

Universitatea Titu Maiorescu din București
Școala Doctorală de Medicină Dentară

**Studii privind incidența afecțiunilor parodontale, asocierea cu
anumite tipuri de germeni microbieni și
eficiența terapiilor alternative asupra acestora**

Teză de doctorat

Doctorand: Constantin (căs. Vodiță) Cristina

Conducător de doctorat:

Prof. Univ. Dr. Doina-Lucia Ghergic

2021

Cuprins

Introducere

Partea generală

Capitolul 1 ***Structura parodonțiului***

Capitolul 2 ***Aspecte privind boala parodontală***

Capitolul 3 ***Clasificarea bolilor parodonțiului marginal, complicațiile acestora și principalele direcții terapeutice***

Cercetare științifică personală

Capitolul 4 ***Evaluarea incidenței diferitelor tipuri de afectări parodontale la un lot de pacienți***

4.1 *Introducere*

4.2 *Materiale și metode*

4.3 *Rezultate*

4.4 *Discuții*

4.5 *Concluzii*

Capitolul 5 ***Studiu privind asocierea unor specii bacteriene cu boala parodontală***

5.1 *Introducere*

5.2 *Materiale și metode*

5.3 *Rezultate*

5.4 *Discuții*

5.5 *Concluzii*

Capitolul 6 ***Studiu privind eficiența terapiilor alternative asupra germenilor microbieni implicați în producerea bolii parodontale***

6.1 *Introducere*

6.2 *Materiale și metode*

6.3 *Rezultate*

6.4 *Discuții*

6.5 *Concluzii*

Capitolul 7 ***Concluzii generale, elemente de originalitate și perspective pe care le deschide teza***

Bibliografie selectivă

Introducere

Progresele realizate în ultima perioadă cu privire la metodele de diagnostic și tratament ale afecțiunilor aparatului dento-maxilar s-au realizat în special prin utilizarea cercetărilor cu grad crescut de interdisciplinaritate.

Boala parodontală reprezintă încă, alături de caria dentară, una dintre afectările majore ale aparatului dento-maxilar, atât prin incidența crescută, cât și prin numeroasele manifestări, influențate de contextul general și local al pacientului. Ca și caria dentară, boala parodontală afectează populația indiferent de vârstă, rasă, sex sau mediul geografic de proveniență.

PARTEA GENERALĂ

Capitolul 1

Structura parodonțiului

Parodonțiul [1-5] este alcătuit din gingie și structuri de suport (ligamente parodontale, os alveolar și cement). Principala funcție a gingiei [6] este aceea de protecție a structurilor subiacente. Cementul [1, 7], deși reprezintă totodată și o componentă a rădăcinilor dentare, este considerat și structură de suport a unităților dento-parodontale deoarece pe el se inseră ligamentele parodontale.

Capitolul 2

Aspecte privind boala parodontală

În etiopatogenia parodontopatiilor marginale cronice sunt incriminați factori locali și factori generali. La rândul lor, factorii locali se împart în factori determinanți sau cauzali, reprezentați de placa bacteriană, precum și factori favorizanți, cum ar fi tartrul, caria dentară, trauma ocluzală, edentațiile, obiceiurile vicioase, anomaliile dento-maxilare, iatrogeniile.

În cavitatea orală conviețuiesc diferite microorganisme [43, 44], în multe cazuri acestea având o specificitate deosebită pentru colonizarea la acest nivel [45].

În prezent există unanimitate de păreri în ceea ce privește rolul primordial al plăcii dentare bacteriene în inițierea îmbolnăvirii parodontale, deoarece:

- Înteruperea igienei orale în mod accidental sau voluntar este urmată de formarea plăcii bacteriene și de instalarea fenomenelor de inflamație gingivală.
- Reluarea igienizării orale este acompaniată de scăderea inflamației gingivale.
- Aplicarea de antibiotice sau antiseptice duce la frânarea evoluției inflamației gingivale.
- În cazul experimentelor pe animale, nu se produc afectări parodontale nici dacă se acționează persistent prin factori mecanici, dacă nu este prezent simultan și factorul microbial.

Capitolul 3

Clasificarea bolilor parodonțiului marginal, complicațiile acestora și principalele direcții terapeutice

Clasificarea bolilor parodontale este utilă pentru:

- Stabilirea unui diagnostic corect
- Stabilirea prognosticului
- Selectarea unui tratament eficient.

Au fost raportate diferite clasificări de-al lungul anilor, dependente de stadiul cunoașterii la momentul respectiv, Odată cu îmbogățirea acestor cunoștințe, clasificările și metodele terapeutice au fost rafinate constant.

Catedra de parodontologie din București e propus o clasificare a bolilor parodonțiului marginal pe baza:

- Mecanismului de producere a bolii
- Gradului de afectare al structurilor parodontale
- Gradului de manifestare a inflamației
- Circumstanțelor specifice care impun o atitudine particulară: tumori gingivale, traumă ocluzală, SIDA.

Îmbolnăvirile parodontale pot evolua uneori spre forme mai grave în lipsa instituirii unui tratament, cu perioade de remisiuni sau de exacerbări ale simptomatologiei.

Evoluția bolilor parodontiului marginal este dictată de factorii favorizanți locali, de vârsta pacientului sau de instalarea unor afecțiuni generale.

Tratamentul bolii parodontale trebuie instituit precoce, trebuie susținut de proceduri specifice, este complex, diversificat, intensiv și individualizat. Totodată, trebuie să fie ghidat în funcție de starea de sănătate generală a pacientului.

Principalele direcții de tratament sunt [35]:

1. Tratamentul antimicrobian
2. Tratamentul chirurgical
3. Tratamentul de echilibrare ocluzală
4. Tratamentul de bioreactivare a parodontiului marginal pentru a-l reabilita morfo-funcțional
5. Tratamentul complicațiilor.

Principalele faze terapeutice [35] sunt:

- A) Faza inițială, în care se realizează igienizarea profesională, se instruiesc pacienții asupra igienei orale, se tratează complicațiile acute și se realizează manopere în vederea desființării microulcerărilor locale.
- B) Faza secundară, în care se apelează la proceduri chirurgicale, șlefuiți selective, tratament ortodontic, restaurări odontale directe sau indirecte. Faza se continuă cu monitorizare.
- C) Faza terțiară, de menținere, prin instituirea unor proceduri specifice care au rolul de prevenire a reinfectării și a recidivei.

CERCETARE ȘTIINȚIFICĂ PERSONALĂ

Capitolul 4

Evaluarea incidenței diferitelor tipuri de afectări parodontale la un lot de pacienți

4.1 Introducere

Brown și colab [93] au apreciat că boala parodontală reprezintă, alături de caria dentară, cele mai frecvente afecțiuni depistate la nivelul dentiției umane. Boala parodontală se caracterizează prin inflamație persistentă, cu afectarea țesuturilor de suport și rezorbție la nivelul osului alveolar, produse ca urmare a infecției cronice bacteriene, eventual în prezența unor factori favorizanți. [94]

Scopul prezentului studiu a fost reprezentat de evaluarea incidenței diferitelor tipuri de afectări parodontale la un lot de pacienți adulți, corelat cu eventualii factorii favorizanți ai apariției și agravării parodontopatiilor.

4.2 Materiale și metode

Studiul s-a desfășurat pe o perioadă de doi ani în cadrul cabinetului propriu de medicină dentară din București, **Clinica stomatologică Dr. Vodiță**. Lotul de studiu a fost inițial alcătuit dintr-un număr de 366 pacienți care s-au adresat cabinetului stomatologic din diferite motive legate de starea de sănătate dentară, în perioada mai 2015 - mai 2017.

Studiul s-a desfășurat având acordul Comisiei de Etică a Facultății de Medicină Dentară din cadrul Universității Titu Maiorescu din București și a fost efectuat respectând declarația de la Helsinki, fără a aduce prejudicii sănătății pacienților sau mediului și respectând drepturile omului.

Intregului lot i s-a explicat că o serie de date, considerate reprezentative, din fișele lor de consultație și tratament, vor fi utilizate în scopuri științifice, cu protejarea identității și s-a cerut acordul scris al pacienților în acest sens.

Criteriile de includere în studiu au fost:

- Pacienți dențați sau cu un număr relativ redus de unități dento-parodontale absente de pe o arcadă
- Pacienți care prezentau minim un semn și /sau un simptom de afectare parodontală
- Pacienți care au semnat acordul scris de includere în studiu.

Criteriile de excludere din studiu au fost:

- Pacienții cu edentație totală sau subtotală pe o arcadă
- Pacienți care nu prezentau nici un semn și / sau simptom de afectare parodontală
- Pacienții care au refuzat includerea în studiu.

Lotul final, obținut după aplicarea criteriilor de includere și a celor de excludere din studiu, a cuprins 205 pacienți, între 18 și 76 ani, de ambele sexe.

În vederea stabilirii cât mai exacte a diagnosticului, pacienților li s-a solicitat efectuarea unor investigații imagistice la un centru de radiologie dentară. De asemenea, au fost efectuate fotografii încă de la prima prezentare în cabinet.

Fiecărui pacient din lotul de studiu i-am efectuat o anamneză riguroasă, din care s-au desprins date privind:

- Vârsta pacientului.
- Istoricul său medical.
- Istoricul dentar
- Condițiile speciale de muncă și viață
- Eventualele obiceiuri vicioase cu impact asupra instalării și agravării afecțiunilor parodontale.

Examenul clinic intraoral mi-a relevat informații despre: statusul odonto-parodontal al pacienților și factorii locali care ar putea favoriza instalarea bolii parodontale (bruxism, edentație parțială cu suprasolicitarea dinților restanți, respirație orală sau malocluzii).

Pentru toți pacienții am evaluat indicele de inflamație gingivală și am instituit tratamente specifice pentru ameliorarea simptomatologiei și întârzierea avansării afecțiunii (recomandări privind autoigienizarea, igienizare profesională prin detartraj și periaj, eventuale debridări și chiuretaje gingivale, aplicații locale cu diferite preparate antibiotice, antiseptice sau naturiste).

Datele obținute în prezentul studiu au fost analizate și prelucrate statistic cu programul Microsoft Excel 2013.

4.3 Rezultate

Lotul de studiu a cuprins 138 pacienți de sex masculin și 67 pacienți de sex feminin. Analizând distribuția pe grupe de vârstă a lotului de studiu, am constatat că ordinea descrescătoare a reprezentării a fost:

- grupa de vârstă 31-40 ani (56.1%)
- grupa de vârstă 51-60 ani (12.2%)
- grupa de vârstă 21-30 ani (10.7%)
- sub 20 ani (6.8%)
- grupa de vârstă 41-50 ani (6.4%)
- grupa de vârstă 61-70 ani (4.4%)
- peste 71 ani (3.4%).

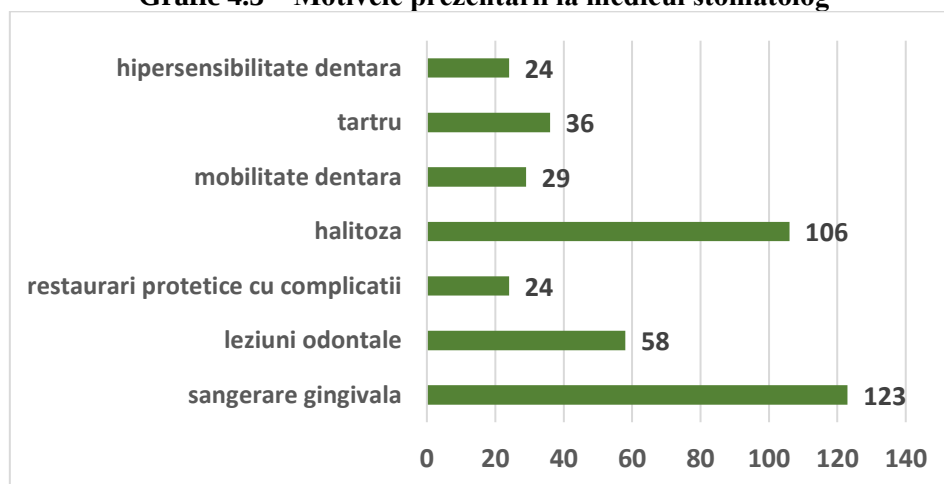
Referitor la motivele prezentării la medic (Grafic 4.3), pacienții din lotul studiat s-au plâns de unul sau mai multe aspecte precum:

- Sângerare gingivală

- Leziuni odontale tratate sau netratate, simple și complicate
- Halitoză
- Restaurări protetice care nu mai corespund estetic și / sau funcțional (fractura placajului ceramic, modificare de culoare, aspect inestetic produs de retracția gingivală, sensibilitate dureroasă a dinților stâlpi)
- Tulburări funcționale prin mobilitate dentară de diferite grade
- Hipersensibilitate dentară
- Prezența tartrului supra și subgingival.

Cele mai frecvente motive ale prezentării la medicul stomatolog au fost sângerarea gingivală și halitoza. 123 pacienți din lot au reclamat prezența sângerării gingivale spontane sau în cursul periajului și 106 au declarat prezența halitozei, din totalul de 205 pacienți, 87 plângându-se de ambele fenomene.

Grafic 4.3 – Motivele prezentării la medicul stomatolog



35 pacienți au precizat că își desfășoară activitatea profesională sau trăiesc într-un mediu pe care îl percep drept stresant. Din lotul analizat, 97 pacienți fumează (reprezentând 47.31%), iar 28 dintre aceștia sunt fumători cronici (28.86% din rândul pacienților fumători și 13.66% din întregul lot de pacienți).

În ceea ce privește starea generală de sănătate, 33 pacienți au semnalat că prezintă afecțiuni cardio-vasculare, 9 suferă de diabet zaharat (dintre care 2 prezintă diabet insulino-dependent), 2 pacienți au afecțiuni neurologice (epilepsie) și 8 prezintă afecțiuni gastro-intestinale (gastrită, reflux gastro-duodenal, ulcer gastro-duodenal). Restul pacienților s-au declarat clinic sănătoși.

Investigând posibilia factorii favorizanți ai instalării și evoluției bolii parodontale, am depistat în lotul analizat 5 pacienți bruxomani, 12 pacienți care prezentau respirație orală, 36 pacienți care aveau malocluzii și 54 pacienți cu edentații parțiale protezate sau neprotezate.

