;
- ◆ le caratteristiche strutturali del dente e la suscettibilità individuale;
- ◆ l'igiene orale meccanica e chimica.

I cofattori sono:

- il tipo di educazione;
- le conoscenze;
- la motivazione;
- l'abilità manuale.

Fig. 2.2: Cariogramma dei fattori concorrenti nell'eziopatogenesi della carie dentaria [Madau e Strohmenger, 2003].



2.2 I denti

Quando un dente erompe, lo smalto è immaturo poiché nei cristalli di apatite sono presenti impurità, e ciò lo rende più suscettibile all'attacco degli acidi; durante la permanenza del dente nel cavo orale lo smalto matura e diventa più resistente alla demineralizzazione [Moss, 1993].

In molte persone si è notato che la carie è una malattia sito-specifica, non si sviluppa infatti in modo ubiquitario, ma predilige alcuni siti [Strohmenger e Ferro, 2003].

La morfologia del dente impone una notevole varietà di batteri che compongono l'ecosistema della placca. Ogni dente consiste di una porzione coronale che si estende all'interno della cavità orale ed è bagnata dalla saliva e una porzione radicolare che è ancorata all'osso tramite le fibre collagene della membrana parodontale. La corona ha 5 superfici che sono più o meno propense a supportare la microflora della placca, la quale può sviluppare carie o parodontopatie [Loesche, 1986]. Generalmente le superfici lisce dei lati buccale/labiale (vestibolare) e linguale/palatale sono più propense alla formazione di placca e si cariano solo in condizioni estreme legate alla xerostomia [Dreizen e Brown, 1976] o ad un contatto eccessivo con substrati fermentabili, come avviene nella baby-bottle syndrome (BBTD) [Ripa, 1978]. Le superfici interprossimali (mesiali-distali) del dente, sono anch'esse predisposte all'accumulo di placca, con conseguente probabilità di sviluppare le malattie cariosa e parodontale. L'anatomia delle superfici oclusali, le superfici masticatorie dei premolari e dei molari, è caratterizzata da solchi e fessure colonizzate da una flora differente da quella delle superfici lisce e delle superfici prossimali. Queste fessure, come quelle presenti sulle superfici lisce, rappresentano i siti più inclini a sviluppare la patologia cariosa [Loesche, 1986] perché la tensione superficiale della saliva ne impedisce la detersione [Strohmenger e Ferro, 2003].

Il margine incisale dei denti anteriori invece non viene quasi mai colonizzato da un numero apprezzabile di batteri e risulta normalmente privo di carie [Loesche, 1986].

La presenza di malposizioni e affollamenti senza una corretta igiene orale contribuisce allo sviluppo della lesione cariosa [Madau e Strohmenger, 2003].

Recessioni gengivali con esposizione del cemento radicolare risultanti da una scarsa igiene orale e dalla perdita di attacco parodontale con l'età, sono aree che

ritengono la placca, predisponendo allo sviluppo di lesioni cariose [Fejerskov e Kidd, 2003]; diversamente dalle carie dello smalto la superficie può diventare soffice e i batteri possono penetrare più velocemente all'interno del tessuto [Kidd e Fejerskov, 2004].

Esistono inoltre dei fattori genetici e nutrizionali che influiscono sulle caratteristiche strutturali e di conseguenza possono correlarsi alla formazione di carie soprattutto se intervengono durante la formazione del dente stesso [Madau e Strohmenger, 2003].

La carenza di vitamina A influenza l'integrità dei tessuti epiteliali, dunque anche dello smalto, la carenza di vitamina C causa alterazioni degli odontoblasti [Shaw, 1970], la carenza di vitamina D influisce sullo sviluppo dello smalto e della dentina dei denti permanenti, sulla velocità di eruzione e sulla posizione dei denti in mandibola, se protratta per lunghi periodi può dare ipoplasia dello smalto [Shaw, 1970]. La carenza di fluoruri e composti calcio-fosforo provoca delle anomalie nella composizione chimica dei tessuti dentari.

La presenza di patologie sistemiche o condizioni patologiche come parodontopatie, bulimia, emesi, iposcialia ed alcune sindromi possono fornire condizioni predisponenti per lo sviluppo di carie [Marci, 1996].

2.3 Il ruolo della saliva

La saliva rappresenta una componente di primaria importanza nel mantenere l'equilibrio fisiologico dell'intero cavo orale. In particolar modo risulta essere protettiva nei confronti della carie in merito alle numerose azioni che svolge:

- detersione delle superficie dentarie;
- “clearance salivare”: processo mediante il quale viene diminuita la concentrazione di molte tipologie di sostanze tra cui il saccarosio ed alcuni acidi organici di derivazione batterica (Swenander e Lanke nel 1957 idearono il primo modello sperimentale);
 - tamponare il pH mediante l'aumento del suo flusso e del contenuto di bicarbonati, fosfati e proteine;
 - trasportare i fattori demineralizzanti, quali ioni calcio, ioni fluoro e fosforo, all'interno di tutto il cavo orale;

- attività antimicrobica prodotta da IgA, IgG, IgM e da fattori non immunoglobulinici come lisozima, lattoferrina, sistemi mieloperossidasi e lattoperossidasi, cellule fagocitarie [Madau e Strohmenger, 2003].

In caso di iposcialia (ridotta salivazione), venendo meno queste funzioni, si ha una più alta probabilità di sviluppare la patologia cariosa. L'iposcialia può essere legata all'assunzione di farmaci, a discrasie ematiche, a malattie dismetaboliche, a sindromi degenerative, a malattie neurologiche, ad alterazioni ormonali (periodo post-menopausa), a fattori emotivi, a terapia radiante del distretto maxillo-facciale [Marci, 1996].

2.4 I Batteri

Dalla placca dentaria sono state isolate in laboratorio più di 200 specie microbiche; numerosi studi hanno dimostrato tuttavia che esiste un notevole grado di specificità batterica nella patogenesi della carie. Il ruolo primario è svolto da *Streptococcus mutans* (SM) e dai lattobacilli [Mosci *et al*, 1990].

Nel 1924 Clarke isolò lo *Streptococcus mutans* da lesioni cariose umane.

Questa scoperta venne però accantonata per un certo periodo di tempo in favore di quella effettuata da Klinger nel 1915; egli dimostrò la presenza di Lattobacilli nelle lesioni cariose contrariamente a quanto avveniva nella placca in assenza di carie.

Altri studi dimostrarono che i Lattobacilli sono acidogeni, capaci di produrre acido lattico dalla fermentazione degli zuccheri, ed acidurici ossia di vivere in ambiente acido.

Per queste loro caratteristiche i lattobacilli vennero identificati come i maggiori agenti causali della carie, dando inizio all'era del genere *Lactobacillus*".

Successivamente nuovi studi hanno messo in discussione il ruolo cardine dei Lattobacilli nella patologia cariosa poiché questi sono invasori secondari e rappresentano una piccola percentuale della flora batterica salivare (0,02-0,1%).

Ciò portò i ricercatori a concludere che la carie fosse ad eziologia batterica, ma non specifica.

Anche questa teoria fu presto abbandonata quando Orland e i suoi collaboratori effettuarono studi su ratti germ-free.

Il primo di questi studi utilizzava ratti germ-free alimentati con una dieta altamente cariogena, ne risultava che questi non si ammalavano di carie [Orland *et al*, 1954].

Un successivo studio evidenziò lo sviluppo di lesioni cariose nei solchi dei molari di ratti germ-free in seguito all'inoculazione di una coltura mista di enterococchi [Orland *et al*, 1955].

Solo dagli anni '60 in poi lo *Streptococcus mutans* è stato riproposto come principale responsabile della carie da vari gruppi di ricercatori, i quali dimostrarono che:

a) è costantemente isolato dalle placche e dalla saliva di soggetti con lesioni cariose [Loesche, 1982];

b) provoca la carie nei roditori [Fitzgerald e Keyes, 1960; Gibbons *et al*, 1966].

Tali scoperte portarono alla formulazione de “l'ipotesi placca specifica” [Loesche, 1976], poi confermata da studi clinici che rilevarono la presenza di SM (specialmente *S. mutans* e *S. sobrinus*) nella placca di lesioni cariose e di LB nelle lesioni più avanzate [Loesche, 1986].

Nel 1991 Marsh propose un termine alternativo -“l'ipotesi placca ecologica”- volto a sostituire la definizione “specificità”, poiché questo termine era stato impropriamente usato sin da quando non era stata totalmente riconosciuta l'eziologia batterica della carie [Marsh, 1991].

2.4.1 Cariogenicità

La cariogenicità è in parte strettamente legata alla capacità di un microrganismo di aderire alle superfici del dente, di produrre acidi organici (acidogenicità) in quantità sufficiente a demineralizzare lo smalto e, contemporaneamente, di sopravvivere in ambienti a pH basso e per lungo tempo (acidotolleranza). Dati dettagliati sull'acidotolleranza esistono solo per pochi batteri della placca. I più acidotolleranti sono risultati, nell'ordine, i Lattobacilli omofermentativi (producono acido lattico i seguito alla fermentazione degli zuccheri), *S. mutans* e *S. salivarius*. In questi microrganismi l'acidotolleranza si accompagna ad un elevato grado di

acidogenicità e ciò instaura un circolo vizioso per il quale il pH della placca scende ai livelli critici sempre più frequentemente e più a lungo.

Tra i batteri acidogeni e acidotolleranti solo lo *S. mutans* sembra possedere una spiccata abilità nel colonizzare le superfici lisce del dente; tali caratteristiche lo rendono la specie più cariogeno ed è per questo che necessita di una speciale trattazione [Teti e Mattina, 2002].

2.5 Alimentazione

In accordo con l'American Dietetic Association "l'alimentazione è una componente integrante per la salute orale...".

La relazione tra salute orale e alimentazione è sinergica: così come infezioni e patologie acute e croniche del cavo orale rendono difficoltosa l'alimentazione, questa può inficiare l'integrità del cavo orale e/o far progredire una patologia già in corso. La dieta può avere sia effetti locali che effetti sistemici sul cavo orale [Touger-Decker e van Loveren, 2003].

Tab. 2.1: Effetti locali e sistemici della dieta sul cavo orale [Touger-Decker e van Loveren, 2003].

EFFETTI LOCALI	EFFETTI SISTEMICI
Integrità dei denti	Denti
pH	Parodonto
Composizione della saliva	Mucosa orale
Composizione della placca	Osso alveolare

I carboidrati fermentabili introdotti con la dieta sono stati riconosciuti come il primo fattore responsabile dei cambiamenti biochimici e fisiologici all'interno del biofilm orale [Paes Leme *et al*, 2006].

Tab. 2.2: Carboidrati fermentabili [Madau e Strohmenger, 2003].

MONOSACCARIDI	DISACCARIDI	OLIGOSACCARIDI	POLISACCARIDI E AMIDI
Glucosio Fruttosio Galattosio	Saccarosio (glu+fru) Maltosio (glu+glu) Lattosio (glu+gal)	3-8 molecole di glucosio	catene lineari o ramificate di glucosio (amilosio e amilopectina)

E' stato dimostrato come in seguito all'assunzione di zuccheri fermentabili (glucosio, saccarosio o fruttosio), il pH della placca scende rapidamente dalla neutralità a valori pari al 5.0 o inferiori [Bowen *et al*, 1966].

Inoltre, con assunzioni frequenti, si assiste ad un aumento di *S. mutans* e lactobacilli e una contemporanea diminuzione di *S. sanguis* e Streptococchi orali [De Stoppelaar *et al*, 1970; Dennis *et al*, 1975; Staat *et al*, 1975].

Tuttavia non è ancora chiaro se l'aumento di batteri cariogeni sia dovuto allo zucchero in sé o alla risposta al persistere di un pH basso dovuto al catabolismo degli zuccheri [Marsh, 2003].

