

VALOAREA EXAMENULUI MICROBIOLOGIC ÎN DIAGNOSTICUL ȘI MONITORIZAREA PARODONTITEI

The value of the microbiological examination in the diagnosis and monitoring of periodontitis

Asist. Univ. Drd. Irina Lupșe¹, Prof. Dr. Alexandra Roman², Asist. Univ. Drd. Iulia Cristina Micu²,
Conf. Dr. Andrada Soanca²

¹Disciplina de Pedodontie, Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj Napoca

²Disciplina de Parodontologie, Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj Napoca

REZUMAT

Proprietățile habitatului subgingival sunt selective și influențează colonizarea microorganismelor sub forma unor membri majoritari sau minoritari ai comunității microbiene. De obicei, există o relație armonioasă și stabilă între organismul gazdă și flora rezidentă subgingivală. Ruperea acestei relații homeostatice permite colonizarea unor specii exogene sau creșterea proporției componentelor bacterieni inițiali minoritari prin exploatarea noilor oportunități de mediu, ceea ce poate predispune la dezvoltarea bolii parodontale. Dacă organismul nu reușește să controleze insulta microbiană inițială, natura răspunsului la biofilmul disbiotic furnizează în continuare condiții de selectare a unor patogeni care vor amplifica procesul inflamator parodontal. Ca și alte boli cronice, parodontita este o infecție polimicrobiană multifactorială în care bacteriile sunt necesare dar nu suficiente pentru declanșarea bolii și în care marea parte a distrucției țesuturilor parodontale este consecința inflamației aberante declanșate la nivel parodontal de biofilmul patogen. În acest moment, nu este posibilă diferențierea parodontitei cronice și parodontitei agresive pe baza amprentei microbiologice subgingivale relevate de tehnicile tradiționale de identificare. Chiar și așa, maparea amprentei microbiologice subgingivale este importantă pentru perfectarea planului de tratament individual și monitorizarea pacienților parodontopați din punctul de vedere al riscului de recidivă. Este posibil ca tehnicile moleculare mai avansate, ca MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight), capabile să identifice nerestricționat microbiota subgingivală, să furnizeze informații suplimentare celor actuale care să faciliteze distincția dintre parodontita cronică și cea agresivă.

Cuvinte cheie: sinus maxilar, migrare implant, complicații infecțioase, aspergiloză

ABSTRACT

The properties of subgingival niches are selective and influence the colonization of microorganisms as minority or majority members of the microbial community. Usually there is a harmonious relationship between the host and subgingival resident flora. The impairment of the subgingival homeostasis could predispose to the development of periodontitis because it allows the colonization of exogenous pathogens or the increase of the minority bacteria by exploring the new environmental opportunities. When the host could not manage the initial microbial insult, the nature of the local response to the dysbiotic subgingival biofilm provides conditions for selecting other pathogens that would amplify periodontal inflammation. As other chronic diseases, periodontitis is a polymicrobial infection in which tooth-associated biofilm plays a crucial role in the initiation and progression of the disease but it is not enough for periodontitis to develop. It is primarily the host inflammatory response that inflicts the irreversible damage to the periodontal tissues. A distinction between chronic and aggressive periodontitis is not possible based on the subgingival microbial fingerprint as revealed by traditional laboratory methods. Even though, mapping subgingival flora is an important aid in treatment planning as well as for monitoring the risk of recurrence in periodontitis patients. More advanced molecular techniques such as MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight) could eventually provide supplementary information that would allow the distinction between the chronic and aggressive periodontal diseases.

Keywords: maxillary sinus, implant migration, infectious complications, aspergillosis

Autor corespondent:

Prof. Dr. Alexandra Roman, Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Str. Victor Babeș nr. 8, Cluj-Napoca
E-mail: veve_alexandra@yahoo.com

Boala parodontală este o cauză importantă a pierderii dinților și poate determina și agrava diferite patologii sistemice, având un efect negativ important asupra stării generale de sănătate și a calității vieții (1). Parodontita afectează o mare parte a populației. Astfel, studiile recente comunică o prevalență a bolii parodontale de 47% și valori mai mari, de 64%, pentru grupul de vârstă de peste 65 de ani (2). Parodontita severă este considerată cea de-a șasea cea mai prevalentă condiție cronică, care afectează 10,8% din populație, adică 743 milioane indivizi în întreaga lume (3). Etiologia acestei boli este una infecțioasă, dependentă de terenul gazdei, bacteriile parodontopatogene și unii factori externi.