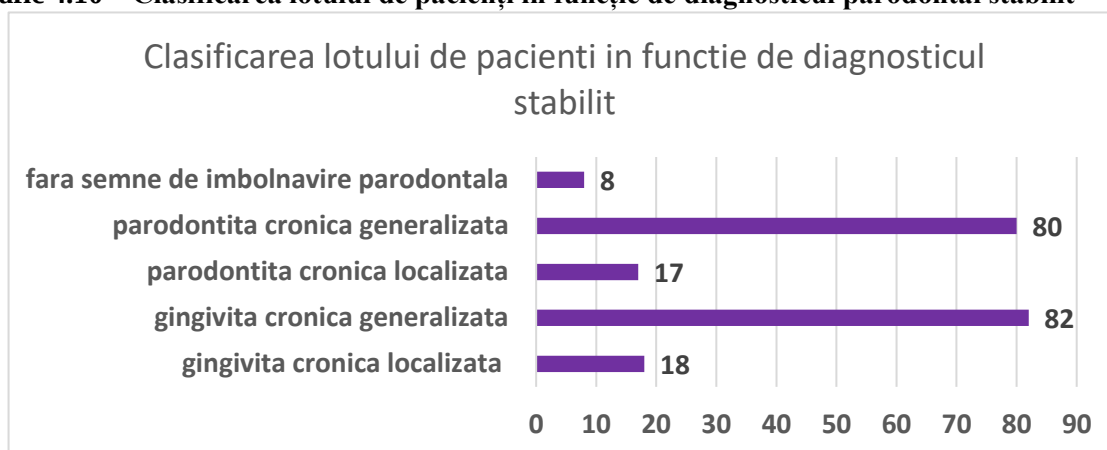
La calcularea indexului gingival Loe și Silness, am remarcat incidența mai crescută a valorilor 1 (49.75% din cazuri) și 2 (40% din cazuri). Valoarea 3 a indexului Loe și Silness am întâlnit-o în 7.8% din cazuri, iar valoarea 0 în 2.44% din cazuri.

Analizând indexul Mühlemann de sângerare papilară, la lotul studiat 11 cazuri prezentau valoarea 0, 79 cazuri prezentau valoarea 1, 72 cazuri aveau valoarea 2, 29 cazuri aveau valoarea 3 și 14 cazuri valoarea 4 (Grafic 4.9).

Pe baza consultului clinic de specialitate, alcătuit din anamneză, examen clinic și examen paraclinic imagistic, pentru lotul analizat am stabilit următoarele diagnostice:

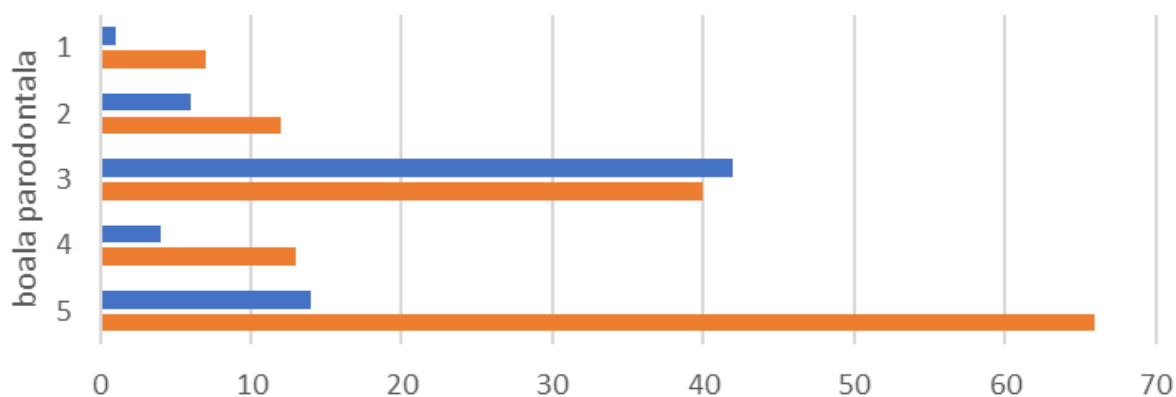
- 8 pacienți nu aveau instalată vreo formă propriu-zisă de îmbolnăvire parodontală (notați cu 1 mai jos), deși 5 prezentau halitoză și 3 prezentau sângerare gingivală izolată
- 18 pacienți aveau gingivită cronică localizată (notați cu 2 mai jos)
- 82 pacienți aveau gingivită cronică generalizată (notați cu 3 mai jos)
- 17 pacienți aveau parodontită cronică localizată (notați cu 4 mai jos)
- 80 pacienți aveau parodontită cronică generalizată (notați cu 5 mai jos).

Grafic 4.10 – Clasificarea lotului de pacienți în funcție de diagnosticul parodontal stabilit



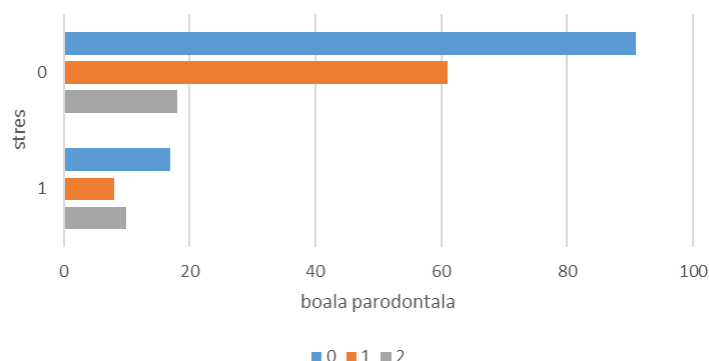
Efectuând corelații între tipurile de afecțiuni parodontale diagnosticate mai frecvent și sexul pacienților incluși în studiu, am remarcat că în cazul femeilor predomina gingivita cronică generalizată (3), iar în cazul bărbaților se regăsea mai frecvent parodontita cronică generalizată (5) (Grafic 4.11).

Grafic 4.11 – Distribuția pe sexe a afecțiunilor parodontale (cu portocaliu sunt reprezentați bărbații, iar cu albastru sunt reprezentate femeile) [103]



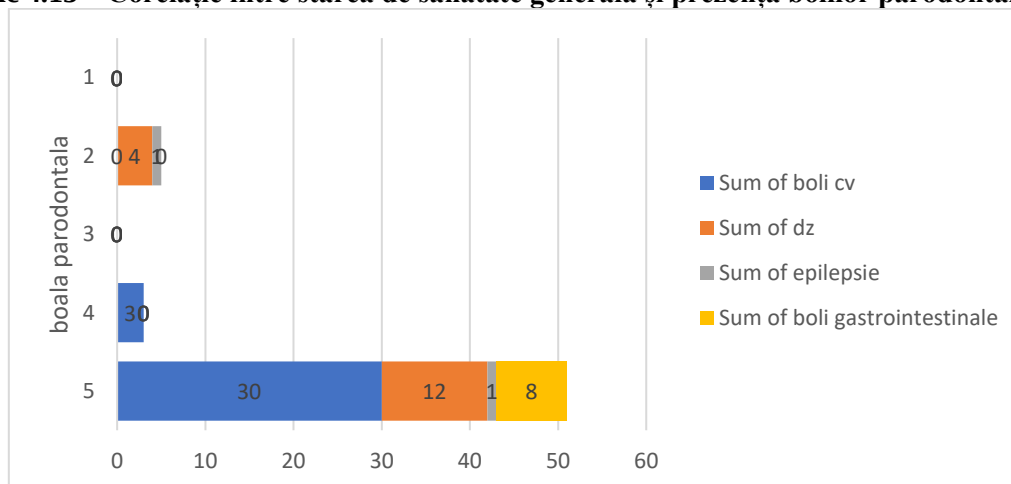
Pe baza corelațiilor dintre nivelul autoapreciat de stres, frecvența obiceiurilor vicioase de tipul fumatului și afectarea parodontală a pacienților investigați, am constatat că nefumătorii care prezentau boli parodontale se regăseau majoritar atât în rândul pacienților care au declarat că muncesc și trăiesc într-un mediu stresant, cât și în rândul pacienților care nu s-au autoevaluat ca fiind stresați (Grafic 4.12).

Grafic 4.12 – Corelație între fumat, stres și prezența bolii parodontale la lotul analizat (nefumătorii sunt reprezentați cu albastru, fumătorii moderați cu portocaliu, iar fumătorii cronici cu gri) [103]



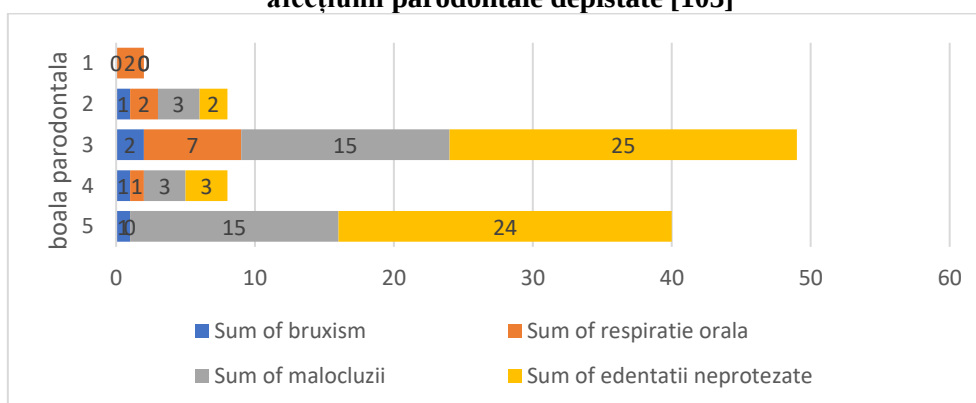
La lotul analizat, am constatat asocierea parodontitei cronice generalizate cu bolile cardiovasculare, diabetul zaharat și bolile gastrointestinale, iar pacienții cu gingivită localizată cronică prezentau și diabet zaharat (grafic 4.13).

Grafic 4.13 – Corelație între starea de sănătate generală și prezența bolilor parodontale [103]



În studiul nostru, pacienții cu gingivită și parodontită cronică generalizată erau asociați mai frecvent cu prezența malocluziilor sau a edentațiilor neprotezate, iar pacienții cu gingivită cronică generalizată prezentau mai frecvent bruxism sau respirație orală (grafic 4.14).

Grafic 4.14 – Corelația dintre factorii locali ce favorizează instalarea bolii parodontale și tipul afecțiunii parodontale depistate [103]



4.4 Discuții

În prezentul studiu, cel mai bine au fost reprezentați pacienții tineri (164 pacienți sub 40 ani), ceea ce demonstrează o preocupare crescută a respectivelor grupe de vârstă pentru starea de sănătate dentară.

În acest studiu, desfășurat pe un lot de pacienți caucazieni, am depistat o incidență mai crescută a afecțiunilor parodontale la bărbați. De asemenea, tot bărbații prezentau majoritar forme mai grave de îmbolnăvire parodontală, respectiv formele cronice ale parodontitelor generalizate.

În studiul nostru, 79% din pacienți prezentau forme generalizate ale îmbolnăvirilor parodontale, fie că era vorba de gingivite (40% din cazuri), fie că ne referim la parodontite (39% din cazuri).

Pacienții din lotul nostru prezentau majoritar sîngerare izolată, punctiformă, la examenul clinic (38.53% din cazuri), față de doar 6.8% care prezentau sîngerare ce depășea marginea gingivală liberă. La aproape jumătate din pacienții analizați (49.75% din cazuri) placa dentară era vizibilă doar în urma răzuirii suprafețelor dentare.

Din punct de vedere al istoricului medical, putem afirma că afecțiunile cardio-vasculare au o incidență crescută în rândul lotului analizat (33 pacienți dintr-un total de 205, reprezentând aproximativ 16.1%), iar diabeticii au fost prezenți doar în proporție de 4.39%. Este bine cunoscut caracterul de interdependență dintre boala parodontală și o serie de patologii sistemice (boli cardio-vasculare, diabet zaharat, etc) [113], așa cum am depistat și în studiul nostru.

Evaluarea, înțelegerea și managementul adecvat al factorilor de risc locali și generali poate facilita prevenirea și controlul bolii parodontale. [114] Un bun control asupra afecțiunii generale cronice previne instalarea complicațiilor la nivel parodontal.

Asocierea între condițiile stresante de muncă și viață și alte afecțiuni generale scad capacitatea organismului de vindecare în caz de infecții sau inflamații [115], dar în studiul nostru stresul nu pare a reprezenta unul dintre factorii asociați în mod frecvent cu apariția și agravarea bolii parodontale, din rândul pacienților analizați doar 17.07% declarând că trăiesc în condiții stresante.

47.32% din pacienți din prezentul studiu au declarat că fumează, riscul de leziuni parodontale în cazul fumătorilor fiind confirmat de multiple studii [116-118]. Se estimează că mai mult de 40% din cazurile de parodontită la adulți se datorează fumatului zilnic [117].

4.5 Concluzii

- 1) Boala parodontală reprezintă o patologie foarte frecvent întâlnită în populație, adesea neglijată în stadiile incipiente și de cele mai multe ori depistată în forme grave, generalizate și cronicizate.
- 2) Sîngerarea gingivală și halitoza reprezintă principalele semne care alarmează pacienții și îi motivează să solicite consult de specialitate.
- 3) Bărbații din lotul analizat au fost net mai predispuși instalării diferitelor forme de îmbolnăvire parodontală indiferent de tip, cu excepția gingivitelor cronice generalizate unde femeile au avut un ușor avans.
- 4) Conform prezentului studiu, fumatul poate fi considerat un factor favorizant corelat într-o mai mare măsură cu agravarea bolii parodontale decât nivelul cotidian autoapreciat al stresului.
- 5) Afecțiunile cardio-vasculare au reprezentat comorbidități care au favorizat agravarea bolii parodontale.
- 6) Limitele studiului sunt date de numărul relativ redus de cazuri investigate. Pentru validarea rezultatelor obținute este necesară extinderea studiului la un lot mai mare de pacienți.

Capitolul 5

Studiu privind asocierea unor specii bacteriene cu boala parodontală

5.1 Introducere

Flora parodontală microbiană este caracterizată de heterogenitate [124, 125] și este compusă din peste 400 specii de bacterii subgingivale, dintre care orice individ prezintă doar anumite proporții. La orice prelevare a plăcii subgingivale vom detecta aproximativ 30 de specii diferite bacteriene [126].

După caracterul patogen, bacteriile implicate în producerea și evoluția agravantă a bolii parodontale pot fi clasificate în 3 categorii:

- a) Bacterii ce posedă patogenitate ridicată: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*.
- b) Bacterii ce posedă patogenitate moderată: *Prevotella intermedia*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Prevotella nigrescens*.
- c) Bacterii ce posedă patogenitate redusă: *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga sputigena*.

Bacteriile din categoria celor cu patogenitate ridicată se consideră asociate puternic cu instalarea și progresia acelor forme agresive ale bolii parodontale, având efecte patogene și la concentrații reduse.

Bacteriile care fac parte din a doua categorie sunt în special identificate în formele cronice ale bolii parodontale și s-a constatat că sunt asociate într-o proporție moderată cu dezvoltarea bolii parodontale.

Bacteriile din categoria celor cu patogenitate moderată sunt asociate într-o proporție redusă cu boala parodontală. Ele sunt identificate în formele acute, dar și în variantele cronice ale îmbolnăvirilor parodontale.

Cuantificarea speciilor bacteriene care apar în diferite forme ale bolii parodontale are importanță în determinarea celor mai frecvent întâlnite tulpini bacteriene ce se asociază cu manifestări mai agresive ale afectării parodontale la variate populații.

Scopul prezentului studiu desfășurat pe un lot de pacienți a fost acela de a detecta prezența și de a cuantifica nivelurile (scăzut, ridicat sau nedetectabil) celor 12 tulpini bacteriene care sunt, conform literaturii de specialitate [35, 121], cel mai frecvent asociate cu apariția și agravarea bolii parodontale.

5.2 Materiale și metode

Am inclus în studiu un lot de 55 pacienți de ambele sexe, care prezentau semne și simptome de îmbolnăvire parodontală și nu se mai prezentaseră la control stomatologic periodic și igienizare profesională de cel puțin 2 ani. Lotul de pacienți a fost selectat din protofoliul Clinicii stomatologice Dr. Vodiță.