Tra i carboidrati il più cariogeno risulta essere il saccarosio seguito dal glucosio, dal fruttosio e dal lattosio. Gli amidi, che rappresentano la più vasta fonte di carboidrati della dieta, se consumati crudi, a causa della loro forma pressoché insolubile, fermentano molto più lentamente nel cavo orale anche se vi è l'amilasi salivare. Cucinare l'amido ne causa la degradazione e un cambiamento nella conformazione molecolare, ciò permette all'amilasi di scindere l'amido nei suoi substrati come maltosio, maltotriosio, destrina e piccole quantità di glucosio che sono utilizzate come substrato di crescita dai batteri cariogeni. Secondo uno studio condotto sui ratti da Ishii e Collaboratori nel 1968, i prodotti derivati dall'amido, combinati con il saccarosio, presentano un potere cariogeno superiore a quello del solo saccarosio [Jensen, 1999; Ribeiro *et al*, 2005].

Gli zuccheri definiti "semplici" vengono suddivisi in intrinseci, contenuti nella frutta e nella verdura, e in estrinseci, a maggior potenziale cariogeno, contenuti nel latte (il meno acidogeno), nel miele, lo zucchero da cucina (il saccarosio) e alcuni dolcificanti utilizzati dall'industria [Strohmenger e Madau, 2003].

Il saccarosio possiede proprietà addizionali rispetto a glucosio e fruttosio che gli conferiscono un potere cariogeno di gran lunga superiore:

- promuove una più alta perdita di minerali dello smalto [Cury *et al*, 2000];
- induce valori di pH più bassi;
- è fermentabile e serve da substrato per la sintesi di glucani extracellulari (EPS) e intracellulari (IPS); i primi promuovono l'adesione batterica alla superficie del dente e influenzano le proprietà fisiche e biochimiche del biofilm, i secondi fungono da fonte endogena di carboidrati che possono essere metabolizzati per produrre acidi nei periodi di insufficienze alimentari [Tanzer, 1976; Zero *et al*, 1986].

Alcuni studi condotti in istituti svedesi negli anni '50 dimostrarono l'esistenza di fattori che contribuiscono a rendere dannosa l'azione degli zuccheri [Strohmenger e Madau, 2003]:

1. l'adesività e la viscosità degli alimenti ne aumentano la permanenza all'interno del cavo orale e facilitano la formazione di carie; Aristotele scriveva: "Perché i fichi quando sono morbidi e dolci provocano danni ai denti? Forse perché la viscosa morbidezza dei fichi provoca la formazione di piccole particelle che aderiscono alle gengive e si insinuano negli interstizi dei denti dove diventano molto facilmente causa dei processi putrefattivi!". Risultano dunque meno cariogene le forme liquide rispetto alle forme solide;
2. scorrette abitudini alimentari: se il consumo di sostanze cariogene avviene durante i pasti principali, e si evitano i fuoripasto tipo crackers, merendine, biscotti e bevande zuccherate, il problema carie viene arginato;
3. frequenza di assunzione: introdurre alimenti ricchi di zuccheri a intervalli ravvicinati incrementa la durata dell'attacco acido;
4. un frequente e prolungato consumo di agrumi, mele, succhi di frutta e bevande carbonate, che oltre agli zuccheri contengono acidi, provoca spesso erosioni dentali;
5. scorrette abitudini di igiene orale.

2.6 L'importanza dell'Igiene Orale

"A clean tooth will not decay!": "un dente pulito non si caria!" con questa frase il primo presidente dell'American Dental Association, J. Leon Williams (1852-1931), suggerì che le manovre di igiene orale sono sufficientemente efficaci nel prevenire la carie.

Stephan e Miller in seguito fornirono evidenze scientifiche a sostegno di questa tesi; conducendo misurazioni sul pH riscontrarono che, in seguito ad una normale manovra di igiene orale, il pH non scendeva a valori acidi contrariamente a quanto accadeva prima della stessa [Stephan e Miller, 1943].

Tuttavia, benché si possano istruire le persone ad un'adeguata tecnica e frequenza nelle manovre di igiene orale, alcuni Autori sostengono che sia un po' irrealistico affermare che il semplice spazzolamento da solo sia in grado di prevenire la carie [Bellini *et al*, 1981].

Clinical trials hanno dimostrato che l'utilizzo combinato di adeguate tecniche di igiene orale e l'utilizzo di paste dentifricie fluorate riducono notevolmente l'incidenza di carie.

E' molto più importante lavarsi i denti due volte al giorno con dentifricio fluorato che ridurre il consumo di carboidrati raffinati nella dieta [Gibson e Williams, 1999].

La causa principale del declino della prevalenza della carie nei paesi industrializzati a partire dagli anni '70 è dovuta proprio alla diffusione su larga scala del fluoro [Strohmenger e Ferro, 2003]

Una corretta igiene orale risulta dunque utile per allontanare sia il rischio di carie, sia di parodontopatie; essa può essere effettuata usando sia mezzi meccanici, come filo e spazzolino, sia mezzi chimici quali gli svariati prodotti antimicrobici su cui la ricerca si è tanto evoluta negli ultimi 20 anni: i colluttori.

2.6.1 I colluttori

I colluttori sono utilizzati dalle popolazioni di ogni parte del mondo da secoli. Infatti, il primo accenno al loro uso come pratica formale risale alla medicina cinese del 2700 a.C. [Weinberger, 1948]. Nella tradizione i colluttori erano stati pensati sia per provvedere alla salute orale, che come cosmetici per rinfrescare l'alito [Golding, 1982]. Oggi è risaputo che la pulizia meccanica da sola fornisce raramente un ambiente totalmente privo di placca [Alexander, 1971; Addy *et al*, 1987]. Per questo motivo i colluttori sono sempre più utilizzati come veicoli per agenti inibitori volti a migliorare il controllo di placca e la salute gengivale. Inoltre colluttori antisettici sono

una valida misura profilattica contro le infezioni post-operatorie [de Lima *et al*, 1984].

In commercio ve ne sono molti, contenenti una vasta gamma di agenti antimicrobici quali i bisguanidi (clorexidina), composti dell'ammonio quaternario (cetilpiridinio cloruro e benzalconio cloruro), detergenti (sodio lauryl solfato), enzimi (mutanasio/glucanasio, amyloglucosidasi/glucosio ossidasi), olii essenziali (thymolo, eucaliptolo), composti fenolici (Triclosan), un derivato della pirimidina (hexetidina), ioni metallici (zinco, rame, stannosi) e la sanguinarina, derivata da una pianta [Seymour e Heasman, 1992].

Da quanto è emerso da una revisione sistematica della letteratura sul tema dei collutori, condotta nel 2007 da varie Associazioni di Professionisti della salute orale quali l'Associazione Nazionale Dentisti Italiani (ANDI), l'Associazione Nazionale Igienisti Dentali (ANID), l'Associazione Italiana Igienisti Dentali (AIDI) e dal Collegio dei Docenti di Odontoiatria, i principi attivi per cui è disponibile il maggior numero di indagini metodologicamente valide, nelle quali gli indici di gengivite (GI) e di sanguinamento (BI) sono significativamente migliorati, risultano essere Clorexidina (CHX) ed Oli Essenziali.

Anche il Cetilpiridinio Cloruro, seppure in un numero di studi inferiore, ha evidenziato di migliorare ambedue gli indicatori di flogosi gengivale.

L'utilizzo di ciascuno di questi tre principi attivi, in associazione con le quotidiane procedure di igiene orale, determina significativi vantaggi in termini di miglioramento di salute orale.

3 - *STREPTOCOCCUS MUTANS*

Il genere *Streptococcus* è costituito da cocchi gram-positivi, immobili, aerobi facoltativi (in qualche caso anaerobi obbligati), vantando un gran numero di specie diversamente distribuite nel regno animale.

Questi batteri si trovano generalmente disposti in sequenze ordinate di cellule rotonde che ricordano una collana, oppure possono trovarsi in coppia o come singole cellule, e ciò dipende sia dalla composizione del terreno di coltura, sia dalla specie che dal ceppo.

Nell'uomo molte di queste sono commensali, altre rappresentano invece gli agenti eziologici di patologie anche severe come infezioni respiratorie (polmoniti e faringotonsilliti), sepsi ed endocarditi, meningiti neonatali, infezioni cutanee e sottocutanee, scarlattina.

Allo scopo di inquadrare meglio le numerose specie Sherman, nel 1937, propose di dividerle in quattro gruppi, e nel 1978 Jones li portò a sette.

Pur essendo ormai obsoleti, nella pratica medica sono ancora in uso solo due dei sette gruppi proposti dai due autori: quello degli “streptococchi orali” e quello degli “streptococchi fecali”.

Gli streptococchi orali si ritrovano nella cavità orale dell'uomo e di altri mammiferi; sebbene la cavità orale costituisca il loro habitat principale, molte specie appartenenti a questo gruppo sono state ritrovate in altre sedi, sia in condizioni normali, che patologiche. I più rilevanti sono: *S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. cricetus*, *S. crista*, *S. gordonii*, *S. intermedius*, *S. milleri*, *S. mitior*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. parasanguis*, *S. rattus*, *S. salivarius*, *S. sanguis*, *S. sobrinus*, *S. vestibularis*.

Nel 1933 la batteriologa R.C. Lancefield scoprì che gli streptococchi potevano essere divisi in molti gruppi sierologici in base ad un antigene specifico contenuto nella loro parete cellulare.

Gli antigeni specifici per i gruppi A, B, C, E, F, G, H, K, L, O ed R sono polisaccaridi; quelli dei gruppi D e N sono acidi teicoici, gli altri non sono stati identificati.

I gruppi di Lancefield sono di grandissima utilità pratica, tuttavia non tutti gli streptococchi di interesse clinico possiedono antigeni gruppo specifici, in particolare gli alfa-emolitici, nella maggior parte dei casi corrispondenti agli streptococchi orali, e i non emolitici.

Per la crescita gli streptococchi richiedono terreni di coltura particolarmente arricchiti, solitamente si utilizza per la coltura il sangue di varie specie animali (agar-sangue) o il siero ed è in base al loro comportamento nei confronti degli eritrociti che possono essere classificati in:

- Alfa-emolitici (alone a margini sfumati attorno alle colonie per parziale distruzione degli eritrociti; anche definiti “viridanti”)
- Beta-emolitici (alone a margini netti per completa lisi degli eritrociti)
- Non emolitici (nessuna apparente attività emolitica)

Lo *Streptococcus mutans* non è classificabile nello schema di Lancefield o qualche ceppo appartiene al gruppo E, è alfa-emolitico o non emolitico (è stato trovato anche qualche ceppo beta-emolitico) ed è inserito nel raggruppamento di Sherman e Jones col nome di “streptococchi orali”.

E’ stato isolato dalla carie dentaria, ma si ritrova anche nelle feci; può essere l’agente eziologico, oltre che della carie, dell’endocardite subacuta [Mar Nicolosi e Nicoletti, 2002].

3.1 Tassonomia

Gli SM vengono definiti come streptococchi presenti nella placca dentaria che fermentano il mannitolo e il sorbitolo producendo acido lattico, sintetizzano glucani extracellulari dal saccarosio e sono cariogeni nei modelli sperimentali animali.

Nel 1924 Clarke per la prima volta isolò lo SM dalle lesioni cariose umane e vi attribuì il nome *mutans* poichè egli riteneva che fossero una forma mutante: la morfologia di questa cellula batterica non è rotonda come per gli altri Streptococchi, bensì ovale.

Bisognerà tuttavia arrivare negli anni ‘60 per veder riconosciuto lo SM principale agente patogeno della carie.

Ulteriori e più approfonditi studi hanno dimostrato che all’interno della specie *mutans* vi è una considerevole eterogeneità sierologica [Bratthall, 1970; Perch *et al*, 1974] e genetica [Coykendall, 1970; Dunny *et al*, 1973; Coykendall *et al*, 1976].

Sono stati individuati 8 sierotipi in base alle differenze degli antigeni carboidratici [Perch *et al*, 1974] e 4 gruppi genetici grazie a studi di ibridizzazione

[Coykendall, 1974]. A questi gruppi genetici sono stati poi attribuiti nomi che ricordano la specie di mammiferi da cui sono stati isolati [Coykendall, 1977].

Dunque il nome *Streptococcus mutans* attualmente identifica soltanto gli streptococchi isolati dall'uomo che assomigliano all'originale descrizione di Clarke.

La specie *S. mutans* contiene 3 sierotipi identificati in base agli antigeni carboidratici c, e, f ; il 70-100% di tutti gli SM isolati nell'uomo appartengono al sierotipo c.

Gli altri SM isolati nell'uomo che possiedono gli antigeni d, g, h sono stati chiamati *S. sobrinus* [Coykendall, 1977].

