

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

SCUOLA DI DOTTORATO
in Scienze Fisiopatologiche, Neuropsicobiologiche e assistenziali del ciclo
della vita
XXVIII° ciclo

DIPARTIMENTO
di Scienze biomediche, chirurgiche e odontoiatriche
Dir. chia.mo Roberto Weinstein



Tesi di dottorato di ricerca

**SALUTE ORALE E PREVENZIONE, ASPETTI CLINICI, BIOCHIMICI E
MICROBIOLOGICI**

Autore:
Dott. Marco Tremolati
Matricola R09968

Tutor: chia.mo prof. Giampietro Farronato

Coordinatore della scuola di dottorato: chia.mo prof. Roberto Weinstein

A.A. 2015/2016

INDICE

| | |
|---|-----|
| ABSTRACT | pag |
| ABBREVIAZIONI E DEFINIZIONI | pag |
| Capitolo 1. Introduzione | pag |
| 1.1. La popolazione anziana in Italia..... | pag |
| 1.2. Salute Orale e Prevenzione delle malattie sistemiche.... | pag |
| 1.3. Il paziente in Unresponsive Wakefulness Syndrome ... | pag |
| 1.3.1. La salute orale nei pazienti in UWS..... | pag |
| 1.4. Diabete..... | pag |
| 1.4.1. La correlazione fra Diabete e Malattia Parodontale... | pag |
| 1.5. Aterosclerosi e Batteri Parodontopatogeni | pag |
| Capitolo 2. Materiali e metodi | pag |
| 2.1. Stato Vegetativo..... | pag |
| 2.2. Diabete e HbA1c..... | pag |
| 2.3. Aterosclerosi e batteri Parodontopatogeni | pag |
| Capitolo 3. Risultati | pag |
| Capitolo 4. Discussione | pag |
| 4.1. Stato Vegetativo | pag |
| 4.2. Diabete: HBA1C..... | pag |
| 4.3. Aterosclerosi e Batteri Parodontopatogeni..... | pag |
| Conclusioni ed implicazioni cliniche | pag |
| Capitolo 5. Bibliografia | pag |

ABSTRACT

L'obiettivo di questa ricerca è stato quello di studiare la *safety*, l'*efficacia*, e la *fattibilità* dell'igiene orale all'interno di una casa di cura, analizzare quali siano i cambiamenti del cavo orale ed i miglioramenti riscontrati a livello clinico generale analizzando tre tipi di *outcome*: il primo biochimico, il secondo microbiologico ed il terzo clinico.

All'interno di un'Azienda dei Servizi alla Persona come il Pio Albergo Trivulzio si possono incontrare sia pazienti indipendenti (Reparto Diurno), sia pazienti dipendenti funzionali, dove la funzione non corretta, talvolta viene a colpire anche pazienti giovani e adulti (Reparto Vegetative Permanent/Persistent State). Questo studio è stato volto all'analisi degli effetti dell'igiene orale domiciliare, assistita e professionale su tre gruppi di pazienti con differenti condizioni patologiche: il diabete (valutazione HbA1c, valutazione biochimica), la malattia aterosclerotica (Batteri parodontopatogeni, valutazione microbiologica) e lo Stato Vegetativo/Unresponsive Wakefulness Syndrome (VS/UWS) (Valutazione Clinica in paziente non collaborante né autosufficiente).

Nel gruppo dei diabetici sono state rilevate diminuzioni di HbA1c dopo Igiene professionale sui pazienti analizzati, ma non sono state riscontrate differenze statisticamente significative ($p=0,24$), confermando il trend espresso in letteratura; certamente l'infiammazione ha un ruolo all'interno dell'omeostasi del paziente diabetico, ma nel nostro studio sono stati ritrovati molti fattori di confondimento non considerati da alcuni autori (cambiamento di dieta, inizio modifica farmaci/insulina, cause di ricovero etc...).

