



UNIVERSITÀ
di **VERONA**

DIPARTIMENTO DI NEUROSCIENZE BIOMEDICINA E MOVIMENTO

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

*DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE APPLICATE DELLA VITA E DELLA SALUTE
XXXV CICLO/ANNO ACCADEMICO 2019/2020*

TITOLO DELLA TESI DI DOTTORATO

**STUDIO PILOTA SULL'ANALISI DEL MICROBIOTA E DEL
MICROBIOMA ORALE PRIMA E DOPO L'ESTRAZIONE DEGLI
OTTAVI INFERIORI CON L'UTILIZZO DEL PROBIOTICO
CURASEPT PREVENT**

Coordinatore: Prof. Simone Accordini

Firma: _____

Tutor: Prof. Daniele De Santis

Firma: _____

Correlatore: Prof. Massimo Albanese

Firma: _____

Dottorando: Dott. Umberto Luciano

Firma: _____

<i>SOMMARIO</i>	4
<i>ABSTRACT</i>	-
<i>INTRODUZIONE</i>	
<i>MATERIALI E METODI</i>	15
<i>RISULTATI</i>	24
<i>DISCUSSIONE</i>	52
<i>CONCLUSIONI</i>	57
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	58

SOMMARIO

Obiettivo: L'obiettivo di questo studio è quello di valutare, con uno studio pilota clinico osservazionale, le differenze qualitative e quantitative del microbiota orale di pazienti sottoposti all'estrazione degli ottavi inferiori inclusi o seminclusi, in tre momenti diversi: T0 prima dell'estrazione, T1 alla rimozione delle suture dopo 5 giorni di terapia antibiotica e 10 giorni di terapia antisettica, T2 dopo 1 mese di terapia con probiotici.

Materiali e Metodi: Sono stati arruolati 10 pazienti candidati all'estrazione del dente del giudizio inferiore. I soggetti sono stati sottoposti dopo l'intervento a terapia antibiotica, antisettica e probiotica a base di *Bifidobacterium lactis* HN019 e *Kluyveromyces marxianus fragilis* B0399. Attraverso il prelievo di tamponi orali prima dell'intervento, al termine della terapia antibiotica e antisettica e al termine della terapia probiotica, è stata effettuata un'analisi del microbioma orale tramite 16S NGS.

Risultati: sono state rilevate differenze significative nel microbiota orale tra i dati ottenuti al termine della terapia antibiotica e antisettica e quelli prima dell'intervento ($p=0,002$) e dopo la terapia probiotica ($p=0,019$).

Conclusioni: l'utilizzo della terapia antibiotica, antisettica e probiotica ha modificato significativamente il microbiota orale. Questo è uno studio pilota eseguito su dieci pazienti, saranno quindi necessari ulteriori studi per chiarire le dinamiche alla base dei risultati ottenuti.

ABSTRACT

Aim: The purpose of the present pilot observational clinical study is to evaluate the quantitative and qualitative changes in the oral microbiota of patients with lower semi-impacted wisdom tooth extraction in three different moments: before the surgery (T0), at the suture removal after 5 days of antibiotic therapy and 10 days of antiseptic therapy (T1) and after one month of probiotic therapy (T2).

Materials and Methods: Ten patients in need of a lower wisdom tooth extraction have been enrolled. After the surgery all the patients followed an antibiotic, antiseptic and probiotic therapy with *Bifidobacterium lactis* HN019 and *Kluyveromyces marxianus fragilis* B0399. Through oral sampling collected in three moments: before the surgery, and the end of the antibiotic and antiseptic therapy and at the end of the probiotic therapy has been performed an analysis of the oral microbioma through 16S NGS.

Results: with the present study statistically meaningful changes in the oral microbiota have been observed when comparing the data collected at the end of the antibiotic and antiseptic therapy and the pre-surgical visit ($p=0,002$) and after the probiotic therapy ($p=0,019$).

Conclusions: Antibiotic, antiseptic and probiotic therapies lead to significant changes in the oral microbiota. The present study is a pilot research performed on ten patients, further research is necessary to investigate the dynamics at the bases of the collected data.

INTRODUZIONE

L'organismo umano è un sistema biologico estremamente complesso costituito da circa 10^{14} cellule, di cui solo il 10% sono cellule di mammifero, o ovvero cellule umane, il resto sono cellule di microorganismi (batteri, virus, miceti, protozoi e archeobatteri) che formano la flora residente o normale dell'ospite¹. Ovviamente questo rapporto, numericamente molto a favore dei microorganismi nell'essere umano, è controbilanciato dalle dimensioni delle cellule di mammifero che sono in media più grandi delle dimensioni dei microorganismi. A questo numero di cellule umane corrispondono circa 20.000 geni diversi, mentre nel corpo umano sono stimati tra i due e 20 milioni di geni di microorganismi. Questo rapporto nel numero di cellule nella quantità di informazioni genetiche tra i batteri e l'uomo che li ospita, sottolinea l'importanza dei microorganismi che giocano un ruolo fondamentale nella vita stessa di un essere vivente, contribuendo al funzionamento di diverse vie metaboliche e alla difesa dell'organismo ospite da altri microrganismi patogeni. L'essere umano, come tutti gli esseri viventi pluricellulari, è in realtà un definito "olobionte", ovvero un ecosistema vivente costituito dall'ospite con i microorganismi che lo abitano e che partecipano ai meccanismi vitali e la difesa dell'essere vivente stesso punto la vita sul pianeta terra, d'altronde, nel corso di miliardi di anni ha raggiunto una struttura pluricellulare grazie a dei rapporti tra organismi unicellulari: commensalismo, parassitismo o simbiosi. Se non ci fosse stato un rapporto vantaggioso nella collaborazione tra forme di vita unicellulari, queste non si sarebbero mai unite per formare degli ecosistemi più complessi dove una cellula trae vantaggio e contribuisce la vita dell'altra; quindi, non avremmo avuto tutte le forme di vita complesse che troviamo oggi in natura. Si ricorda, infatti, che la struttura delle cellule eucariote degli esseri viventi ha alla base un rapporto di simbiosi tra cellule eucariote primordiali i progenitori dei

mitocondri. Questo scambio di ambiente produzione di metaboliti era talmente vantaggioso per entrambe le strutture unicellulari, che con il passare dei milioni di anni, i mitocondri sono entrati a far parte della struttura stessa cellulare eucariote come organelli specializzati nel loro compito di produzione di ATP.

Definizione microbioma e microbiota:

Joshua Lederberg, nel 2001, ha introdotto il concetto di microbioma, Ovvero l'insieme dei microrganismi, dei genomi e delle interazioni che questi stabiliscono in un determinato ospite ². Il microbiota, invece, per definizione è la somma di tutti i microrganismi che vivono nei vari siti del corpo umano, ed è quindi più un sinonimo di flora microbiologica.

Il microbioma è considerato un organo vero e proprio del nostro organismo ed è costituito dall'insieme dei geni dei microrganismi, che costituiscono il microbiota, e dalle interazioni che questi stabiliscono in un determinato distretto corporeo³.

La gran parte dei microrganismi sono batteri, ma in minima parte sono presenti anche miceti, virus, protozoi e archei. Il microbiota umano è costituito da una flora microbica residente, più stabile, ed una flora transitoria che cambia più velocemente ed è sempre influenzato dai nostri stili di vita, dalla dieta, dalla tecnica di generale, dalle patologie sistemiche, dallo stress, dai contatti con altri individui e dalle fasi dello sviluppo. Diverse relazioni sono state evidenziate infatti tra il microbioma di un individuo e alcuni parametri metabolici come, ad esempio, il body mass Index, ma anche la glicemia ^{4,5}.

Il microbiota è, in genere, specifico per ogni distretto corporeo, ma cambia con l'età, con gli stili di vita e da un individuo all'altro. Infatti, batteri che

sembrano vantaggiosi per la maggior parte delle persone possono causare danni ad altre.

Il microbiota di un neonato è molto simile a quello della madre ma attraversa cambiamenti repentini durante alcune fasi della vita; si tratta dunque, di un equilibrio dinamico e resiliente ⁶.

Le fasi dello sviluppo in cui è stato evidenziato un maggior cambiamento del microbiota coincidono con alcuni cambiamenti nello stile di vita alterazioni anatomiche: l'eruzione degli elementi decidui e permanenti, modifiche nel tipo di alimentazione e persino il passaggio dalla deglutizione infantile a quella adulta, la pubertà e l'età adulta con il cambio del nucleo familiare oppure la presenza di patologie sistemiche, orali o semplicemente la presenza di impianti dentali ^{7,8}.

Una parte del microbiota dell'essere umano, si forma prima degli 8 anni di età e rimane stabile in situazioni di equilibrio definito "eubiosi". Durante l'eubiosi, l'ecosistema ospite-microbiota forma un equilibrio dinamico basato sulle proprietà della resilienza, ovvero reagisce alle perturbazioni esterne senza discostarsi dell'equilibrio che consente la salute dell'ospite e la protezione e proliferazione dei microrganismi.

Microbiota orale:

La cavità orale è uno dei siti del nostro organismo con concentrazione batterica più alta, insieme all'intestino e alla cute. Questo perché è un sito ideale per la crescita e l'organizzazione di biofilm batterici: è un ambiente umido, caldo, con PH di 6.75- 7.25, ricco di sostanze nutritive e in comunicazione con l'esterno.

I membri della popolazione microbica rimangono costanti, nonostante un regolare afflusso di microbi che entrano in bocca durante l'alimentazione e la respirazione. Non tutti i microbi sopravvivono nell'ambiente orale, ma una persona media ha circa 250 specie da un pool di circa 700 residenti orali documentati ¹.

All'interno del cavo orale sono presenti superfici di vario tipo e quindi micro-ecosistemi diversi.

I microbi sembrano essere specialisti della nicchia che occupano, sia che si tratti dei siti più studiati come la saliva o la placca dentale, sia di altre aree del cavo orale: lingua, guancia, palato, gola o tonsille.

Come riportato da Jessica Mark Welch, ecologista microbica presso il Marine Biological Laboratory di Woods Hole, nel Massachusetts: "Punti diversi della bocca, distanti solo pochi millimetri l'uno dall'altro, sono abitati da comunità microbiche completamente diverse". La superficie della lingua, ad esempio, ha una popolazione batterica diversa da quella dell'orofaringe o da quella del vestibolo e differiscono da quella della superficie dentale.

I responsabili delle patologie del cavo orale:

"Per le condizioni dentali, siamo stati molto influenzati dall'idea che ogni malattia dovrebbe avere un singolo agente microbico causale" ⁹.

Fino ai tardi anni '90 specifici microbi erano ritenuti diretti responsabili dell'insorgenza delle più diffuse patologie del cavo orale: lo *Streptococcus mutans* causava la carie dentale, *Porphyromonas gingivalis* causava parodontite e *Candida Albicans* causava candidosi orale.

Successivamente gli scienziati del Forsyth Institute hanno proposto come i complessi di organismi nella placca sotto il bordo gengivale potessero essere responsabili di malattie dentali, rendendosi conto dell'importanza delle comunità microbiche nella bocca ben prima che diventassero disponibili tecniche di sequenziamento del DNA facilmente accessibili ¹⁰.

All'inizio degli anni 2000, con l'avvento delle tecniche di sequenziamento di nuova generazione, i ricercatori, anche se potevano distinguere tra diversi batteri orali umani in base alle loro sequenze geniche uniche (osservando i geni dell'RNA ribosomiale 16 s), non potevano assegnare i nomi a questi batteri o capire le loro relazioni con altri microbi. Nacque così la necessità di creare un database completo del microbioma orale umano, che permettesse la catalogazione dell'intera gamma conosciuta di microbi in diversi siti di microbiomi orali. Nell'ambito dello Human Microbiome Project ^{11,12}, una delle prime indagini su larga scala al mondo sui microbiomi di individui sani. Il progetto includeva campioni provenienti da nove punti della cavità orale.

La composizione del microbioma variava ampiamente da persona a persona, il che purtroppo precludeva l'identificazione di caratteristiche che segnalassero un microbioma sano. Tuttavia, i gruppi microbici dominanti in ogni sito tendevano a essere condivisi, mentre quelli meno dominanti erano altamente personalizzati.

I dati ottenuti hanno confermato la presenza di agenti patogeni orali nelle persone con e senza malattie orali e, con ricerche successive, è stato confermato che diversi profili microbici erano associati alla carie in individui diversi. Le ultime teorie ipotizzano che un cambiamento nella comunità microbica orale consenta ai batteri che normalmente sono tenuti sotto controllo da altri microbi di diventare virulenti, causando malattie orali. Come affermato dal ricercatore Mogens Kilian "Quei batteri sono tenuti sotto controllo in un ecosistema sano, aumentano in proporzione, cambiano il profilo dell'espressione genica, quindi diventano agenti patogeni"¹³. Questo sarebbe il motivo per cui, secondo il ricercatore danese, non è stato possibile sviluppare un vaccino contro la carie, dal momento che prendono di mira un singolo microorganismo che è irregolarmente implicato nell'evoluzione della patologia.

Un altro enigma che potrebbe essere affrontato con la conoscenza delle comunità microbiche orali è il motivo per cui solo una frazione delle persone con gengivite progredisce verso la malattia conclamata. Potrebbe essere che la presenza di un biofilm dentale sia meno importante dei microbi esatti nel biofilm, perché quegli individui che sviluppano malattie gengivali hanno microbi orali che interagiscono in modo diverso con il sistema immunitario e innescano più infiammazioni che distruggono i tessuti man mano che la malattia gengivale progredisce verso la parodontite.

Pensare ai batteri orali e al loro ospite come parte dello stesso ecosistema generale consente un quadro più completo di ciò che determina la salute dentale degli individui¹⁴. In questo nuovo quadro per le malattie dentali, fattori dello stile di vita come il consumo di dolci o la frequenza con cui i denti di qualcuno entrano in contatto con il fluoro attraverso l'acqua potabile o

il dentifricio potrebbero esercitare pressione sull'intera comunità microbica e spostarla nella direzione della salute o della malattia ⁹.

Evoluzione delle cure dentali probiotici e prebiotici:

Gli attuali pilastri delle cure dentistiche sono i trattamenti chirurgici e antibiotici. Ma la ricerca sul microbioma orale potrebbe inaugurare un'era in cui i microbi della bocca possono essere manipolati con precisione, forse anche aggiungendo di proposito batteri per mantenere la salute dentale.

L'obiettivo, come scrive la ricercatrice Jessica Mark Welch, sarebbe quello di selezionare i ceppi aggressivi nella bocca di un individuo e cercare di sostituirli con altri ceppi, mettendo a punto la comunità orale ¹⁵.

Sono in fase di sviluppo nuove strategie di intervento che prevedono l'utilizzo di Probiotici e Prebiotici.