3.1.1 Come isolare selettivamente lo *Streptococcus mutans*

Dal momento che la specie *Streptococcus mutans* fermenta sia il sorbitolo che il mannitolo in maniera caratteristica, ed è in grado di produrre anche una notevole quantità di glucano e qualche levano, se si utilizza come substrato il saccarosio, è facilmente identificabile con i tests biochimici.

Il terreno utilizzato per la crescita dello SM è un terreno di coltura selettivo; tra i più utilizzati vi sono il Mitis salivarius kanamicina-bacitracina agar (MSB agar), il Mitis salivarius kanamicina-bacitracina (MSKB), il glucosio-saccarosio-tellurito-bacitracina (GSTB), il trypticase soy-saccarosio-bacitracina (TYS20B) e il tryptone-yeast-cisteina-saccarosio-bacitracina agar (TYCSB agar).

Da qualche anno è stato introdotto un nuovo terreno selettivo: l'MS-MUTV che aggiunge 10mg/l di valinomicina al Mitis salivarius bacitracina agar [Takada e Hirasawa, 2005].

Fig 3.2: Colture cellulari di *Streptococcus mutans* (ingrandimento 1x)



3.2 Struttura cellulare

La cellula dello streptococco si compone di una parete cellulare e una sottostante membrana citoplasmatica che racchiude il citoplasma.

La parete cellulare contiene quattro principali polimeri antigenici:

1. peptidoglicano,
2. polisaccaridi specifici per gruppo o sierotipo,
3. proteine,
4. acido teicoico e lipoteicoico.

Questi sono disposti a mosaico per essere accessibili alle reazioni che avvengono sulla superficie della cellula [Slade, 1977].

Gli *Streptococchi mutans* causano lesioni cariose anche grazie alle caratteristiche strutturali della loro membrana cellulare, infatti presentano particolari sistemi di trasporto di membrana, quali: 1) fosfotransferasi ad alta affinità per il trasporto degli esosi e del saccarosio; 2) permeasi per il passaggio di glucosio e saccarosio; 3) sistemi di pompe di protoni a bassa affinità, la cui attività è modulata dalla concentrazione extracellulare di potassio e risulta essere particolarmente efficace in ambiente acido [Mosci *et al*, 1990].

3.3 Fattori di virulenza

I meccanismi che permettono agli SM ed ai LB di rimanere localizzati in determinati siti di ritenzione del dente costituiscono i fattori di virulenza che rendono tali microorganismi odontopatogeni.

La capacità dello SM di aderire alle superficie dentarie sia in assenza che in presenza di saccarosio [Michalek *et al*, 1977] può essere classificata come fattore di virulenza poiché costituisce il primo passo verso la colonizzazione batterica.

In assenza di saccarosio, SM può aderire ad altri batteri, ad agglutinine salivari, alla matrice extracellulare ed a recettori di superficie di cellule epiteliali grazie ad interazioni di tipo ionico o mediate da lectine.

Inoltre questo microrganismo, a differenza di altre specie dello stesso genere come *S. sobrinus* [Gibbons *et al*, 1986], esprime diverse adesine tra cui l'antigene I/II o proteina streptococcica antigene P (SpaP), in grado di legarsi ad una specifica componente salivare, la glicoproteina agglutinina salivare (SAG) [Mitchell, 2003].

In presenza di saccarosio invece l'adesione dello SM alla superficie dentaria è mediato dalla glucosil-transferasi della parete batterica, attraverso la sintesi di glucani, che a loro volta permettono l'attaccamento di numerose altre cellule come avviene per altri Streptococchi orali (es. *S. sobrinus*) [Gibbons *et al*, 1986].

La formazione della carie è un processo strettamente interconnesso con la presenza di saccarosio nella dieta e con il suo peculiare metabolismo da parte di questi batteri.

Studi epidemiologici hanno dimostrato che dopo l'introduzione di saccarosio nella dieta vi è stato un significativo aumento della patologia cariosa con relativo incremento del numero degli SM, LB, Veillonella sp. e dei lieviti della flora microbica della placca [Dennis *et al*, 1975; Minha *et al*, 1985; Skinner e Woods, 1984; Staat *et al*, 1975].

In un individuo con un'alimentazione a basso contenuto di zuccheri i solchi dei denti in eruzione mostrano una minore incidenza di carie anche se dopo la maturazione degli stessi, questi soggetti cominciano una dieta cariogena, e ciò è spiegato dal fatto che tali spazi essendo stati precocemente colonizzati da microrganismi non cariogeni, i batteri cariogeni non riescono ad insediarsi. Questi microrganismi, deboli produttori di acidi, ostacolano i tentativi di colonizzazione

delle fessure profonde del dente da parte di SM e LB, forti produttori di acidi, con la fermentazione del saccarosio [Kohler *et al*, 1984].

La principale caratteristica di virulenza dello SM rimane però il suo potenziale acidogenico, che risulta nella demineralizzazione dell'idrossiapatite e nella conseguente formazione della carie.

Gli SM utilizzano prevalentemente il saccarosio per il loro metabolismo energetico, che porta, quando è in eccesso, alla produzione di acido lattico [Mosci *et al*, 1990].

Attraverso la via glicolitica si assiste alla produzione di piruvato, ridotto successivamente in acido lattico, etanolo ed acetato. Ne risulta una progressiva acidificazione dell'ambiente locale causa dell'insorgenza della lesione cariosa [Michalek *et al*, 1975].

Alcune specie come *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. mitis* sono incapaci, *in vitro*, in un ambiente a pH 5, di convertire il saccarosio in acido lattico, mentre SM e *S. sobrinus* sono più attivi a pH 5 che a pH 7 [Mosci *et al*, 1990]. SM è inoltre in grado di sopravvivere in tale ambiente poiché esso è acidurico, grazie alla presenza di una membrana in grado di mantenere il pH intracellulare ad un valore di 7.5 [Michalek *et al*, 1975].

3.4 Acquisizione del battere cariogeno

L'acquisizione dello SM è stata dimostrata già dalla prima infanzia sino ai 26 mesi. La trasmissione è dovuta allo stretto contatto del bambino con la madre o con chi lo accudisce durante i primi due anni di vita [Wendt *et al*, 1996], tuttavia, il bambino corre il rischio di contrarre l'infezione se la carica batterica della madre è superiore a 10×10^5 CFU/mL [Marci *et al*, 1996; Bokhout *et al*, 1996; Berkowitz, 1996].

4 - IL CETILPIRIDINIO CLORURO

Il Cetilpiridinio cloruro o *Cetylpyridinium chloride* è chiamato anche con il nome di *1-palmitilpyridinium chloride*, *C16-alkylpyridinium chloride*, *1-hexadecylpyridinium chloride*, *acetoquat CPC*, *aktivex*, *ammonyx CPC*, *ceecure*, *ceepryn chloride*, *cepacol*, *ceprim*, *cepacol chloride*, *cetafilm*, *cetanium*, *dobendan*, *halset*, *ipanol*, *medilave*, *mercocet*, *merothol*, *pionin B*, *pristacin*, *pyrisept* e *asept*.

Il Cetilpiridinio cloruro (CPC) era usato già dal 1940 negli USA come collutorio e si è subito dimostrato un valido ausilio nella disinfezione del cavo orale e nella prevenzione della carie.

Oggi si trova in farmacia come medicinale di automedicazione grazie alla sua attività disinfettante e all'assenza di effetti tossici alle concentrazioni terapeutiche; il CPC è attivo nei confronti dei batteri gram-positivi (come *S. mutans* e *S. sobrinus*), meno nei confronti dei gram-negativi ed esplica un'ottima attività antisettica e battericida. Possiede inoltre proprietà antifungine.

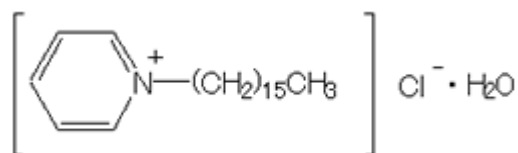
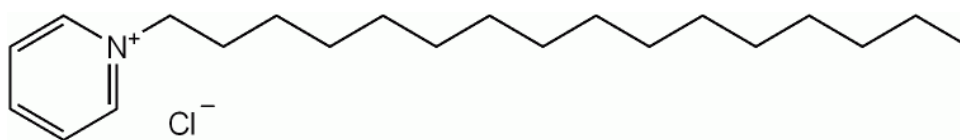
E'contenuto negli orofaringolaringologici locali (farmaci per la disinfezione delle mucose delle vie aeree superiori) sottoforma di collutori, spray e compresse, nei disinfettanti per mani, nei disinfettanti per l'igiene intima e di recente in alcuni prodotti dolciari.

4.1 Composizione e caratteristiche fisico-chimiche

Il Cetilpiridinio cloruro è un composto dell'ammonio quaternario con una catena alifatica a superficie cationica positiva.

La sua formula molecolare è: $C_{21}H_{38}NCl$.

Fig. 4.1 e 4.2: struttura chimica del Cetilpiridinio cloruro.



La sua massa molare è di 339.986g/mol.

A temperatura ambiente si presenta sottoforma di polvere bianca inodore e insapore. Il suo punto di fusione è a 77° centigradi; a 83° centigradi passa dallo stato anidro allo stato monoidrato. E' combustibile. E' solubile in tutti i liquidi ad eccezione dell'acetone, dell'acido acetico e dell'etanolo.

La sicurezza biologica del CPC è documentata da vari studi randomizzati e controllati. Tuttavia in soluzioni concentrate distrugge le membrane mucose. E' altamente tossico se inalato. La dose letale DL50 nel ratto è di 200mg/die.

4.2 Meccanismi d'azione

Come precedentemente affermato, il CPC ha dimostrato di possedere attività battericida verso un ampio spettro di batteri del cavo orale.

Esso esplica la sua funzione legandosi alle membrane cellulari dei batteri causando la fuoriuscita di componenti cellulari, l'alterazione del metabolismo, l'inibizione della crescita e infine la morte della cellula [Scheie, 1989].

Il CPC è in grado di aderire ai fosfati a carica negativa delle membrane cellulari grazie alla sua superficie cationica carica positivamente. Per rendere efficace tale meccanismo è dunque indispensabile che il gruppo cationico presente nella sua struttura sia stabile [Baker *et al*, 1941].

Un report eseguito da Sheen *et al* (2003) indica che detergenti anionici come il Sodio-lauryl-solfato (SLS), comunemente contenuto nella maggior parte dei dentifrici, interagiscono col CPC inattivando l'effetto cationico e conseguentemente neutralizzano anche l'effetto antisettico. La stessa cosa avviene per la Chlorexidina:

ciò ha suggerito ad alcuni ricercatori [Barkvoll *et al*, 1989] di lasciar trascorrere almeno 30 minuti tra lo spazzolamento dei denti con dentifricio e l'uso di un collutorio.

In particolare è raccomandato attendere 60 minuti tra lo spazzolamento con dentifricio e uno sciacquo con 10 ml di CPC allo 0,05% [Sheen *et al*, 2003] e 30 minuti per uno sciacquo con 20 ml di CPC allo 0,07% [Witt *et al*, 2006]. L'alta biodisponibilità del principio attivo allo 0,07% mostra benefici statisticamente significativi nei confronti della placca batterica anche quando usato immediatamente dopo lo spazzolamento con dentifricio o dopo spazzolamento e preceduto da uno sciacquo con acqua [Witt *et al*, 2006].

Studi clinici dimostrano che la migliore attività antibatterica si ottiene con concentrazioni comprese tra lo 0,05% e lo 0,1%.

Come affermato dall'US Food and Drug Administration "E'importante la disponibilità del composto nel collutorio: il range di disponibilità più efficace nel ridurre placca e gengivite si aggira tra il 72% e il 76%; 72-77%" [Paraskevas, 2005].

E' dimostrato che aumentando la ritenzione del CPC all'interno del biofilm aumenta il suo effetto antibatterico [Sutch *et al*, 1995].