Suprafețele mucoase și tegumentare ale organismului sunt larg colonizate de bacterii. Microflora orală, denumită colectiv microbiota orală și, mai recent, microbiom oral (4), se stabilește și predomină pe anumite suprafețe în funcție de proprietățile biologice și fizice ale fiecărui loc (5) și cuprinde bacterii, archaea, fungi, micoplasme, protozoare și, ocazional, virusuri. Cavitatea orală găzduiește nișe anatomice multiple cu caracteristici fizico-chimice diferite dictate de pH, concentrația de oxigen, temperatură, potențial redox, ceea ce favorizează dezvoltarea de populații microbiene diferite, care contribuie la conturarea unei microbiote complexe (6). Microbiomul oral este unic pentru fiecare individ (7). Flora rezidentă contribuie direct sau indirect la dezvoltarea fiziologică normală a organismului, la nutriție și la dezvoltarea sistemului imun. Colonizatorii permanenți acționează ca o barieră față de organismele exogene sau tranzitorii, unele cu potențial patogen. Această proprietate a biofilmului se numește rezistență la colonizare. Tratatamentul antibiotic este un exemplu de factor care rupe această rezistență deoarece suprimă rapid flora rezidentă, ceea ce conduce la creșterea excesivă a componentelor minoritari ai microflorei rezistenți la antibiotic sau exogeni și astfel se creează condițiile de producere a bolii (8). Astfel, flora comensală rezidentă poate fi considerată ca parte a apărării imune înnăscute. În condiții normale, microbiota orală se dezvoltă, deci, în echilibru cu organismul gazdă, cu beneficii reciproce.

Cunoștințele actuale legate de diversitatea microflorei orale au fost mult îmbogățite de rezultatele tehnicilor de cultură, clonare și secvențiere a genelor. Astfel, s-au identificat aproximativ 700 de

specii de bacterii la nivelul cavității orale, dintre care doar jumătate au fost cultivate (4). Aproximativ 20-30 de specii predominante au fost izolate din fiecare situs de prelevare (mucoasă sau placă dentară) (9,10).

O serie de factori, cum ar fi caracteristicile genetice ale organismului gazdă, diabet, fumat, igiena orală deficitară, pot determina modificări sistemice (inflamație cronică și răspuns imuno-inflamator alterat) și perturbarea ecosistemului oral (11).

În inițierea parodontitei se produce o modificare a proporției bacteriilor subgingivale denumită disbioză, care se referă la scăderea numărului bacteriilor comensale și creșterea proporției patogenilor parodontali (12). Răspunsul inflamator local gingival la acumularea biofilmului subgingival (13) determină modificări ale habitatului subgingival, traduse prin creșterea fluxului lichidului crevicular, sângerare și creșterea locală a temperaturii, ceea ce diversifică disponibilitatea nutrițională și favorizează dezvoltarea speciilor anaerobe și a celor proteolitice (14). Acest proces proteolitic duce la creșterea ușoară a pH-ului, ceea ce favorizează dezvoltarea unor parodontopatogeni ca *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* și *Fusobacterium nucleatum* (15, 16); în plus, o alterare a expresiei genelor și creșterea consecutivă a capacității proteolitice a lui *P. gingivalis* au fost raportate (15). Creșterea temperaturii subgingivale consecutive inflamației gingivale s-a asociat cu colonizarea lui *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* și *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (17). Persistența condițiilor disbiotice și creșterea virulenței microbiotei subgingivale cresc riscul producerii parodontitei (18).

Biofilmul subgingival nu reprezintă doar o acumulare întâmplătoare de bacterii, ci este vorba despre un consorțiu microbial înalt organizat în funcție de o serie de afinități celulare și interacțiuni metabolice dezvoltate între membrii comunității. Proximitatea celulelor una față de cealaltă în biofilm facilitează numeroase interacțiuni sinergice și antagonice, formându-se adevărate rețele interconectate de celule capabile să comunice între ele (19). Proprietățile bacteriilor din biofilm diferă de cele ale celulelor planctonice, astfel că s-a observat o creștere a toleranței la agenții antimicrobieni, inclusiv la cei folosiți în paste de dinți și ape de gură (20).