Il termine “probiotici” è stato definito dall' “International Scientific Association” come “microrganismi vivi che, quando somministrati in quantità adeguate, conferiscono un beneficio per la salute all'ospite” ¹⁶. si presume che il meccanismo d'azione dei probiotici in bocca sia simile a quelli osservati in altre parti del corpo ¹⁷. Si pensa che gli Organismi probiotici agiscano principalmente attraverso queste vie: la competizione per i nutrienti o siti di adesione con i potenziali agenti patogeni, l'eliminazione o l'inibizione della crescita di agenti patogeni attraverso la produzione di batteriocine o altri prodotti, il miglioramento dell'integrità della barriera intestinale e sovra regolazione della produzione di mucina, la modulazione della proliferazione cellulare e dell'apoptosi, e la stimolazione e modulazione del sistema immunitario della mucosa ^{17,18}.

Tuttavia, i probiotici per il cavo orale devono avere delle caratteristiche specifiche. I probiotici orali dovrebbero essere in grado di aderire e colonizzare i tessuti orali, comprese le superfici dure non esfolianti, e di diventare parte del biofilm ^{17,19}. Inoltre, non dovrebbero fermentare gli zuccheri; altrimenti, farebbero abbassare il pH orale e si svilupperebbe la carie ¹⁶.

I prebiotici sono oligosaccaridi scarsamente digeriti e sono stati dimostrati essere un aiuto per integrare i probiotici nel trattamento di malattie orali ¹⁷.

I prebiotici potrebbero stimolare la crescita e l'attività di batteri benefici e contemporaneamente inibiscono la crescita e l'attività di batteri potenzialmente dannosi ¹⁹. Potrebbero anche migliorare la funzione di barriera della mucosa, l'immunità dell'ospite e migliorare la produzione di acidi grassi a catena corta ²⁰.

Lattosio, Inulina, Frutto-oligosaccaridi, galatto-oligosaccaridi e xilooligosaccaridi sono alcuni comuni prebiotici ampiamente utilizzati nell'intestino, mentre gli studi sui prebiotici utilizzati in cavità orale sono estremamente limitati ²¹.

Zuccheri e fibre alimentari, che sono considerati prebiotici per i batteri lattici intestinali, non lo sono per l'ambiente orale. Alcuni potenziali prebiotici orali come xilitolo xilosio e arabinosio potrebbero sopprimere la crescita dello streptococco mutans, ma sono stati utilizzati anche per la crescita di alcuni ceppi di lattobacilli ²². Data la mancanza di alcuni prebiotici orali perfetti, sono sempre di più gli studi che tentano di identificare nuovi prebiotici ^{23,24}.

Procedure odontoiatriche:

Al giorno d'oggi tutte le procedure odontoiatriche prevedono l'utilizzo di antisettici, primo fra tutti la clorexidina, aventi come obiettivo l'abbattimento della carica microbica a livello del cavo orale al fine di ridurre il rischio di contaminazione dello specifico distretto anatomico interessato ²⁵.

Oltre all'utilizzo di antisettici bisogna tenere conto delle terapie antibiotiche comunemente prescritte ai pazienti che presentano infezioni acute, croniche e in pazienti che sono stati sottoposti a procedure chirurgiche routinarie come, ad esempio, l'estrazione dei denti del giudizio.

Visto quanto emerso dalla letteratura più recente, è evidente come le procedure eseguite e, le terapie antisettiche e antibiotiche prescritte, possano alterare lo stato di eubiosi del paziente e diventare il "primus movens" di un processo di modificazione e riorganizzazione del microbiota orale ²⁶.

L'estrazione degli ottavi inferiori rappresenta l'intervento di chirurgia orale più frequentemente eseguito in ambito odontoiatrico ²⁷. In genere, l'avulsione degli ottavi è conseguenza di problematiche correlate all'inclusione di tali

elementi. Si stima, infatti, che il dente del giudizio inferiore sia l'elemento dentario più frequentemente incluso (prevalenza di inclusione del 20-30% circa), seguito dal terzo molare superiore e dal canino superiore.

Le infezioni post-operatorie rappresentano la più comune delle complicanze e l'alveolite, descritta per la prima volta da Crawford nel 1896, è la complicanza più comune associata alla chirurgia degli ottavi. La sua eziopatogenesi è tuttora sconosciuta; sono state formulate molte ipotesi, ma nessuna è sostenuta da dati concordi.

Non conoscendo i fattori causali, quindi, non disponiamo di una terapia eziologica corretta: i dati disponibili non concordano neppure sull'efficacia della prevenzione antibiotica.

L'alveolite non lascia esiti apprezzabili e la sua durata, comunque limitata, si manifesta oggettivamente con lisi del coagulo e alitosi, oltre che soggettivamente con un dolore pulsante, che insorge tipicamente in seconda-quarta giornata, ed è spesso resistente ai comuni analgesici.

Nei casi tipici, l'alveolo è completamente vuoto e ha un colorito verdastro. Il trattamento è sintomatico ed è finalizzato soprattutto al controllo del dolore. Lavaggi con acqua e antisettici permettono di liberare l'alveolo da residui alimentari e da corpi estranei.

Quello che deve essere assolutamente evitato è il raschiamento dell'alveolo, eseguito frequentemente diversi decenni addietro, per il rischio di contaminare gli spazi midollari con la patina microbica, trasformando un'innocua alveolite in un'osteite^{28,29,30}.

Tutto questo permette di poter formulare l'ipotesi per cui il controllo del microbiota orale sia fondamentale per la prevenzione dello sviluppo di nicchie batteriche patogene, probabilmente collegate all'insorgenza della più comune delle complicanze post-operatorie nella chirurgia degli ottavi.

Scopo dello studio:

L'obiettivo di questo studio è quello di valutare, con uno studio pilota clinico osservazionale, le differenze qualitative e quantitative del microbiota orale di pazienti sottoposti all'estrazione degli ottavi inferiori inclusi o semi inclusi, in tre momenti diversi: T0 prima dell'estrazione, T1 alla rimozione delle suture dopo 5 giorni di terapia antibiotica e 10 giorni di terapia antisettica, T2 dopo 1 mese di terapia con probiotici.

MATERIALI E METODI

DISEGNO DELLO STUDIO

È stato eseguito uno studio pilota clinico osservazionale

Fonti dei dati e variabili raccolte:

Per l'esecuzione di questo studio sono stati arruolati pazienti che dovevano essere sottoposti a estrazione dei terzi molari inferiori in inclusione totale o parziale.

I criteri di inclusione sono i seguenti:

- età compresa tra i 16 e i 35 anni
- Pazienti non fumatori
- Pazienti non diabetici
- assenza di patologie sistemiche controindicanti il trattamento
- assenza di infezioni in atto
- assenza di allergia alle penicilline
- pazienti sottoposti a terapia di mantenimento igienico orale
- firma del consenso informato all'analisi del microbioma orale e al trattamento dei dati
- estrazione di un ottavo inferiore 3.8 o 4.8 in inclusione ossea totale o parziale.

Protocollo clinico:

A seguito della spiegazione dello scopo dello studio e, della firma di un consenso informato, sono stati arruolati dieci pazienti.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad una visita specialistica odontoiatrica, alle radiografie diagnostiche di routine (Radiografie endorali, Ortopantomografie delle arcate dentarie e Tac delle arcate dentarie).

Il giorno dell'intervento (T0), prima dell'estrazione è stato eseguito il primo prelievo con un tampone (Swab Collection and DNA Preservation System, Norgen Biotek Corp.) per l'analisi del microbiota orale.

Protocollo chirurgico:

Previa anestesia locoregionale tronculare e plessica con mepivacaina con adrenalina 1:200000 è stato allestito un lembo mucoperiosteale esteso dal margine anteriore della branca montante della mandibola al margine mesiale del secondo molare inferiore. Successivamente è stata eseguita un'osteotomia tramite l'utilizzo di strumenti rotanti ad alta velocità e frese al carburo di tungsteno. Una volta isolato l'elemento dentario questo è stato estratto con l'ausilio di pinze e leve odontoiatriche e, quando necessario è stato separato in più frammenti. In seguito, è stato eseguito il curettaggio dell'alveolo post estrattivo e il lavaggio dello stesso con soluzione fisiologica; avvenuta l'emostasi il lembo è stato suturato per prima intenzione con sutura Vicryl 4/0.

Terapia post-operatoria:

Successivamente all'intervento ai pazienti è stata prescritta una terapia antibiotica così composta: Amoxicillina 875 mg + acido clavulanico 125 mg, 1 compressa ogni 8 ore per 5 giorni. A questa è stata associata e una terapia

antisettica con Curasept Clorexidina 0,2%, sciacqui da 30 secondi ogni 12 ore per 10 giorni.

Collutorio curasept 0,2% con dna sodico:

Composizione: acqua depurata, xilitolo 16041, cremophor rh40, glicol propilenico, sodio citrato tribasico, clorexidina digluconato 0,20%, acido ascorbico, simperonico f127, sodio metabisolfito, PVP VA copolimero, blue fd & c, dna sodico, menta piperita m644, anetolo, mentolo, menta verde, olio essenziale di chiodi di garofano, olio essenziale di cannella.

La CLOREXIDINA digluconato o 1,6-di(N-p-clorofenil-diguanido) esano, sale digluconato è una molecola dotata di carica positiva, per cui viene attirata e adsorbita sulla membrana cellulare batterica e penetra all'interno della cellula stessa.

L'attività antiplacca si esplica sia contrastando lo sviluppo dei batteri, sia legandosi alla matrice impedendone lo sviluppo e disgregandola.

È caratterizzata da una notevole prontezza d'azione e da una elevata ritenzione nel cavo orale. Mantiene la sua attività antiplacca e antibatterica fino a 8-12 ore.

L'assenza di alcool rispetta maggiormente le mucose, evita gli effetti irritanti e dolorosi e aumenta la compliance del prodotto. Non interagisce con cementi, resine, etc, proteggendoli dall'abrasione alcolica.

La colorazione esterna dei denti è una possibile conseguenza di un uso prolungato di soluzioni a base di Clorexidina. Il sistema ADS (Anti discoloration System), contenuto nei collutori Curasept, interferisce con due dei principali meccanismi della pigmentazione e contribuisce a diminuirne l'incidenza e l'entità. Il sistema ADS è costituito dall'associazione di due principi attivi, che interferiscono con le due principali reazioni responsabili della pigmentazione da Clorexidina. L'associazione dei due principi attivi con la Clorexidina è coperta da brevetto MIZ002A000421.

Il DNA sodico aumenta l'idratazione delle mucose con conseguente miglioramento del trofismo gengivale.

Augmentin:

Ogni compressa rivestita contiene amoxicillina triidrato corrispondente a 875 mg di amoxicillina e potassio clavulanato corrispondente a 125 mg di acido clavulanico.

Eccipienti: Nucleo della compressa, Magnesio stearato Carbossimetilamido sodico A Silice colloidale anidra Cellulosa microcristallina. Filmatura della compressa, Titanio diossido (E171) Ipromellosa, Macrogol (4000, 6000) e Dimeticone.

Il giorno della rimozione delle suture, terminata la terapia antibiotica e antisettica 10 giorni dopo l'intervento chirurgico (T1), è stato eseguito il secondo prelievo con un tampone (Swab Collection and DNA Preservation System, Norgen Biotek Corp.) per l'analisi del microbiota orale.

Da questo momento in poi i pazienti hanno iniziato ad assumere il probiotico della linea Curasept Prevent (1 compressa 2 volte al giorno per 28 giorni) unitamente al Dentifricio e collutorio specifico della medesima linea.

Probiotico Curasept Prevent:

Curasept Prevent Probiotico è un integratore alimentare che può vantare un'esclusiva associazione di batteri probiotici:

Bifidobacterium lactis HN019: è uno dei probiotici più utilizzati in campo medico e alimentare. Inoltre, alcuni studi hanno mostrato la capacità di

migliorare gli esiti della terapia parodontale^{1,2}, e di facilitare il mantenimento della salute e dei risultati nel tempo.

Kluyveromyces marxianus fragilis B0399, che ha dimostrato funzioni anti-alitosi³, uno degli effetti più frequenti nei pazienti con problematiche gengivali.

Cursept Prevent Probiotico contiene inoltre Colostro, che presenta numerose sostanze protettive per la mucosa ed enzimi antibatterici, e la biotina o vitamina B8, che aiuta il regolare/il buon funzionamento delle mucose del tratto digerente

Composizione:

Edulcoranti: isomalto, xilitolo; *Kluyveromyces marxianus fragilis* B0399 (MUCL 55798), aromi, Colostro polvere liofilizzata (30% immunoglobuline totali, contiene latte e derivati incluso lattosio), *Bifidobacterium lactis* HN019 (SD 5674) supportato su maltodestrina, stabilizzante: mono- e digliceridi degli acidi grassi; agenti antiagglomeranti: biossido di silicio, sali di magnesio degli acidi grassi; spirulina in polvere con funzione colorante, amido di mais, Biotina (D-biotina).

Dopo 28 giorni di assunzione di probiotici (T2) i pazienti sono stati rivisti a una visita specialistica controllo e, sono stati sottoposti al terzo prelievo con tamponi (Swab Collection and DNA Preservation System, Norgen Biotek Corp.) per l'analisi del microbiota orale.



Figura1. Linea temporale dello studio eseguito.

Le variabili raccolte dallo studio per ogni paziente sono state:

- Sesso (M o F)
- Età (anni)
- Sede dente estratto: 3.8 o 4.8.
- Anamnesi clinica e farmacologica del paziente
- Microbiota e microbioma orale

Data management e procedure per garantire la confidenzialità del dato:

I dati delle cartelle cliniche sono stati salvati in un file Excel e saranno mantenuti in computer con accesso tramite password. Hanno accesso ai dati lo sperimentatore principale e i collaboratori.

Per garantire la confidenzialità dei dati, ogni paziente è stato registrato e de-identificato nel registro tramite un codice identificativo. I dati ottenuti sono stati utilizzati a scopo scientifico e verranno custoditi secondo le vigenti norme della Privacy (GDPR 2018).

Estrazione del DNA:

Il DNA è stato estratto utilizzando lo strumento Qiacube HT con il kit Qiagen DNeasy 96 PowerSoil Pro, applicando uno step di lisi appositamente modificato. 300 µl di tampone conservante eNAT (Copan ITA) sono stati aggiunti a 100 µl di biglie di zirconia, a 800 µl di soluzione specifica per le biglie (soluzione CD1). I campioni sono quindi stati incubati per 15 minuti a 72°C e lisati nel Tissue Lyser (Qiagen) a 25 Hz. Infine, i campioni sono stati centrifugati a 13000 x g per 1 min. 550 µl di surnatante sono stati usati come materiale di partenza per l'estrazione, effettuata seguendo le istruzioni del produttore.