A questo proposito alcuni studiosi hanno formulato due vernici degradabili a rilascio sostenuto, basati su una resina acrilica con il CPC come agente attivo. Queste formulazioni farmaceutiche furono testate in un modello sperimentale di biofilm orale. La ritenzione del CPC nel biofilm dipendeva dagli additivi farmaceutici delle vernici. Nei primi 15 minuti circa il 70% del farmaco era mantenuto sulla superficie, nei minuti successivi si assisteva ad un suo graduale declino. Entrambe le vernici diminuivano l'adesione batterica e nel contempo appariva anche una marcata attività antibatterica verso il biofilm [Steinberg *et al*, 2001].

4.3 Azione antiplacca e anticarie

La presenza di placca batterica è una condizione essenziale per la comparsa di patologie del cavo orale come la carie e le parodontopatie [Addy *et al*, 1992]. Lo *Streptococcus sanguis* è tra le prime specie batteriche coinvolte nella formazione della placca [Nyvad e Kilian, 1987], mentre lo *Streptococcus mutans* è solitamente associato con la placca batterica cariogena [Loesche, 1986]. La completa rimozione

della placca ridurrebbe significativamente la malattia cariosa. Il riconoscimento dei limiti nelle metodiche d'igiene orale meccaniche ha condotto alla ricerca di agenti chimici per il controllo della placca sulle superficie dentarie [Addy *et al*, 1992].

L'effetto di un principio attivo sulla placca dipende, come già affermato, dalla sua concentrazione. Inizialmente, un inibitore può essere presente a concentrazioni relativamente alte (più alte della Minima Concentrazione Inibente, MIC), dopo di che può aderire ad una superficie e può funzionare a livelli sub-letali, probabilmente a causa dell'interferenza col metabolismo batterico [Marsh, 1992].

La MIC del CPC è di 23.50×10^{-3} per *S. sanguis* e di 14.70×10^{-3} per lo *S. mutans*. E' stato dimostrato che, utilizzando concentrazioni inferiori alla MIC, i valori di idrofobicità (percentuali di batteri che aderiscono all'hexadecane) ottenuti dall'incubazione di cellule di *S. sanguis* e *S. mutans* in CPC, non differiscono da quelli ottenuti nelle stesse condizioni in assenza del principio attivo; nel contempo il CPC non impedisce a tali microrganismi di aderire, in vitro, all'idrossiapatite immersa nella saliva [Cai *et al*, 1994].

L'efficacia antibatterica *in vitro* del CPC è compatibile con quella della Clorexidina (CHX) [Gjermeo *et al*, 1970]; il CPC si è rivelato un potente inibitore dell'enzima extracellulare glucosyltransferasi (GTF), più ancora della CHX [Ciardi *et al*, 1978], mentre è richiesta una maggior concentrazione di CPC rispetto alla CHX per inibire la crescita di *S. mutans* [Roberts e Addy, 1981]. L'effetto antiplacca e antiglicolitico del CPC *in vivo* è inferiore rispetto a quello della CHX, presumibilmente perché il CPC è rimosso più rapidamente della CHX dai siti di legame presenti nella cavità orale [Giertsen *et al*, 1991]. E' noto che il CPC perde la sua attività quando aderisce alle superfici [Moran e Addy, 1984].

Dall'uso combinato di agenti antibatterici ad ampio raggio d'attività si possono trarre notevoli benefici rispetto all'utilizzo di agenti individuali ne è un esempio Botelho (2000), che con la combinazione di quattro agenti antibatterici quali *Chlorexidina dihydrochloride*, *benzalkonium chloride*, *cetrimide* e CPC testati su specie individuali di batteri cariogeni come *Streptococcus*, *Lactobacillus* ed *Actinomyces*, mostrò che nonostante non vi fosse né sinergia né antagonismo tra questi principi attivi la concentrazione di tali batteri era notevolmente diminuita [Botelho, 2000].

Uno studio su ratti desalivati, condotto da Giertsen (1991), mostrava come l'effetto antiplacca di alcuni detergenti cationici, tra cui il CPC, veniva notevolmente

aumentato se questi principi attivi erano utilizzati in combinazione con ioni di Zinco (Zn^{2+}). I risultati mostravano infatti che Zn^{2+} -CPC diminuiva le lesioni cariose delle superfici lisce, molto più del CPC da solo, agendo contro le specie di *S. sobrinus* e *S. sanguis*. Ciò può essere riconducibile all'aumentato legame dello Zinco con i batteri in presenza del detergente [Giertsen *et al*, 1991], che a sua volta si lega alla superficie della cellula batterica aumentandone la permeabilità [Hugo 1982]. Zn^{2+} è risultato efficace quasi quanto il fluoro (in concentrazioni equimolari) nel diminuire la dissoluzione dell'idrossiapatite da parte degli acidi [Brudevold *et al*, 1963]. Inoltre, la formazione di complessi zinco-fosfato insolubili possono rendere la superficie del dente più resistente agli attacchi acidi contribuendo così all'effetto cariostatico [Leach e Appleton, 1981].

Un altro studio condotto su cani Beagle valutava la differenza di efficacia tra CPC allo 0,05%, CPC allo 0,05%+ZnCl e acqua in un periodo di 7 settimane, raccogliendo dati alle settimane 0, 1, 2, 5 e 7. Dai risultati era emerso che il CPC da solo diminuiva significativamente gli indici di placca e gengivite rispetto alla sola acqua, tuttavia il CPC associato a ZnCl risultava ancora più efficace, ma solo alla quinta e alla settima settimana [Ritchey *et al*, 1982].

Studi più attendibili in cui un collutorio a base di CPC viene messo a confronto con un placebo dimostrano, attraverso l'indice di placca di Turesky, che le concentrazioni di CPC testate sono significativamente superiori ad un placebo nel modificare l'indice di placca a 6 mesi [Mankodi, 2005; Stookey, 2005]. E' inoltre emerso che l'effetto sull'indice di placca tra due collutori a diverse concentrazioni di CPC, rispettivamente allo 0,075% e allo 0,1%, è molto simile, ma stranamente inferiore rispetto ad un collutorio a base di CHX allo 0,12% [Stookey, 2005].

4.4 CPC: gengivite e sanguinamento

Studi in cui veniva confrontato l'effetto del CPC a diverse concentrazioni 0,07%, 0,075% e 0,1% contenuto in un collutorio e un placebo [Mankodi, 2005; Stookey, 2005] mostravano che tutte e tre le concentrazioni di CPC sono significativamente superiori al placebo nel modificare gli indici di gengivite a 6 mesi (Modified Gingival Index per Mankodi e Gingival Index per Stookey). Gli stessi studi offrivano indicazioni sulle modifiche che un indice di sanguinamento (Bleeding On

Probig per Stookey e indice di Saxton per Mankodi) subiva nei due gruppi (gruppo principio attivo e gruppo placebo) al termine dei 6 mesi di trattamento. Dai dati ricavati risultava che il CPC alle concentrazioni di 0,07% [Mankodi, 2005], di 0,075% e di 0,1% [Stookey, 2005] diminuiva il sanguinamento molto più di quanto non facesse il placebo.

Stookey (2005) aveva inoltre dimostrato che l'effetto di due collutori a due differenti concentrazioni di CPC, 0,075 e 0,1%, è pressoché simile sia per quanto riguarda l'indice di placca, sia per quanto riguarda il sanguinamento [Stookey, 2005].

Le stesse concentrazioni di CPC sottoforma di collutorio vennero poi confrontate con un collutorio a base di CHX allo 0,12%: quest'ultimo si dimostrava più efficace nel combattere gengivite e sanguinamento rispetto al CPC alla concentrazione più alta [Stookey, 2005].

4.5 CPC e alitosi

“Alitosi” è un termine generalmente usato per descrivere un odore sgradevole emanato dalla cavità orale. Numerose condizioni patologiche non orali sono state correlate al maleodore orale, incluse infezioni delle alte e basse vie aeree, il tratto gastrointestinale (es. ernia iatale) e alcune patologie metaboliche che coinvolgono i reni o il fegato [Manolis, 1983]. Scoperte cliniche hanno dimostrato che circa il 90% del maleodore orale origina dalla bocca [Delanghe *et al*, 1997].

La maggior parte degli individui riscontra un alito cattivo al risveglio. Questa condizione transitoria è dovuta a cause fisiologiche come il ridotto flusso salivare durante il sonno. Un maleodore orale persistente può essere indicativo di altre malattie orali, come parodontopatie o la presenza di eccessive colonie batteriche all'interno della bocca, in particolare situate sul dorso della lingua [Bosy *et al*, 1994].

E' stato dimostrato infatti che pulire anche il dorso della lingua nelle quotidiane manovre di igiene orale diminuisce notevolmente il maleodore orale, soprattutto se viene effettuato uno sciacquo con un collutorio contenente un agente antimicrobico [Nachani, 1997].

Esistono vari metodi per misurare il maleodore orale. Il metodo organolettico dipende dalla sensibilità di olfatto del clinico ed è molto soggettivo. Un metodo più oggettivo consiste nella misurazione dei Composti Solforati Volatili (VCS), prodotti

della degradazione batterica di aminoacidi contenenti zolfo, tramite un apparecchio chiamato Halimeter®.

Rosemberg *et al* (1992) usando un collutorio bifasico/olio-acqua contenente CPC riscontrarono una significativa riduzione di VSC nell'aria orale [Rosemberg *et al*, 1992]; anche Kozlovsky *et al*. (1996) trovarono una notevole riduzione nei punteggi del test organolettico, sebbene il test non sia totalmente attendibile.

Uno studio a doppio cieco condotto nel 2003 da Winkel *et al*. testava l'efficacia clinica di una nuova formula di un collutorio verso l'alitosi orale di soggetti senza parodontite. Il collutorio conteneva CHX allo 0,05%, CPC allo 0,05% e lo zinco-lactate allo 0,14%. Al giorno 0 e al giorno 14 venivano effettuati: 1) il test organolettico, 2) la misurazione di VSC con l'Halimeter® e 3) il WTCI (il dorso della lingua viene diviso in 6 aree, ad ognuna delle quali viene attribuito un punteggio: 0=nessuna patina, 1=leggera patina, 2=spessa patina; i risultati vanno poi sommati). Benché la compliance di tutti i pazienti non fosse ottimale, i risultati mostrarono una chiara riduzione sia del punteggio organolettico che dei VSC nel gruppo che ha usato il collutorio con il principio attivo. Al contrario non si rilevava una riduzione statisticamente significativa in WTCI. Si può ipotizzare dunque che è la composizione della patina linguale, piuttosto che il suo spessore o la sua estensione, il fattore determinante per l'alitosi orale. In conclusione una formulazione a basse concentrazioni di CHX, CPC e zinco-lactato è un'efficace combinazione di composti chimici in grado di ridurre la presenza dei composti volatili nell'aria della bocca, responsabili di alitosi [Winkel *et al*, 2003].

4.6 Effetti collaterali

Il più comune effetto collaterale causato da un utilizzo eccessivo e prolungato del CPC è la pigmentazione dentale [Ciancio *et al*, 1978; Lobene *et al* 1979], nonostante il grado di macchie formato risulti considerevolmente inferiore a quello della CHX [Llewelyn, 1980].

E' dimostrato che l'uso prolungato di collutori al CPC macchia i denti [Addy e Jenkins, 1977].

Sono stati proposti svariati meccanismi per spiegare l'eziologia delle pigmentazioni dentali estrinseche associate ad agenti antisettici cationici e ad alcuni

sali di metallo polivalenti [Addy e Moran, 1995]. Sia le ricerche in laboratorio, sia le evidenze cliniche sostengono fermamente che la causa delle macchie sia la precipitazione dei cromogeni della dieta favorita dagli antisettici cationici tra cui CPC e CHX [Addy e Moran, 1985; Addy e Moran, 1995].

Questo fenomeno è stato sfruttato in vitro per valutare le capacità di alcuni antisettici cationici al fine di creare nuove formulazioni da immettere nel commercio [Addy *et al*, 1995; Addy *et al*, 1991]. A questo proposito uno studio si prefiggeva di comparare l'attività di vari collutori contenenti CPC e CHX. Dai risultati è emerso che la capacità di pigmentazione di alcuni collutori contenenti il medesimo principio attivo è variabile, e ciò suggerisce che molto spesso i essi non raggiungono l'effetto placca-inibitore per cui sono formulati [Sheen e Addy, 2003].

Il CPC ha un insignificante effetto tossico quando usato a concentrazioni di 0,05% peso/volume, sebbene siano stati riportati effetti secondari come una moderata sensazione di bruciore della lingua [Ciancio *et al*, 1975].