O corelație dintre anumite asocieri bacteriene și statusurile parodontale a fost observată (21). Astfel, s-a remarcat constanta asociere dintre parodontita cronică și agresivă și trei bacterii – *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* și *Tannerella forsythia* – incluse în complexul roșu și alte nouă bacterii incluse în complexul portocaliu (22).

Porphyromonas gingivalis s-a dovedit a fi o bacterie esențială în producerea parodontitei, având capacitatea de a dereglă răspunsul imun și de a întrerupe relația homeostatică dintre biofilmul subgingival și organism, putând orchestra inflamația parodontală prin remodelarea microbiotei normale, benigne, într-una disbiotică. Astfel, *Porphyromonas gingivalis* este considerat un micro-organism keystone („keystone pathogen“), care susține și stabilizează microbiota asociată parodontitei (23). Acest concept, cunoscut ca keystone pathogen hypothesis, consideră capacitatea patogenilor keystone de a stimula inflamația chiar dacă sunt componente minore cantitativ ai microbiotei, ceea ce contrastează cu inflamația indusă de patogenii dominanți ai microbiotei, care cauzează și supresia simultană a comensalilor (24). *Porphyromonas gingivalis* mai degrabă dezvoltă strategii complexe ca să evite componentele ai sistemului imun decât să acționeze direct, ca o bacterie pro-inflamatorie. Astfel, *Porphyromonas gingivalis* slăbește imunitatea înăscută, astfel că permite creșterea și dezvoltarea biofilmului în ansamblu, declanșând o modificare distructivă în relația homeostatică normală bacterii-organism (23). Alterarea numărului comunității comensale, asociată co-lonizării lui *Porphyromonas gingivalis*, precede instalarea pierderii de os de natură inflamatorie. *Porphyromonas gingivalis* nu poate cauza singur parodontită, în absența comunității comensale (25). Aceste alterări se produc imediat după colonizarea lui *Porphyromonas gingivalis*. Mai mult decât atât, prezența lui *Porphyromonas gingivalis* într-o comunitate multi-bacteriană normală alterează modelul expresiei genice de la nivelul comunității (23).

Creșterea necontrolată a bacteriilor subgingivale crește componenta inflamatorie distructivă, ceea ce generează produși de degradare și furnizează elemente nutritive care modifică în continuare biofilmul și stabilizează tranziția spre o microbiotă care provoacă boală.

Eradicarea completă a florei subgingivale disbiotice nu este posibilă, iar eliminarea neselectivă

prin tratament poate favoriza colonizarea patogenilor și ocuparea unei poziții dominante în comunitate în defavoarea bacteriilor comensale. Dezvoltarea de strategii terapeutice care să țintească patogenii cheie ca *Porphyromonas gingivalis* pare o idee de perspectivă (26).

Diagnosticul afecțiunilor parodontale este esențial pentru evoluția modificărilor parodontale și statusul dentiției, cu atât mai mult pentru parodontitele agresive pentru care au fost raportate pierderi tisulare rapide și dificultăți de control asupra bolii. Pentru un diagnostic pozitiv și diferențiat al bolii parodontale este nevoie de disponibilitatea datelor anamnestice și maparea clinică și radiografică a statusului structurilor parodontale. Diagnosticul este și un punct de plecare pentru elaborarea planului de tratament (27). Unul dintre scopurile majore ale tratamentului parodontal este de rezolvare a inflamației și reducerea infecției. Majoritatea formelor de îmbolnăvire, chiar și parodontitele agresive, sunt tratabile, dar acest lucru implică o compliance exemplară a pacientului și elaborarea unui diagnostic complet care să surprindă o serie de variabile etiologice individuale. Unele forme de parodontită, mai ales cele agresive, răspund mai puțin previzibil la terapia inițială convențională (28), de multe ori din cauza inabilității practicianului de a adresa etiologic terapia efectuată.