Studiul s-a desfășurat de asemenea având acordul Comisiei de Etică a Facultății de Medicină Dentară din cadrul Universității Titu Maiorescu din București și a fost efectuat respectând declarația de la Helsinki, fără a aduce prejudicii sănătății pacienților sau mediului și respectând drepturile omului.

Întregului lot i s-a explicat că o serie de date, provenite din fișele de consultație și tratament, dar și din analizele medicale efectuate, vor fi utilizate în scopuri științifice, cu protejarea identității și s-a cerut acordul scris al pacienților în acest sens.

În consultul efectuat în cadrul Clinicii stomatologice Dr. Vodiță am completat fișele de observație ale pacienților, în care am consemnat:

- Vârsta pacienților
- Sexul pacienților
- Statutul pacienților de fumător sau nefumător

- Condițiile medicale relevante ale pacienților ce pot favoriza instalarea parodontopatiilor (diabet, boli parodontale ereditare, imunodepresie, afecțiuni cardiovasculară)
- Condiții fiziologice relevante ale pacientelor (prezența sarcinii)
- Descrierea simptomatologiei parodontale prezente la data examinării (posibile sângerări gingivale spontane sau produse la atingere, modificări de culoare ale gingiei, semne de inflamație locală, halenă fetidă, resorbție osoasă)
- Gradul îmbolnăvirii parodontale (afectare de tip I - gingivită, afectare de tip II - parodontită ușoară, afectare de tip III - parodontită moderată, afectare de tip IV - parodontită avansată, afectare de tip V - parodontită refractară la tratament)
- Întinderea afectării structurilor de suport ale dinților (parodontită localizată sau generalizată).

În scopul identificării prezenței și cuantificării nivelului germenilor bacterieni, de la fiecare pacient a fost recoltat fluid din pungile parodontale cu ajutorul a 5 conuri de hârtie sterile.

Prelevarea probelor se realizează prin introducerea fiecărui con de hârtie steril cu ajutorul pensei cât mai profund în pungile parodontale mai adânci de la nivelul a 5 dinți diferiți, unde sunt menținute 10 secunde până la îmbibarea cu fluid. Ulterior, conurile de hârtie imbibate cu lichid provenit din pungile parodontale, sunt introduse într-un tub de transfer steril și sunt transmise la laboratorul Genetic-Lab (București) în vederea cuantificării speciilor bacteriene prezente și pentru extracția ADN bacterian. Pentru obținerea unor rezultate concludente, pacientul nu trebuie să fi luat antibiotice 3 săptămâni anterior recoltării.

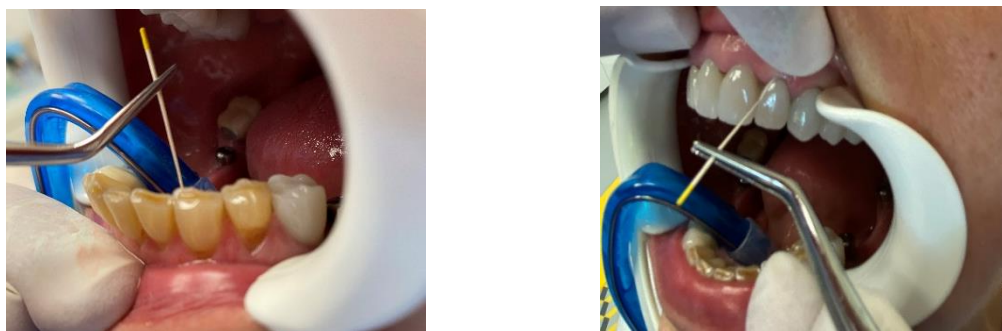


Fig. 5.1 – Recoltarea fluidului dintr-o pungă parodontală de la nivelul arcadei inferioare [127] (stg) și dintr-o pungă parodontală de la nivelul arcadei superioare (dr)



Fig. 5.3 – Pregătirea tubului de transfer cu 5 conuri de hârtie cu probe prelevate de la un pacient în vederea transmiterii către laboratorul de analize [127]

În laboratorul Genetic-Lab probele recoltate au fost supuse investigațiilor în vederea detectării prezenței celor 12 specii bacteriene mai frecvent implicate în instalarea și progresia bolii parodontale:

- *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (codificare Aa),
- *Porphyromonas gingivalis* (codificare Pg),

- *Treponema denticola* (codificare Td),
- *Tannerella forsythia* (codificare Tf),
- *Eikenella corrodens* (codificare Ec),
- *Campylobacter rectus* (codificare Cr),
- *Prevotella intermedia* (codificare Pi),
- *Fusobacterium nucleatum* (codificare Fn),
- *Prevotella nigrescens* (codificare Pn),
- *Capnocytophaga ochracea* (codificare Co),
- *Capnocytophaga sputigena* (codificare Cs)
- *Capnocytophaga gingivalis* (codificare Cg).

Pentru extragerea ADN-ului bacterian, conurile de hârtie au fost introduse și ținute peste noapte în cadrul laboratorului în 1 mL de soluție 1.5x PBS. Sedimentul bacterian a fost obținut în urma vortexării conurilor de hârtie suspendate în PBS timp de 10 minute, urmată de centrifugarea soluției rezultate timp de 10 minute la 16.000G.

S-au recoltat 200 μ L de supernatant PBS din soluția rezultată, ce conținea sediment bacterian resuspendat, iar ADN-ul bacterian s-a extras cu Kit-ul produs de Favorgen - Viral Kit I, respectând recomandărilor producătorului.

Fiecărei probe de 200 μ L de supernatant PBS i s-a adăugat tampon VNE (buffer cu AND-carrier) în volum de 570 μ L. Mostrele rezultate au fost initial incubate la temperatura camerei pentru 10 minute, apoi au fost adăugate peste fiecare probă etanul pur, câte 570 μ L.

Soluția rezultată s-a încărcat în coloane separatoare de ADN, ce au fost spălate o singură dată cu 500 μ L soluție tampon I și de două ori cu 750 μ L soluție tampon II. Ulterior, ADN-ul bacterian a fost eluat în 80 μ L apă liberă de nucleaze, preîncălzită.

Cuantificarea concentrațiilor bacteriene s-a efectuat cu LightCycler 2.0 (produs de Roche) prin *real-time quantitative PCR*. Au fost efectuate reacții PCR țintite pe fiecare dintre cele 12 specii bacteriene testate, într-un volum total de 25 μ L conținând 1,25X soluție tampon incoloră (Promega), 0.25 mM dNTPs, 4 mM MgCl₂, 1,5 unități de PQ Taq (Promega), 1 μ L de 1X SYBR Green I, 0.5 mM din fiecare primer și 5 μ L de extract ADN din probă. Programul de amplificare include o denaturare inițială de 5 minute la 95°C, 40 de cicluri de 10 secunde la 95°C, 5 secunde la 55°C și 25 secunde la 72°C, urmat de analiza HRM (denaturarea ADN de înaltă rezoluție).

Amplificarea PCR s-a realizat monitorizând semnalul fluorescent al SYBR Green I, care este un fluorofor cu afinitate specifică pentru ADN-ul bicatenar. Pe măsura amplificării PCR, ciclul de amplificare soldat cu depășirea nivelului de “zgomot” (prag) de către semnalul fluorescent a fost considerat drept estimator al cantității inițiale de material ADN al fiecărei specii bacteriene testate.

Încărcarea cantitativă bacteriană a probelor analizate s-a obținut comparând intensitatea semnalului fluorescent produs de fiecare specie testată cu semnalul qPCR fluorescent produs de anumite concentrații bacteriene bine cunoscute (curbă standard). Curbă standard de amplificare qPCR a fost obținută pe baza unei scale de diluții decimale succesive dintr-o cultură pură de *Porphyromonas gingivalis*, având o densitate celulară inițială cunoscută (determinată turbidimetric). Astfel, semnalul fluorescent al fiecărei probe (și al fiecărei specii testate) a fost extrapolat pe curbă standard, obținând astfel o estimare a numărului de celule bacteriene recoltate din pungile parodontale, pentru fiecare din cele 12 specii bacteriene.

Analiza HRM este utilizată pentru a distinge între amplificările de material ADN specific țintelor căutate față de amplificări PCR nespecifice. Pe măsura ridicării treptate a temperaturii unei probe de ADN amplificat, acesta se disociază. Analiza HRM are rolul de a monitoriza punctul termic la care se produce înjumătățirea semnalului fluorescent (“melting point”) specific pentru disocierea catenelor ADN ale ampliconilor care s-au obținut pentru fiecare specie bacteriană testată. Pe măsură ce se produce denaturarea ADN-ului bacterian,

Laboratorul a emis rapoarte de analiză pentru toți pacienții lotului, iar datele obținute au fost prelucrate statistic cu Microsoft Excel 2016.

Pacienții au fost încadrați, în ordinea descrescătoare a frecvenței, în parodontită avansată (tip IV), moderată (tip III) și incipientă (tip II). Niciun pacient din lotul analizat nu prezenta alergie la antibiotice.



Cazul 1 aparține unui pacient în vârstă de 44 ani la momentul recoltării, ce prezenta sângerare, inflamație locală, deterioarea structurii osoase, modificare de culoare a gingiei și halenă fetidă. Diagnosticul stabilit a fost de parodontită avansată de tip IV, generalizată.

În urma analizei probelor recoltate, s-au identificat niveluri crescute de:

- Porphyromonas gingivalis,
- Treponema denticola,
- Tannerella forsythia,
- Prevotella intermedia,
- Fusobacterium nucleatum,
- Capnocytophaga sputigena.

Alți germeni au fost identificați în proporții reduse:

- Eikenella corrodens,
- Campylobacter rectus,
- Prevotella nigrescens,
- Capnocytophaga ochracea,
- Capnocytophaga gingivalis.

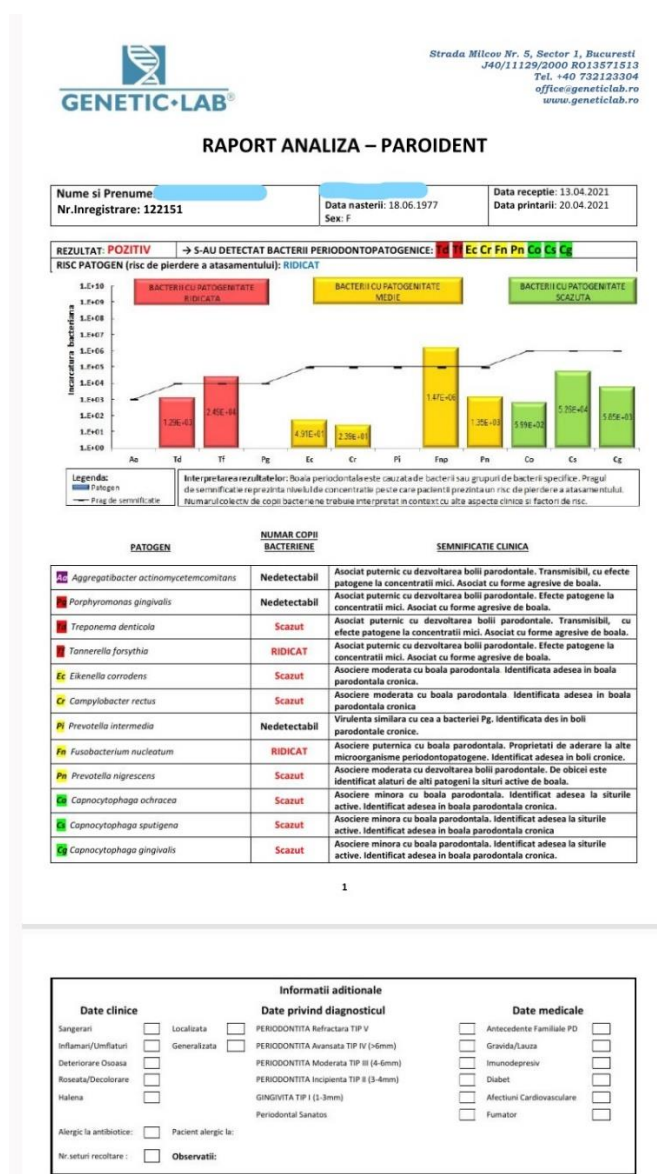


Fig. 5.10 – Raport de analiză în cazul 29

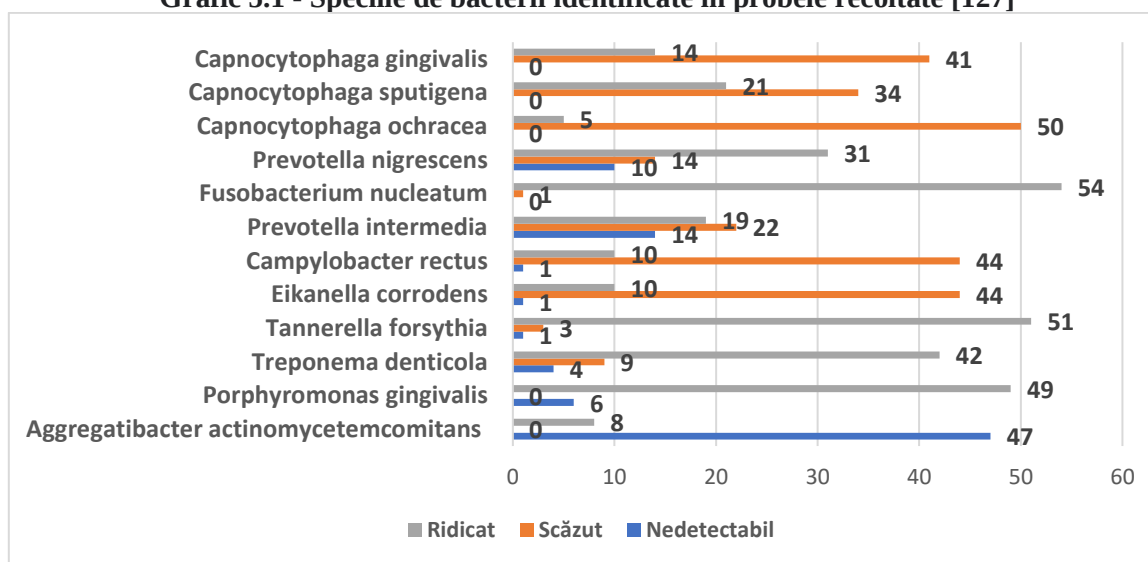
Cazul 29 aparține unei paciente de 44 de ani la momentul recoltării probei, care prezenta inflamație locală cu modificare de culoare a gingiei și halenă. Diagnosticul a fost de parodontită incipientă, de tip II.

La analiza probelor recoltate din pungile parodontale, s-au identificat niveluri crescute de *Tannerella forsythia* și *Fusobacterium nucleatum*, și niveluri scăzute de:

- *Treponema denticola*,
- *Eikenella corrodens*,
- *Campylobacter rectus*,
- *Prevotella nigrescens*,
- *Capnocytophaga ochracea*,
- *Capnocytophaga sputigena*,
- *Capnocytophaga gingivalis*.