5 SCOPO DELLA RICERCA

Lo scopo della ricerca è valutare l'effetto della somministrazione di un collutorio contenente lo 0,1% di cetilpiridinio cloruro, inserito in microcapsule gelatinose, sulla concentrazione salivare di *Streptococcus mutans* e sui batteri responsabili dell'alitosi.

6 MATERIALI E METODI

6.1 Protocollo sperimentale

Sono stati selezionati solamente 10 soggetti adulti, di età compresa tra i 20 e i 40 anni, considerati “ad elevato rischio di carie”, ossia con una concentrazione di *S. mutans* $>10^5$ CFU/ml.

Sono stati esclusi dal campione:

- soggetti con patologie sistemiche,
- soggetti sotto trattamento farmacologico che può alterare il flusso o la composizione della saliva e della flora orale,
- soggetti sottoposti a trattamenti topici o sistemici a base di composti fluorati e/o con preparati contenenti clorexidina al momento dello studio o da 30 giorni.

Ai soggetti selezionati è stato richiesto un consenso informato scritto per lo studio; è stato altresì richiesto di astenersi da ogni manovra di igiene orale nelle 24 ore precedenti l’inizio del periodo sperimentale.

Il primo giorno (giorno 1) tutti i soggetti sono stati sottoposti ad un prelievo di saliva non stimolata per conoscerne la concentrazione basale di *Streptococcus mutans*.

Inoltre è stato effettuato un prelievo mediante tampone sterile del biofilm presente sulla porzione basale del dorso della lingua, analizzandolo poi con il cosiddetto “BANA-test”.

Successivamente ai prelievi sono state somministrate 2 perle contenenti CPC allo 0,1% ed è stato chiesto ai partecipanti di romperle con i denti e di veicolare immediatamente il contenuto alle due arcate dentarie con la lingua.

Sono stati effettuati quattro prelievi di saliva:

- dopo 1 minuto
- dopo 5 minuti
- dopo 10 minuti
- dopo 60 minuti

dalla deglutizione del prodotto.

Ai 10 partecipanti è stato poi consegnato un dentifricio privo di fluoro con l’indicazione di usarlo due volte al dì.

Il giorno seguente (giorno 2) agli stessi soggetti sono stati eseguiti gli stessi prelievi con le medesime modalità, ma questa volta dopo somministrazione di 4 perle contenenti il principio attivo.

Il prelievo del biofilm linguale non è stato ripetuto.

Il terzo giorno (giorno 3) sono state somministrate 6 perle ed effettuati i 4 prelievi come nei giorni precedenti.

In questo caso però, dopo l'ultimo prelievo salivare (dopo 60 minuti dall'assunzione), è stato ripetuto il prelievo del biofilm linguale soltanto a quei soggetti per i quali il primo giorno il BANA-test aveva dato esito positivo.

Trascorse 24 ore, ai 10 soggetti è stato somministrato con le stesse procedure dei giorni precedenti il placebo, perle identiche nell'aspetto e nel sapore alle altre, ma prive del principio attivo (CPC).

La sperimentazione è stata eseguita in doppio cieco.

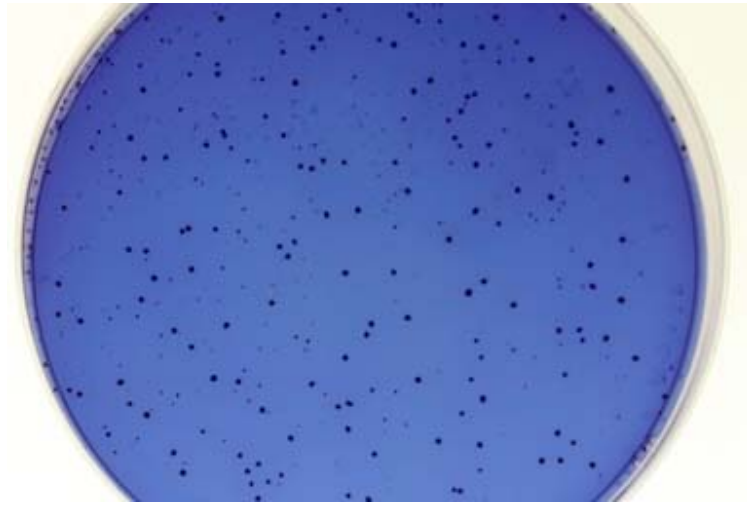
6.2 Determinazione della concentrazione salivare di *S. mutans*

I campioni prelevati sono stati immediatamente processati.

Sono state preparate piastre di terreno selettivo per lo *Streptococcus mutans*, Mitis Salivarius Bacitracina Agar, sulle quali sono stati seminati 20 µl del fluido biologico e sono state incubate in termostato a 37° per 48h.

Terminate le 48h di incubazione si è passati all'identificazione delle colonie dal punto di vista biochimico (Vitek, BioMerieux, Marcy-L'Etoile, France), poi si è proceduto alla conta.

Fig 6.1: Colonie di *Streptococcus mutans* su piastra di terreno selettivo Mitis Salivarius Bacitracina Agar (ingrandimento 1x)



6.3 Il BANA-test

Alcune delle specie batteriche della placca possiedono un enzima in grado di idrolizzare il peptide sintetico benzoyl-DL-arginine naphthylamide (BANA).

Esistono in letteratura numerosi studi colturali, immunologici e prove sul DNA i quali associano la malattia parodontale a queste specie batteriche: *P. gingivalis*, *B. forsythus* e *T. denticola* [Dzink *et al*, 1988; Loesche *et al*, 1990 e 1992; Lotufo *et al*, 1994; Grossi *et al*, 1995; Ashimoto, 1996; Haffajee *et al*, 1996 e 1998; Socransky *et al*, 1998].

L'idrolisi di questo enzima può essere misurata mediante un semplice *chairside test* [Loesche *et al*, 1990].

Sono state individuate più di 60 specie batteriche presentanti l'enzima BANA, solo le tre precedentemente menzionate sono risultate uniformemente positive al BANA-test; numerose specie di *Bacteroides* e di *Capnocytophaga* risultavano occasionalmente BANA-positive: è un'arginine hydrolase che degrada il substrato sintetico BANA [Loesche *et al*, 1990].

Il *chairside test*, chiamato BANA-test, della durata di 5-10 min, può essere usato per diagnosticare un'infezione anaerobia da *P. gingivalis*, *B. forsythus* e *T. denticola* [Loesche *et al*, 1990; Loesche *et al*, 1997]. Il BANA-test non indica quale delle tre

specie è presente, ma ciò può non risultare necessario poiché queste specie convivono nella placca e sono tutte anaerobie [Haffajee *et al*, 1998; Lotufo *et al*, 1994; Simonson, 1992; Socransky *et al*, 1998].

I risultati del BANA-test sono comparabili al test del DNA e ai reagenti immunologici per la sensibilità e la specificità nel rilevare la presenza di *P. gingivalis*, *B. forsythus* e *T. denticola* in campioni di placca [Loesche *et al*, 1992].

Il BANA-test è utile per diagnosticare un'infezione anaerobica e quindi anche per definire il trattamento della malattia parodontale che si accompagna a codesta infezione [Loesche *et al*, 1990]. Da Loesche (1990), in particolare, fu usato il BANA-test liquido per fare diagnosi e somministrare ai pazienti positivi al test il metronidazolo; nei pazienti sottoposti al farmaco si osservava un netto miglioramento della salute parodontale rispetto ai pazienti controllo [Loesche *et al*, 1990].

Un BANA-test positivo dopo scaling e root planing è associato ad alte concentrazioni di Spirochete, che suggeriscono che il trattamento effettuato non era adeguato a sopprimere o eliminare l'infezione anaerobica. Ciò è supportato dal fatto che i denti con placca BANA-positiva al termine del trattamento, al contrario di quelli con placca BANA-negativa, perdono significativamente più attacco durante i seguenti trattamenti eseguiti nell'arco dell'anno [Loesche *et al*, 1990].

Un BANA-test con risultato positivo è inoltre un fattore predittivo per cui il clinico può raccomandare la chirurgia parodontale o l'estrazione [Loesche *et al*, 1997].

Inoltre dal momento che le stesse specie batteriche causa di parodontopatie sono associate al maleodore orale, dovuto alla liberazione nell'aria espirata di composti solforati volatili (VCS), come l'hydrogen sulfide, il methylmercaptan e il dimethyl sulfide [Tonzetich e Ritcher, 1964; Tonzetich, 1971; Persson *et al*, 1990], esiste una correlazione tra i punteggi del BANA-test ottenuti da vari siti (saliva, tasche parodontali e lingua) e il maleodore orale [Kozlovsky *et al*, 1994; De Boever e Loesche, 1995]. Sebbene vi siano correlazioni significative tra i risultati del BANA e il metodo organolettico di misurazione dell'alitosi, non esistono correlazioni così evidenti tra lo stesso BANA-test e il livello di VSC misurato con l'Halimeter®, uno strumento dotato di monitor portatile [Kozolovsky *et al*, 1994]. E' possibile che i batteri delle tasche parodontali in cui è stato effettuato il BANA-test non producano solfuri odorosi come cadaverine, indole e pyridine [Goldberg *et al*, 1994; Tonzetich *et al*, 1967; Kostelc *et al*, 1980].

Il BANA-test dunque non risulta essere sempre un ottimo indicatore di maleodore orale [Morita e Wang, 2001].

6.4 Come è stato eseguito il BANA-test

Il BANA-test è stato eseguito strofinando il tampone linguale sull'apposita striscia di carta assorbente presente sul reagent strip BANA (BANAMet LLC 2220 Washtenaw Ann Arbor, MI USA).

Lo strip è stato quindi ripiegato in modo che la carta assorbente coincidesse con la porzione dello strip contenente il diazo-reagente cromogeno (fast Black k) che in questo modo reagisce con la B-naftilamina (prodotto di idrolisi del BANA) presente nel campione provocando una reazione di colorito blu scuro.

Lo strip è stato poi collocato nell'apposita incubatrice ed è stato lasciato agire per 15 minuti a 55°.

Completata la reazione, la lettura del test viene eseguita valutando l'intensità della colorazione ottenuta sulla striscia reagente con l'apposita cartella di riferimento.

Fig 6.2: BANA system



7 ANALISI STATISTICA

Allo scopo di normalizzare i dati, le concentrazioni di SM nei vari soggetti e nei vari prelievi sono stati trasformati logaritmicamente prima di procedere all'analisi.

Sia per le perle contenenti il principio attivo, sia per il placebo, che per ciascuna fase della ricerca sono stati calcolati la media, la deviazione standard e l'errore standard.

La differenza tra le concentrazioni riscontrate con il prodotto contenente CPC e col placebo nei diversi tempi è stata valutata con il t-student a due vie per coppie disomogenee (data l'esigua numerosità del campione).

I dati relativi a ciascun prodotto nei diversi tempi sono stati invece analizzati utilizzando ripetute analisi della varianza ad una via (ANOVA).

8 - RISULTATI

Si è potuto osservare che dopo 1 minuto dalla somministrazione delle perle contenenti il CPC la concentrazione di *Streptococcus mutans* subisce un rapido decremento; allo stesso modo, seppure in misura minore, la concentrazione di tale microrganismo diminuisce dopo somministrazione di perle prive di principio attivo.

Dopo 5 minuti dall'assunzione tale riduzione è ancora rilevabile anche se sensibilmente diminuita.

La riduzione a 10 minuti rispetto al valore basale è ancora rilevabile.

Trascorsi 60 minuti dalla somministrazione la concentrazione di SM torna ad un valore simile a quello iniziale.

Tale andamento della concentrazione di SM è analogo sia per la somministrazione di 2, 4 che 6 perle, anche se a 1 minuto dall'assunzione delle 6 perle si è riscontrata la riduzione più marcata del microrganismo.

Tab. 8.1 Concentrazione di *Streptococcus mutans* ai diversi tempi di rilevazione dopo assunzione dei due prodotti.