Parodontitele agresive, dar și unele parodontite cronice, sunt asociate cu o infecție cu anumiți parodontopatogeni parodontali extrem de virulenți ca *A. actinomycetemcomytans* sau *Porphyromonas gingivalis* (29). Instrumentarea mecanică subgingivală reduce numărul total de bacterii subgingivale și proporția unor bacterii Gram-negative, dar pentru nicio pungă parodontală infectată inițial cu *A. actinomycetemcomytans* nu s-a obținut eradicarea bacteriei (30). Terapia adjuvantă antibiotică poate îmbunătăți efectele instrumentării mecanice când *A. actinomycetemcomytans* este prezent (31). Pe de altă parte, deși *A. actinomycetemcomytans* este mai prevalent la pacienții cu parodontită agresivă, bacteria nu este identificată la toți pacienții cu acest diagnostic (32) și deci o terapie antibiotică adjuvantă în aceste situații poate fi considerată un supratratement. De asemenea, se pare că, în parodontitele agresive pozitive pentru *Porphyromonas gingivalis* și *Tannerella forsythia*, terapia antibiotică adjuvantă nu oferă îmbunătățiri clinice suplimentare (33).

O metaanaliză recentă a arătat că terapia mecanică non-chirurgicală asociată cu antibioterapie, în parodontite, a determinat, după 6 luni post-operator, o reducere semnificativă cu 32% a persoanelor pozitive pentru *Porphyromonas gingivalis* și cu 25% a celor pozitive pentru *A. actinomycetemcomytans*, în comparație cu grupurile control (tratate doar prin terapie nonchirurgicală) (34). După un an, efectul s-a menținut pentru *Porphyromonas gingivalis*, dar diferențele nu au mai fost semnificative pentru *A. actinomycetemcomytans*, posibil din cauza numărului mai redus de date disponibile pentru acest moment de evaluare. De asemenea, s-a mai observat că, dacă în analiza statistică a fost considerată doar terapia non-chirurgicală convențională (multiple sesiuni de instrumentare), diferența dintre grupurile de tratament cu privire la detecția lui *A. actinomycetemcomytans* a fost nesemnificativă. Dacă analiza a evaluat protocolul full-mouth disinfection, diferența a devenit semnificativă. Aceste aspecte subliniază că, în cazul unei infecții subgingivale cu *A. actinomycetemcomytans* și când se prevede o terapie antibiotică sistemică, instrumentarea mecanică subgingivală trebuie realizată în cât mai scurt timp posibil conform unui protocol full-mouth disinfection (34).

Porphyromonas gingivalis poate servi ca un marker surogat al disbiozei comunității bacteriene subgingivale (23). De asemenea, ca patogen important asociat parodontitei agresive, *A. Actinomycetemcomytans* poate juca un rol important în sinergia polimicrobiană care inițiază boala (35).

Din aceste perspective, analiza microbiologică poate fi o unealtă utilă pentru perfectarea planului de tratament în parodontite, în funcție de make-up-ul microbiologic subgingival și pentru monitorizarea riscului de recidivă a bolii, mai ales în contextul planificării unor terapii implantare sau protetice de reabilitare.

Metodele bazate pe identificarea acizilor nucleici ca FISH (*in situ* hybridization) și strategiile bazate pe PCR (Polymerase Chain Reaction) au scăzut dramatic timpul de obținere a rezultatului microbiologic și au adus îmbunătățiri importante atât fluxului de lucru din laboratoare, cât și prognosticului pacienților (36). Metodele nu necesită viabilitatea bacteriilor și elimină etapa de cultură. Secvențierea genetică este o altă opțiune atractivă pentru identificarea universală a fungilor și bacteri-

ilor. Secvențierea genetică 16S rRNA și 18S rRNA (pentru identificarea de bacterii și respectiv de fungi) este o metodă diagnostică puternică cu o capacitatea discriminatorie importantă pentru determinările la nivel de specie sau subspecie (37). Porțiunea genelor 16S rRNA este o parte genetică stabilă a ADN-ului bacterian (dar nu numai) folosită astăzi pentru taxonomia bacteriană (38). Gradul de conservare derivă din importanța 16S rRNA ca fiind component critic al funcției celulei bacteriene (38). Gena este suficient de mare, cu un polimorfism suficient pentru a furniza măsurători distincte și statistic valide. De obicei, primerii comerciali sunt complementari regiunilor conservate ale 16S rRNA de la începutul genei și din regiunea 540-bp sau de la sfârșitul întregii secvențe (aproximativ regiunea 1550-bp). Deși lungimile de 500 și 1500 bp sunt cele mai folosite pentru secvențiere și comparare, secvențele pot avea diferite lungimi. Secvențierea genei 16S rRNA a fost determinată pentru multe sușe. Cea mai mare bază de date de secvențe nucleotidice, Gen Bank, are depozitate peste 200 de milioane de secvențe (38). Metodele de secvențiere genetică sunt folosite în principal de laboratoarele clinice complexe și cele de referință pentru testarea de confirmare și reflexă (teste importante realizate automat, fără comandă specifică din partea medicului, atunci când rezultatele testelor inițiale au atins criteriile de predeterminare, nefiind necesare alte prelevări de produs biologic și pentru care testele preliminare au determinat rezultate neconcludente). Secvențierea genetică rRNA necesită instrumente speciale și spații dedicate, ceea ce o face metodă nepractică pentru unele laboratoare. Astfel, folosirea instrumentelor automatizate pentru analiza fenotipică a izolatelor bacteriene (culturi pure) încă predomină pentru identificarea microbiologică de rutină (39).