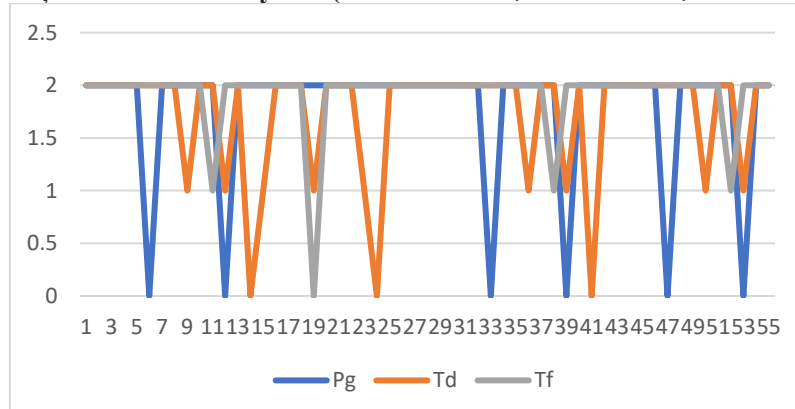
Graficul 5.1 ilustrează intervalele (ridicat, scăzut sau nedetectabil) în care au fost identificate cele 12 tipuri bacteriene analizate la lotul studiat.

Grafic 5.1 - Speciile de bacterii identificate în probele recoltate [127]

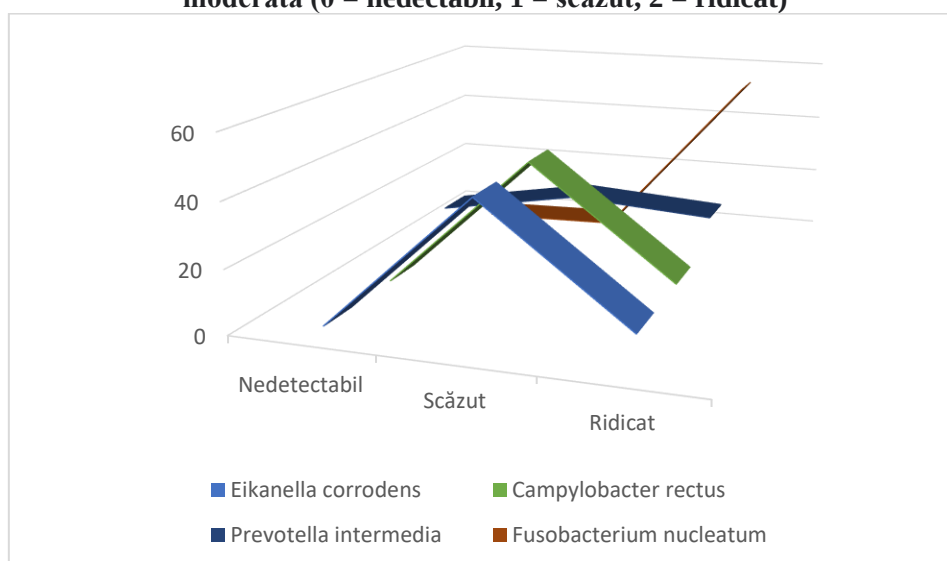


La lotul studiat nu am identificat o corelație semnificativă între *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* și prezența celorlalte 3 tulpini bacteriene cu patogenitate ridicată. Însă, am constatat că *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* și *Tannerella forsythia* au fost constant prezente în situsurile analizate (grafic 5.2).

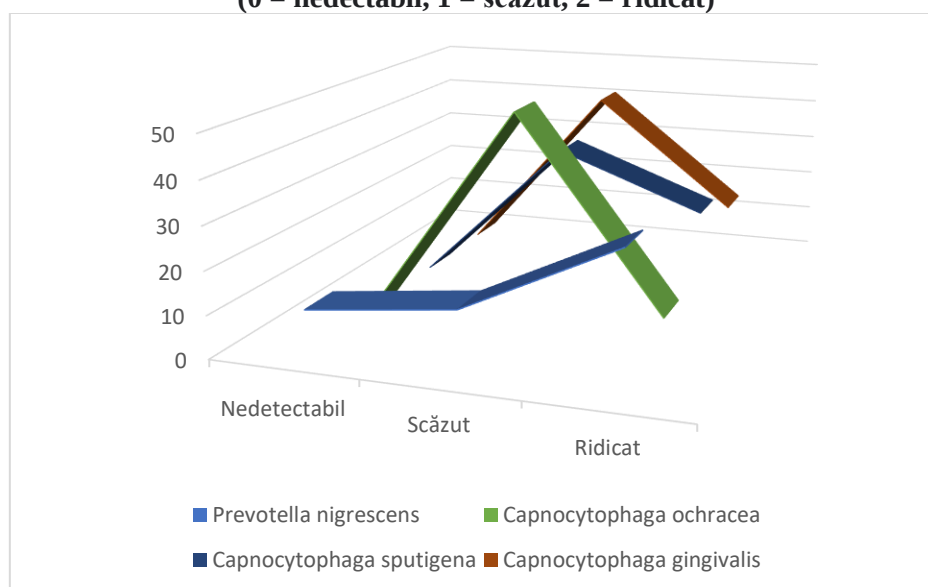
Grafic 5.2 – Corelații la lotul studiat între prezența *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* și *Tannerella forsythia* (0 = nedetectabil, 1 = moderat, 2 = ridicat) [127]



Grafic 5.3 – Corelații la lotul studiat în ceea ce privește prezența bacteriilor cu patogenitate moderată (0 = nedetectabil, 1 = scăzut, 2 = ridicat)



Grafic 5.4 – Corelații efectuate la lotul studiat între prezența bacteriilor cu patogenitate redusă (0 = nedetectabil, 1 = scăzut, 2 = ridicat)



Cele mai puțin am detectat prezența bacteriilor din speciile: *Capnocytophaga ochracea*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens* și *Campylobacter rectus*, urmate îndeaproape de *Capnocytophaga gingivalis*, *Prevotella intermedia* și *Capnocytophaga sputigena*. [127] Celelalte 5 specii bacteriene au fost identificate mult mai frecvent (grafic 5.3, grafic 5.4).

5.4 Discuții

Aggregatibacter actinomycetemcomitans face parte din grupa cocobacililor non-motili, Gram-negativi, cu profil capnofil (necesitând bioxid de carbon pentru creșterea sa), zaharolitic și facultativ anaerob. [121, 128-130] Chiar dacă formele agresive de parodontită localizată nu sunt produse de monoinfecția cu Aa, germenul face parte din grupa parodontopatogenilor majori. La lotul analizat în prezentul studiu nu am depistat monoinfecția cu Aa.

Porphyromonas gingivalis [131-134] este dominantă în parodontitele generalizate juvenile, în parodontitele rapid progresive cu caracter agresiv, în parodontite cronice, dar și în gingivostomatita ulcero-necrotică. În prezentul studiu, Pg a înregistrat valori crescute în aproximativ 89% din probele analizate, similar cu alte studii recente, dar în care Pg a fost majoritar din rândul bacteriilor cu patogenitate crescută [135].

Treponema denticola [136-138] este o bacterie spiralată Gram-negativă, ce conține smocuri de flageli care o ajută să efectueze deplasări variate și complexe, inclusiv în medii vâscoase. În cazul lotului analizat, Td a fost identificată doar în 76.36% din totalul cazurilor în cantități crescute, față de primul studiu efectuat în acest sens în România și publicat în 2017 [139], în care Td a fost majoritar prezentă printre bacteriile cu patogenitate crescută.

Tannerella forsythia [140-143] aparține clasei bacililor Gram-negativi, imobili și nesporulați. În prezentul studiu, Tf a fost identificată în concentrații mari în 92.72% cazuri.

Eikenella corrodens [144] este un bacil Gram-negativ, facultativ anaerob, pe care îl depistăm în cazurile agresive ale parodontopatiilor. *Campylobacter rectus* [145, 146] are aspect helicoid și datorită cilului său polar are o mobilitate deosebit de crescută. Am identificat în studiul nostru cantități crescute de Ec și Cr în 18.18% din probele prelevate.

Prevotella intermedia [147, 148] este un bacil Gram-negativ, identificat în gingivostomatitele ulcero-necrotice și în parodontopatiile cronice avansate. În prezentul studiu, cantități importante de Pi au fost decelate în 34.54% din probele investigate.

Fusobacterium nucleatum [149] este de asemenea un bacil Gram-negativ, care se găsește dispus în snopi, pereche sau izolat, în cazurile de gingivite ulcero-necrotice și boli parodontale progresive. În studiul nostru, Fn a fost identificat în proporții crescute în 98.18% din probele analizate.

Prevotella nigrescens [150] este un bacil imobil, Gram-negativ, izolat în parodontite și gingivite. În studiul prezent, Pn a fost identificată în cantități importante în 56.36% din eşantioanele prelevate. În studiul nostru, Co a fost identificată în cantități crescute în 9.09% din probele prelevate, Cs în 38.18%, iar Cg în 24.45%.

Similar prezentului studiu, cercetările anterioare efectuate pe populații din Asia au demonstrat că Pg, Td și Tf sunt frecvent întâlnite la adulții cu parodontopatie [135, 152-154]. De asemenea, în prezentul studiu s-a identificat o prevalență scăzută a Aa, la fel ca în alte studii [135, 155-157].

Conform studiului nostru Tf este unul dintre agenții etiologici majoritari ai parodontitei, așa cum au relevat și alte studii [135, 152-154, 161-163], în asociere însă cu alte bacterii din zona roșie, precum Pg și Td.

5.5 Concluzii

- 1) *Tannerella forsythia* a fost bacteria cea mai frecvent identificată din cadrul clasei germenilor cu patogenitate ridicată în producerea parodontopatiei.
- 2) *Fusobacterium nucleatum* a fost cea mai întâlnită bacterie dintre toate cele 12 specii izolate și, implicit, din clasa bacteriilor cu patogenitate moderată.
- 3) *Capnocytophaga sputigena* a fost cel mai frecvent izolată dintre bacteriile cu patogenitate redusă.
- 4) Pentru validarea rezultatelor obținute este necesară extinderea studiului privind izolarea tuturor celor 12 bacterii mai frecvent implicate în producerea parodontopatiei la un număr mai mare de pacienți, eventual și cu comorbidități și cu obiceiuri vicioase care au impact asupra instalării și agravării bolii parodontale.
- 5) În vederea înțelegerii complete a etiologiei polimicrobiene a bolii parodontale sunt necesare, de asemenea, studii asupra interacțiunilor dintre diferitele clase de bacterii prezente în pungile parodontale.

Capitolul 6

Studiu privind eficiența terapiilor alternative asupra germenilor microbieni implicați în producerea bolii parodontale

6.1 Introducere

Flora bacteriană a cavității orale cuprinde diverse microorganisme ce trăiesc permanent sau temporar la acest nivel, îndeplinind efecte pozitive sau negative asupra structurilor componente [164]. S-au efectuat de-a lungul timpului numeroase studii asupra florei implicate în apariția și evoluția bolii parodontale [165, 172, 177, 179, 180]. Patogenul dominant implicat pare a fi *P. gingivalis* [174, 175, 181-184]. Fiecare introducere a unui nou element nebacterian în mediul cavității bucale, începând de la primul dinte erupt și terminând cu protezele totale, contribuie la crearea de noi condiții de mediu [185, 186].

Profilaxia primară a inflamațiilor parodontiului marginal cuprinde măsurile de igienizare locală ce au drept scop evitarea instalării bolilor parodontale.

Profilaxia secundară este adresată stadiilor incipiente de îmbolnăvire parodontală, cu scopul de a le împiedica evoluția spre forme avansate.

Profilaxia terțiară are rolul de a preveni apariția recidivelor după tratament.

Igienizarea constituie ansamblul de acțiuni terapeutice care au drept scop îndepărtarea plăcii bacteriene, a tartrului și a detritusului organic ce ocupă șanțul gingival, dar și a cementului necrotic care devine accesibil după detartraj, pentru buna menținere în timp a igienei orale. [35]

Igienizarea se realizează de către medic în cabinet și de către pacient, la domiciliu, și poate fi completată de aplicarea unor substanțe cu rol antiinflamator și antimicrobian [35].

Dacă cu zeci, sute sau mii de ani în urmă oamenii se tratau cu plante sau minerale, după descoperirea antibioticelor constatăm "uitarea" primelor remedii și utilizarea excesivă a celor din a doua categorie.

Origanum vulgare (sovarv), este o specie perenă, ierboasă, erectă, cu înălțime de 30-40cm, ramificată, ce aparține genului *origanum*. Prezintă rizomi dispuși orizontal, de culoare brun-cenușiu, din care pornesc rădăcini filiforme și stoloni subterani. Tulpina este aeriană, păroasă, de culoare verzuie cu nuanțe roșiatice.

Are frunze ovale, lungi, opuse, scurt pețiolate, prezintă flori cu caliciul redus (2 mm), de culoare roz-violaceu. Corola are sub 6mm și este dispusă în inflorescențe corimbiforme. Fructele plantei sunt grupate câte 4 în caliciu, sub formă de nucule ovoidale.

Planta înflorește în perioada iulie-august. Se utilizează părțile aeriene înflorite după uscare sau uleiul volatil ce se extrage prin antrenare cu vapori de apă [188].

Mirosul este aromat, caracteristic, iar gustul amar, aromatic.

Specia crește în păduri și la marginea drumurilor și prezintă un interes deosebit în primul rând datorită conținutului bogat de ulei volatil cu timol și carvacrol. Întâlnim în compoziția sa în cantități mai mici acid rozmarinic, cimol alfa-tuiona, alfa-terpene, tanoizi, substanțe amare, flavone, antociani- penigdoli și malvidoli [189].

Carvacrolul are proprietăți antifungice, antiparazitare și antibacteriene, iar timolul este un fungicid cu proprietăți antiseptice.

Uleiul de oregano sălbatic forte produs de Provita Nutrition are multiple indicații, printre recomandări aflându-se dezinfectarea cavității orale în ansamblu, inclusiv a gingiei.

Scopul prezentului studiu a fost evaluarea eficienței terapiilor alternative, respectiv eficiența antibacteriană a uleiului de oregano asupra germenilor microbieni implicați în producerea îmbolnăvirii parodontale.

6.2 Materiale și metode

Materialul de studiu a fost reprezentat de un lot de 52 de pacienți de ambele sexe ai Clinicii stomatologice Dr. Vodiță, care nu mai beneficiaseră de igienizare profesională de minim 2 ani.

Cercetarea s-a desfășurat în cadrul studiilor doctorale cu acordul Comisiei de Etică a Facultății de Medicină Dentară din cadrul Universității Titu Maiorescu din București și a fost efectuată respectând declarația de la Helsinki, fără a aduce prejudicii sănătății pacienților sau mediului și respectând drepturile omului, având totodată acordul scris al pacienților pentru includerea în studiu și pentru utilizarea rezultatelor studiului în scopuri științifice, cu protejarea identității pacienților.

Lotul de studiu a fost împărțit aleator în 2 eșantioane:

1. Eșantionul A a cuprins 28 pacienți cărora li s-a realizat igienizare profesională, urmată de recomandări privind autoigienizarea la domiciliu.
2. Eșantionul B a cuprins 24 pacienți cărora li s-a realizat igienizare profesională, urmată de recomandări privind autoigienizarea la domiciliu și aplicarea locală de ulei de oregano timp de o lună.