Somministrazione di 2 perle

Prodotto	0	1'	5'	10'	60'	Anova one way
CPC	2.0×10^5	4.3×10^4	5.17×10^4	7.2×10^4	2.0×10^5	<0.001
Placebo	2.0×10^5	5.6×10^4	5.6×10^4	8.5×10^4	2.0×10^5	<0.01
t-test	NS	p = 0.03	NS	p = 0.04	NS	

NS= non significativo

Somministrazione di 4 perle

Prodotto	0	1'	5'	10'	60'	Anova one way
CPC	2.0×10^5	6.0×10^4	6.36×10^4	7.6×10^4	2.0×10^5	<0.05
Placebo	2.0×10^5	5.7×10^4	6.5×10^4	8.5×10^4	2.0×10^5	<0.01
t-test	NS	NS	NS	p = 0.04	NS	

NS= non significativo

Somministrazione di 6 perle

Prodotto	0	1'	5'	10'	60'	Anova one way
CPC	2.0×10^5	3.9×10^4	3.9×10^4	5.2×10^4	2.0×10^5	<0.02
Placebo	2.0×10^5	4.3×10^4	4.7×10^4	5.6×10^4	2.0×10^5	<0.01
t-test	NS	NS	p=0.03	NS	NS	

NS= non significativo

Grafico 8.1: Andamento della concentrazione di SM in saliva dopo somministrazione di 2 perle (CPC e placebo).

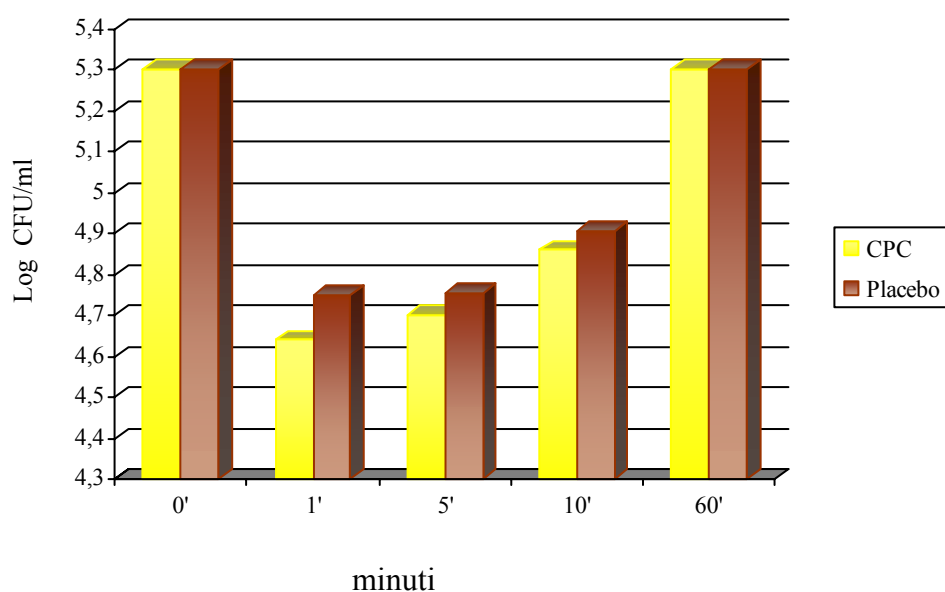


Grafico 8.2: Andamento della concentrazione di SM in saliva dopo somministrazione di 4 perle (CPC e placebo).

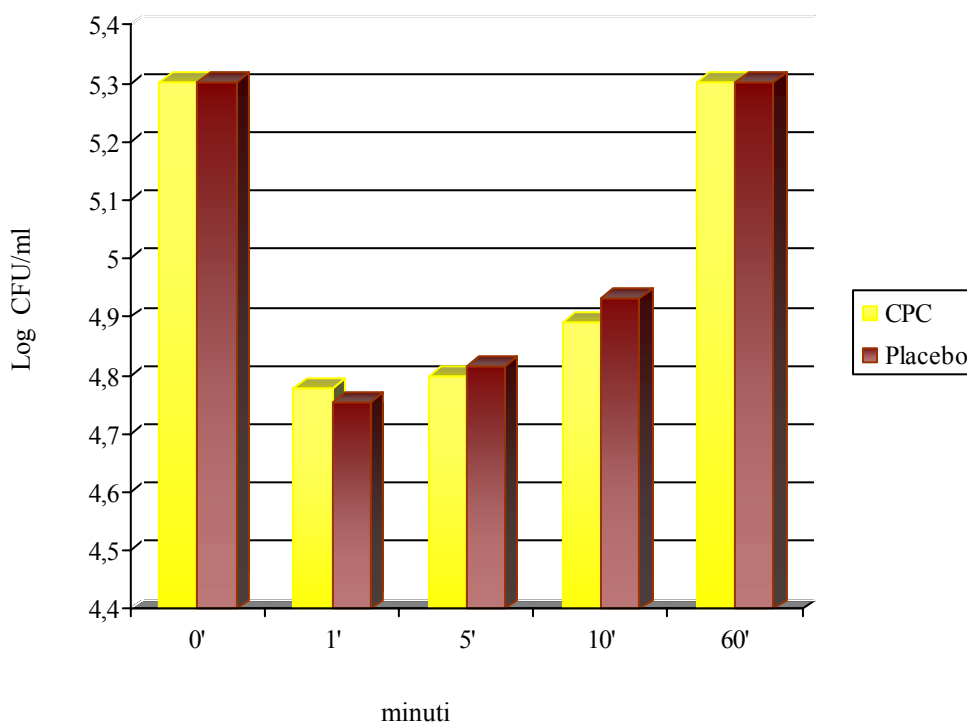
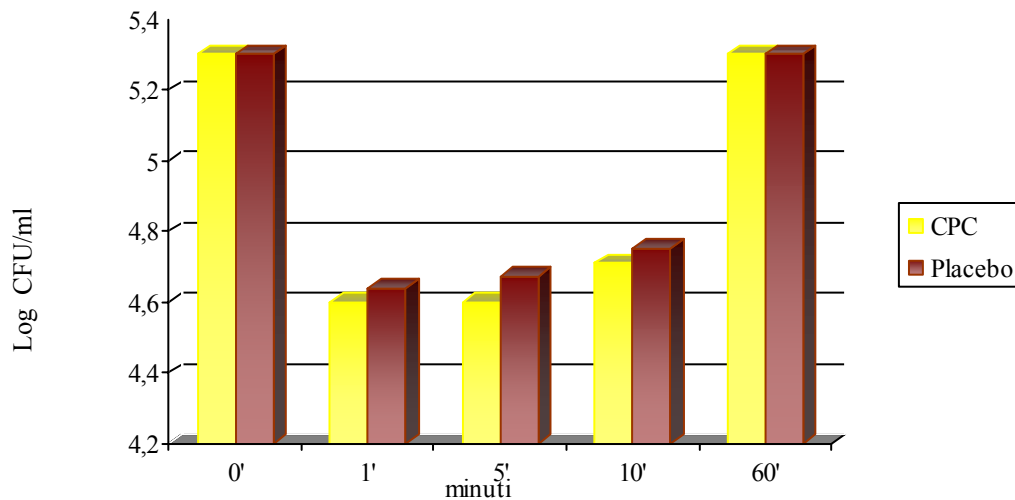


Grafico 8.3: Andamento della concentrazione di SM in saliva dopo somministrazione di 6 perle (CPC e placebo).



Confrontando l'andamento delle due curve (CPC e placebo) si dimostra una differenza significativa dopo somministrazione di 2 perle al tempo 1 e 10 minuti, dopo la somministrazione di 4 perle a 10 minuti e dopo la somministrazione di 6 perle al tempo 5 minuti.

Il fatto che le perle prive del principio attivo siano anch'esse in grado di ridurre la concentrazione di SM è da imputare alla stimolazione da parte di queste del flusso salivare e alla conseguente diluizione del biofilm orale.

La prova iniziale con BANA-test si è rivelata positiva in 16 soggetti, mostrando una colorazione media della cartina dopo confronto con la scala colorimetrica fornita assieme all'apparecchio.

Tale positività è scomparsa solo in seguito alla somministrazione di 6 perle contenenti cetilpiridinio cloruro, rimanendo invece invariata nei pazienti "controllo" e anche dopo aver ingerito 2 e 4 perle.

La positività risultava assente già dopo un'ora dal termine della prova, indicando come tale principio attivo non eserciti un'azione antibatterica, se non estremamente blanda, ma solo un'azione rinfrescante dell'alito.

Il CPC è un agente antisettico già in commercio nelle farmacie sotto forma di pastiglie contro il mal di gola. Nelle perle oggetto dello studio, il CPC è presente ad una concentrazione molto più bassa rispetto a quella dei farmaci da banco attualmente in commercio perché tali perle vogliono essere un prodotto dolciario vendibile nei supermercati e negozi. La scarsa azione antibatterica riscontrata è probabilmente dovuta proprio alla sua bassa concentrazione nel prodotto.

9 - CONCLUSIONI

I dati raccolti nel presente studio hanno mostrato come l'utilizzo del cetilpiridinio cloruro alla concentrazione di 0,1%, analogamente ai lavori presenti in letteratura, comporta un beneficio in termini di riduzione della concentrazione salivare di *Streptococcus mutans*, principale agente eziologico della carie.

Poichè la riduzione della carica batterica, riscontrata nel nostro studio, è risultata transitoria, le perle in questione possono essere considerate un metodo solo per controllare la concentrazione di SM in saliva, ma non possono essere considerate un mezzo di prevenzione della patologia cariosa, né del controllo dell'alitosi, in quanto sono attualmente necessari ulteriori studi per confermare questi dati ottenuti.

10 - BIBLIOGRAFIA

1. Addy M, Jenkins PM. Chlorhexidine staining: *in vitro* studies of beverage as aetiological factors. IRCS Med Sci 1977; 5: 393.
2. Addy M, Griffiths G, Dummer P, Kingdom A, Shaw WC. The distribution of plaque and gingivitis and the influence of toothbrushing hand in a group of South Wales 11-12 year-old children. J Clin Periodontol 1987; 14 (10): 564-72.
3. Addy M, Mahdavi SA, Loyn T. Dietary staining *in vitro* by mouthrinses as a comparative measure of antiseptic activity and predictor of staining *in vivo*. J Dent 1995; 23 (2): 95-9.
4. Addy M, Moran J, Newcombe R, Warren P. The comparative tea staining potential of phenolic, chlorhexidine and anti-adhesive mouthrinses. J Clin Periodontol 1995; 22 (12): 923-8.
5. Addy M, Moran J. Extrinsic tooth discoloration by metals and chlorhexidine. II. Clinical staining produced by chlorhexidine, iron and tea. Br Dent J 1985; 159 (10): 331-4.
6. Addy M, Slayne MA, Wade WG. The formation and control of dental plaque - an overview. J Appl Bacteriol 1992; 73 (4): 269-78.
7. Addy M, Wade W, Goodfield S. Staining and antimicrobial properties *in vitro* of some chlorhexidine formulations. Clin Prev Dent 1991; 13 (1): 13-7.
8. Alexander AG. A study of the distribution of supra and subgingival calculus, bacterial plaque and gingival inflammation in the mouths of 400 individuals. J Periodontol 1971; 42 (1): 21-8.
9. Al-Hashimi I, Levine MJ. Characterization of *in vivo* salivary-derived enamel pellicle. Arch Oral Biol 1989; 34 (4): 289-95.
10. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. Oral Microbiol Immunol 1996; 11 (4): 266-73.
11. Axelsson P. Diagnosis and risk prediction of dental caries. Vol 2. Chicago: Quintessence Publishing Co, Inc, 2000.
12. Baker Z, Harrison RW, Miller BF. The bacterial action of synthetic detergents. J Exp Med 1941; 74: 161611-620.