Costruzione della libreria e sequenziamento:

5 µl di DNA estratto sono stati usati per l'amplificazione con i primer modificati Takahashi et al (2014) e testati in gel di agarosio 1,5%. Gli ampliconi sono stati purificati con Esonucleasi Termolabile I (NEB), diluiti 1:2 ed amplificati con ciclo breve con gli Index Nextera XT. Gli ampliconi sono stati normalizzati con SequalPrep (Thermo Fisher) e multiplexati. Il pool è stato purificato con Beads magnetiche Agencourt XP 1X, caricato su Miseq e sequenziato con chimica V3 – strategia 300PE. Tutti i 30 campioni iniziali sono risultati idonei al sequenziamento.

Analisi bioinformatica Qiime2 (2021.4):

Dai 30 campioni sono state estratte 3007689 reads e, in seguito ripulite dai primer utilizzando il software Cutadapt v. 2021.4 e quindi processate con il plugin denoised-paired del software DADA2.

Brevemente, le sequenze sono state trimmate all'estremità 3' (Forward: 270 bp; Reverse 215 bp), filtrate per qualità. e per lunghezza. In seguito, le sequenze sono state dereplicate e fuse al fine di ottenere sequenze uniche (uniques). Come ultimo passaggio vengono eliminate le chimere. Le 1926 ASV (features) cos. prodotte sono associate alla loro abbondanza nei vari campioni, costituendo la cosiddetta feature-table.

Le ASV sono state quindi filtrate allo 0,01% di frequenza, al fine di eliminare le sequenze poco rappresentate e di bilanciare il numero di ASV all'interno dei campioni, e per lunghezza (>350 basi), rimuovendo cos. possibili sequenze contaminanti. La successiva analisi di rarefazione è stata effettuata per verificare il numero minimo di reads a cui normalizzare i campioni. Il numero finale di ASV rimanenti, 550 associate a 1554619 reads, costituendo così la final feature table, punto di partenza per tutte le successive analisi. I campioni sono stati poi rarefatti a 26236 reads, mantenendo un adeguato Good's coverage.

Le tassonomie sia di GreenGenes v.13-8 che di Silva v.1 38 sono state assegnate alle sequenze delle ASV.

Ogni analisi di summarize taxonomy, alpha e beta-diversity ha preso in considerazione sia i campioni singoli (tranne le analisi statistiche che focalizzano solo le ipotesi sperimentali) che le condizioni sperimentali presenti nel mapping file.

Le analisi di alpha-diversity sono state effettuate su tutti i campioni utilizzando, tra gli altri, gli indici Observed Features, Shannon, Pielou's evenness, Faith PD e per ogni indice è stato utilizzato il test Kruskal- Wallis per verificare la significatività delle comparazioni tra le condizioni sperimentali.

Le analisi di beta-diversity sono state effettuate su tutti i campioni utilizzando le metriche Bray-

Curtis, Jaccard e Unifrac (weighted e unweighted) e hanno prodotto i PCoA interattivi visibili su web tramite il tool "Emperor".

Le analisi statistiche per comparare le condizioni sperimentali sono state effettuate utilizzando il test PERMANOVA.

Le analisi longitudinali pairwise-differences sono state effettuate per determinare se, considerando i campioni in modo accoppiato, la differenza dei valori di una specifica metrica (indici di alpha diversity o Asse 1 delle PcoA di beta diversity) tra due tempi è significativamente diversa da 0. A queste sono state aggiunte le analisi di volatilità per valutare l'andamento nel tempo delle metriche di diversità in ciascun individuo, aggregando eventualmente l'informazione anche a livello di gruppo. Infine, l'analisi dell'abbondanza differenziale su entrambe le tassonomie (GreenGenes e Silva) è stata effettuata a vari livelli (ASV, specie, genere, famiglia, phylum) utilizzando ANCOM.

I risultati di tale analisi sono racchiusi nell'archivio comparisons.zip, al cui interno è presente una cartella per ogni confronto a coppie

Flowchart

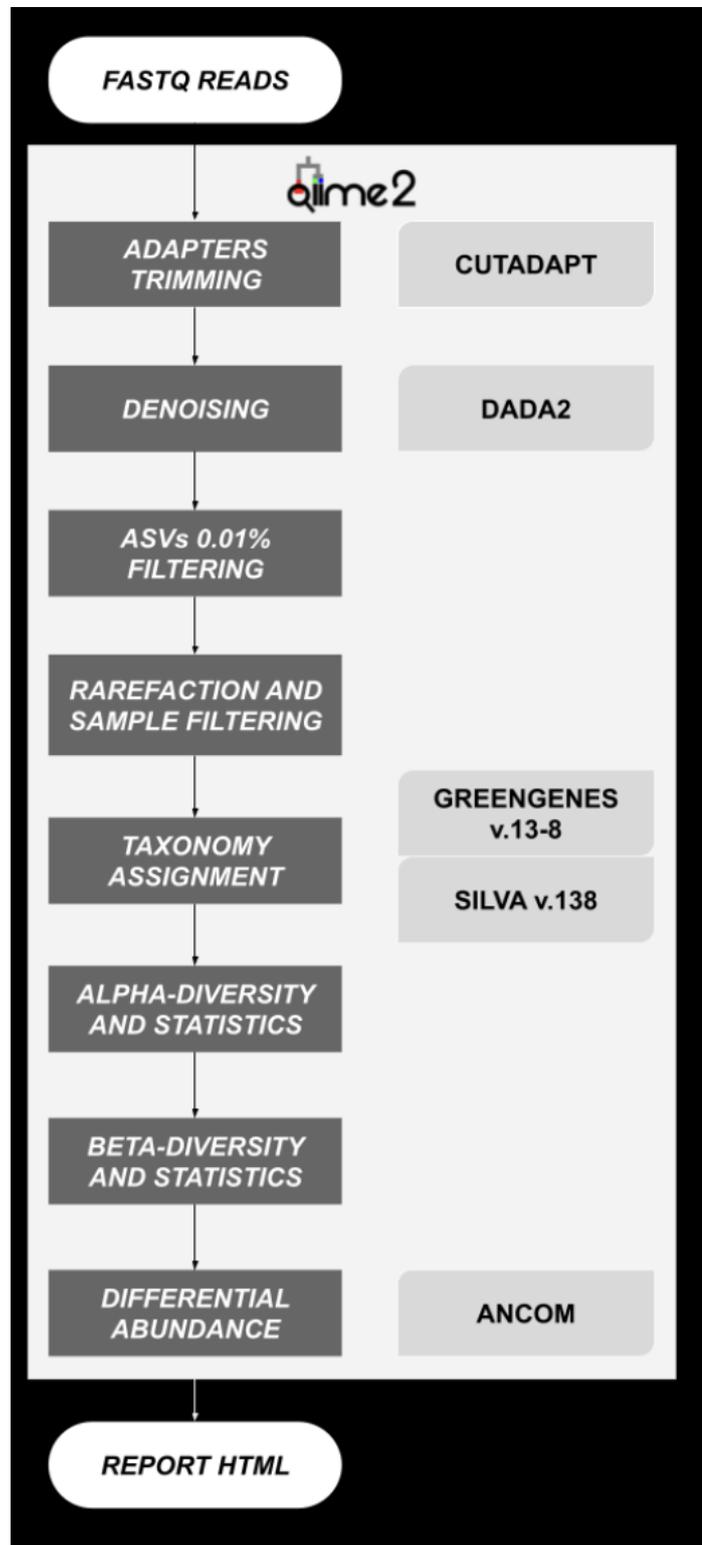


Figura 2 Flowchart dell'analisi bioinformatica

RISULTATI

DADA 2 statistics:

Ad ogni passaggio dell'analisi del dato è possibile tenere traccia della quantità di sequenze (reads) che superano le fasi di filtraggio e stimare la bontà del dato sequenziato. Nella tabella sottostante (tabella 1) sono riportati i risultati preliminari ottenuti dall'analisi bioinformatica tramite la pipeline di DADA2 del software QIIME2.

sample-id	I n p u t	fil te re d	per cent age of inp ut pas sed filte r	de no ise d	m er ge d	per cent age of inp ut mer ged	no n- ch im eri c	per cent age of inp ut non - chi mer ic
1236776 F11618 20	7 3 9 3 0	5 7 5 1 6	77.8	56 65 2	5 4 9 7 8	74.3 6	50 75 9	68.6 6
1236768 F11618 12	7 6 3 2 7	6 0 1 5 2	78.8 1	59 29 2	5 7 6 7 5	75.5 6	51 45 9	67.4 2
1236763 F11618 07	1 0 1 2 1 0	8 1 5 5 7	80.5 8	78 81 4	7 4 6 2 4	73.7 3	67 75 4	66.9 4
1236788 F11618 32	8 6 1	6 5 4	75.9 5	63 92 0	6 1 6	71.6 1	57 46 5	66.7 3

	1 1	0 1			6 1			
1236783 F11618 27	1 0 8 3 5 5	8 5 5 3 1	78.9 4	84 54 8	8 1 9 1 5	75.6	70 60 3	65.1 6
1236784 F11618 28	7 2 4 3 7	5 5 7 7 9	77	54 42 6	5 2 0 3 6	71.8 4	46 95 5	64.8 2
1236786 F11618 30	1 1 0 6 6 5	8 8 5 3 7	80	87 83 2	8 5 3 9 2	77.1 6	68 31 3	61.7 3
1236782 F11618 26	1 1 2 9 0 1	8 8 8 4 4	78.6 9	86 48 6	8 1 4 7 5	72.1 6	67 57 4	59.8 5
1236785 F11618 29	7 4 4 4 9	5 7 6 4 6	77.4 3	56 86 9	5 4 7 6 6	73.5 6	44 31 9	59.5 3
1236778 F11618 22	7 9 4 3 8	6 3 0 4 5	79.3 6	61 60 6	5 7 8 7 0	72.8 5	45 70 4	57.5 3
1236771 F11618 15	8 0 9 1 0	6 4 1 6 2	79.3	63 45 1	6 1 5 9 0	76.1 2	46 16 7	57.0 6
1236775 F11618 19	1 0 8 3 0 4	8 3 2 9 4	76.9 1	80 40 4	7 5 1 4 7	69.3 9	61 13 1	56.4 4
1236779 F11618 23	8 3 9 9 4	6 6 0 2 6	78.6 1	64 99 9	6 1 4 2 6	73.1 3	45 50 2	54.1 7
1236787 F11618 31	1 1 3 0 6 2	8 8 3 0 1	78.1	86 98 9	8 1 9 8 5	72.5 1	61 04 3	53.9 9

1236764 F11618 08	1 0 0 0 5 6	7 4 3 3 8	74.3	70 39 6	6 4 2 6 9	64.2 3	53 74 3	53.7 1
1236773 F11618 17	1 2 0 1 9 0	9 3 3 0 9	77.6 3	88 72 3	8 1 7 3 3	68	64 30 3	53.5
1236781 F11618 25	1 0 7 8 4 3	8 6 8 6 6	80.5 5	85 11 1	8 1 4 7 3	75.5 5	57 39 1	53.2 2
1236761 F11618 05	1 0 5 0 7 5	8 4 0 3 8	79.9 8	81 02 9	7 4 3 1 1	70.7 2	55 92 5	53.2 2
1236765 F11618 09	1 4 3 0 9 8	1 1 3 2 5 9	79.1 5	10 93 21	1 0 1 4 8 2	70.9 2	76 13 9	53.2 1
1236762 F11618 06	1 2 1 9 5 3	9 7 0 0 7	79.5 4	95 09 7	9 0 0 2 6	73.8 2	62 92 4	51.6
1236769 F11618 13	5 2 4 0 1	4 1 1 2 1	78.4 7	40 14 8	3 7 5 7 4	71.7	26 55 2	50.6 7
1236789 F11618 33	1 3 1 2 3 7	1 0 6 1 9 7	80.9 2	10 37 31	9 6 3 3 2	73.4	63 93 6	48.7 2
1236767 F11618 11	1 1 3 6 4 6	8 9 4 9 8	78.7 5	87 86 0	8 1 7 3 9	71.9 2	54 58 5	48.0 3
1236774 F11618 18	1 2 6 2	1 0 2 2	81	10 05 71	9 5 9 1 6	75.9 7	60 38 6	47.8 3

	5 9	7 2						
1236766 F11618 10	1 5 2 6 5 7	1 1 7 6 1 2	77.0 4	11 14 28	9 9 3 4 4	65.0 8	70 90 2	46.4 5
1236780 F11618 24	6 7 9 9 0	5 2 1 5 3	76.7 1	49 64 0	4 4 8 8 9	66.0 2	31 41 9	46.2 1
1236770 F11618 14	1 0 9 4 4 2	7 9 5 6 4	72.7	77 34 9	7 1 4 6 7	65.3	49 15 0	44.9 1
1236777 F11618 21	6 9 5 2 0	5 5 6 7 6	80.0 9	53 94 1	4 9 2 2 4	70.8 1	31 17 8	44.8 5
1236790 F11618 34	1 2 7 8 9 8	9 8 8 0 6	77.2 5	96 11 8	8 8 5 9 5	69.2 7	56 22 2	43.9 6
1236772 F11618 16	7 6 3 2 8	5 5 5 9 1	72.8 3	52 64 5	4 6 6 4 3	61.1 1	31 06 9	40.7

Tabella 1: dati numerici indicanti il numero di sequenze batteriche contenute in ciascun campione nelle diverse fasi di analisi del dato (QC Quality Control Filtering, denoising, merging e rimozione delle chimere). Nella tabella sono riportati i risultati preliminari ottenuti dall'analisi bioinformatica tramite la pipeline di DADA2 del software QIIME2.

In media per ogni campione viene utilizzato solo il 50% delle sequenze, ovvero quelle di alta qualità.

Feature table summary:

Nella tabella 2 viene riportato un “riassunto” dei risultati ottenuti attraverso l’intero workflow di analisi. Su 30 campioni analizzati, sono state identificate 1926 diverse sequenze (sequenze univoche) con un’abbondanza assoluta di 1630572 sequenze (sequenze non univoche).

La tabella 3 mostra le frequenze delle sequenze nell’intero pool di campioni.

Tabella 2: Nella tabella vengono riportati il numero di ASV uniche e il numero di ASV non univoche per i diversi campioni analizzati.

Table summary

Metric	Sample
Number of samples	30
Number of features	1,926
Total frequency	1,630,572

Tabella 3: Frequenza delle sequenze per il totale dei campioni studiati

Frequency per sample

	Frequency
Minimum frequency	26,552.0
1st quartile	46,364.0
Median frequency	56,073.5
3rd quartile	63,683.0
Maximum frequency	76,139.0
Mean frequency	54,352.4

L’istogramma in figura 3 mostra la distribuzione del numero di sequenze dei campioni in esame.