Tuturor pacienților incluși în studiu li s-au efectuat prelevări din pungile parodontale și determinări microbiene înainte de efectuarea igienizării profesionale și la 1-6 luni după detartraj, urmând protocoalele de recoltare și de izolare a speciilor bacteriene care au făcut subiectul studiului prezentat în capitolul 5.

Pentru ambele eșantioanele A și B, igienizarea profesională a constat în detartraj ultrasonic asociat în caz de nevoie cu detartraj manual și periaj profesional, realizat de același medic. Recomandările privind autoigienizarea au constat în sfaturi pentru îmbunătățirea tehnicii de periaj, utilizarea aței dentare, a dușului bucal și clătirea cu același tip de apă de gură.

În cazul eșantionului B, după periajul dentar de seara, pacienții au efectuat timp de 30 de zile badijonaj la nivelul gingiei cu un tampon steril îmbibat în **Ulei de oregano sălbatic forte** produs de Provita Nutrition, prin mișcări circulare, în dreptul fiecărui grup dentar. Pentru o mai bună absorbție, am recomandat ca durata badijonajului să fie de 3-5 minute.

Rezultatele determinărilor microbiene ante- și post- tratament au fost prelucrate statistic cu Microsoft Excel 2016.

6.3 Rezultate

a) Eșantionul A

Aggregatibacter actinomycetemcomitans a fost detectată inițial în cantități ridicate la 28.57% din pacienți, la restul pacienților fiind nedetectabilă. La a doua determinare, Aa a fost nedetectabilă la toți pacienții eșantionului A.

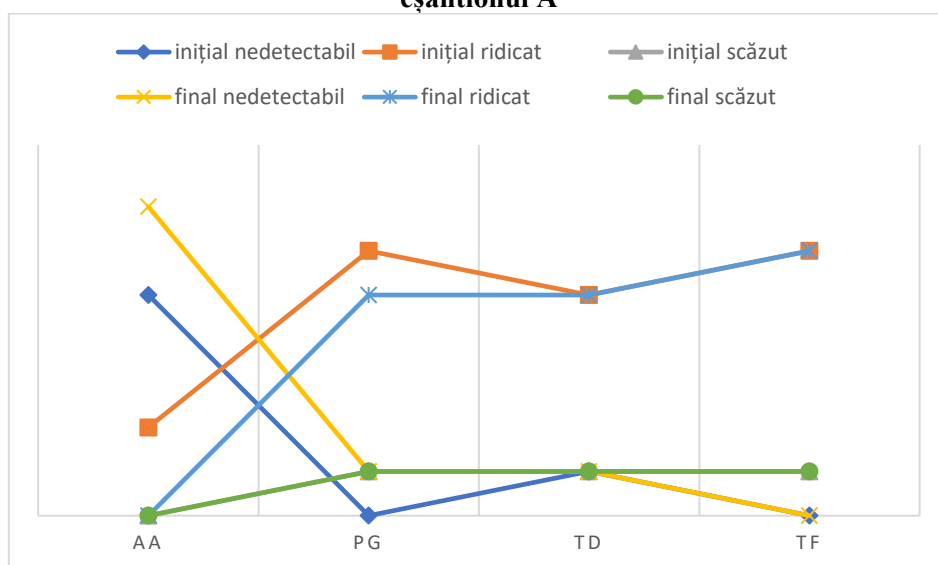
Porphyromonas gingivalis și *Tannerella forsythia* au fost depistat inițial în cantități crescute la 85.71% din pacienți și scăzute la 14.29% din pacienți. La a doua determinare, Pg s-a fost nedetectată în 14.29% din cazuri, a fost detectată în cantități reduse în 14.29% din cazuri și depistată în cantități crescute în 71.42% din cazuri. Tf nu a suferit modificări în ceea ce privește procente de distribuție față de situația inițială.

Treponema denticola a fost depistată atât la prima cât și la a doua determinare în cantități crescute în 71.42% din cazuri, în cantități reduse sau nedetectabilă în câte 14.29% din cazuri.

În graficul 6.1 sunt prezentate comparativ variațiile bacteriilor cu patogenitate ridicată în boala parodontală.

Eikenella corrodens, *Campylobacter rectus*, *Capnocytophaga sputigena* și *Capnocytophaga gingivalis* au fost detectate inițial în cantități reduse în 85.71% din cazuri și în cantități crescute în 14.29% din cazuri. La a doua determinare, Ec și Cr au fost nedetectabile în 14.29% din cazuri, detectate în cantități ridicate tot în 14.29% din cazuri și detectate în cantități scăzute în 71.42% din cazuri. La a doua determinare, Co a fost detectată în cantități scăzute în toate cauzile, iar Cs a fost detectată în cantități ridicate în 28.57% din cazuri și în cantități scăzute în 71.43% din cazuri.

Grafic 6.1- Variația comparativă a bacteriilor cu patogenitate ridicată în boala parodontală la eșantionul A



Prevotella intermedia a fost detectată inițial în cantități reduse în 57.13% din cazuri, în cantități ridicate în 28.58% din cazuri și a fost nedetectabilă în 14.29% din cazuri. La a doua determinare, a fost depistată în cantități ridicate în 14.28% din cazuri, depistată în cantități scăzute sau nedetectabilă în câte 42.86% din cazuri.

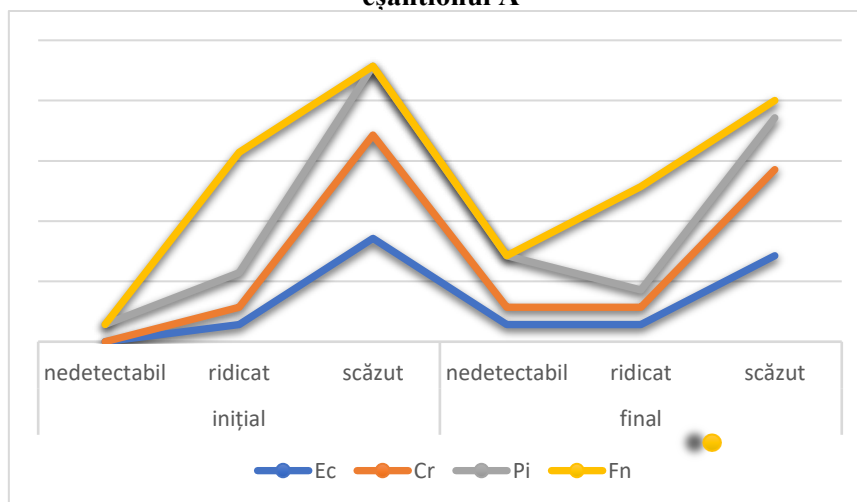
Fusobacterium nucleatum a fost depistată inițial în cantități ridicate în toate cazurile, iar la a doua determinare a mai fost prezentă în cantități ridicate doar în 85.71% din cazuri, în restul de 14.29% din cazuri fiind prezentă în cantități reduse.

Prevotella nigrescens a fost prezentă inițial în cantități ridicate în 28.58% din cazuri și în cantități reduse în 71.42% din cazuri. La a doua determinare, a fost nedetectabilă în 42.87% din cazuri și prezentă în cantități reduse în 57.13% din cazuri.

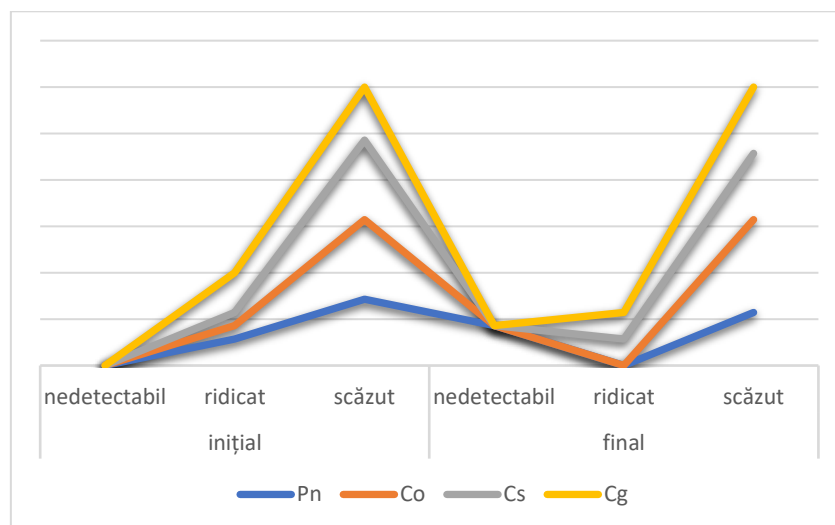
Capnocytophaga ochracea a fost prezentă inițial în cantități ridicate în 42.87% din cazuri și în cantități scăzute în 57.13% din cazuri. La a doua determinare a fost identificată în cantități reduse în 71.18% din cazuri și în cantități ridicate în 28.57% din cazuri.

Graficul 6.2 ilustrează variațiile comparative ale bacteriilor cu patogenitate moderată, iar graficul 6.3 variațiile bacteriilor cu patogenitate redusă în inițierea bolii parodontale.

Grafic 6.2- Variația comparativă a bacteriilor cu patogenitate moderată în boala parodontală la eșantionul A



Grafic 6.3- Variația comparativă a bacteriilor cu patogenitate redusă în boala parodontală la eșantionul A



Pacienta BM, în vîrstă de 55 ani, se prezintă în clinica noastră solicitînd consult de specialitate și tratament. Pacienta prezenta parodontită moderată tip III, generalizată, cu modificări de culoare și inflamații gingivale, acompaniate de rezorbtii osoase. Anterior realizării igienizării profesionale realizăm prelevare de lichid din 5 pungi parodontale după tehnica descrisă în capitolul 5. După realizarea igienizării profesionale, pacienta este consiliată cu privire la tehnicile de autoigienizare și este dispensarizată pentru o perioadă de 2 luni.

La 2 luni de la realizarea igienizării profesionale pacienta este rechemată în cabinet și i se recoltează din nou lichid din pungile parodontale în vederea identificării bacteriilor cu patogenitate de diferite grade în producerea bolii parodontale. Examinînd comparativ cele 2 rezultate obținute la interval de 2 luni, constatăm că Pi, Cs și Cg care inițial se găseau în cantități ridicate se află la a doua determinare în cantități scăzute.

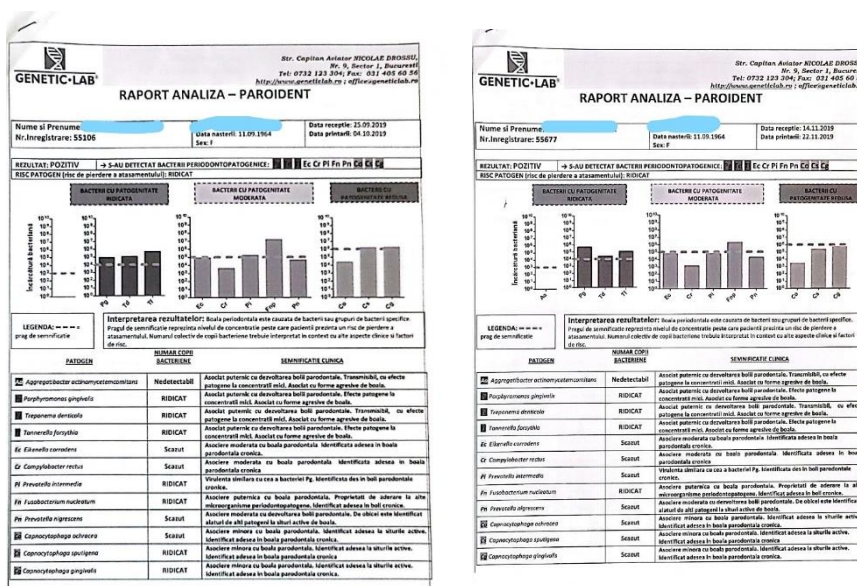


Fig. 6.3 – Rapoarte de analiză ale pacientei BM la interval de 2 luni

b) Eșantionul B

Aggregatibacter actinomycetemcomitans nu a fost detectat nici la prima determinare, nici la a doua, în cadrul pacienților care au compus eșantionul B.

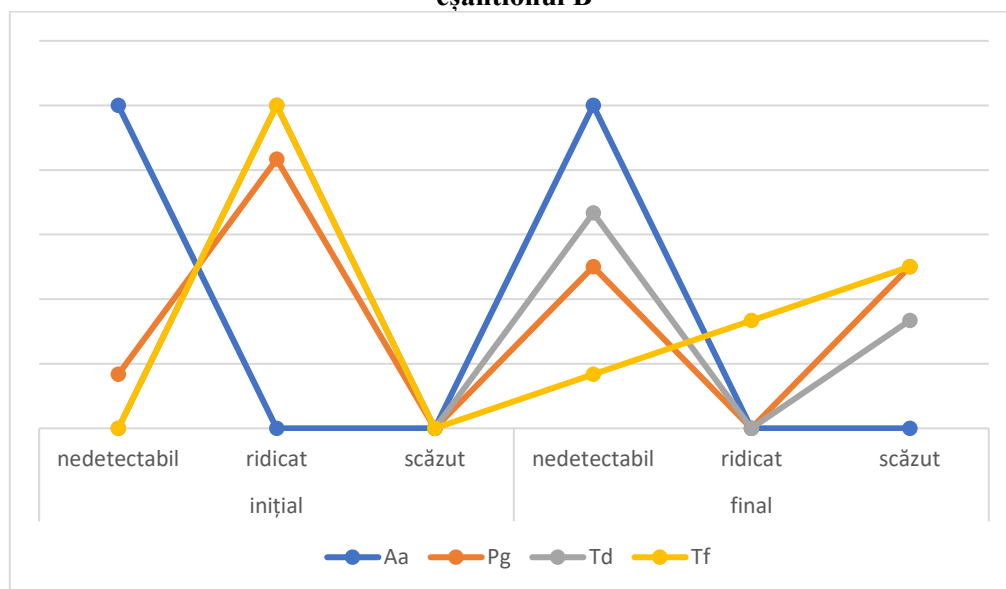
Porphyromonas gingivalis a fost ridicat în 83.33% din cazuri și nedetectabil în 16.67% din cazuri la prima determinare. La a doua determinare, jumătate din lot a avut niveluri scăzute de Pg, iar la cealaltă jumătate a lotului nu a fost detectabilă.

Treponema denticola a fost prezentă la prima determinare în cantități crescute la toți pacienții eșantionului, dar la a doua determinare a fost nedetectabilă la 66.67% din pacienți și prezentă în cantități reduse la 33.33% din pacienți.

Tannerella forsythia a fost detectată în cantități crescute la prima determinare la toți pacienții eșantionului. La a doua determinare, Tf a fost nedetectabilă în 16.67% din cazuri, prezentă în cantități reduse în 50% din cazuri și prezentă în cantități crescute în 33.33% din cazuri.

În graficul 6.4 sunt prezentate comparativ variațiile bacteriilor cu patogenitate ridicată în boala parodontală întâlnite la eșantionul B.