13. Barkvoll P, Rolla G, Svendsen K. Interaction between chlorhexidine digluconate and sodium lauryl sulfate *in vivo*. J Clin Periodontol 1989; 16 (9): 593-5.
14. Bellini HT, Arneberg P, van der Fehr R. Oral hygiene and caries. A review. Acta Odont Scand 1981; 39: 257-65.
15. Bokhout B, van Loveren C, Hofman FX, Buijs JF, van Limbeek J, Prahl-Andersen B. Prevalence of *Streptococcus mutans* and lactobacilli in 18-month-old children with cleft lip and/or palate. Cleft Palate Craniofac J 1996; 33 (5): 424-8.
16. Bortolaia C, Sbordone L. Biofilms of the oral cavity. Formation, development and involvement in the onset of diseases related to bacterial plaque increase. Minerva Stomatol 2002; 51 (5): 187-92.
17. Bosy A, Kulkarni GV, Rosenberg M, McCulloch CA. Relationship of oral malodor to periodontitis: evidence of independence in discrete subpopulations. J Periodontol 1994; 65 (1): 37-46.
18. Botelho MG. Fractional inhibitory concentration index of combinations of antibacterial agents against cariogenic organisms. J Dent 2000; 28 (8): 565-70.
19. Bowen WH, Eastoe JE, Cock DJ. The effect of sugar solution on the pH of plaque in caries active monkeys (*Macaca irus*). Arch Oral Biol 11: 833-838, 1966.
20. Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Allison C. Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. Infect Immun 1998; 66 (10): 4729-32.
21. Bratthall D. Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling *Streptococcus mutans*. Odontol Revy 1970; 21 (2): 143-52.
22. Brudevold F, Steadman LT, Spinelli MA, Amdur BH, Gron P. A study of zinc in human teeth. Arch Oral Biol 1963; 8: 135-44.
23. Busscher HJ, van der Mei HC. Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. Adv Dent Res 1997; 11 (1): 24-32.
24. Cai S, Simionato MR, Mayer MP, Novo NF, Zelante F. Effects of subinhibitory concentrations of chemical agents on hydrophobicity and *in vitro*

- adherence of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. Caries Res 1994; 28 (5): 335-41.
25. Carlsson J (2000). Growth and nutrition as ecological factors. In: Kuramitsu, H.K. & Ellen R.P. (eds). *Oral Bacterial Ecology: the molecular Basis*, pp. 67-130. Wymondham: Horizon Scientific Press.
 26. Cate JM. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. Odontology 2006; 94 (1): 1-9.
 27. Caufield PW, Griffen AL. Dental caries. An infectious and transmissible disease. Pediatr Clin North Am 2000; 47 (5): 1001-19.
 28. Cavedon K, London J. Adhesin degradation: a possible function for a *Prevotella loescheii* protease? Oral Microbiol Immunol 1993; 8 (5): 283-7.
 29. Ciancio SG, Mather ML, Bunnell HL. Clinical evaluation of a quaternary ammonium-containing mouthrinse. J Periodontol 1975; 46 (7): 397-401.
 30. Ciancio SG, Mather ML, Bunnell HL. The effect of a quaternary ammonium-containing mouthwash on formed plaque. Pharmacol Ther Dent 1978; 3 (1): 1-6.
 31. Ciardi JE, Bowen WH, Rolla G. The effect of antibacterial compounds on glucosyltransferase activity from *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol 1978; 23 (4): 301-5.
 32. Coykendall AL. Four types of *Streptococcus mutans* based on their genetic, antigenic and biochemical characteristics. J Gen Microbiol 1974; 83 (2): 327-38.
 33. Coykendall AL. Proposal to elevate the subspecies of *Streptococcus mutans* to species status based on their molecular composition. Int J Syst Bacteriol 1977; 27: 26-30.
 34. Coykendall AL, Bratthall D, O'Connor K, Dvarskas RA. Serological and genetic examination of some nontypical *Streptococcus mutans* strains. Infect Immun 1976; 14 (3): 667-70.
 35. Coykendall AL. Base composition of deoxyribonucleic acid isolated from cariogenic streptococci. Arch Oral Biol 1970; 15 (4): 365-8.
 36. Cury JA, Rebelo MA, Del Bel Cury AA, Derbyshire MT, Tabchoury CP. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. Caries Res 34: 491-497, 2000.

37. De Boever EH, Loesche WJ. Assessing the contribution of anaerobic microflora of the tongue to oral malodor. *J Am Dent Assoc* 1995; 126 (10): 1384-93.
38. De Stoppelaar JD, Van Houte J, Backer Dirks O. The effect of carbohydrate on the presence of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* and hydrophilic polysaccharide-producing bacteria in human dental plaque. *Caries Res* 4: 114-123, 1970.
39. Delanghe G, Ghyselen J, van Steenberghe D, Feenstra L. Multidisciplinary breath-odour clinic. *Lancet* 1997; 19, 350 (9072): 187.
40. Dennis DA, Gawronski TH, Sudo SZ, Harris RS, Folke LE. Variations in microbial and biochemical components of four-day plaque during a four-week controlled diet period. *J Dent Res* 1975; 54 (4): 716-22.
41. Dreizen S, Brown LR, Handler S, Levy BM. Radiation-induced xerostomia in cancer patients. Effect on salivary and serum electrolytes. *Cancer* 1976; 38 (1): 273-8.
42. Dunny GM, Birch N, Hascall G, Clewell DB. Isolation and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid from *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 1973; 114 (3): 1362-4.
43. Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1988; 15 (5): 316-23.
44. Featherstone JD. Caries detection and prevention with laser energy. *Dent Clin North Am* 2000; 44 (4): 955-69, ix.
45. Featherstone JD. The caries balance: the basis for caries management by risk assessment. *Oral Health Prev Dent* 2004; 2 Suppl 1: 259-64.
46. Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res* 2004; 38 (3): 182-91.
47. Fejerskov O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. *Community Dent Oral Epidemiol* 1997; 25 (1): 5-12.
48. Fejerskov O, Kidd EAM. *Dental caries: the disease and its clinical management*. Copenhagen, Denmark. Blackwell Monksgaard, 2003.
49. Fitzgerald RJ, Keyes PH. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. *J Am Dent Assoc* 1960; 61: 9-19.

50. Gibbons RJ, Berman KS, Knoettner P, Kapsimalis B. Dental caries and alveolar bone loss in gnotobiotic rats infected with capsule forming streptococci of human origin. *Arch Oral Biol* 1966; 11 (6): 549-60.
51. Gibbons RJ, Cohen L, Hay DI. Strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* attach to different pellicle receptors. *Infect Immun* 1986; 52 (2): 555-61.
52. Gibson S, Williams S. Dental caries in pre-school children: associations with social class, toothbrushing habit and consumption of sugars and sugar-containing foods. Further analysis of data from the National Diet and Nutrition Survey of children aged 1.5-4.5 years. *Caries Res* 1999; 33 (2): 101-13.
53. Giertsen E, Bowen WH, Pearson SK. Combined effects of Zn(2+)-chlorhexidine and Zn(2+)-cetylpyridinium chloride on caries incidence in partially desalivated rats. *Scand J Dent Res* 1991; 99 (4): 301-9.
54. Gjermo P, Baastad KL, Rolla G. The plaque-inhibiting capacity of 11 antibacterial compounds. *J Periodontal Res* 1970; 5 (2): 102-9.
55. Goldberg S, Kozlovsky A, Gordon D, Gelernter I, Sintov A, Rosenberg M. Cadaverine as a putative component of oral malodor. *J Dent Res* 1994; 73 (6): 1168-72.
56. Golding PS. The development of the toothbrush. Part 1. A short history of tooth cleansing. *Dent Health (London)*. 1982; 21 (4): 25-7.
57. Golding PS. The development of the toothbrush. Part 2. The modern toothbrush. *Dent Health (London)*. 1982; 21 (5): 10-11.
58. Grossi SG, Genco RJ, Machtei EE, Ho AW, Koch G, Dunford R, Zambon JJ, Hausmann E. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontol* 1995; 66 (1): 23-9.
59. Haffajee AD, Cugini MA, Tanner A, Pollack RP, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS. Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *J Clin Periodontol* 1998; 25 (5): 346-53.
60. Haffajee AD, Socransky SS, Dibart S, Kent RL Jr. Response to periodontal therapy in patients with high or low levels of *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* and *B. forsythus*. *J Clin Periodontol* 1996; 23 (4): 336-45.

61. Hugo WB. Disinfection mechanism. In: Russel AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ, eds. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. Oxford: Blackwell Scientific, 1982; 158-85.
62. Jenkinson HF, Lamont RJ. Streptococcal adhesion and colonization. Crit Rev Oral Biol Med 1997; 8 (2): 175-200.
63. Jensen ME. Diet and dental caries. Dent Clin North Am 43: 615-633, 1999.
64. Kidd EA, Fejerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. J Dent Res 2004; 83 Spec No C: C35-8.
65. Kidd EA, Giedrys-Leeper E, Simons D. Take two dentists: a tale of root caries. Dent Update 2000; 27 (5): 222-30.
66. Kohler B, Andreen I, Jonsson B. The effect of caries-preventive measures in mothers on dental caries and the oral presence of the bacteria *Streptococcus mutans* and lactobacilli in their children. Arch Oral Biol 1984; 29 (11): 879-83.
67. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ Jr. Communication among oral bacteria. Microbiol Mol Biol Rev 2002; 66 (3): 486-505.
68. Kolenbrander PE, Andreasen RN, Kazmerak KM, Palmer RJ: Coaggregation and coadhesion in oral biofilms. In Allison DG, Gilbert P, Lappin-Scott HM, Wilson M: Community Structure and Co-Operation in Biofilms. Society for General Microbiology Symposium 59. Cambridge University Press, 2000, pp 65-85.
69. Kopec LK, Vacca-Smith AM, Wunder D, Ng-Evans L, Bowen WH. Properties of *Streptococcus sanguinis* glucans formed under various conditions. Caries Res 2001; 35 (1): 67-74.
70. Kostelc JG, Preti G, Zelson PR, Stoller NH, Tonzetich J. Salivary volatiles as indicators of periodontitis. J Periodontal Res 1980; 15 (2): 185-92.
71. Kozlovsky A, Gordon D, Gelernter I, Loesche WJ, Rosenberg M. Correlation between the BANA test and oral malodor parameters. J Dent Res 1994; 73 (5): 1036-42.
72. Lamont RJ, Jenkinson HF: Adhesion as an ecological determinant in the oral cavity; in Kuramitsu HK, Ellen RP: Oral Bacterial Ecology: The Molecular Basis. Wymondham, Horizon Scientific press, 2000, pp 131-168.

73. Leach SA, Appleton J. Ultrastructural Investigations by Energy Dispersive X-ray Microanalysis of Some of the Elements Involved in the Formation of Dental Plaque and Pellicle. In: Tooth Surface Interactions and Preventive Dentistry, G. Rolla, T. Sonju, and G. Embery, Eds., London: IRL Press Ltd., 1981, pp. 65-79.
74. Lee SF, Li YH, Bowden GH. Detachment of *Streptococcus mutans* biofilm cells by an endogenous enzymatic activity. *Infect Immun* 1996; 64 (3): 1035-8.
75. Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, Socransky SS, Oppen Heim FG. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol* 2004; 97: 1311-8.
76. de Lima SN, Maia Campos G, Verri RA. Clinical evaluation of the effectiveness of an antiseptic and local anesthetic solution, in postoperative periodontal surgery. *Rev Fac Odontol Ribeiro Preto* 1984; 21 (1): 1-15.
77. Lindhe J. Placca dentale e tartaro; in Lindhe J (3^{ed}): Parodontologia e implantologia dentale. Edi Ermes Milano, edi. Martina Bologna, 1997, cap.3: pp. 102-137.
78. Llewelyn J. A double-blind crossover trial on the effect of cetylpyridinium chloride 0.05% (Merocet) on plaque accumulation. *Br Dent J* 1980; 148 (4): 103-4.
79. Lobene RR, Kashket S, Soparkar PM, Shloss J, Sabine ZM. The effect of cetylpyridinium chloride on human plaque bacteria and gingivitis. *Pharmacol Ther Dent* 1979; 4 (1): 33-47.
80. Loesche WJ. Dental caries: a treatable infection. Springfield, Ill : Charles C Thomas Publisher, 1982.
81. Loesche WJ, Bretz WA, Kerschensteiner D, Stoll J, Socransky SS, Hujoel P, Lopatin DE. Development of a diagnostic test for anaerobic periodontal infections based on plaque hydrolysis of benzoyl-DL-arginine-naphthylamide. *J Clin Microbiol* 1990; 28 (7): 1551-9.
82. Loesche WJ, Giordano J, Hujoel PP. The utility of the BANA test for monitoring anaerobic infections due to spirochetes (*Treponema denticola*) in periodontal disease. *J Dent Res* 1990; 69 (10): 1696-702.