Una dintre limitările majore asociate acestor metode este că majoritatea acestor investigații necesită cunoașterea avansată a caracteristicilor microorganismului sau a probabilității ca acel microorganism să fie prezent, pentru a putea selecta evaluarea corectă care să corespundă aplicației de testare. În plus, pentru infecțiile polimicrobiene, pentru caracterizarea completă a probei clinice sunt necesare multiple evaluări moleculare, cultura prealabilă și separarea sau testarea adițională downstream; acest lucru crește costul și timpul de inves-

tigare. Astfel, maparea microbiologică a situsurilor subgingivale nu este posibilă prin tehnicile curente, aspect care nu trebuie neglijat având în vedere diversitatea florei orale (40) și posibilitatea ca speciile implicate în etiologia parodontitelor să fie mai complexe decât cele descrise până în acest moment. Alte **neajunsuri asociate metodelor moleculare** se referă la imperfecțiunile de acuratețe, robustețe și timpi mari de identificare (39).

Aceste aspecte ar putea fi remediate de noile metode alternative spectrofotometrice de identificare rapidă și universală care au fost dezvoltate și validate. MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight) poate răspunde neajunsurilor metodelor moleculare. Metodele spectrofotometrice sunt la începutul dezvoltării lor și au fost restrânse inițial la laboratoarele de cercetare fundamentală și folosite pentru identificarea microbiologică a compoziției celulei bacteriene și taxonomică. **Avantajele spectrometriei de masă** se referă la tehnologia robustă, puterea mare de analiză și sensibilitatea analitică mare. Dintre **dezavantajele spectrometriei de masă** face parte costul ridicat, ceea ce determină o utilizare actuală restrictivă doar la marile laboratoare de referință, dar o reducere a prețurilor ar putea facilita folosirea ei de rutină chiar în laboratoarele mici. Adresarea altor dezavantaje ar putea conduce la modificări care să permită analiza unei palete mai largi de microbi și molecule, standardizări care să faciliteze folosirea de către o forță de muncă neuniformă și integrarea în sistemele informatice ale laboratoarelor. Astfel, metodele de spectrometrie de masă ar putea deveni o unealtă completă pentru majoritatea laboratoarelor de diagnostic microbiologic (39).

Folosirea spectrometriei de masă pentru identificarea bacteriană (41) a fost urmată de dezvoltarea MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization). Metoda MALDI a fost introdusă prima dată în 1987, susținută de alte experimente (42) și onorată cu premiul Nobel în 2002. De atunci, MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry) a evoluat într-o metodă analitică rapidă și fiabilă de caracterizare a colecțiilor microbiene din laboratoarele clinice.

Tehnologia MALDI-TOF MS cuprinde o componentă de ionizare a probei de analizat (colonie microbiană, material de cultură sanguină, extracte proteice) și a matricii cu care proba se amestecă.