Grafic 6.4- Variația comparativă a bacteriilor cu patogenitate ridicată în boala parodontală la eșantionul B



Eikenella corrodens a fost la prima determinare ridicată în 16.67% din cazuri și scăzută în 83.33% din cazuri. La a doua determinare, Ec a fost nedetectabilă în 16.67% din cazuri și scăzută în 83.33% din cazuri.

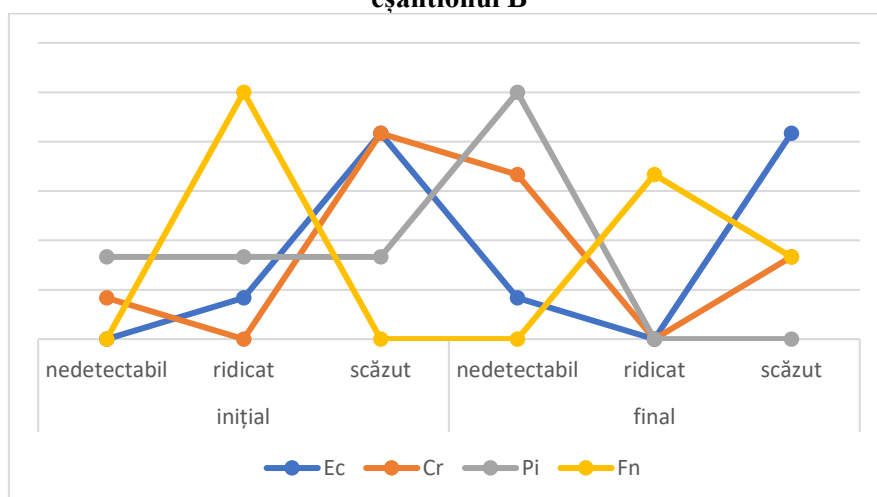
Campylobacter rectus a fost la prima determinare scăzută în 83.33% din cazuri și nedetectabilă în 16.67% din cazuri. La a doua determinare a fost nedetectabilă în 66.67% din cazuri și scăzută în 33% din cazuri.

Prevotella intermedia a fost inițial la câte o treime din lot nedetectabilă, crescută, respectiv scăzută, iar la a doua determinare a fost 100% nedetectabilă.

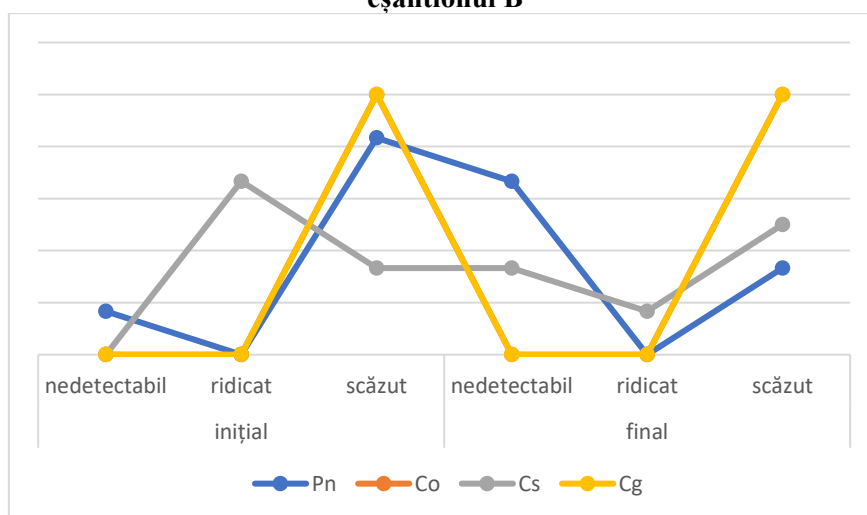
Fusobacterium nucleatum a fost inițial prezentă în cantități crescute la absolut toți pacienții lotului, iar la a doua determinare a fost prezentă în cantități ridicate la 66.67%, la restul de 33.33% din pacienți fiind prezentă în cantități scăzute.

Graficul 6.5 ilustrează variațiile comparative ale bacteriilor cu patogenitate moderată, iar graficul 6.6 variațiile bacteriilor cu patogenitate redusă în inițierea bolii parodontale întâlnite la eșantionul B.

Grafic 6.5- Variația comparativă a bacteriilor cu patogenitate moderată în boala parodontală la eșantionul B



Grafic 6.6- Variația comparativă a bacteriilor cu patogenitate scăzută în boala parodontală la eșantionul B



Prevotella nigrescens am întâlnit-o inițial în cantități scăzute în 83.33% din cazuri, la restul pacienților fiind nedetectabilă. La a doua determinare, Pn a fost nedetectabilă la 66.67% din pacienți și prezentă în cantități scăzute la 33.33% din cazuri.

Capnocytophaga ochracea și *Capnocytophaga gingivalis* au fost prezente în cantități scăzute la toți pacienții atât la prima determinare, cât și la cea de-a doua.

Capnocytophaga sputigena a fost inițial prezentă în cantități crescute la 66.67% din pacienți și prezentă în cantități reduse în 33.33% din cazuri. La a doua determinare a fost nedetectabilă în 33.33% din cazuri, prezentă în cantități crescute la 16.67% din cazuri și în cantități reduse în 50% din cazuri.

Din cazurile eșantionului B vă prezentăm 2, considerate reprezentative.

Pacienta TN, în vârstă de 52 ani, se prezintă în clinica noastră solicitând consult de specialitate și tratament. Pacienta prezenta parodontită avansată tip IV, generalizată, cu modificări de culoare și inflamații gingivale, acompaniate de rezorbții osoase și sângerare gingivală. Anterior realizării igienizării profesionale realizăm prelevare de lichid din 5 puncte parodontale după tehnica descrisă în capitolul 5. După realizarea igienizării profesionale, pacienta este consiliată cu privire la tehnicile de autoigienizare, i se recomandă aplicarea locală de ulei de oregano sălbatic seara după periaj timp de 30 zile și este dispensarizată pentru o perioadă de 2 luni.

La 2 luni de la realizarea igienizării profesionale pacienta este rechemată în cabinet și i se recoltează din nou lichid din pungile parodontale în vederea identificării bacteriilor cu patogenitate de diferite grade în producerea bolii parodontale. Examinând comparativ cele 2 rezultate obținute la interval de 2 luni, constatăm că Tf și Cs care inițial se găseau în cantități ridicate se află la a doua determinare în cantități scăzute, iar Td care inițial se găsea în cantități ridicate și Pn care inițial se găsea în cantități scăzute devin nedetectabile la a doua determinare.

Pacienta MM, în vârstă de 46 ani, se prezintă în clinica noastră solicitând consult de specialitate și tratament. Pacienta prezenta parodontită avansată tip IV, generalizată, cu modificări de culoare și inflamații gingivale, acompaniate de rezorbții osoase și sângerare gingivală. Anterior realizării igienizării profesionale realizăm prelevare de lichid din 5 pungi parodontale după tehnica descrisă în capitolul 5. După realizarea igienizării profesionale, pacienta este consiliată cu privire la tehnicile de autoigienizare, i se recomandă aplicarea locală de ulei de oregano sălbatic seara după periaj timp de 30 zile și este dispensarizată pentru o perioadă de 7 luni.

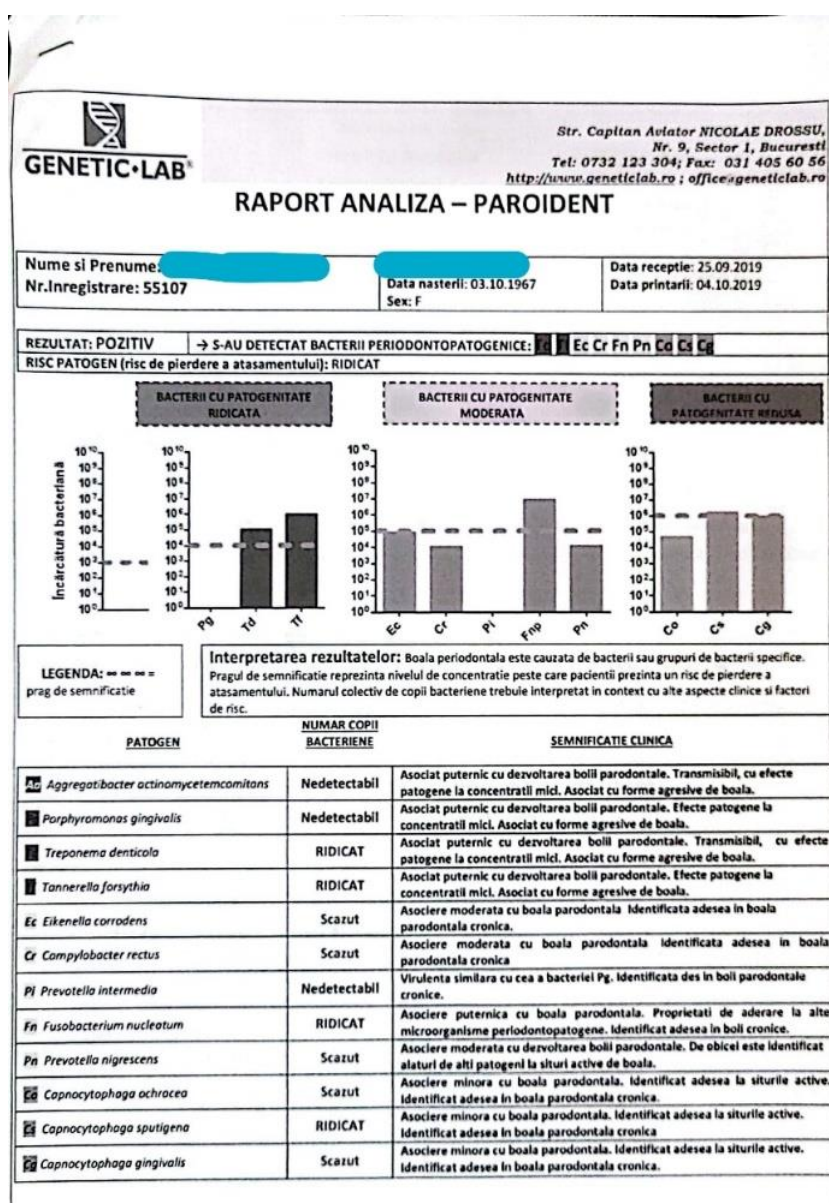


Fig. 6.5 – Raport de analiză inițial al pacientei TN

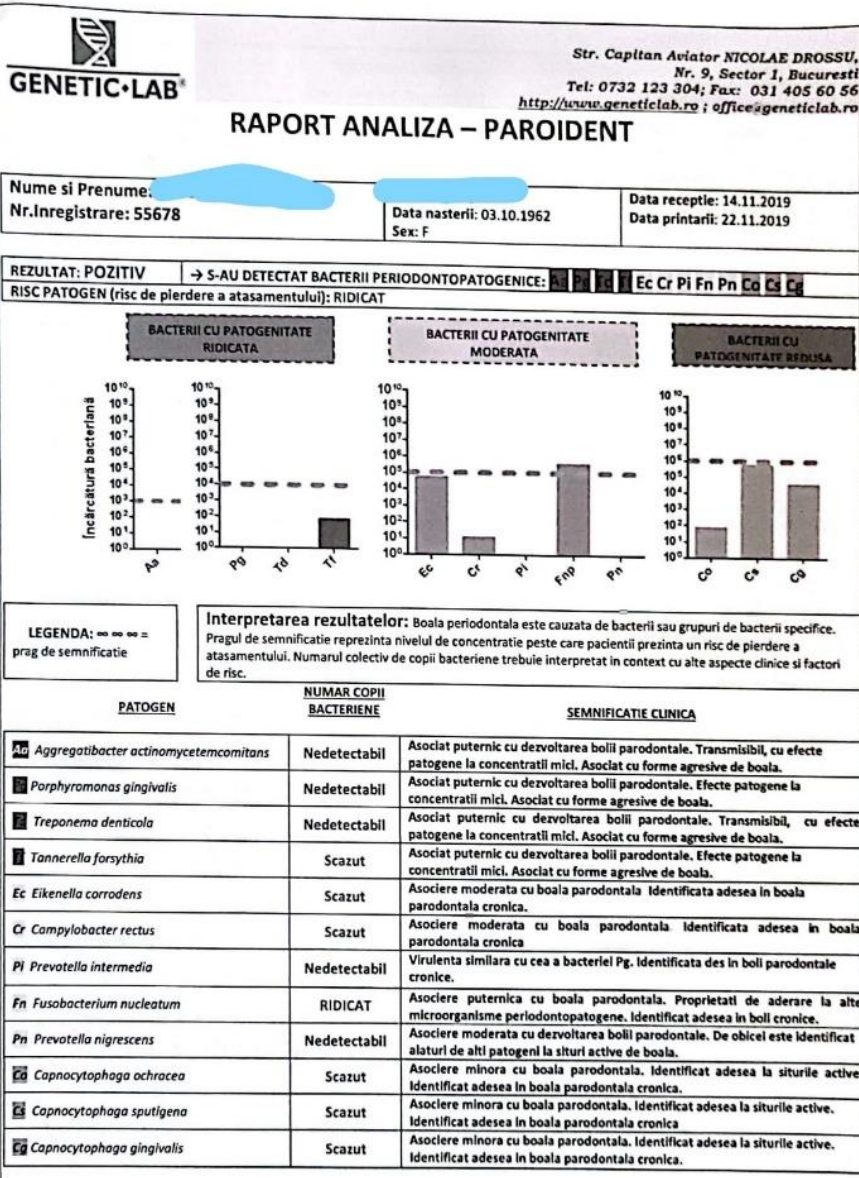


Fig. 6.6 – Raport de analiză final al pacientei TN

6.4 Discuții

Antibioticele sunt considerate o resursă de neprețuit pentru gestionarea infecțiilor oro-faciale [193]. Studiile anterioare au sugerat că aplicarea adjuvantă a antibioticelor sistemice la pacienții cu parodontită cronică are efecte clinice mai bune decât fără antibiotice [194-197]. Dar, în cazurile în care profilurile microbiene subgingivale sunt necunoscute, majoritatea regimurilor terapeutice cu antibiotice parodontale sunt prescrise pe baza experienței medicului curant [198]. În acest caz, dacă agenții patogeni parodontali sunt rezistenți sau slab sensibili la antibioticul selectat, eșecul tratamentului antimicrobian clinic este inevitabil [199].

Prescrierea empirică a antibioticelor a dus din nefericire la dezvoltarea unei game largi de rezistență microbiană, făcând antibioticele utilizate în mod obișnuit ineficiente [200, 201].

În acest context, utilizarea uleiurilor esențiale derivate din frunze, flori, rădăcini, tulpini, semințe sau frunțe aparținând mai multor familii de plante, ca sursă naturală de agenți antimicrobieni [202], este salutară. Uleiurile esențiale au stimulat cercetătorii pentru a

apofunda studii referitoare la utilizarea lor drept alternativ natural în afecțiunile cavității orale [203].

Când comparăm mai multe uleiuri esențiale (cuișoare, coriandru, oregano, scorțișoară, cimbru, mentă, rozmarin, muștar sau salvie), uleiul esențial de oregano se clasează printre cele mai înalte eficiențe antibacteriene [202, 217].