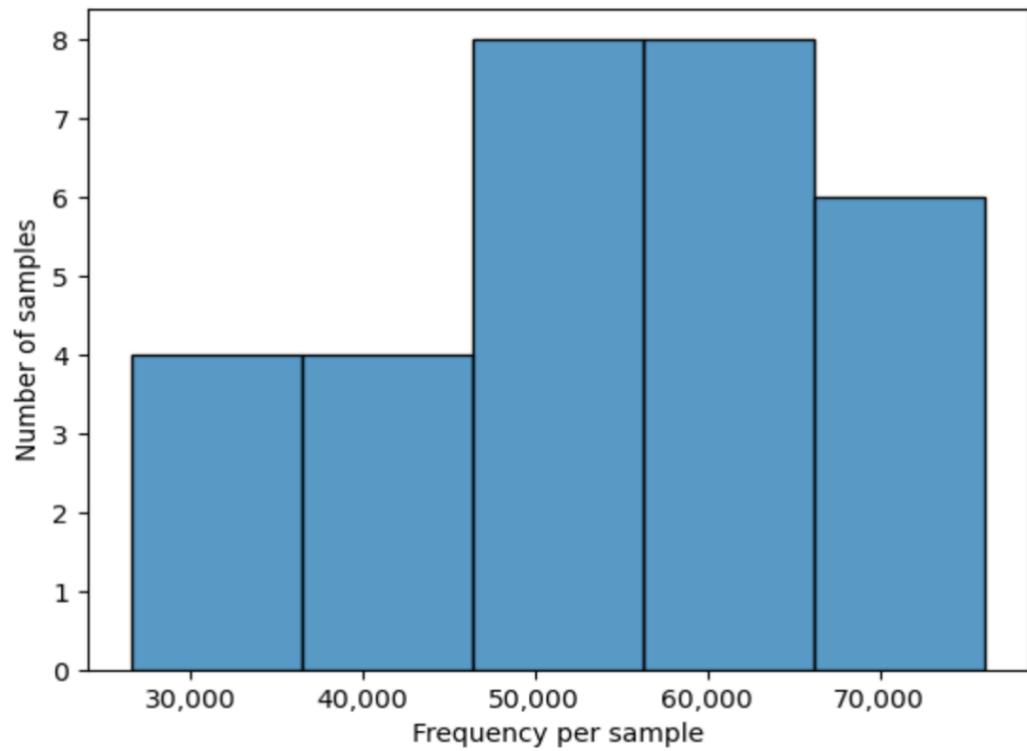


Figura 1. Sul totale di 30 campioni sono state ottenute: 30000 sequenze in 4 campioni, nei successivi 4 40000 sequenze, in 8 50000 sequenze, in 8 60000 e in 6 70000.

Feature sequences:

Considerando il numero minimo di basi che devono sovrapporsi per far sì che le reads forward e reverse si uniscano nel passaggio di merging, le 1926 ASV ricavate presentano una lunghezza minima di 270bp e una lunghezza massima di 465 bp (tabella 4).

Sequence Length Statistics

Download sequence-length statistics as a TSV

Sequence Count	Min Length	Max Length	Mean Length	Range	Standard Deviation
1926	270	465	414.25	195	29.28

Tabella 1. Variabilità delle 1926 sequenze in base alla loro lunghezza; in media queste sequenze riportano una lunghezza di ~415 bp.

Andando ad analizzare il cinquantesimo percentile della lunghezza delle sequenze, si ottiene una lunghezza media di 422 bp.

Seven-Number Summary of Sequence Lengths

Download seven-number summary as a TSV

Percentile:	2%	9%	25%	50%	75%	91%	98%
Length* (nts):	270	402	406	422	427	427	429

*Values rounded down to nearest whole number.

Tabella 2. Valutazione dei percentili per le ASV identificate.

Alpha rarefaction curve

Attraverso l'analisi della rarefazione risulta evidente che, con una profondità di lettura di ventimila reads, l'indice di diversità ha raggiunto il plateau in tutti i campioni.

In dettaglio utilizzando la metrica observed feature si nota che il numero minimo di read da sequenziare è circa di 6000, in modo tale che ciascuna curva raggiunga il plateau a tale valore, indicando che per ciascun campione si è raggiunto il massimo numero di sequenze identificate. Dal grafico si evince che ciascuna curva, rappresentante ciascun campione, ha raggiunto il plateau.

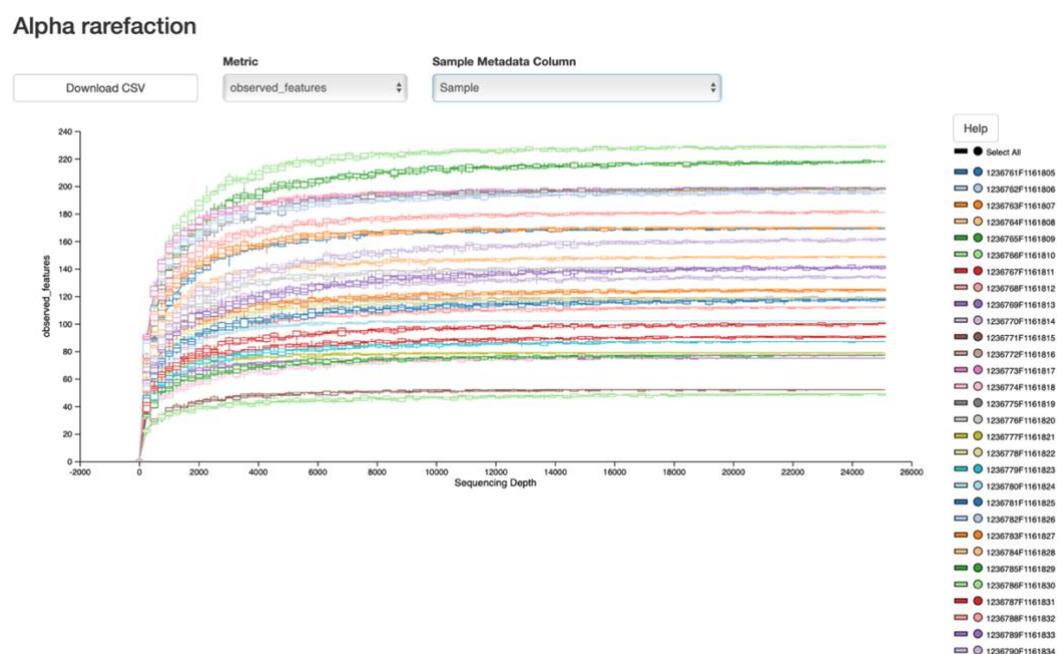


Figura 2. Il grafico mostra una curva di rarefazione per ciascun campione. Secondo la metrica “observed-feature”, in cui vengono prese in considerazione le singole sequenze, si nota come il plateau venga raggiunto per un numero minimo di reads di 6000.

Utilizzando invece l'indice di Shannon, che permette di valutare anche la biodiversità e l'omogeneità delle sequenze ottenute, il plateau si raggiunge con una profondità di sequenziamento di 2000 bp.

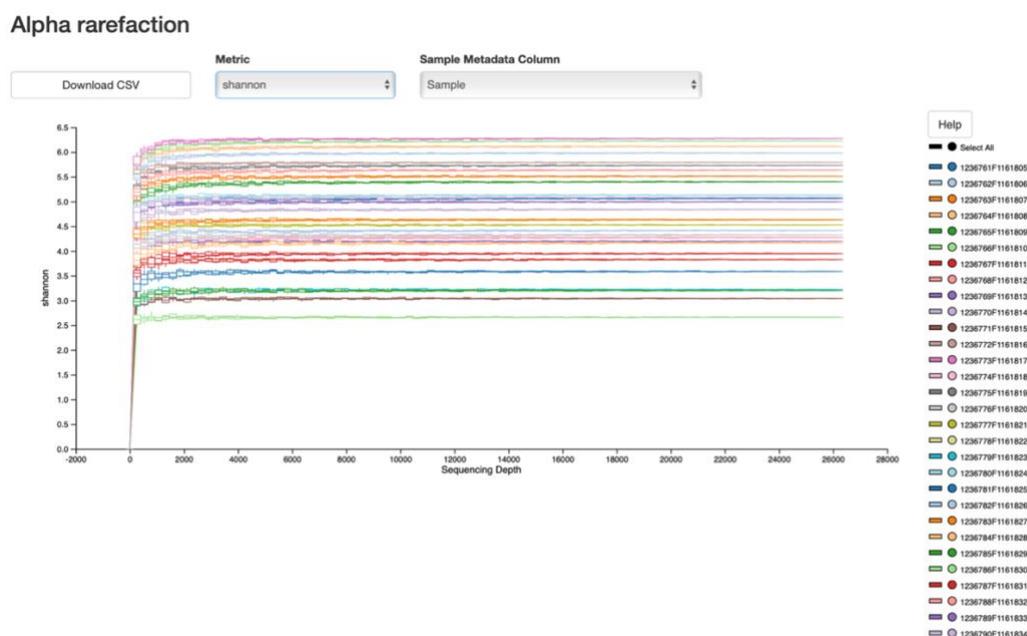


Figura 3. Rarefaction curve secondo la metrica di Shannon. Si denota che il plateau viene raggiunto già a 2000 sequenze.

Dendrogram heatmap

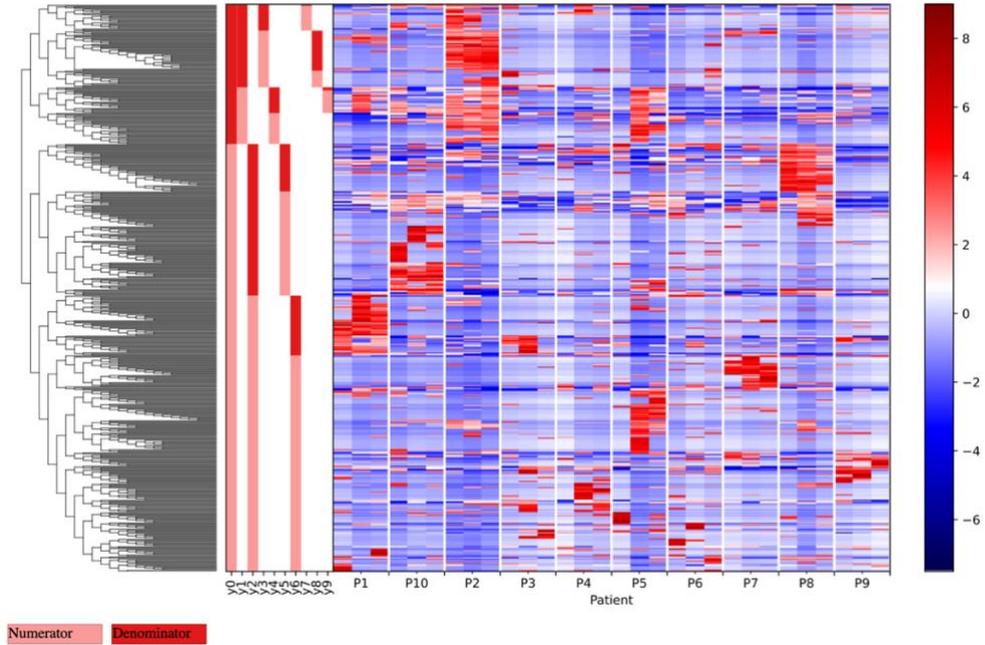


Figura 4. Dendrogram Heatmap:

I dati ricavati dall'analisi bioinformatica è possibile visualizzarli tramite grafici come quello raffigurato in figura 7 (barplot), dove si può osservare la biodiversità batterica per ciascun campione e osservarne la relativa abbondanza. Come mostrato in figura 7, vediamo rappresentati i batteri presenti nei 30 campioni al livello tassonomico corrispondente all'Ordine.

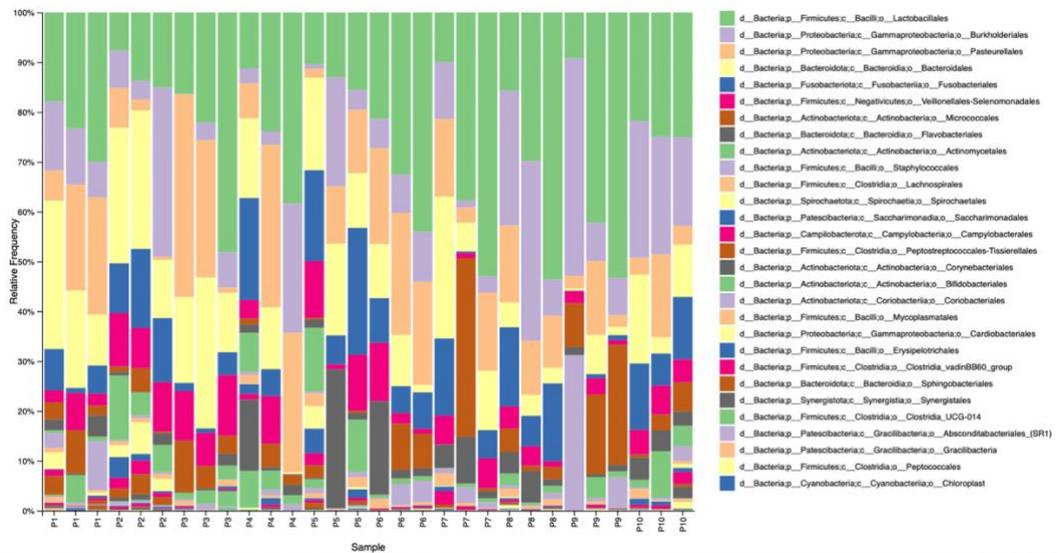


Figura 5. Il barplot della figura mostra per ciascun campione i batteri identificati dall'analisi del microbiota in seguito all'assegnamento della tassonomia con il database Silva v.138. In figura vediamo rappresentata la tassonomia per i primi quattro livelli tassonomici (Dominio, Phylum, Classe, Ordine). Sull'asse x del grafico sono presenti i 30 campioni; sull'asse y vediamo la frequenza o abbondanza relativa.

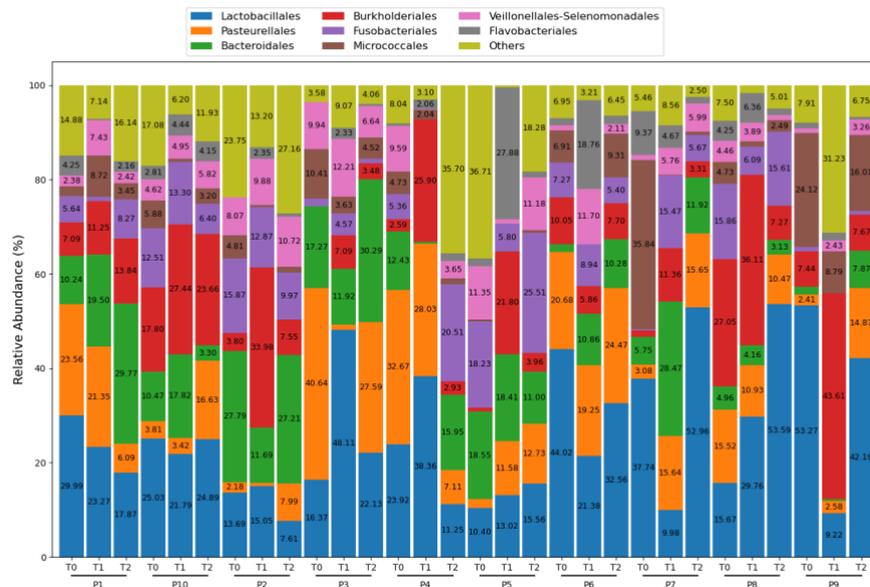


Figura 6. L'istogramma in figura mostra gli 8 batteri più abbondanti (classificati a livello di Ordine) identificati nell'intero set di campioni nei 3 tempi diversi.