Astfel, peste proba clinică se adaugă o soluție saturată a unui compus organic cu masă moleculară mică denumit matrice. Ionizarea proteinelor este esențială pentru identificarea microbiană, deoarece permite identificarea de biomolecule mari, inclusiv proteine ribozomale, de până la 100 kDa (42,39). Odată ionizate, proteinele din proba clinică sunt analizate de o componentă a spectrometrului de masă denumită analizor de masă (de exemplu TOF), astfel încât furnizează informații caracteristice despre compoziția probei. MALDI folosește o sursă de ionizare pulsatilă, în timp ce un plus de ioni din proba clinică este produs odată cu expunerea instantanee la conul laser. Natura pulsatilă a procesului MALDI se potrivește în mod natural cu analizorul de masă TOF (Time of Flight Analyzer) care necesită ca toți ionii să intre simultan în tubul (flight) de conducere (43). În plus, analizorul de masă TOF este ideal pentru MALDI datorită limitei de masă virtual nelimitată în contextul în care MALDI produce tipic ioni cu raport masă/încărcare mare. De obicei, pentru asigurarea standardizării și reproductibilității, analizoarele de masă sunt optimizate și vândute ca parte a pachetului de instrumente dedicat identificării de microorganisme.

Analizorul TOF funcționează după principiul conform căruia aplicarea unui câmp electrostatic (eV) unui material ionizat generează ioni cu anumită sarcină (z) care pot fi accelerați, împărțind cu ei energia cinetică (KE). Metoda TOF lineară are o sensibilitate și viteză mare, fiind capabilă să analizeze molecule în concentrație fentomolară (10^{-15} moli/litru) și atomolară (10^{-18} moli/litru) (44). Una dintre limitările metodei TOF este că are o rezoluție mică din cauza peak-ului larg ce se poate produce datorită distribuției spațiale a energiilor din pulsul laser, ceea ce determină ioni cu aceeași m/z, având însă energii cinetice diferite. Atunci când se folosesc platformele MALDI-TOF MS pentru analiza de probe clinice, TOF linear este cel mai des folosit.

Multe studii timpurii care au folosit această metodă au constatat că spectrele generate de microorganisme prezintă variații mari în funcție de condițiile de cultură și de laboratoarele de analiză (45). Bazele de date inițiale folosite pentru identificarea și caracterizarea microbiană prin MALDI-TOF MS erau dezvoltate „in house” pentru a răspunde nevoilor interne ale laboratorului și conțineau multe or-

ganisme din colecțiile de sușe ale investigatorilor individuali, făcând dificile comparațiile între studii. Deși bazele de date „in house” sunt încă utilizate, analizele de rutină folosesc astăzi baze de date comercializate cu sistemele MALDI-TOF MS. Din cauza primelor rezultate contradictorii s-a pus problema standardizării condițiilor de cultură, a condițiilor MS și a procesării preanalitice (folosirea de colonii bacteriene) pentru stabilizarea și robustețea spectrelor generate și îmbunătățirea acurateței și fiabilității MALDI-TOF MS pentru identificarea bacteriană.

Ca și alte boli cronice, parodontita este o infecție polimicrobiană (46) multifactorială în care bacteriile sunt necesare dar nu suficiente pentru declanșarea bolii (47). Parodontita este inițiată de componentele biofilmului subgingival, dar cea mai mare parte a distrucției țesuturilor parodontale este consecința inflamației aberante declanșate la nivel

parodontal de biofilmul patogen (48). În acest moment, nu este posibilă diferențierea parodontitei cronice și parodontitei agresive pe baza amprentei microbiologice subgingivale relevate de tehnicile tradiționale de identificare (49). Este posibil ca tehnicile moleculare mai avansate capabile să identifice nerestricționat microbiota subgingivală să furnizeze informații suplimentare celor actuale care să faciliteze distincția dintre formele clinice de boală. În plus, maparea amprentei microbiologice subgingivale este importantă pentru perfectarea planului de tratament individual și monitorizarea pacienților din punctul de vedere al riscului de recidivă.

Mulțumiri. Această lucrare a fost realizată în cadrul Proiectului de Cercetare Doctorală susținut de Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj Napoca, Nr. contract 1300/40 din 13.01.2017.