În prezentul studiu, utilizarea topică a uleiului de oregano sălbatic a avut ca efect reducerea semnificativă a prezenței bacteriilor cu patogenitate crescută în producerea bolii parodontale. Atât Pg, cât și Td și Tf au fost detectate în cantități mult mai reduse la a doua determinare în cazul eșantionului B.

Clătirile cu uleiuri esențiale diluate sau încorporate în apă de gură ca rutină de îngrijire la domiciliu ar putea fi utilizate pentru a trata ulcerările aftoase recurente, pentru a controla infecțiile parodontale post-chirurgicale, pentru întreținerea implanturilor și pentru prevenirea cariilor dentare sau a gingivitei [202, 218-221].

Multe studii recente [224-240], îndreptate asupra efectului antimicrobian pe care uleiurile esențiale extrase din plante îl au asupra germenilor patogeni ce fac parte din biofilmul dentar, furnizează rezultate similare studiului nostru, în ceea ce privește scăderea prezenței germenilor microbieni la nivelul cavității orale.

6.5 Concluzii

- 1) Utilizarea topică a uleiului de oregano sălbatic, în completarea igienizării profesionale a arcadei dento-alveolare și a măsurilor susținute de auto-igienizare locală, a avut ca efect în studiul nostru reducerea semnificativă a microflorei cavității orale, în special a bacteriilor din “seria roșie”, cu patogenitate ridicată în inițierea îmbolnăvirilor parodontale, în comparație cu eșantionul A de studiu la care s-a efectuat doar igienizare profesională și consiliere privind măsurile de autoigienizare.
- 2) Limitele studiului sunt date de lotul relativ redus de pacienți incluși în studiu și de perioada redusă de dispensarizare.
- 3) Pentru validarea rezultatelor obținute în ceea ce privește efectul antibacterian al aplicării topice a uleiului de oregano sălbatic asupra bacteriilor patogene implicate în inițierea bolii parodontale, ar fi necesară repetarea studiului pe un lot mai mare de pacienți, dar și creșterea perioadei de dispensarizare.

Capitolul 7

Concluzii generale, elemente de originalitate și perspective pe care le deschide teza

Cele 3 direcții de cercetare abordate în cadrul doctoratului au următoarele concluzii:

- A) Studiul privind evaluarea incidenței diferitelor tipuri de afectări parodontale la un lot de pacienți:
 - 1) Populația din țara noastră din păcate nu acordă o atenție deosebită prevenirii îmbolnăvirilor parodontale, care constituie pe plan mondial afecțiunea principală, alături de caria dentară, care produce tulburarea homeostaziei aparatului dento-maxilar.
 - 2) Pacienții se prezintă adesea la control de specialitate în stadii grave, cronicizate ale îmbolnăvirilor parodontale, fiind alarmați de sîngerările gingivale, mobilitatea dinților și halitoză.
 - 3) În studiul nostru, asocierea dintre fumat și îmbolnăvirea parodontală a fost mai bine reprezentată decât asocierea cu un nivel crescut autoapreciat de stres.
- B) Studiul privind asocierea unor specii bacteriene cu boala parodontală, unul dintre puținele efectuate în acest sens la populația din România, a relevat:

- 1) Tannerella forsythia, Fusobacterium nucleatum și Capnocytophaga sputigena au fost bacteriile cel mai frecvent depistate din cadrul celor 3 clase principale de bacterii cu patogenitate ridicată, moderată și respectiv scăzută în inițierea bolii parodontale.
 - 2) Dintre cele 3 reprezentante menționate anterior, Fusobacterium nucleatum s-a detașat vizibil, fiind prezentă în aproape toate probele recoltate din pungile parodontale ale lotului de pacienți examinat.
- C) Studiul cu privire la eficiența terapiilor alternative asupra germenilor microbieni implicați în producerea bolii parodontale, de asemenea unul dintre puținele studii efectuate în acest sens, a demonstrat că:
- 1) La lotul de pacienți la care s-au efectuat aplicații topice cu ulei de oregano sălbatic s-a înregistrat o scădere semnificativă a florei bacteriene implicate în inițierea bolii parodontale, în special a bacteriilor cu patogenitate ridicată, comparativ cu lotul martor la care nu s-au aplicat terapii alternative, ci doar măsuri clasice de igienizare profesională și auto-igienizare.

Propunem pe viitor, pentru validarea rezultatelor obținute, extinderea studiilor pe loturi mai ample de pacienți, eventual și cu comorbidități și cu obiceiuri vicioase care au impact asupra instalării și agravării bolii parodontale. De asemenea, ar fi utile cercetări aprofundate asupra interacțiunilor dintre diferitele clase de bacterii prezente în pungile parodontale, pentru o mai bună înțelegere a etiologiei polimicrobiene a acestei afecțiuni.

Bibliografie selectivă

1. Rathee M, Jain P. Embryology, Teeth. 2021 Jul 31. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. PMID: 32809350.
2. Torabi S, Soni A. Histology, Periodontium. 2021 Mar 31. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. PMID: 34033366.
3. Agustín-Panadero R, Martín-de Llano JJ, Fons-Font A, Carda C. Histological study of human periodontal tissue following biologically oriented preparation technique (BOPT). J Clin Exp Dent. 2020 Jun;12(6):e597-e602.
4. Alkan B, Koroglu P. Effects of amoxicillin on gingival biopsies and oral smears: A cross-sectional study. Niger J Clin Pract. 2021 Feb;24(2):233-239.
5. Mehrotra N, Singh S. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; Treasure Island (FL): May 15, 2021. Periodontitis.
6. Koller A, Sapra A. Anatomy, Head and Neck, Oral Gingiva. 2021 Aug 11. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. PMID: 32809497.
7. Chavez MB, Chu EY, Kram V, de Castro LF, Somerman MJ, Foster BL. Guidelines for Micro-Computed Tomography Analysis of Rodent Dentoalveolar Tissues. JBM Plus. 2021 Mar 3;5(3):e10474. doi: 10.1002/jbm4.10474. PMID: 33778330; PMCID: PMC7990153.
35. Dumitriu HT, Parodontologie, Ed. Viața Medicală Românească, 2009.
43. Abusleme L et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. ISME J. 2013, 7, 1016–1025.
44. Griffen AL et al. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. ISME J. 6, 2012, 1176–1185.
45. Rosan B & Lamont RJ Dental plaque formation. Microbes Infect. 2, 2000, 1599–1607.
93. Brown LJ, Brunelle JA, Kingman A. Periodontal status in the United States, 1988-1991: prevalence, extent, and demographic variation. J. Dental Res., 1996, 75:672-683.
94. Yamamoto M, Kobayashi R, Kono T, Bolerjack B, Gilbert R. Induction of IL-10- producing CD4 T-cells in Chronic Periodontitis. J. Dent. Res. 2011, 90(5):653-658.
103. Vodiță C, Vodiță AE, Coman C, Comăneanu RM, Ghergic DL, Mihai LL, Assessment of periodontal status in a group of patients and correlations with factors which favoring periodontal disease, Ref: Ro J Stomatol. 2021;67(2) DOI: 10.37897/RJS.2021.2.3.
113. Mărțu S, Solomon S, Potârniche O, Păsărin L, Mărțu A, Nicolaiciuc O, Ursarescu I, Evaluation of the prevalence of the periodontal disease versus systemic and local risk factors, International Journal of Medical Dentistry, vol 3(3) 2013, pp. 212-218
114. Solomon S, Mărțu A, Ursărescu I, Mărțu S. Severe periodontal impairment in systemic conditions: a case report. Romanian Journal of Oral Rehabilitation 2012: 5(2):91-97.
115. Broadbent E, Petrie KJ, Alley PG, Booth RJ. Psychological stress impairs early wound repair following surgery. Psychosomatic Medicine, 2003, 65, 865-869.
116. Axelsson P, Paulander J, Lindhe J. Relationship between smoking and dental status in 35-, 50-, 65-, and 75-year-old individuals. J Clin Periodontol 1998: 25:297-305.
117. Holm G. Smoking as an additional risk for tooth loss. J Periodontol 1994: 65: 996-1001.
118. Martinez-Canut P, Lorca A, Magaña R. Smoking and periodontal disease severity. J Clin Periodontol 1995: 22: 743-749.

121. Ionescu E și colab, Manual pentru rezidențiat, Ed Universitară Carol Davila, **2021**.
124. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol*. **1992** Apr;63(4 Suppl):322-31. doi: 10.1902/jop.1992.63.4s.322. PMID: 1573546.
125. Darveau RP. The oral microbial consortium's interaction with the periodontal innate defense system. *DNA Cell Biol*. **2009** Aug;28(8):389-95. doi: 10.1089/dna.2009.0864. PMID: 19435427; PMCID: PMC2883565.
126. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*. **2002**;28:12-55. doi: 10.1034/j.1600-0757.2002.280102.x. PMID: 12013340.
127. Vodiță C, Ghergic DL, Vodiță AE, Comăneanu RM, Mihai LL. Detection of bacterial species associated with periodontal disease in a group of patients, *Romanian Journal of Stomatology*, 2021, Vol 67(2):128-134, DOI: 10.37897/RJS.2021.2.11
128. Oscarsson J, DiRienzo J, Johansson A. Editorial Comments to the Special Issue: "Aggregatibacter actinomycetemcomitans-Gram-Negative Bacterial Pathogen". *Pathogens*. **2020** Jun 4;9(6):441. doi: 10.3390/pathogens9060441. PMID: 32512822; PMCID: PMC7350384.
129. Ardila CM, Bedoya-García JA. Antimicrobial resistance of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in periodontitis patients. *J Glob Antimicrob Resist*. **2020** Sep;22:215-218. doi: 10.1016/j.jgar.2020.02.024. Epub 2020 Mar 10. PMID: 32169683.
130. Jensen AB, Isidor F, Lund M, Væth M, Johansson A, Lauritsen NN, Haubek D. Prevalence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and Periodontal Findings among 14 to 15-Year Old Danish Adolescents: A Descriptive Cross-Sectional Study. *Pathogens*. **2020** Dec 16;9(12):1054. doi: 10.3390/pathogens9121054. PMID: 33339288; PMCID: PMC7765784.
131. Mei F, Xie M, Huang X, Long Y, Lu X, Wang X, Chen L. *Porphyromonas gingivalis* and Its Systemic Impact: Current Status. *Pathogens*. **2020** Nov 13;9(11):944. doi: 10.3390/pathogens9110944. PMID: 33202751; PMCID: PMC7696708.
132. Olsen I, Kell DB, Pretorius E. Is *Porphyromonas gingivalis* involved in Parkinson's disease? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **2020** Nov;39(11):2013-2018. doi: 10.1007/s10096-020-03944-2. Epub **2020** Jun 21. PMID: 32564247; PMCID: PMC7561584.
133. Mulhall H, Huck O, Amar S. *Porphyromonas gingivalis*, a Long-Range Pathogen: Systemic Impact and Therapeutic Implications. *Microorganisms*. **2020** Jun 9;8(6):869. doi: 10.3390/microorganisms8060869. PMID: 32526864; PMCID: PMC7357039.
134. Mulhall H, Huck O, Amar S. *Porphyromonas gingivalis*, a Long-Range Pathogen: Systemic Impact and Therapeutic Implications. *Microorganisms*. **2020** Jun 9;8(6):869. doi: 10.3390/microorganisms8060869. PMID: 32526864; PMCID: PMC7357039.
135. Torrungruang K, Jitpakdeebordin S, Charatkulangkun O, Gleeubua Y. *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and *Treponema denticola* / *Prevotella intermedia* Co-Infection Are Associated with Severe Periodontitis in a Thai Population. *PLoS One*. **2015**;10(8):e0136646. Published 2015 Aug 27.
136. Kin LX, Butler CA, Slakeski N, Hoffmann B, Dashper SG, Reynolds EC. Metabolic cooperativity between *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*. *J Oral Microbiol*. **2020** Aug 24;12(1):1808750. doi: 10.1080/20002297.2020.1808750. PMID: 32944158; PMCID: PMC7482830.
137. Kurniyati K, Li C. Genetic Manipulations of Oral Spirochete *Treponema denticola*. *Methods Mol Biol*. **2021**;2210:15-23. doi: 10.1007/978-1-0716-0939-2_2. PMID: 32815123; PMCID: PMC7925132.
138. Laiola M, De Filippis F, Vitaglione P, Ercolini D. A Mediterranean Diet Intervention Reduces the Levels of Salivary Periodontopathogenic Bacteria in Overweight and Obese Subjects. *Appl Environ Microbiol*. **2020** Jun 2;86(12):e00777-20. doi: 10.1128/AEM.00777-20. PMID: 32276980; PMCID: PMC7267188.
139. Cosac IC, Ionica C, Ratiu AC, Savu L. Relative quantification of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* high-risk bacterial species in Romanian patients evaluated for periodontal disease, **2017**, 10.1101/184770.
140. Hampelska K, Jaworska MM, Babalska ZŁ, Karpiński TM. The Role of Oral Microbiota in Intra-Oral Halitosis. *J Clin Med*. **2020** Aug 2;9(8):2484. doi: 10.3390/jcm9082484. PMID: 32748883; PMCID: PMC7465478.
141. Miralda I, Uriarte SM. Periodontal Pathogens' strategies disarm neutrophils to promote dysregulated inflammation. *Mol Oral Microbiol*. **2021** Apr;36(2):103-120. doi: 10.1111/omi.12321. Epub **2020** Dec 31. PMID: 33128827; PMCID: PMC8048607.
142. Menini M, Delucchi F, Bagnasco F, Pera F, Di Tullio N, Pesce P. Analysis of the Subgingival Microbiota in Implant-Supported Full-Arch Rehabilitations. *Dent J (Basel)*. **2020** Sep 5;8(3):104. doi: 10.3390/dj8030104. PMID: 32899493; PMCID: PMC7557827.
143. Liukkonen J, Gürsoy UK, Könönen E, Akhi R, Salminen A, Liljestrand JM, Pradhan-Palikhe P, Pietiäinen M, Sorsa T, Persson GR, Mäntylä P, Buhlin K, Paju S, Sinisalo J, Hörrkö S, Pussinen PJ. Immunological and Microbiological Profiling of Cumulative Risk Score for Periodontitis. *Diagnostics (Basel)*. **2020** Aug 5;10(8):560. doi: 10.3390/diagnostics10080560. PMID: 32764360; PMCID: PMC7460115.
144. Lee J, Lee JB, Song HY, Son MJ, Li L, Rhyu IC, Lee YM, Koo KT, An JS, Kim JS, Kim E. Diagnostic Models for Screening of Periodontitis with Inflammatory Mediators and Microbial Profiles in Saliva. *Diagnostics (Basel)*. **2020** Oct 14;10(10):820. doi: 10.3390/diagnostics10100820. PMID: 33066545; PMCID: PMC7602207.
145. Thomas C, Nothaft H, Yadav R, Fodor C, Alemka A, Oni O, Bell M, Rada B, Szymanski CM. Characterization of ecotin homologs from *Campylobacter rectus* and *Campylobacter showae*. *PLoS One*. **2020** Dec 30;15(12):e0244031. doi: 10.1371/journal.pone.0244031. PMID: 33378351; PMCID: PMC7773321.
146. Lee Y, Hong Y, Kim B, Lee D, Kim S, Rhyu IC. Efficacy of salivary versus subgingival bacterial sampling for the detection and quantification of periodontal pathogens. *J Periodontal Implant Sci*. **2020** Dec;50(6):358-367. doi: 10.5051/jpis.2002420121. PMID: 33350176; PMCID: PMC7758303.
147. Yamashita Y, Nagaoka K, Kimura H, Suzuki M, Fukumoto T, Hayasaka K, Kaku N, Morinaga Y, Yanagihara K, Konno S. Pathogenic Effect of *Prevotella intermedia* on a Mouse Pneumonia Model Due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus*