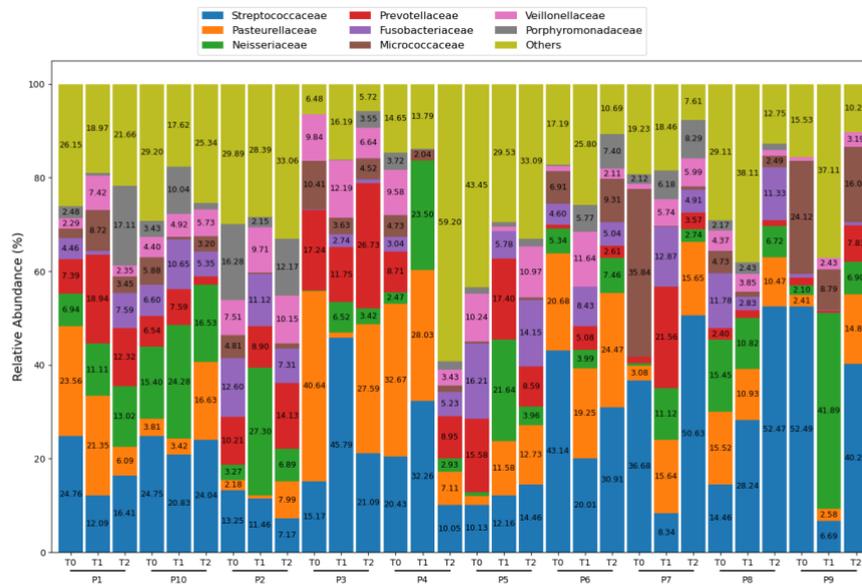


Figura 7. L'istogramma in figura mostra gli 8 batteri più abbondanti (classificati a livello di Famiglia) identificati nell'intero set di campioni.

Alpha diversity:

L'alpha diversity mette in evidenza la biodiversità dei campioni analizzati. Nel nostro caso si nota come le specie batteriche si riducono sia in numero che in variabilità in T1 rispetto a T0 (quindi in seguito a terapia antibiotica e clorexidina), e i 3 tempi non presentano differenze risultando così paragonabili.

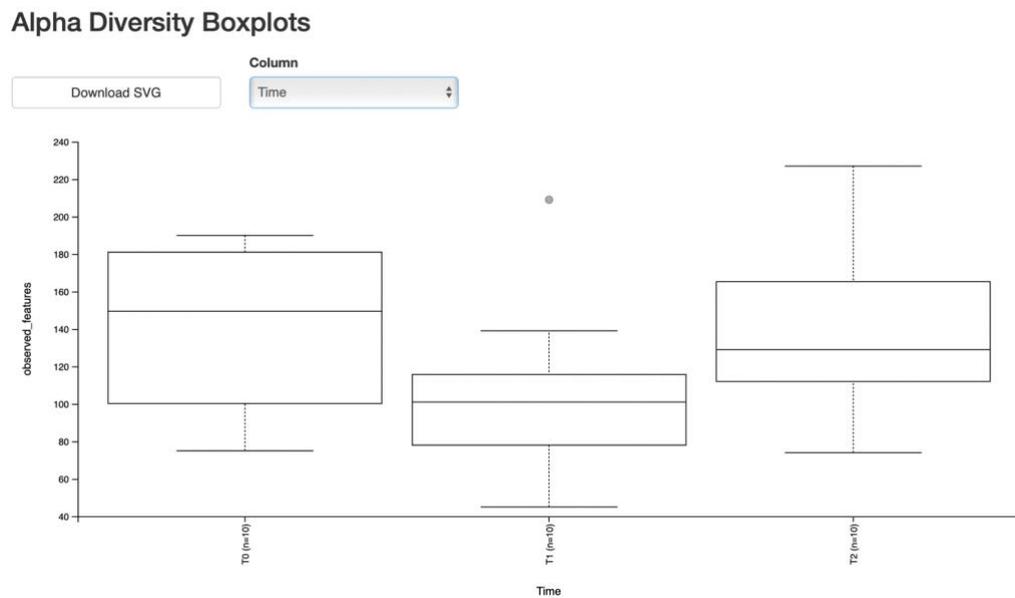


Figura 8. Alpha Diversity Boxplot raffigurante la variabilità batterica nei 3 tempi di studio (T0, T1 e T2).

Kruskal-Wallis (all groups)

	Result
H	3.668083685733354
p-value	0.1597665098746102

Tabella 3. La tabella mostra un p-value non significativo applicando il test di Kruskal-Wallis, che verifica l'uguaglianza delle mediane tra i vari gruppi.

Utilizzando l'analisi di Shannon per la alpha diversity sono stati ottenuti risultati non significativi, ma è possibile vedere come siano diverse tra i pazienti la numerosità e l'eterogeneità delle specie presenti.

Alpha Diversity Boxplots

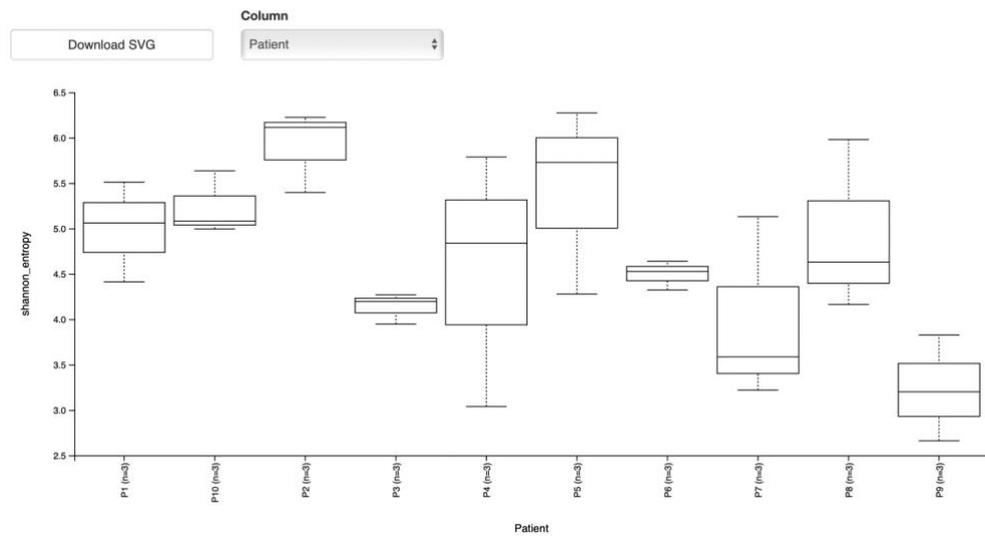


Figura 9. Alpha Diversity Boxplot raffigurante la variabilità batterica nei diversi campioni.

Kruskal-Wallis (all groups)

	Result
H	16.380645161290346
p-value	0.059345818178287116

Tabella 4. La tabella mostra un p-value non significativo applicando il test di Kruskal-Wallis.

Beta diversity:

Con la beta diversity (Bray-Curtis metric) non sono state rilevate differenze significative ($p=0.186$) nei tre diversi tempi (T0, T1 e T2) (tabella 8) e, l'impronta del microbiota residente dell'individuo rimane senza perturbazioni rilevabili, indipendentemente da terapia antibiotica e clorexidina e probiotico (figura 12).



Overview

PERMANOVA results	
method name	PERMANOVA
test statistic name	pseudo-F
sample size	30
number of groups	3
test statistic	1.157456
p-value	0.186
number of permutations	999

Tabella 5. Beta-diversity: test di PERMANOVA per il confronto tra gruppi (Bray-Curtis metric)

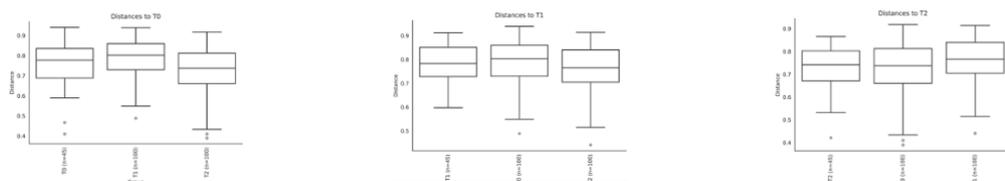


Figura 10. Grafico della significatività dei gruppi: nessuno dei tre confronti valutati mostra differenze significative.

La stessa valutazione è stata eseguita con la metrica Unweighted Unifrac, la quale non ha riportato anch'essa differenze significative tra i differenti gruppi.



Overview

	PERMANOVA results
method name	PERMANOVA
test statistic name	pseudo-F
sample size	30
number of groups	3
test statistic	1.291863
p-value	0.199
number of permutations	999

Tabella 6. Beta-diversity basata sulla metrica “unweighted Unifrac. Test di PERMANOVA per il confronto tra gruppi (Unweighted Unifrac metric)

Secondo l’analisi statistica della beta diversity basata sulla metrica Weighted Unifrac, non sono state riscontrate differenze significative tra i differenti gruppi.



Overview

	PERMANOVA results
method name	PERMANOVA
test statistic name	pseudo-F
sample size	30
number of groups	3
test statistic	0.975484
p-value	0.437
number of permutations	999

Tabella 7. Beta-diversity basata sulla metrica “weighted Unifrac”.

Alpha diversity longitudinal analysis:

È stata effettuata l'analisi longitudinale alpha diversity basata sulle differenze a coppie tra i diversi Tempi (T0, T1 e T2) con metrica observed featured index.

Alpha diversity longitudinal analysis t1 t0:

L'analisi longitudinale dell'alpha diversity ha mostrato differenze significative ($p=0,02$) tra i campioni del gruppo T1 e i campioni del gruppo T0, come riportato in tabella 11.



Paired difference tests			
Metric	Difference in observed_features (Time T1 - Time T0)		
Group column	None		
State column	Time		
State 1	T0		
State 2	T1		
Individual ID column	Patient		
Parametric	False		
Replicates handling	error		

Pairwise difference tests			
Group	W (wilcoxon signed-rank test)	P-value	FDR P-value
all subjects	6.0	0.027344	0.027344

Tabella 8. Analisi longitudinale a coppie dell'alpha diversity valutata nei gruppi T1 e T0.

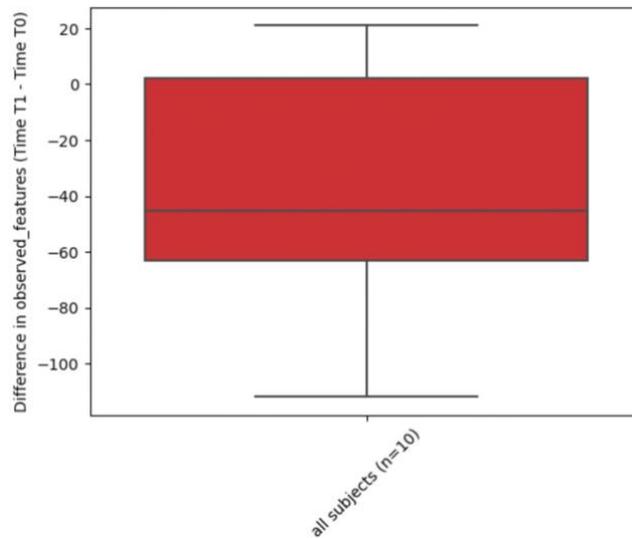


Figura 11. Boxplot dell'analisi longitudinale a coppie dell'alpha diversity valutata nei gruppi T1 e T0.

Alpha diversity longitudinal analysis t2 t0:

L'analisi longitudinale alpha diversity non ha mostrato differenze significative ($p=0,92$) tra T2 e T0

qime2

Paired difference tests	
Metric	Difference in observed_features (Time T2 - Time T0)
Group column	None
State column	Time
State 1	T0
State 2	T2
Individual ID column	Patient
Parametric	False
Replicates handling	error

Pairwise difference tests			
Group	W (wilcoxon signed-rank test)	P-value	FDR P-value
all subjects	26.0	0.921875	0.921875

Tabella 9. Analisi longitudinale a coppie dell'alpha diversity valutata nei gruppi T2 e T0.

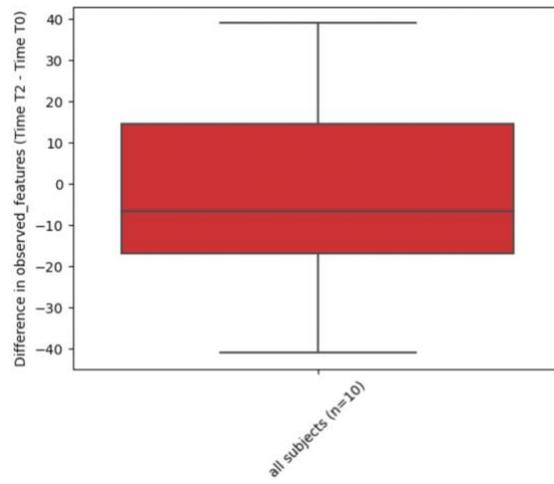


Figura 12. Boxplot dell'analisi longitudinale a coppie dell'alpha diversity valutata nei gruppi T2 e T0.

Alpha diversity longitudinal analysis t2 t1

L'analisi longitudinale alpha diversity ha mostrato differenze significative ($p=0,01$) tra T2 e T1



Paired difference tests			
Metric	Difference in observed_features (Time T2 - Time T1)		
Group column	None		
State column	Time		
State 1	T1		
State 2	T2		
Individual ID column	Patient		
Parametric	False		
Replicates handling	error		

Pairwise difference tests			
Group	W (wilcoxon signed-rank test)	P-value	FDR P-value
all subjects	5.0	0.019531	0.019531

Tabella 10. Analisi longitudinale a coppie dell'alpha diversity valutata nei gruppi T2 e T1.

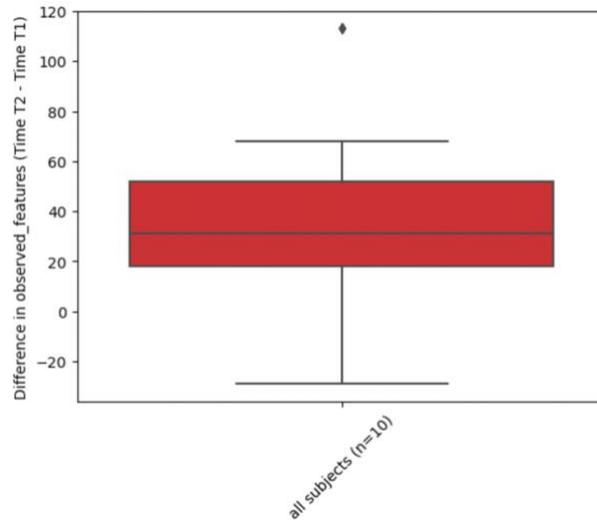


Figura 13. Boxplot dell'analisi longitudinale a coppie dell'alpha diversity valutata nei gruppi T2 e T0.