Nello studio su pazienti in VS/UWS 21 pazienti sono stati arruolati nello studio: 9 trattati con frequenza bi/tri-settimanale per 3 anni da un gruppo di igienisti specializzato e per un periodo più breve da una logopedista (1 anno), e 12 nel gruppo "controllo". Nel gruppo "Test" si sono ottenuti risultati clinici insperati come la conservazione di tutti gli elementi dentari nel gruppo test, il mantenimento di condizioni del cavo orale migliorate ed anche una diminuzione delle infezioni nosocomiali (polmoniti da pneumoniae etc). La frequenza d'infezioni da Pneumonie, infatti si sono verificate con frequenza molto minore nel gruppo test rispetto al controllo. Nel gruppo "test" in tre anni è deceduto un paziente e nel gruppo "controllo" tre, questi pazienti sono stati esclusi dallo studio. Le variazioni fra i due gruppi dei valori di proteina C-reattiva non sono risultate statisticamente significative ($p=0,42$) e non si sono verificate variazioni

statisticamente significative fra le medie dei valori ematochimici fra i due gruppi. Le modifiche dell'Eiler's OAG Modified sono risultate statisticamente significative per il gruppo test e non statisticamente significative per il gruppo controllo, nel quale abbiamo invece riscontrato un peggioramento non statisticamente significativo.

Nell'ultimo gruppo di pazienti affetti da malattia cardiovascolare sono stati analizzati batteri parodontopatogeni all'interno del plasma e delle lesioni ateromasiche 19 pazienti test e 20 pazienti sani controllo nei quali è stato analizzato soltanto il plasma. Nella totalità dei campioni sia di plasma che di placca ateromasica è stata ritrovata la presenza di almeno un patogeno, ulteriore differenza fra sano e aterosclerotico era la presenza di almeno due o più patogeni sia nel plasma (10/12; 83%), che nelle placche ateromasiche (8/12; 67%), avvalorando l'ipotesi del Pathogen Burden. Mettendo in relazione il plasma di sani e malati si sono ottenuti valori significativi ($p=0,0002$ -sommatoria carica microbica) ed anche confrontando le placche dei pazienti sani e malati ($p=0,002$); con valori molto interessanti per il *P. Gingivalis* che si è dimostrato essere presente in tutte le placche dei pazienti test ed anche nel plasma degli stessi, proponendosi come batterio con maggior relazione con la patologia aterosclerotica.

Un protocollo d'igiene orale personalizzato per i pazienti internati in una casa di cura e quindi a rischio risulta ad oggi sicuro per il paziente anziano e fondamentale per la salute orale, e per il controllo della diffusione di infezioni nosocomiali come lo Pneumonia, ma non sono ancora presenti prove sufficienti a supporto di una teoria aggravante o scatenante reazioni sistemiche a partire dalle malattie parodontali.

ABBREVIAZIONI E DEFINIZIONI

| | |
|-----------------------|--|
| AD: | Malattia di Alzheimer (Alzheimer disease) |
| AGEs | Prodotto Glicato finale (Advanced Glycation End Products) |
| AR: | Artrite reumatoide |
| BMDs: | densità minerale ossea (Bone mineral density) |
| CRP: | Proteina C-reattiva (C-Reactive Protein) |
| EV: | terapia endovenosa |
| GCS: | Glasgow Coma Scale |
| GERD: | Reflusso gastro-esofageo (Gastro-Esophageal Reflux Disease) |
| HBA1C: | Emoglobina Glicata |
| IL-1/IL-6/IL-8/IL-10: | Interleuchine |
| IM: | Terapia Intramuscolare |
| PD: | Malattia Parodontale (Periodontal Disease) |
| PEG: | Gastrostomia endoscopica percutanea |
| PVS: | Stato Vegetativo Permanente (Persistent Vegetative State) |
| RSA: | Residenze socio assistenziali |
| VS/UWS: | Vegetative State, Unresponsive Wakefulness Syndrome |
| Long-Term Care: | Ogni forma di cura fornita a persone non autosufficienti, lungo un periodo di tempo esteso, senza data di termine predefinita, Assistenza Continuativa (dell'anziano) |
| Salute Orale: | Omeostasi del cavo orale basata sulla integrità fisiologica, biologica e funzionale |
| SC: | Terapia Sottocutanea |
| Igiene Orale: | Processo nel quale sono compresi il debridement (rimozione tartaro e placca), l'idratazione e la pulizia del cavo orale e dei suoi tessuti, per promuovere e mantenere la salute orale |