BIBLIOGRAFIE

- Gully N., Bright R., Marino V., Marchant C., Cantley M., Haynes D., Butler C., Dashper S., Reynolds E., Bartold M. Porphyromonas gingivalis peptidyl-arginine deiminase, a key contributor in the pathogenesis of experimental periodontal disease and experimental arthritis, *PLoS One* 2014; (6):e100838
- Eke P.I., Dye B.A., Wei L., Thornton-Evans GO, Genco R.J. CDC Periodontal Disease Surveillance workgroup. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res*. 2012; 91(10):914-20
- Frencken J.E., Sharma P., Stenhouse L., Green D., Lavery D., Dietrich T. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis – a comprehensive review. *J Clin Periodontol*. 2017:S94-S105
- Dewhirst F.E., Chen T., J. IZARD, B.J. Paster, A.C. Tanner, Yu W.H., Lakshmanan A., Wade W.G. The human oral microbiome, *J.Bacteriol*. 2010; 192:5002-5017
- Samaranayake L., Matsubara V.H. Normal Oral Flora and the Oral Ecosystem. *Dent Clin N Am* 2017; 61:199–215
- Simon-Soro A., Tomas I., Cabrera-Rubio R., Catalan M.D., Nyvad B., Mira A. Microbial geography of the oral cavity. *J Dent Res* 2013 ; 92(7):616–21
- Ding T., Schloss P.D. Dynamics and associations of microbial community types across the human body. *Nature* 2014; 509(7500):357–60.
- Topoll H.H., Lange D.E., Muller R.F. Multiple periodontal abscesses after systemic antibiotic therapy. *J Clin Periodontol* 1990; 17(4):268–72.
- Aas J.A., Paster B.J., Stoked L.N., Olsen I., Dewhirst F.E. Defining the normal bacteria flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5721-5732
- Keijser B.J., Zaura E., Huse S.M., van der Vossen J.M., Schuren F.H., Montijn R.C., Ten Cate J.M., Crielaard W. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J.Dent Res* 2008;87:1016-1020
- Stone V.N., Xu P. Targeted antimicrobial therapy in the microbiome era. *Mol Oral Microbiol*. 2017; 10.1111/omi.12190.
- Berezow A.B., Darveau R.P. Microbial shift and periodontitis. *Periodontol* 2000. 2011; 55(1):36-47
- Loe H., Thielade E., Jensen S.B. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 1965:36:177-187
- TerSteeg P.F., Van der Hoeven J.S., De Jong M.H., Van Munster P.J.J., Jansen M.J.H. Enrichment of subgingival microflora on human serum leading to accumulation of Bacteroides species, peptostreptococci and fusobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1987;53:261-272.
- McDermid A.S., McKee A.S., Marsh P.D. Effect of environmental pH on enzyme activity and growth of Bacteroides gingivalis W50. *Infect Immun* 1988;56:1096-1100
- Rogers A.H., Zilm P.S., Gully N.J., Pfenning A.L., Marsh P.D. Aspects of the growth and metabolism of Fusobacterium nucleatum ATCC 10953 in continuous culture. *Oral Microbiol Immunol* 1991;6:250-255
- Haffajee A.D., Socransky S.S., Smith C., Dibart S., Goodson J.M. Subgingival temperature (III). Relation to microbial counts. *J Clin Periodontol*. 1992;19(6):417-22
- Marsh P.D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* 2003;149:279-294.
- Kuramitsu H.K., He X., Lux R., Anderson M.H., Shi W. Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007;71:653-670)
- Pratten J., Wilson M. Antimicrobial susceptibility and composition of microcosm dental plaques supplemented with sucrose. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1595-1599
- Socransky S., Haffajee A.D., Cugini M.A., Smith C., Kent R.L. Jr., Microbial complexes in subgingival plaque, *J.Clin. Periodontol*. 1998; 25:134-144
- Rescala B., Rosalem W.Jr., Teles R.P., Fischer R.G., Haffajee A.D., Socransky S.S., Gustafsson A., Figueredo