Differenze:

Analisi dell'abbondanza differenziale a vari livelli (caratteristiche, specie, genere, famiglia, phylum) utilizzando il plug-in ANCOM.

Le sequenze ottenute al termine dell'analisi bioinformatica sono state catalogate utilizzando la banca dati Silva (<https://www.arb-silva.de>). Tramite l'utilizzo del plug-in Ancom del software (Qiime2 <https://qiime2.org>) è stata eseguita l'analisi dell'abbondanza differenziale a livello di caratteristiche, specie, genere, famiglia. È stata analizzata la presenza di differenze significative tra tre diversi intervalli di tempo: T0 vs T1, T1 vs T2 e T2 vs T0.

Sono riportati di seguito i risultati ottenuti a livello di famiglia rappresentati per mezzo della metrica Volcano.

Analisi dell'abbondanza differenziale a livello di famiglia T0 vs T1:

L'analisi dell'abbondanza differenziale delle diverse famiglie batteriche, presenti negli intervalli T0 e T1 messi a paragone, ha mostrato differenze significative.



ANCOM Volcano Plot

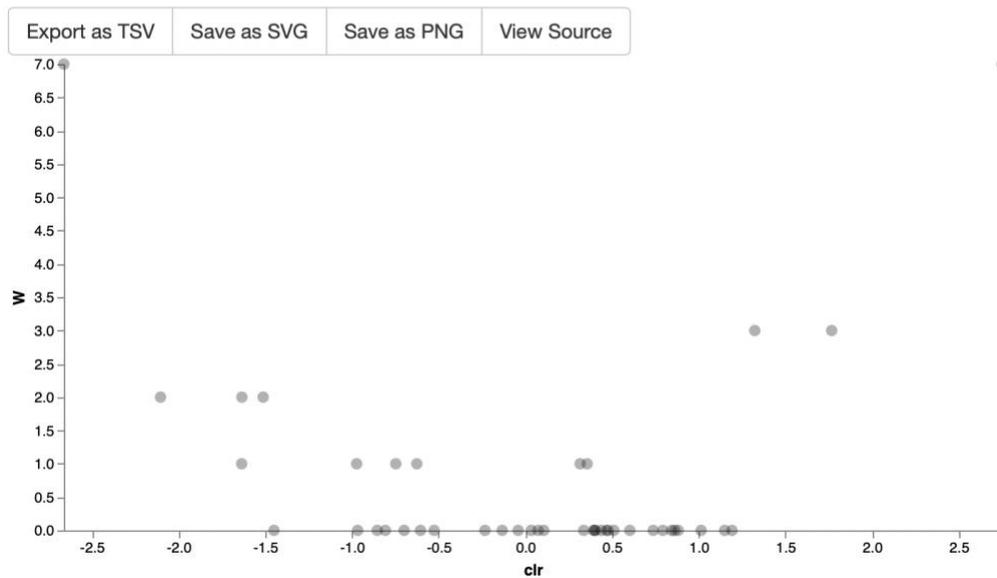


Figura 14. ANCOM Volcano plot: grafico a livello della famiglia dei gruppi T0 vs T1.

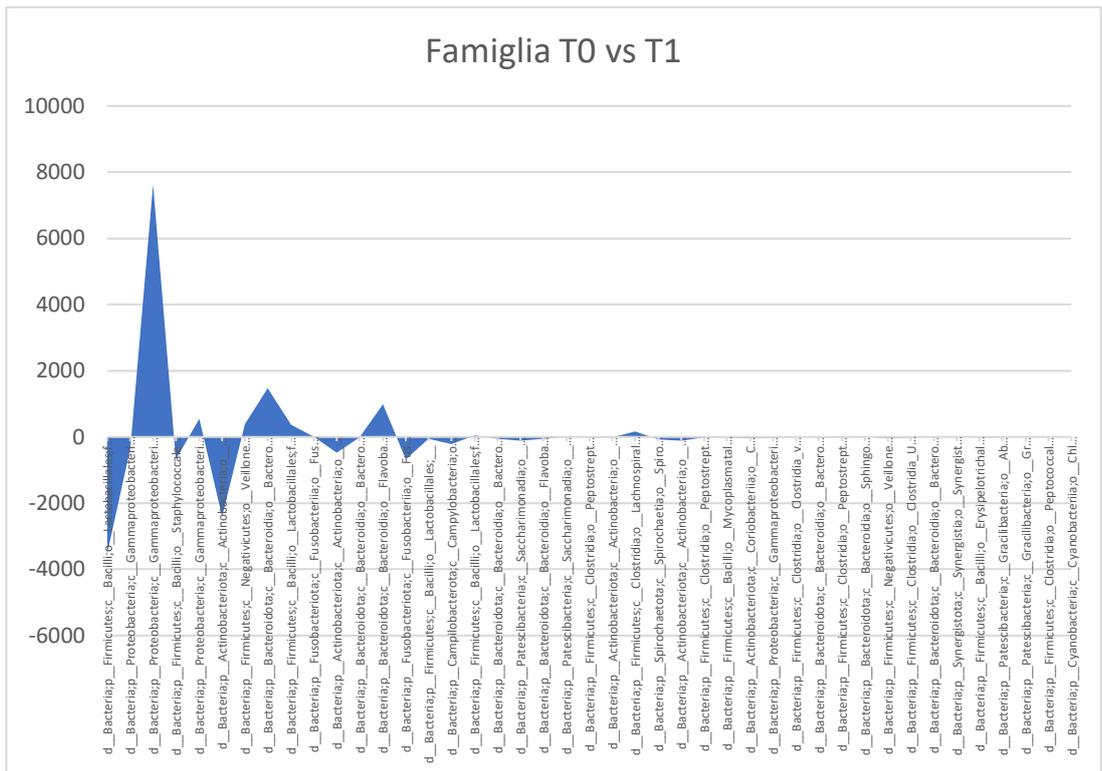


Figura 17. Specie batteriche la cui differenza è risultata significativatra To e T1

Analisi dell'abbondanza differenziale a livello di famiglia T1 vs T2:

L'analisi dell'abbondanza differenziale delle diverse famiglie batteriche, presenti negli intervalli T1 e T2 messi a paragone, ha mostrato differenze significative.



ANCOM Volcano Plot

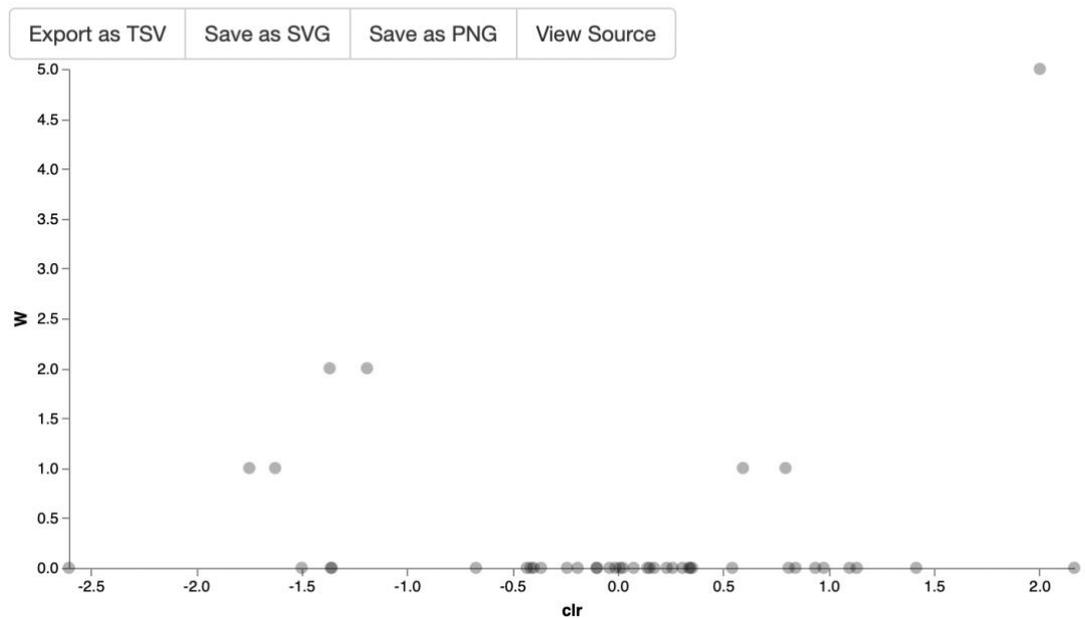


Figura 18. ANCOM Volcano plot: grafico a livello della famiglia dei gruppi T1 vs T2.

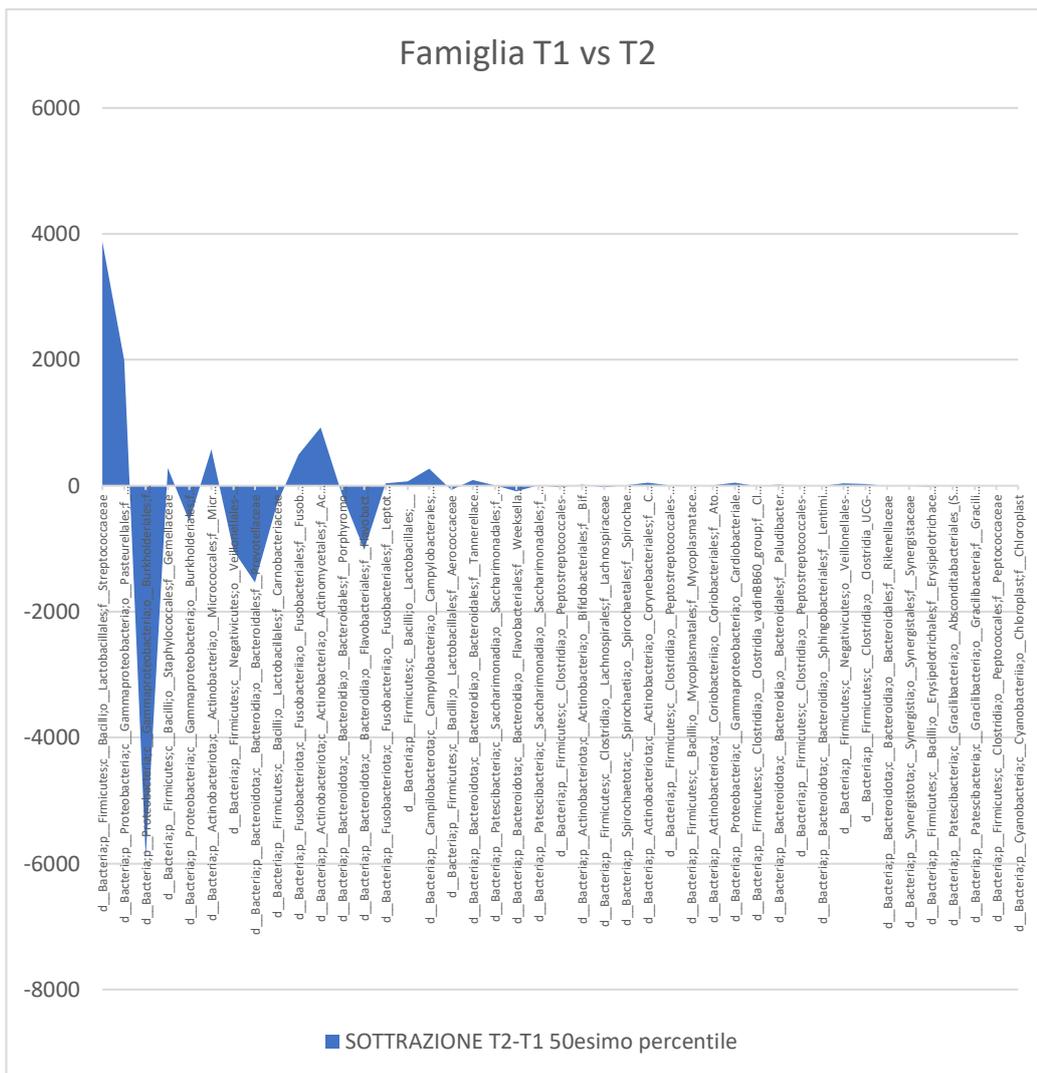


Figura 19. Specie batteriche la cui differenza è risultata significativa tra T1 vs T2

Analisi dell'abbondanza differenziale a livello di famiglia T0 vs T2:

L'analisi dell'abbondanza differenziale delle diverse famiglie batteriche, presenti negli intervalli T0 me T2 messi a paragone, non ha mostrato differenze significative.



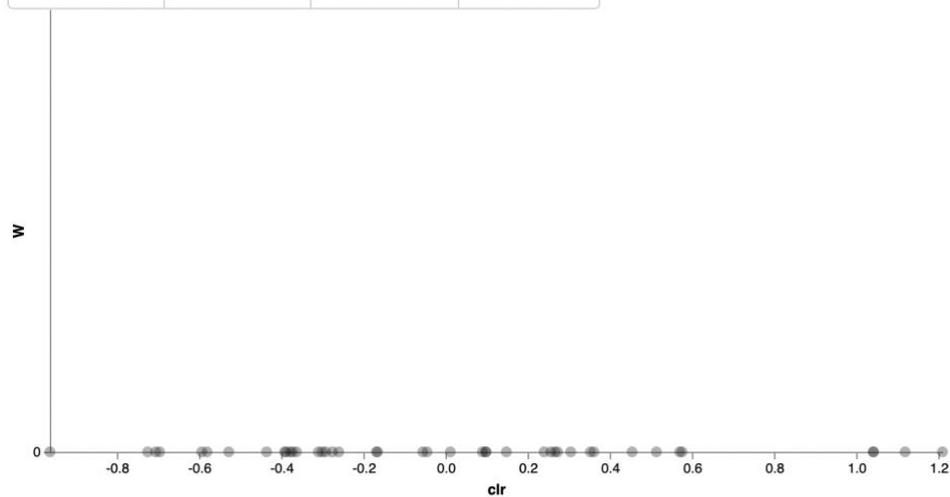
ANCOM Volcano Plot

Export as TSV

Save as SVG

Save as PNG

View Source



ANCOM statistical results

No significant features found

Percentile abundances of features by group

No significant features found

Figura 20. ANCOM Volcano plot: grafico a livello della famiglia dei gruppi T0 vs T2.