83. Loesche WJ, Kazor CE, Taylor GW. The optimization of the BANA test as a screening instrument for gingivitis among subjects seeking dental treatment. *J Clin Periodontol* 1997; 24 (10): 718-26.
84. Loesche WJ, Lopatin DE, Giordano J, Alcoforado G, Hujoel P. Comparison of the benzoyl-DL-arginine-naphthylamide (BANA) test, DNA probes, and immunological reagents for ability to detect anaerobic periodontal infections due to *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Bacteroides forsythus*. *J Clin Microbiol* 1992; 30 (2): 427-33.
85. Loesche WJ. Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sci Rev* 1976; 9: 65-107.
86. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986; 50 (4): 353-80.
87. Lotufo RF, Flynn J, Chen C, Slots J. Molecular detection of *Bacteroides forsythus* in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1994; 9 (3): 154-60.
88. Madau M, Strohmeier L. Prevenzione e promozione della salute orale in età pediatrica. Quintessenza ed., 2003.
89. Mankodi S, Bauroth K, Witt JJ, Bsoul S, He T, Gibb R, Dunavent J, Hamilton A. A 6-month clinical trial to study the effects of a cetylpyridinium chloride mouthrinse on gingivitis and plaque. *Am J Dent* 2005; 18 Spec No: 9A-14A.
90. Manolis A. The diagnostic potential of breath analysis. *Clin Chem* 1983; 29 (1): 5-15.
91. Mar Nicolosi V., Nicoletti G. Batteriologia speciale. In: Poli G, Cocuzza G, Nicoletti G, Clementi M (2^aed): *Microbiologia medica*. UTET, 2002, pp. 209-219.
92. Marci F. Prevenzione della carie. *Dent Mod Suppl, Utet* 03/1996: 5-60.
93. Marsh PD. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. *J Dent Res* 1992; 71 (7): 1431-8.
94. Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res* 2004; 38 (3): 204-11.
95. Marsh PD. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. *Dent Clin North Am* 1999; 43 (4): 599-614.
96. Marsh PD. Sugar, fluoride, pH and microbial homeostasis in dental plaque. *Proc Finn Dent Soc* 1991; 87 (4): 515-25.

97. Marsh PD. Are dental disease examples of ecological catastrophes? *Microbiology* 149: 279-294, 2003.
98. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC Oral Health* 2006 15; 6 Suppl 1: S14.
99. Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol* 2005; 32 Suppl 6: 7-15.
100. Michalek SM, McGhee JR. Virulence of *Streptococcus mutans*: an antibiotic-suppressed rat model for studies of pathogenesis. *J Dent Res* 1977; 56 (3): 205-11.
101. Michalek SM, Shiota T, Ikeda T, Navia JM, McGhee JR. Virulence of *Streptococcus mutans*: biochemical and pathogenic characteristics of mutant isolates. *Proc Soc Exp Biol Med* 1975; 150 (2): 498-502.
102. Minah GE, Solomon ES, Chu K. The association between dietary sucrose consumption and microbial population shifts at six oral sites in man. *Arch Oral Biol* 1985; 30 (5): 397-401.
103. Mitchell TJ. The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat Rev Microbiol* 2003; 1 (3): 219-30.
104. Moran J, Addy M. The effect of surface adsorption and staining reactions on the antimicrobial properties of some cationic antiseptic mouthwashes. *J Periodontol* 1984; 55 (5): 278-82.
105. Morita M, Wang HL. Association between oral malodor and adult periodontitis: a review. *J Clin Periodontol* 2001; 28 (9): 813-9.
106. Mosci F, Perito S, Bassa S, Capuano A, Marconi PF. The role of *Streptococcus mutans* in human caries. *Minerva Stomatol* 1990; 39 (5): 413-29.
107. Moss SJ. Possibili meccanismi d'azione del fluoro nella prevenzione della carie dentale. Atti del convegno Nuove prospettive in tema di fluoro profilassi di comunità, Cittadella, 17 marzo 1993.
108. Nachani S. The effects of oral rinses on halitosis. *J Calif Dent Ass* 1997; 25, 145-150.
109. Nyvad B, Kilian M. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces *in vivo*. *Scand J Dent Res* 1987; 95 (5): 369-80.

110. Orland FJ, Blayney JR, Harrison RW, Reyniers JA, Trexler PC, Ervin RF, Gordon HA, Wagner M. Experimental caries in germfree rats inoculated with enterococci. *J Am Dent Assoc* 1955; 50 (3): 259-72.
111. Orland FJ, Blayney JR, Harrison RW, Reyniers JA, Trexler PC, Wagner M, Gordon HA, Lukey TD. Use of the germfree animal technic in the study of experimental dental caries. I. Basic observations on rats reared free of all microorganisms. *J Dent Res* 1954; 33 (2): 147-74.
112. Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation - New insight. *J Dent Res* 85 (10): 878-887, 2006.
113. Paraskevas S. Randomized controlled clinical trials on agents used for chemical plaque control. *Int J Dent Hyg* 2005; 3 (4): 162-78.
114. Perch B, Kjems E, Ravn T. Biochemical and serological properties of *Streptococcus mutans* from various human and animal sources. *Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol* 1974; 82 (3): 357-70.
115. Persson S, Edlund MB, Claesson R, Carlsson J. The formation of hydrogen sulfide and methyl mercaptan by oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 1990; 5 (4): 195-201.
116. Pitts NB. Modern concepts of caries measurement. *J Dent Res* 2004; 83 Spec No C: C43-7.
117. Ribeiro CC, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LM, Rosalen PL, Cury JA. Effect of starch on the cariogenic potential of sucrose. *Br J Nutr* 94: 44-50, 2005.
118. Ripa LW. Nursing habits and dental decay in infants: "nursing bottle caries". *ASDC J Dent Child* 1978; 45 (4): 274-5.
119. Ritchey TW, Lamster IB, Mann PH, Alfano MC. The effect of zinc chloride on the development of gingivitis in beagle dogs treated with cetylpyridinium chloride. *J Dent Res* 1982; 61 (10): 1217-20.
120. Roberts WR, Addy M. Comparison of the in vivo and in vitro antibacterial properties of antiseptic mouthrinses containing chlorhexidine, alexidine, cetylpyridinium chloride and hexetidine. Relevance to mode of action. *J Clin Periodontol* 1981; 8 (4): 295-310.
121. Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. *Microbes Infect* 2000; 2 (13): 1599-607.

122. Rosenberg M, Gelernter I, Barki M and Bar-Ness R. Day long reduction of oral malodor by a two-phase oil: Water mouthrinse as compared to chlorhexidine and placebo rinses. *J Periodont* 1992; 63, 39-43.
123. Scheie AA. Modes of action of currently known chemical anti-plaque agents other than clorexidine. *J Dent Res* 1989; 68: 1609-1616
124. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet* 2007, 6; 369 (9555): 51-9.
125. Seymour RA, Heasman PA. Anti-plaque and anti-calcolous agents. In: *Drugs, disease and the periodontium*, Chapter 9. New York: Oxford Medical Publications, 1992.
126. Shaw JH. Preeruptive effects of nutrition on teeth. *J Dent Res* 1970; 49 (6): 1238-51.
127. Sheen S, Addy M. An in vitro evaluation of the availability of cetylpyridinium chloride and chlorhexidine in some commercially available mouthrinse products. *Br Dent J* 2003; 22; 194 (4): 207-10.
128. Sheen S, Eisenburger M, Addy M. Effect of toothpaste on the plaque inhibitory properties of a cetylpyridinium chloride mouth rinse. *J Clin Periodontol* 2003; 30 (3): 255-60.
129. Simonson LG, Robinson PJ, Pranger RJ, Cohen ME, Morton HE. *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* as prognostic markers following periodontal treatment. *J Periodontol* 1992; 63 (4): 270-3.
130. Skinner A, Woods A. An investigation of the effects of maltose and sucrose in the diet on the microbiology of dental plaque in man. *Arch Oral Biol* 1984; 29 (4): 323-6.
131. Slade HD. Cell surface antigenic polymers of *Streptococcus mutans* and their role in adherence of the microorganism in vitro, p.411-416. In: D. Schlessinger (ed.), *Microbiology*, Washington, DC, 1977.
132. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25 (2): 134-44.
133. Staat RH, Gawronski TH, Cressey DE, Harris RS, Folke LE. Effects of dietary sucrose levels on the quantity and microbial composition of human dental plaque. *J Dent Res* 1975; 54 (4): 872-80.

134. Steinberg D, Moldovan M, Molukandov D. Testing a degradable topical varnish of cetylpyridinium chloride in an experimental dental biofilm model. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48 (2): 241-3.
135. Stephan RM, Miller BF. A quantitative method for evaluating physical and chemical agents which modify production of acids in bacterial plaques on human teeth. *J Dent Res* 1943; 22: 45-53.
136. Stookey GK, Beiswanger B, Mau M, Isaacs RL, Witt JJ, Gibb R. A 6-month clinical study assessing the safety and efficacy of two cetylpyridinium chloride mouthrinses. *Am J Dent* 2005; 18 Spec No: 24A-28A.
137. Strohmenger L, Ferro R. *Odontoiatria di comunità: dalla prevenzione della carie alla promozione della salute orale*. Masson, 2003.
138. Sutch JCD, Pinney RJ, Wilson M. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to oral antiseptics. *Pharmaceut Sci* 1995; 1: 395–398
139. Swenander Lanke L. Influence on salivary sugar of certain properties of foodstuffs and individual oral conditions (1957). *Acta Odontol Scand* 15, Suppl. 23: 1-156.
140. Takada K, Hirasawa M. A novel selective medium for isolation of *Streptococcus mutans*. *J Microbiol Methods* 2005; 60 (2): 189-93.
141. Tanzer G. Association of *Streptococcus mutans* virulence with synthesis of intracellular polysaccharide. In: *Microbial aspects of dental caries*, 1976.
142. Teti G e Mattina R: *Microbiologia del cavo orale*; in Poli G, Cocuzza G, Nicoletti G, Clementi M (2^{ed}): *Microbiologia medica*. UTET, 2002, pp 399-422.
143. Tonzetich J, Eigen E, King WJ, Weiss S. Volatility as a factor in the inability of certain amines and indole to increase the odour of saliva. *Arch Oral Biol* 1967; 12 (10): 1167-75.
144. Tonzetich J, Ritcher VJ. Evaluation of volatile odoriferous components of saliva. *Arch Oral Biol* 1964; 16: 39-46.
145. Tonzetich J. Direct gas chromatographic analysis of sulphur compounds in mouth air in man. *Arch Oral Biol* 1971; 16 (6): 587-97.
146. Touger-Decker R, van Loveren C. Sugars and dental caries. *American Journal of Clinical Nutrition* 2003, 78 (4): 881.

147. Vacca-Smith AM, Venkitaraman AR, Schilling KM, Bowen WH. Characterization of glucosyltransferase of human saliva adsorbed onto hydroxyapatite surfaces. *Caries Res* 1996; 30 (5): 354-60.
148. Wang BY, Kuramitsu HK. Interactions between oral bacteria: inhibition of *Streptococcus mutans* bacteriocin production by *Streptococcus gordonii*. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71 (1): 354-62.
149. Weinberger BW. Introduction to the history of dentistry. St. Louis: Mosby Co, 1948.
150. Wendt LK, Hallonsten AL, Koch G, Birkhed D. Analysis of caries-related factors in infants and toddlers living in Sweden. *Acta Odontol Scand* 1996; 54 (2): 131-7.
151. Winkel EG, Roldan S, Van Winkelhoff AJ, Herrera D, Sanz M. Clinical effects of a new mouthrinse containing chlorhexidine, cetylpyridinium chloride and zinc-lactate on oral halitosis. A dual-center, double-blind placebo-controlled study. *J Clin Periodontol* 2003; 30(4):300-6.
152. Witt J, Bsoul S, He T, Gibb R, Dunavent J, Hamilton A. The effect of toothbrushing regimens on the plaque inhibitory properties of an experimental cetylpyridinium chloride mouthrinse. *J Clin Periodontol* 2006; 33 (10): 737-42. Epub 2006.
153. Zero DT, van Houte J, Russo J. Enamel demineralization by acid produced from endogenous substrate in oral streptococci. *Arch Oral Biol* 31: 229-234, 1986.