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

Ettinger e Beck svilupparono un'interessante definizione funzionale dell'anziano, basata sulle capacità fisiche dello stesso di usufruire autonomamente di servizi odontoiatrici. Di certo particolare e di difficile realizzazione pratica, questa definizione dell'anziano risulta, però valutare sia le abilità fisiche, sia quelle neurologiche/psicologiche del paziente (Ettinger and Beck, 1984). La classificazione differenzia tre tipologie di anziano: il primo funzionalmente *indipendente*, il secondo considerato *fragile (frail)* e il terzo, quello funzionalmente *dipendente*. Seguendo l'impostazione di questo schema, la maggior parte degli anziani (70%), sempre secondo Ettinger e Beck, è in grado di recarsi dal dentista ed è quindi classificata come *indipendente* funzionale. All'incirca il 14% degli anziani rientra, invece, all'interno della categoria *fragile*; queste sono persone con condizioni patologiche croniche primarie o secondarie che creano grandi limitazioni alla mobilità, soprattutto in autonomia. Il 5% invece è classificato come funzionalmente *dipendente* (Leon and Lai, 1990) e talvolta si ritrova in condizioni precarie di abbandono (*homebound*). L'ultimo gruppo, dei *dipendenti* funzionali, sono istituzionalizzati in case di ricovero e cura, Aziende di Servizi alla Persona (Long Term Care) (Ettinger and Beck, 1984). All'interno di un'Azienda dei Servizi alla Persona come il Pio Albergo Trivulzio si possono incontrare sia pazienti estremamente indipendenti (Reparto Diurno), che abitano in case private e si recano per controlli periodici all'interno del Pio Albergo, sia pazienti dipendenti funzionali, dove il limite funzionale talvolta viene a colpire anche pazienti giovani (Reparto Vegetative Permanent/Persistent State).

Non soltanto l'odontoiatria riveste un ruolo, anche se marginale, nella differenziazione e nella classificazione delle capacità residue, quindi della

“autosufficienza” dell’anziano, ma all’interno della grande branca di Medicina Preventiva sta acquisendo un ruolo di primaria importanza.

Nelle ultime decadi la salute orale ha carpito l’attenzione dei ricercatori, non solo per il paziente anziano oppure non autosufficiente, ma anche per tutte le altre categorie, per differenti motivi. Innanzitutto le malattie orali sono cumulative e diventano più complesse e difficili da trattare con il tempo. Inoltre, il costo delle cure odontoiatriche e i bassi limiti di reddito per ottenere rimborsi o trattamenti con Servizio Sanitario Nazionale in Italia rendono spesso le cure odontoiatriche procrastinabili (Satcher, 2000).

I problemi orali hanno spesso un impatto negativo sulla qualità della vita, non soltanto i dolori dentali ed oro-faciali possono ridurre grandemente le capacità di masticazione, rendendo impossibile o quasi la masticazione, ma possono inoltre ledere negativamente anche la parte comunicativa e psicologica del paziente. Individui con problematiche o segni di patologie orali possono subire perdite di autostima, ansietà, depressione ed essere colpiti quindi da una specie di stigma sociale. La dieta, la nutrizione, il sonno, le interazioni sociali più o meno strette, lo stato psicologico vengono tutte inficiate grandemente quando la salute orale viene meno (Helgeson et al., 2002). Basti pensare all’impatto ed alle conseguenze sia nella vita lavorativa che in quella personale di una delle più frequenti problematiche del cavo orale quale l’alitosi, definibile come invalidante nelle pratiche sociali più comuni.

Negli anni più recenti, punto forse di maggior importanza, è stata messa in luce la forte correlazione, con molteplici studi in letteratura, fra le malattie del cavo orale ed una serie di patologie sistemiche quali diabete, patologie cardiovascolari, infezioni polmonari ed altre problematiche con alla base infezioni microbiche. Il cavo orale si è quindi proposto come possibile porta di entrata per una serie di batteri patogeni che, grazie all’entrata nel circolo sanguineo (Mulligan et al., 1992), oppure per aspirazione diretta all’interno dei polmoni (Bartlett, 1994) si rendono pericolosi con infezioni, talvolta anche mortali.