Interactive tree of life:

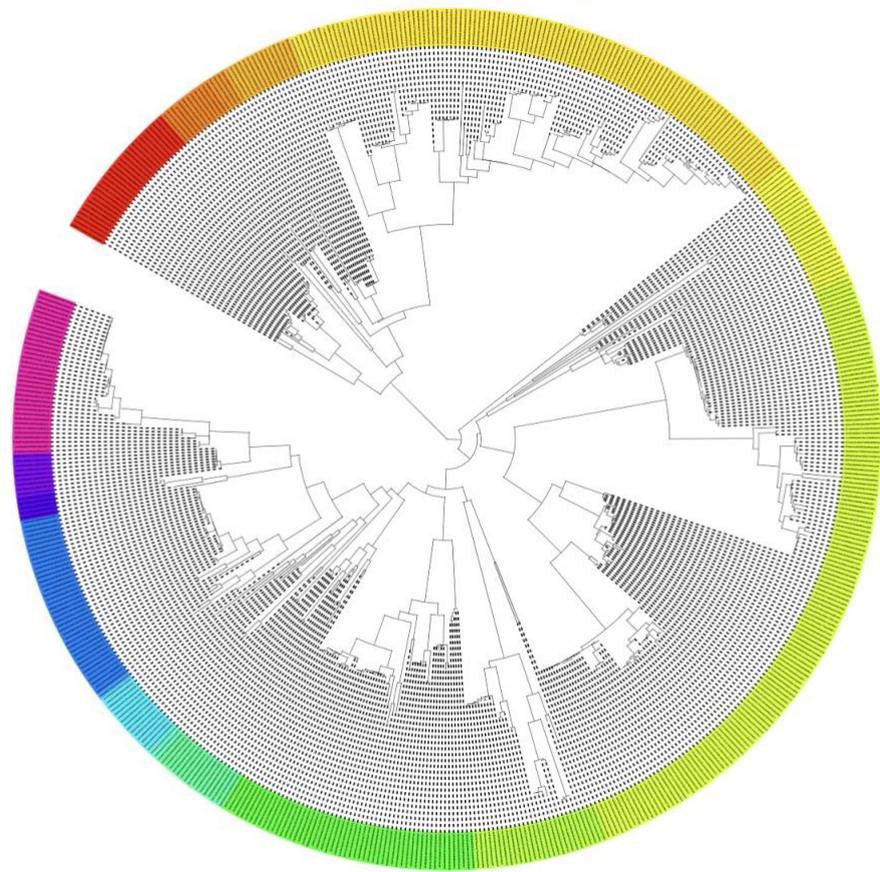


Figura 21. Interactive tree of life. Rooted tree built on final feature sequence (<https://itol.embl.de>).

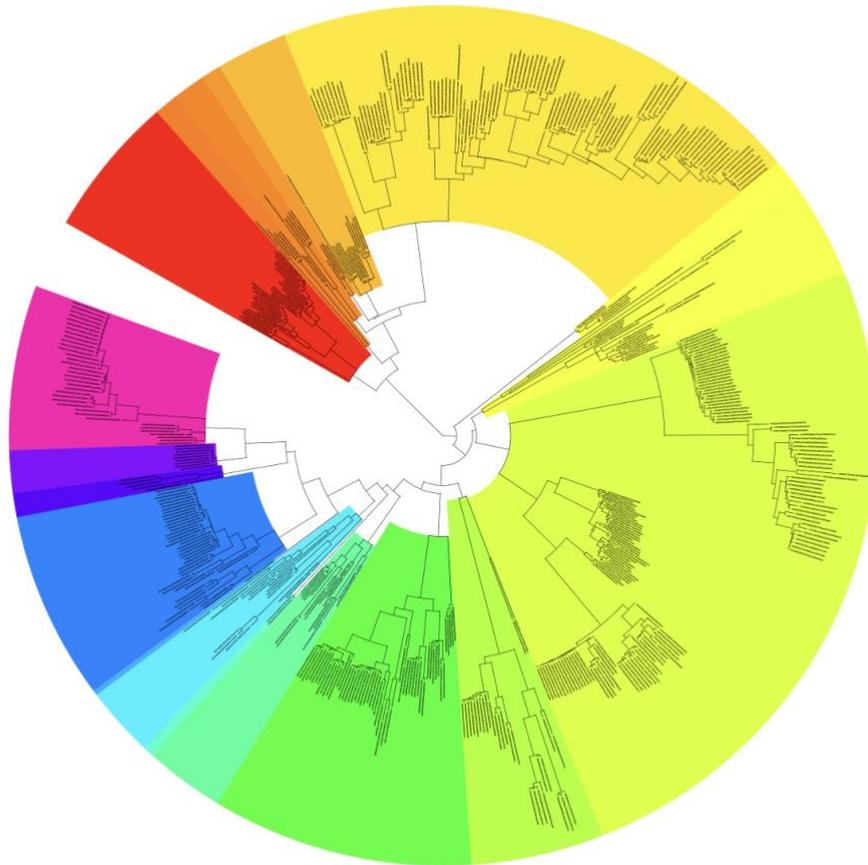


Figura 22. Interactive tree of life. Rooted tree built on final feature sequence (<https://itol.embl.de>).

DISCUSSIONE

L'analisi bioinformatica del microbiota è stata in grado di riconoscere dei campioni analizzati la biodiversità batterica presente negli stessi, ricavandone poi i batteri più abbondanti nei pazienti dello studio. Da una prima analisi dell'alpha-diversity (curva di rarefazione) è stato inoltre possibile verificare la capacità del sequenziamento nel rilevare tutte le sequenze batteriche presenti nei campioni studiati.

Dall'analisi statistica del dato abbiamo riscontrato una riduzione delle frequenze batteriche sia dal punto di vista numerico (abbondanza assoluta), sia in termini di variabilità nel confronto tra i gruppi T0 e T1.

L'analisi della biodiversità del campione, valutata tramite l'alpha diversity, non ha riportato significatività né con metrica observed features né con la metrica Shannon ma si può già intravedere come l'azione dell'antibiotico e della clorexidina agisca modificando anche l'eterogeneità della specie.

Con l'analisi longitudinale alpha diversity, basata sulle differenze a coppie tra i diversi tempi, sono stati ottenuti risultati significativi utilizzando la metrica observed features, ma gli stessi risultati non risultano significativi se viene utilizzata la metrica Shannon.

Il confronto a coppie tra i due gruppi T1 e T0 è risultato essere significativo con un p-value pari a 0,02, così come nel confronto tra i gruppi T2 con T1 ($p=0,019$); mentre il confronto T2 con T0 non è risultato significativo, riportando un p-value di 0,92.

Andando a valutare singolarmente i risultati ottenuti è possibile confermare che, a seguito di un intervento odontoiatrico, la terapia antibiotica ha un'azione anche sulla flora del cavo orale.

Nell'analisi di quest'ultimo data bisogna tuttavia tenere presente che tra T1 e T0 i pazienti sono stati sottoposti anche a terapia antisettica con Clorexidina allo 0,2%.

Pertanto, per interpretare correttamente il dato, sarebbe necessario analizzare separatamente quale sia l'effettiva perturbazione del microbiota orale creata dal solo antibiotico e quale invece come effetto del solo antisettico utilizzato. In letteratura sono già presenti diversi studi che hanno valutato l'effetto della somministrazione di antibiotici sul microbiota orale.

Da questi articoli è emerso che la somministrazione di antibiotici, indipendentemente dal tipo di principio attivo utilizzato, provoca un aumento della diversità batterica. Questo è probabilmente attribuibile alla formazione di comunità di batteri resistenti agli antibiotici negli organismi³¹.

Questo aumento ³² della diversità del microbiota orale non è favorevole all'ospite, perché l'ecologia del microbiota e le vie funzionali sono strettamente correlate al microbiota orale primitivo. La alpha diversity ³³ tassonomica e funzionale tra le comunità di microbiota è risultata significativamente correlata ³⁴.

Anche l'effetto della Clorexidina è stato ampiamente studiato in letteratura, e rappresenta tutt'ora il gold standard degli antisettici per la disinfezione del cavo orale.

In diversi articoli viene descritto come la Clorexidina crei una diminuzione del pH della saliva e una riduzione della sua capacità tampone, accompagnata da un aumento dei livelli di lattato e glucosio nella saliva. Sono state anche riscontrate concentrazioni inferiori di nitriti.

In uno studio è riportato che la Clorexidina ha aumentato significativamente l'abbondanza di Firmicutes e proteobacteria e ha ridotto il contenuto di Bacteroides, TM7, SR1 e Fusobacteria ³⁵.

Nel complesso quindi la terapia antisettica con un collutorio contenente Clorexidina è associato a un importante cambiamento nel microbioma salivare, portando a condizioni più acide e una minore disponibilità di nitriti negli individui sani ^{36,37}.

Le differenze che sono state quindi rilevate tra gli intervalli di tempo T1 e T0 dello studio risultano in linea con quanto riportato in letteratura.

Dallo studio è emersa anche una significatività ($p = 0,019$) nell'analisi longitudinale della alpha diversity secondo la metrica observed features tra i due intervalli T2 e T1.

È stata quindi rilevata una differenza significativa tra le sequenze batteriche isolate, al termine della terapia antibiotica e antisettica, e tra quelle ottenute dopo 28 giorni di terapia probiotica.

Anche per questa significatività ottenuta è possibile identificare due criticità fondamentali.

In primo luogo, bisognerebbe poter valutare se anche in un gruppo di pazienti, che potrebbe essere definito "controllo", il microbiota orale presenti una differenza significativa dopo quattro settimane dal termine della terapia antibiotica e antisettica.

È infatti interessante comprendere se alla base della riorganizzazione dell'"asset" della flora batterica orale ci siano determinate specie batteriche facenti parte del microbioma primitivo.

Il secondo aspetto da considerare è rappresentato dalla possibilità di confrontare i risultati ottenuti dopo 28 giorni di terapia con assunzione di probiotici con quelli del cosiddetto gruppo "controllo" per valutare come la somministrazione di determinati gruppi microbici possa influire positivamente sul ristabilimento di un ecosistema orale di "eubiosi".

Il trattamento con probiotici è stato proposto per la prima volta in medicina all'inizio del XIX secolo. Da allora numerosi studi hanno mostrato modificazioni nel microbiota di diversi distretti corporei, tra cui quello orale, suggerendo gli effetti positivi di alcuni probiotici.

La maggior parte degli studi non ha riportato alcun impatto sul microbiota. Il loro meccanismo d'azione, infatti, non risiede tanto nella loro capacità di innestarsi nel microbiota, ma piuttosto nella condivisione di geni e metaboliti, nel supportare il microbiota con cui entrano in competizione e nell'influenzare direttamente le cellule epiteliali e immunitarie ³⁸.

Nell'analisi longitudinale della alpha diversity non è stata ottenuta una differenza significativa ($P= 0,92$) tra le reads di T2 e T0.

Se non sono presenti differenze significative in termini di varietà e abbondanza delle reads tra i due intervalli, significa che, terminata la terapia post-operatoria, dopo 28 giorni è possibile ottenere valori sovrapponibili tra T2 e T0. Resta da chiarire in che entità questi risultati tra T2 e T0, non significativi anche nell'analisi di alpha diversity, siano da attribuire all'azione del probiotico utilizzato.

In letteratura sono presenti diversi studi che analizzano l'azione di *Bifidobacterium lactis* HN019 e *Kluyveromyces marxianus fragilis* B0399. Il probiotico utilizzato nel nostro studio conteneva *Bifidobacterium lactis* HN019 E *Kluyveromices marxianus fragilis*.

In letteratura sono già presenti diversi lavori scientifici aventi come oggetto l'utilizzo di *Bifidobacterium lactis* HN019 per il trattamento delle disbiosi sia a livello gastrointestinale, che a livello del cavo orale ³⁸.

In studi clinici e preclinici ^{39, 40} sono state dimostrate le proprietà antibatteriche e immunoinfiammatorie di *Bifidobacterium lactis* HN019. Esso agisce positivamente sul sistema immunitario aumentando l'attività linfocitaria e la capacità fagocitaria dei monociti a livello del circolo ematico periferico.

In uno studio che analizzava l'effetto di *Bifidobacterium lactis* HN019 sulla parodontite indotta in ratti con artrite reumatoide sono state riscontrate anche una diminuzione dei livelli di $TNF\alpha$ e un aumento dei livelli di interleuchina 17 nei tessuti gengivali degli animali con parodontite ⁴¹. Questo può indicare un effetto protettivo della citochina sopramenzionata sull'infezione parodontale.

Negli animali trattati con il probiotico era presente anche un aumento del rapporto tra specie batteriche aerobie e anaerobiche.

Pertanto, Il trattamento con HN019 ha portato a una diminuzione delle specie microbiche parodontopatogene e ad un aumento delle specie compatibili con la salute parodontale. Da studi in vitro HN019 ha inibito anche la crescita delle più conosciute specie associate alla parodontite: *Porphyromonas*

gingivalis, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella intermedia*. È stato quindi confermato l'effetto protettivo di *Bifidobacterium lactis* HN019 ⁴².

In altri studi clinici sull'uomo è stata dimostrata la capacità di HN019 di migliorare gli esiti della terapia parodontale e riequilibrare il microbiota. Induce infatti una maggior quota di batteri non parodontopatogeni (*Actinomyces* e *Streptococchi*) e determina una minor porzione di patogeni nella placca sopra e sotto gengivale (*Veillonella parvula*, *Capnocytophaga sputigena*, *Eikenella corrodens*, *Prevotella intermedia*)⁴³.

Bifidobacterium lactis HN019 svolge anche un'azione protettiva nei confronti dell'osso alveolare e del tessuto connettivale modificando i parametri microbiologici e immunoinfiammatori; abbassa la presenza di interleuchine e mediatori di riassorbimento osseo e tissutale (*RANKL*) ⁴⁴.

Kluyveromyces marxianus fragilis B0399 è il primo lievito non *Saccharomyces* approvato per uso probiotico nell'alimentazione umana. È stata dimostrata la sua azione di contrasto dell'alitosi.

Kluyveromyces marxianus fragilis B0399 aumenta la concentrazione di buona flora intestinale endogena e riduce la presenza di agenti patogeni e la loro produzione di Composti Volatili dello Zolfo (VSC). Inoltre, questo *Kluyveromyces* contrasta la crescita di altri lieviti, compresa la *Candida* ⁴⁵.

CONCLUSIONI

La composizione del microbioma varia ampiamente da persona a persona. Purtroppo, finché non verrà completato l'“Human Microbiome Project”, resterà preclusa la possibilità di identificare caratteristiche che segnalino un microbioma sano.

Le ultime teorie ipotizzano che, un cambiamento nella comunità microbica orale possa far esprimere i batteri virulenti, provocando l'insorgenza malattie orali.

L'estrazione del dente del dente del giudizio, in inclusione ossea parziale o totale, rappresenta ancora oggi uno degli interventi chirurgici odontoiatrici più frequentemente eseguiti.