- aureus With Up-Regulated α -Hemolysin Expression. *Front Microbiol.* **2020** Oct 7;11:587235. doi: 10.3389/fmicb.2020.587235. PMID: 33117325; PMCID: PMC7575765.
148. Du Q, Ma X. [Research progress of correlation between periodontal pathogens and systemic diseases]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* **2020** May 30;40(5):759-764. Chinese. doi: 10.12122/j.issn.1673-4254.2020.05.24. PMID: 32897213; PMCID: PMC7277321.
149. Abed J, Maalouf N, Manson AL, Earl AM, Parhi L, Emgård JEM, Klutstein M, Tayeb S, Almog G, Atlan KA, Chaushu S, Israeli E, Mandelboim O, Garrett WS, Bachrach G. Colon Cancer-Associated *Fusobacterium nucleatum* May Originate From the Oral Cavity and Reach Colon Tumors via the Circulatory System. *Front Cell Infect Microbiol.* **2020** Aug 7;10:400. doi: 10.3389/fcimb.2020.00400. PMID: 32850497; PMCID: PMC7426652.
150. Irshad M, Alam MK, Alawneh A, Alhadi MA, Alhadi AA, Almunajem YS, Alanezi FF, Al Sagoor SA, Bajawi AM, Alfawzan AA, Kamal MA. Characterization and Antimicrobial Susceptibility of Pathogens Associated with Periodontal Abscess. *Antibiotics (Basel).* **2020** Sep 29;9(10):654. doi: 10.3390/antibiotics9100654. PMID: 33003527; PMCID: PMC7600054.
152. Papapanou PN, Teanpaisan R, Obiechina NS, Pithpornchaiyakul W, Pongpaisal S, Pisuthanakan S, et al. Periodontal microbiota and clinical periodontal status in a rural sample in southern Thailand. *Eur J Oral Sci* **2002**, 110: 345–352.
153. Mineoka T, Awano S, Rikimaru T, Kurata H, Yoshida A, Ansai T, et al. Site-specific development of periodontal disease is associated with increased levels of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in subgingival plaque. *J Periodontol* **2008**, 79: 670–676. 10.1902/jop.2008.070398.
154. Papapanou PN, Baelum V, Luan WM, Madianos PN, Chen X, Fejerskov O, et al. Subgingival microbiota in adult Chinese: prevalence and relation to periodontal disease progression. *J Periodontol* **1997**, 68: 651–666.
155. Kuboniwa M, Amano A, Kimura KR, Sekine S, Kato S, Yamamoto Y, et al. Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. *Oral Microbiol Immunol* **2004**, 19: 168–176.
156. He J, Huang W, Pan Z, Cui H, Qi G, Zhou X, et al. Quantitative analysis of microbiota in saliva, supragingival, and subgingival plaque of Chinese adults with chronic periodontitis. *Clin Oral Investig* **2012**, 16: 1579–1588. 10.1007/s00784-011-0654-4
157. Wara-aswapati N, Pitiphat W, Chanchaimongkon L, Taweethaisupapong S, Boch JA, Ishikawa I. Red bacterial complex is associated with the severity of chronic periodontitis in a Thai population. *Oral Dis* **2009**, 15: 354–359. 10.1111/j.1601-0825.2009.01562.x .
161. Lourenco TG, Heller D, Silva-Boghossian CM, Cotton SL, Paster BJ, Colombo AP. Microbial signature profiles of periodontally healthy and diseased patients. *J Clin Periodontol* **2014**, 41: 1027–1036. 10.1111/jcpe.12302.
162. Saygun I, Kubar A, Sahin S, Sener K, Slots J. Quantitative analysis of association between herpesviruses and bacterial pathogens in periodontitis. *J Periodontal Res* **2008**, 43: 352–359.
163. Laine ML, Moustakis V, Koumakis L, Potamias G, Loos BG. Modeling susceptibility to periodontitis. *J Dent Res* **2013**, 92: 45–50. 10.1177/0022034512465435.
164. Rowińska I, Szyperka-Słaska A, Zariczny P, Paślowski R, Kramkowski K, Kowalczyk P. Impact of the Diet on the Formation of Oxidative Stress and Inflammation Induced by Bacterial Biofilm in the Oral Cavity. *Materials.* **2021**; 14(6):1372.
165. Gibbons, R. Role of Adhesion in Microbial Colonization of Host Tissues: A Contribution of Oral Microbiology. *J. Dent. Res.* **1996**, 75, 866–870.
172. Allaker, R.P.; Stephen, A.S. Use of Probiotics and Oral Health. *Curr. Oral Heal. Rep.* **2017**, 4, 309–318.
174. Darveau, R.P.; Hajishengallis, G.; Curtis, M.A. *Porphyromonas gingivalis* as a potential community activist for disease. *J. Dent. Res.* **2012**, 91, 816–820.
175. Marsh, P.D. Dental plaque: Biological significance of a biofilm and community life-style. *J. Clin. Periodontol.* **2005**, 32, 7–15.
179. Grenier, D.; Roy, S.; Chandad, F.; Plamondon, P.; Yoshioka, M.; Nakayama, K.; Mayrand, D. Effect of Inactivation of the Argand/or Lys-Gingipain Gene on Selected Virulence and Physiological Properties of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* **2003**, 71, 4742–4748.
180. Food and Agriculture Organization; World Health Organization. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food—Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food; Food and Agriculture Organization: Rome, Italy; World Health Organization: Geneva, Switzerland, **2002**.
181. Slavkin, H.C. Biofilms, microbial ecology and antoni van leeuwenhoek. *J. Am. Dent. Assoc.* **1997**, 128, 492–495.
182. Jimenez, M.; Giovannucci, E.; Kaye, E.K.; Joshupura, K.J.; Dietrich, T. Predicted vitamin D status and incidence of tooth loss and periodontitis. *Public Heal. Nutr.* **2013**, 17, 844–852.
183. Katz, J.; Chegini, N.; Shiverick, K.; Lamont, R. Localization of *P. gingivalis* in Preterm Delivery Placenta. *J. Dent. Res.* **2009**, 88, 575–578.
184. Colombo, A.V.; Silva, C.M.; Haffajee, A.; Colombo, A.P.V. Identification of oral bacteria as-sociated with crevicular epithelial cells from chronic periodontitis lesions. *J. Med. Microbiol.* **2006**, 55, 609–615.
185. Haffajee, A.D.; Socransky, S.S.; Patel, M.R.; Song, X. Microbial complexes in suprag-ingival plaque. *Oral Microbiol. Immunol.* **2008**, 23, 196–205.
186. Nedzi-Góra, M.; Kowalski, J.; Krajewski, J.; Górska, R. Microbiological analysis of deep periodontal pockets in people with chronic periodontitis by PCR. *Stomatol. J.* **2007**, 11, 717–725.
188. Săvulescu T, Flora Republicii Populare Romane, Vol.VIII, Ed. Academiei, **1961**.
189. Craciun F., Bojor O, Alexan M, Farmacia Naturii, Ed. Ceres, **1976**.
193. Epstein JB, Chong S, Le D. 2000. A survey of antibiotic use in dentistry. *J Am Dent Assoc*, **2000**, [10.14219/jada.archive.2000.0090](https://doi.org/10.14219/jada.archive.2000.0090).
194. Loesche WJ, Syed SA, Morrison EC, Kerry GA, Higgins T, Stoll J. Metronidazole in periodontitis. I. Clinical and bacteriological results after 15 to 30 weeks. *J Periodontol* 55:325–335, **1984**.

195. Herrera D, Alonso B, León R, Roldán S, Sanz M. 2008. Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. *J Clin Periodontol* **2008**, 35:45–66.
196. Haffajee AD, Torresyap G, Socransky SS. Clinical changes following four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis: 1-year results. *J Clin Periodontol* **2007**, 34:243–253.
197. Haffajee AD, Patel M, Socransky SS. Microbiological changes associated with four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* **2008**, 23:148–157.
198. Poveda Roda R, Bagan JV, Sanchis Bielsa JM, Carbonell Pastor E. Antibiotic use in dental practice. A review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **2007**, 12:E186–E192.
199. De Smit M, Van De Stadt LA, Janssen KMJ, Doornbos-Van Der Meer B, Vissink A, Van Winkelhoff AJ, Brouwer E, Westra J, Van Schaardenburg D. Antibodies against *Porphyromonas gingivalis* in seropositive arthralgia patients do not predict development of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **2014**, 73:1277–1279.
200. Oberoi SS, Dhingra C, Sharma G, Sardana D. Antibiotics in dental practice: how justified are we. *Int Dent J* **2015**, 65:4–10.
201. Kang Y, Sun B, Chen Y, Lou Y, Zheng M, Li Z. Dental Plaque Microbial Resistomes of Periodontal Health and Disease and Their Changes after Scaling and Root Planing Therapy. *mSphere*. **2021** Aug 25;6(4):e0016221. doi: 10.1128/mSphere.00162-21.
202. Shamseddine L, Chidiac JJ. Composition's effect of *Origanum Syriacum* essential oils in the antimicrobial activities for the treatment of denture stomatitis. *Odontology*. **2021**;109(2):327–335. doi:10.1007/s10266-020-00547-3.
203. Dagli N, Dagli R, Mahmoud RS, Baroudi K. Essential oils, their therapeutic properties, and implication in dentistry: A review. *J Int Soc Prev Community Dent*. **2015**;5:335–340.
217. Nieto G. Biological activities of three essential oils of the lamiaceae family. *Medicines (Basel)* **2017**;4:63.
218. Claffey N. Essential oil mouthwashes: a key component in oral health management. *J Clin Periodontol*. **2003**;30:22–24.
219. Yengopal V. Essential oils: some lesser known uses and properties for improved oral health. *SADJ*. **2004**;59:381–384.
220. Araujo MWB, Charles CA, Weinstein RB, McGuire JA, Parikh-Das AM, Du Q, Zhang J, Berlin JA, Gunsolley JC. Meta-analysis of the effect of an essential oil-containing mouthrinse on gingivitis and plaque. *J Am Dent Assoc*. **2015**;146:610–622.
221. Meiller TF, Silva A, Ferreira SM, Jabra-Rizk MA, Kelley JI, DePaola LG. Efficacy of listerine antiseptic in reducing viral contamination of saliva. *J Clin Periodontol*. **2005**;32:341–346.
222. Leyva-López N, Gutiérrez-Grijalva EP, Vazquez-Olivo G, Heredia JB. Essential oils of oregano: biological activity beyond their antimicrobial properties. *Molecules*. **2017**;22:989.
223. Al-Thobity AM, Al-Khalifa KS, Gad MM, Al-Hariri M, Ali AA, Alnassar T. In vitro evaluation of the inhibitory activity of thymoquinone in combatting *Candida albicans* in denture stomatitis prevention. *Int J Environ Res Public Health*. **2017**;14:743.
224. Lapina N., Lobach O. Modern aspects of the etiology and pathogenesis of dental caries. *Clin Dent*. **2017**;84(4):76–79. Russian.
225. Karadağlıoğlu Ö.İ., Ulusoy N., Başer K.H.C., Hanoğlu A., Şık İ. Antibacterial activities of herbal toothpastes combined with essential oils against *Streptococcus mutans*. *Pathogens*. **2019**;8(1)
226. Ben Abdallah Fethi, Lagha Rihab, Gaber Ahmed. Biofilm Inhibition and Eradication Properties of Medicinal Plant Essential Oils against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. *Pharmaceuticals (Basel)*. **2020**;13
227. Utami D.T., Pratiwi S.U., Haniastuti T., Hertiani T. Eugenol and thymol as potential inhibitors for polymicrobial oral biofilms: an *in vitro* study. *J Int Oral Health*. **2021**;13:45–52.
228. Jafri H., Banerjee G., Khan M.S.A., Ahmad I., Abulreesh H.H., Althubiani A.S. Synergistic interaction of eugenol and antimicrobial drugs in eradication of single and mixed biofilms of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. *AMB Express*. **2020** Oct 19;10(1):185.
229. Benzaid C., Belmadani A., Tichati L., Djeribi R., Rouabhia M. Effect of *Citrus aurantium* L. Essential oil on *Streptococcus mutans* growth, biofilm formation and virulent genes expression. *Antibiotics (Basel)* **2021**;10(1):54.
230. de Oliveira Carvalho I., Purgato G.A., Pícolo M.S., Pizzio V.R., Coelho R.R., Diaz-Muñoz G. In vitro anticariogenic and antibiofilm activities of toothpastes formulated with essential oils. *Arch Oral Biol*. **2020**;117:104834.
231. Ravi S.B., Nirupad S., Chippagiri P., Pandurangappa R. Antibacterial effects of natural herbal extracts on *Streptococcus mutans*: can they Be potential additives in dentifrices? *Int J Dent*. **2017**;5.
232. Carrol D.H., Chassagne F., Dettweiler M., Quave C.L. Antibacterial activity of plant species used for oral health against *Porphyromonas gingivalis*. *PloS One*. **2020**;15(10)
233. Msomi N.Z., Simelane M.B.C. Herbal medicine. *Intech Open*. **2018**; 10:5772.
234. Tokmakova S.I., Lunitsyna YuV., Kiyashchenko YuV., Kozlova K.S., Barg E.V. Comparative assessment of the antimicrobial activity of dental gels. *Dent Prob*. **2014**;1
235. National center for expertise of medicines and medical devices of the Committee for medical and pharmaceutical control of the Ministry of health of the Republic of Kazakhstan, accessed 7 april **2021**.
236. Dao T.P., Tran T.H., Nhan N.P.T., Quyen N.T.C., Tien L.X., Anh T.T. Optimization of essential oil yield from Vietnamese green pepper (*Piper nigrum*) using hydro-distillation method. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng*. **2020**;736. 022039.
237. Simirgiotis M.J., Burton D., Parra F., López J., Muñoz P., Escobar H., Parra C. Antioxidant and antibacterial capacities of *Origanum vulgare* essential oil from the arid andean region of Chile and its chemical characterization by GC-MS. *Metabolites*. **2020**;16:414. 10(10)
238. Khan S., Khan M., Ahmad J., Wahab R., Abd-Elkader O., Musarrat J. Thymol and carvacrol induce autolysis, stress, growth inhibition and reduce the biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *AMB Express*. **2017**;1(1)
239. Hejazinia F., Fozouni L., Azami N.S., Mousavi S. The anti-biofilm activity of oregano essential oil against dental plaque-forming *Streptococcus mutans* in vitro and in vivo. *J Kerman Univ Med Sci*. **2020**;24(3)
240. Leyva-López N., Gutiérrez-Grijalva E.P., Vazquez-Olivo G., Heredia J.B. Essential oils of oregano: biological activity beyond their antimicrobial properties. *Molecules*. **2017**;22(6):989.