- C.M. Immunologic and microbiologic profiles of chronic and aggressive periodontitis subjects. *J Periodontol*. 2010; 81(9):1308-16
23. Hajishengallis G., Darveau R.P., Curtis M.A. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol*. 2012 Oct; 10(10):717-25
 24. Stecher B. et al. Salmonella entericaserovartyphimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biol*. 2007; 5:2177–89.
 25. Hajishengallis G., Liang S., Payne M.A., Hashim A., Jotwani R., Eskan M.A., McIntosh M.L., Alsam A., Kirkwood K.L., Lambris J.D., Darveau R.P., Curtis M.A. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host Microbe*. 2011; 10:497–506.
 26. Stone V.N., Xu P. Targeted antimicrobial therapy in the microbiome era. *Mol Oral Microbiol*. 2017; 10.1111/omi.12190.
 27. Teughels W., Dhondt R., Dekeyser C., Quirynen M. Treatment of aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000. 2014 Jun; 65(1):107-33
 28. Herrera D., Sanz M., Jepsen S., Needleman I., Roldán S. A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *J ClinPeriodontol*. 2002;29 Suppl 3:136-59
 29. Könönen E., Müller H.P. Microbiology of aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000, 2014; 65(1):46-78.
 30. Slots J., Rosling B.G. Suppression of the periodontopathic microflora in localized juvenile periodontitis by systemic tetracycline. *J ClinPeriodontol*. 1983;10(5):465-86
 31. Van Winkelhoff A.J., Tjihof C.J., de Graaff J. Microbiological and clinical results of metronidazole plus amoxicillin therapy in Actinobacillus actinomycetemcomitans-associated periodontitis. *J Periodontol*. 1992;63(1):52-7
 32. Tonetti M.S., Mombelli A. Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol*. 1999 ;4(1):39-53
 33. Guerrero A., Nibali L., Lambertenghi R., Ready D., Suvan J., Griffiths G.S., Wilson M., Tonetti M.S. Impact of baseline microbiological status on clinical outcomes in generalized aggressive periodontitis patients treated with or without adjunctive amoxicillin and metronidazole: an exploratory analysis from a randomized controlled clinical trial. *J ClinPeriodontol*. 2014;41(11):1080-9.
 34. Dakic A., Boillot A., Colliot C., Carra M.C., Czernichow S., Bouchard P. Detection of Porphyromonasgingivalis and Aggregatibacteractinomycetemcomitans after Systemic Administration of Amoxicillin Plus Metronidazole as an Adjunct to Non-surgical Periodontal Therapy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Microbiol*. 2016;7:1277
 35. Nibali L. Aggressive Periodontitis: microbes and host response, who to blame? *Virulence*. 2015;6(3):223-8
 36. Forrest G.N., Roghmann M.C., Toombs L.S., Johnson J.K., Weekes E., Lincalis D.P., Venezia R.A. Peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization for hospital-acquired enterococcal bacteremia: delivering earlier effective antimicrobial therapy. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2008; 52:3558–3563
 37. Woo P.C.Y., Lau S.K.P., Teng J.L.L., Tse H., Yuen K.Y. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin. Microbiol. Infect*. 2008; 14:908–934.
 38. Clarridge J.E. 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *ClinMicrobiol Rev*. 2004; 17(4):840-6
 39. Clark A.E., Kaleta E.J., Arora A., Wolk D.M. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *ClinMicrobiol Rev*. 2013 Jul; 26(3):547-603
 40. Paster B.J., Dewhirst F.E. Molecular microbial diagnosis. *Periodontol* 2000. 2009; 51:38-44
 41. Anhalt J.P., Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal. Chem*. 47:219–225
 42. Karas M., Bachmann D., Bahr U., Hillenkamp F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process*. 1975;78:53–68
 43. Cotter R.J. Laser mass spectrometry: an overview of techniques, instruments and applications. *Anal. Chim. Acta* 1987; 195:45–59
 44. Onnerfjord P., Nilsson J., Wallman L., Laurell T., Marko-Varga G. Picoliter sample preparation in MALDI-TOF MS using a micromachined silicon flow-through dispenser. *Anal. Chem*. 1998; 70:4755–4760
 45. Wunschel S.C., Jarman K.H., Petersen C.E., Valentine N.B., Wahl K.L., Schauki D., Jackman J., Nelson C.P., White E. Bacterial analysis by MALDI-TOF mass spectrometry: an inter-laboratory comparison. *J. Am. Soc. Mass Spectrom*. 2005; 16:456–462
 46. Peters B.M., Jabra-Rizk O.M., May O., Costerton J.W., Shirtliff M.E. Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human diseases, *Clin. Microbiol. Rev*. 2012; 25:193-213.
 47. Socransky S.S., Haffajee A.D. The bacterial etiology of destructive periodontal disease:currentconcepts. *J Periodontol*, 1992;63(Suppl 4):322-331
 48. Van Dyke T.E. The management of inflammation in periodontal disease. *J Periodontol*, 2008;79(Suppl 8):1601-1608
 49. Van der Velden U. What exactly distinguishes aggressive from chronic periodontitis: is it mainly a difference in the degree of bacterial invasiveness? *Periodontol* 2000. 2017; 75(1):24-44