Attraverso l'utilizzo delle moderne tecniche di analisi bioinformatica del dna batterico 16s NGS è possibile ottenere un campione più ampio ed eterogeneo da studiare, rispetto alle tecniche molecolari e colturali, utilizzate in passato. Con questo studio è stato possibile apprezzare il modo in cui l'utilizzo della terapia antibiotica e della clorexidina, a seguito di un intervento odontoiatrico di routine, provochi una significativa modifica a livello del microbiota orale, senza però andare ad alterare in modo significativo il microbiota primitivo residente del cavo orale.

Grazie alla analisi realizzata è possibile, pertanto, sostenere che l'utilizzo del probiotico a seguito della terapia antibiotica e antisettica sia in grado di agevolare il riequilibrio delle specie microbiche, andando nello specifico a favorire l'eubiosi precedentemente presente nei pazienti trattati.

Tale studio può essere considerato uno studio pilota poiché è stato eseguito su un campione di dieci pazienti.

Al fine di aumentare la potenza statistica della ricerca e definire le dinamiche specifiche innescate dai diversi dispositivi e farmaci utilizzati, sarà opportuno ampliare il numero di individui e creare un più ampio gruppo di controllo.

BIBLIOGRAFIA

- 1) La Placa. Book: "Principi di microbiologia medica." XIV ed. Esculapio. Set. 2014.
- 2) Lederberg J, McCray AT. 2001. 'Ome Sweet 'Omics-a genealogical treasury of words. *Scientist* 15: 8.
- 3) Janssens Y, Nielandt J, Bronselaer A, Debunne N, Verbeke F, Wynendaele E, Van Immerseel F, Vandewynckel YP, De Tré C, De Spiegeleer B. Disbiome database: linking the microbiome to disease. *BMC Microbiol.* 2018 Jun 4;78(1):50. doi:10.1186/s12866-018-1197-5
- 4) Haro C, Rangel-Zúñiga OA, Alcalá-Díaz JF, et al. Intestinal Microbiota Is Influenced by Gender and Body Mass Index. Sanz Y, ed. *PLOS ONE.* 2016,11(5).e0154090. doi:70.1371/journal.pone.0154090.
- 5) Thomas S, Izard J, Walsh E, et al. The Host Microbiome Regulates and Maintains Human Health: A Primer and Perspective for Non-Microbiologists. *Cancer research.* 2017;77(8):1783-1812. doi:70.1158/0008-5472.CAN-16-2929.
- 6) Ward TL, Dominguez-Bello MC, Heisel T, A/-Chalith C, Knights D, Gale CA. Development of the Human Myco biome over the First Month of Life and across Body Sites. *mSystems.* 2018 Mar 6,3(3). pii: e00140-17. doi: 10.1128/mSystems.00140-17.
- 7) Combellick JL, Shin H, Shin D, Cai Y, Hagan H, Lacher C, Lin DL, McCauley K, Lynch SV, Dominguez-Bello MG. Differences in the fecal microbiota of neonates born at home or in the hospital. *Sci Rep.* 2018 Oct 23;8(1):15660. doi:10.1038/s41598-018-33995-
- 8) Shi W, Tian J, Xu H, Zhou Q, Qin M. Distinctions and associations between the microbiota of saliva and supra- gingival plaque of permanent and deciduous teeth. *PLos One.* 2018 Jul 6;13(7)e0200337. doi: 10.1371/journal.pone.0200337. eCollection 2018.
- 9) Campbell K. Oral microbiome findings challenge dentistry dogma. *Nature.* 2021 Oct 27. doi: 10.1038/d41586-021-02920-w. Epub ahead of print. PMID: 34707271.
- 10) Valm AM, Mark Welch JL, Rieken CW, Hasegawa Y, Sogin ML, Oldenbourg R, Dewhirst FE, Borisy GG. Systems-level analysis of microbial community

- organization through combinatorial labeling and spectral imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 8;108(10):4152-7. doi: 10.1073/pnas.1101134108. Epub 2011 Feb 16. PMID: 21325608; PMCID: PMC3054005.
- 11) Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Med*. 2016 Apr 27;8(1):51. doi: 10.1186/s13073-016-0307-y. PMID: 27122046; PMCID: PMC4848870.
 - 12) Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium. The Integrative Human Microbiome Project. *Nature*. 2019 May;569(7758):641-648. doi: 10.1038/s41586-019-1238-8. Epub 2019 May 29. PMID: 31142853; PMCID: PMC6784865.
 - 13) Kilian M. The oral microbiome - friend or foe? *Eur J Oral Sci*. 2018 Oct;126 Suppl 1:5-12. doi: 10.1111/eos.12527. PMID: 30178561.
 - 14) Willis JR, Gabaldón T. The Human Oral Microbiome in Health and Disease: From Sequences to Ecosystems. *Microorganisms*. 2020 Feb 23;8(2):308. doi: 10.3390/microorganisms8020308. PMID: 32102216; PMCID: PMC7074908.
 - 15) Valm AM, Mark Welch JL, Rieken CW, Hasegawa Y, Sogin ML, Oldenbourg R, Dewhirst FE, Borisy GG. Systems-level analysis of microbial community organization through combinatorial labeling and spectral imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 8;108(10):4152-7. doi: 10.1073/pnas.1101134108. Epub 2011 Feb 16. PMID: 21325608; PMCID: PMC3054005.
 - 16) Guarner F, Perdigon G, Corthier G, Salminen S, Koletzko B, Morelli L. Should yogurt cultures be considered probiotic? *Br J Nutr*. 2005 Jun;93(6):783-6. doi: 10.1079/bjn20051428. PMID: 16022746.
 - 17) Teughels W, Loozen G, Quirynen M. Do probiotics offer opportunities to manipulate the periodontal oral microbiota? *J Clin Periodontol*. 2011 Mar;38 Suppl 11:159-77. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01665.x. PMID: 21323712.
 - 18) L. Lingam, T. Ramesh, R. Lavanya, Bacteria in oral health-probiotics and prebiotics a review, *Int. J. Biol. Med. Res.* 2 (4) (2011) 1226–1233.
 - 19) Meurman JH, Stamatova I. Probiotics: contributions to oral health. *Oral Dis*. 2007 Sep;13(5):443-51. doi: 10.1111/j.1601-0825.2007.01386.x. PMID: 17714346.
 - 20) Slavin J. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients*. 2013 Apr 22;5(4):1417-35. doi: 10.3390/nu5041417. PMID: 23609775; PMCID: PMC3705355.
 - 21) Ohshima T, Kojima Y, Seneviratne CJ, Maeda N. Therapeutic Application of Synbiotics, a Fusion of Probiotics and Prebiotics, and Biogenics as a New Concept

- for Oral Candida Infections: A Mini Review. *Front Microbiol.* 2016 Jan 25;7:10. doi: 10.3389/fmicb.2016.00010. PMID: 26834728; PMCID: PMC4724717.
- 22) Y. Kojima, T. Ohshima, C.J. Seneviratne, N. Maeda, Combining prebiotics and probiotics to develop novel synbiotics that suppress oral pathogens, *J. Oral Biosci.* 58 (1) (2016) 27–32.
- 23) Zhang Y, Wang X, Li H, Ni C, Du Z, Yan F. Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomed Pharmacother.* 2018 Mar;99:883-893. doi: 10.1016/j.biopha.2018.01.146. Epub 2018 Feb 20. PMID: 29710488.
- 24) V. Slomka, E. Hernandez-Sanabria, E.R. Herrero, L. Zaidel, K. Bernaerts, N. Boon, M. Quirynen, W. Teughels, Nutritional stimulation of commensal oral bacteria suppresses pathogens: the prebiotic concept, *J. Clin. Periodontol.* 44 (4) (2017) 344–352.
- 25) Brookes ZLS, Belfield LA, Ashworth A, Casas-Agustench P, Raja M, Pollard AJ, Bescos R. Effects of chlorhexidine mouthwash on the oral microbiome. *J Dent.* 2021 Oct;113:103768. doi: 10.1016/j.jdent.2021.103768. Epub 2021 Aug 18. PMID: 34418463.
- 26) Arteagoitia MI, Barbier L, Santamaría J, Santamaría G, Ramos E. Efficacy of amoxicillin and amoxicillin/clavulanic acid in the prevention of infection and dry socket after third molar extraction. A systematic review and meta-analysis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2016 Jul 1;21(4):e494-504. doi: 10.4317/medoral.21139. PMID: 26946211; PMCID: PMC4920465.
- 27) Bui CH, Seldin EB, Dodson T. Types, frequencies, and risk factors for complications after third molar extraction. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;61:1379-89.
- 28) Kiencało A, Jamka-Kasprzyk M, Panaś M, Wszyńska-Pawełec G. Analysis of complications after the removal of 339 third molars. *Dent Med Probl.* 2021 Jan-Mar;58(1):75-80. doi: 10.17219/dmp/127028. PMID: 33789003.
- 29) Krekmanov L, Hallander HO. Relationship between bacterial contamination and alveolitis after third molar surgery. *Int J Oral Surg.* 1980 Aug;9(4):274-80. doi: 10.1016/s0300-9785(80)80034-2. PMID: 6780476.
- 30) Bailey E, Kashbour W, Shah N, Worthington HV, Renton TF, Coulthard P. Surgical techniques for the removal of mandibular wisdom teeth. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020 Jul 26;7(7):CD004345. doi: 10.1002/14651858.CD004345.pub3. PMID: 32712962; PMCID: PMC7389870.
- 31) Cheng X, He F, Si M, Sun P, Chen Q. Effects of Antibiotic Use on Saliva Antibody Content and Oral Microbiota in Sprague Dawley Rats. *Front Cell Infect Microbiol.*

- 2022 Jan 31; 12:721691. doi: 10.3389/fcimb.2022.721691. PMID: 35174102; PMCID: PMC8843035.
- 32)** Dudek-Wicher RK, Junka A, Bartoszewicz M. The influence of antibiotics and dietary components on gut microbiota. *Prz Gastroenterol.* 2018;13(2):85-92. doi: 10.5114/pg.2018.76005. Epub 2018 May 25. PMID: 30002765; PMCID: PMC6040098.
- 33)** Mushet, D.M., Solensky, M.J. & Erickson, S.F. Temporal gamma-diversity meets spatial alpha-diversity in dynamically varying ecosystems. *Biodivers Conserv* 28, 1783–1797 (2019). <https://doi.org/10.1007/s10531-019-01756-1>
- 34)** Freire M, Nelson KE, Edlund A. The Oral Host-Microbial Interactome: An Ecological Chronometer of Health? *Trends Microbiol.* 2021 Jun;29(6):551-561. doi: 10.1016/j.tim.2020.11.004. Epub 2020 Dec 2. PMID: 33279381.
- 35)** Bescos R, Ashworth A, Cutler C, Brookes ZL, Belfield L, Rodiles A, Casas-Agustench P, Farnham G, Liddle L, Burleigh M, White D, Easton C, Hickson M. Effects of Chlorhexidine mouthwash on the oral microbiome. *Sci Rep.* 2020 Mar 24;10(1):5254. doi: 10.1038/s41598-020-61912-4. PMID: 32210245; PMCID: PMC7093448.
- 36)** Chatzigiannidou I, Teughels W, Van de Wiele T, Boon N. Oral biofilms exposure to chlorhexidine results in altered microbial composition and metabolic profile. *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2020 Mar 20;6(1):13. doi: 10.1038/s41522-020-0124-3. PMID: 32198347; PMCID: PMC7083908.
- 37)** Brookes ZLS, Belfield LA, Ashworth A, Casas-Agustench P, Raja M, Pollard AJ, Bescos R. Effects of chlorhexidine mouthwash on the oral microbiome. *J Dent.* 2021 Oct; 113:103768. doi: 10.1016/j.jdent.2021.103768. Epub 2021 Aug 18. PMID: 34418463.
- 38)** Wieërs G, Belkhir L, Enaud R, Leclercq S, Philippart de Foy JM, Dequenne I, de Timary P, Cani PD. How Probiotics Affect the Microbiota. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020 Jan 15; 9:454. doi: 10.3389/fcimb.2019.00454. PMID: 32010640; PMCID: PMC6974441.
- 39)** Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML. Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly: an investigation of age-related immunological changes. *J Clin Immunol.* 2001 Jul;21(4):264-71. doi: 10.1023/a:1010979225018. PMID: 11506196.
- 40)** Ricoldi MST, Furlaneto FAC, Oliveira LFF, Teixeira GC, Pischiotini JP, Moreira ALG, Ervolino E, de Oliveira MN, Bogsan CSB, Salvador SL, Messoria MR. Effects

of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* on the non-surgical treatment of periodontitis. A histomorphometric, microtomographic and immunohistochemical study in rats. *PLoS One*. 2017 Jun 29;12(6):e0179946. doi:

10.1371/journal.pone.0179946. PMID: 28662142; PMCID: PMC5491108.

- 41)** Silva GA, Moreira ALG, Silva PHF, Salvador SL, Casarin RCV, Vicente RM, Ferreira GC, Tanus-Santos JE, Furlaneto FAC, Messora MR. The use of probiotics can reduce the severity of experimental periodontitis in rats with metabolic syndrome: An immunoenzymatic and microtomographic study. *J Periodontol*. 2022 Feb;93(2):e1-e12. doi: 10.1002/JPER.21-0285. Epub 2021 Nov 15. PMID: 34374081.
- 42)** Invernici MM, Furlaneto FAC, Salvador SL, Ouwehand AC, Salminen S, Mantziari A, Vinderola G, Ervolino E, Santana SI, Silva PHF, Messora MR. *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* HN019 presents antimicrobial potential against periodontopathogens and modulates the immunological response of oral mucosa in periodontitis patients. *PLoS One*. 2020 Sep 22;15(9):e0238425. doi: 10.1371/journal.pone.0238425. PMID: 32960889; PMCID: PMC7508403
- 43)** Oliveira LF, Salvador SL, Silva PH, Furlaneto FA, Figueiredo L, Casarin R, Ervolino E, Palioto DB, Souza SL, Taba M Jr, Novaes AB Jr, Messora MR. Benefits of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Probiotic in Experimental Periodontitis. *J Periodontol*. 2017 Feb;88(2):197-208. doi: 10.1902/jop.2016.160217. Epub 2016 Sep 23. PMID: 27660886.
- 44)** Cardoso RS, Messora MR, Silva PHF, Oliveira LF, Leite-Panissi C, Salvador S, Casarin R, Novaes AB Jr, Palioto DB, Furlaneto FAC. Effects of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 on ligature-induced periodontitis in rats with experimental rheumatoid arthritis. *Benef Microbes*. 2020 Feb 19;11(1):33-46. doi: 10.3920/BM2019.0038. Epub 2019 Dec 17. PMID: 32066256
- 45)** Cecchini, F., Nobili, A., Zanvit, A., Miclavez, A., & Nobili, P. (2018). Halitosis Treatment Through the Administration of Antibiotic-Resistant Probiotic Lactic Yeast *Kluyveromyces marxianus fragilis* B0399 (K-B0399). *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 12(1), 8887-8890.