Una delle problematiche più frequenti e maggiormente studiate in letteratura riguarda l'infezione del *Porphyromonas Gingivalis* in pazienti già affetti da aterosclerosi o a rischio (Chou et al., 2005; Homlund et al., 2011; Pussinen, 2011). Yang et al. sono riusciti a dimostrare una possibile compartecipazione di questo batterio nella progressione e nella formazione di ateromi. Dati recenti mettono in luce come il *Porphyromonas Gingivalis* di tipo fim A agisca sulle Regulatory T cells (Tregs) soprattutto sul paziente con presenza di ateromi già formati e quindi contribuisca nella progressione più che nella formazione dell'ateroma stesso (Yang et al., 2014).

Vedremo in seguito in maniera più approfondita come anche il diabete e malattie polmonari quali polmonite ab ingestis siano spesso aggravate, o comunque in relazione stretta con le malattie del cavo orale, in maniera particolare con le malattie parodontali.

Al contrario delle aspettative, anche se la crescente importanza della salute orale e della prevenzione delle problematiche dentali e sistemiche, i dati ISTAT rivelano che in Italia soltanto il 39,7% della popolazione ha accesso alle cure odontoiatriche (ISTAT, 2008). Il dato certo non confortante vede molte motivazioni possibili fra le quali la mancante informazione sulla popolazione, i costi eccessivi, l'inefficienza delle strutture, il non corretto funzionamento organizzativo ed amministrativo, la mancanza dei percorsi terapeutici innovativi e probabilmente anche la mancanza di fiducia nelle strutture pubbliche. A questo dato va ad aggiungersi per gli anziani una percentuale ancora più bassa di accesso alle cure, o anche alla semplice "prima visita". A tale proposito, esiste un particolare svantaggio per i cittadini residenti nel Mezzogiorno. L'offerta pubblica, sempre secondo i dati del 2008, è spesso deficitaria nelle fasce più deboli costituite proprio dalle persone ultrasessantacinquenni e dagli individui in età evolutiva (Barlattani et al., 2001).

| Classi di età ed accesso a cure odontoiatriche (anno 2008) | | | | ISTAT | | | | | |
|--|-------------------------|---------------------|---|-------------|-------------|-------------|-------------------------|---------------------|---|
| CLASSI DI ETA (anni) ¹ | Negli ultimi 12 mesi | Oltre un anno fa | Non è mai stato da un odontoiatra | | | | Negli ultimi 12 mesi | Oltre un anno fa | Non è mai stato da un odontoiatra |
| | | | | Uomini | Donne | Totale | | | |
| 3-5 | 16,8 | 7,9 | 75,3 | 16,4 | 7,5 | 76,0 | 16,6 | 7,7 | 75,7 |
| 6-10 | 45,2 | 19,4 | 35,4 | 47,0 | 18,0 | 35,1 | 46,1 | 18,7 | 35,2 |
| 11-13 | 50,9 | 26,3 | 22,7 | 55,4 | 27,3 | 17,3 | 53,1 | 26,8 | 20,1 |
| 14-17 | 43,9 | 37,9 | 18,2 | 49,8 | 35,6 | 14,6 | 46,8 | 36,8 | 16,5 |
| 18-24 | 39,6 | 44,1 | 16,3 | 49,1 | 39,7 | 11,2 | 44,3 | 41,9 | 13,8 |
| 25-34 | 40,2 | 49,1 | 10,7 | 47,7 | 44,7 | 7,5 | 43,9 | 46,9 | 9,1 |
| 35-44 | 40,3 | 51,7 | 8,0 | 47,8 | 46,7 | 5,6 | 44,0 | 49,2 | 6,8 |
| 45-54 | 41,0 | 52,0 | 7,0 | 45,4 | 49,9 | 4,7 | 43,2 | 51,0 | 5,8 |
| 55-64 | 38,9 | 56,0 | 5,1 | 41,1 | 54,4 | 4,5 | 40,0 | 55,2 | 4,8 |
| 65-69 | 35,0 | 58,8 | 6,3 | 34,6 | 59,8 | 5,5 | 34,8 | 59,3 | 5,9 |
| 70-74 | 29,0 | 64,1 | 7,0 | 28,6 | 66,7 | 4,7 | 28,8 | 65,5 | 5,7 |
| 75-79 | 24,8 | 67,8 | 7,4 | 23,7 | 70,0 | 6,3 | 24,2 | 69,1 | 6,8 |
| 80-e più | 18,4 | 73,2 | 8,4 | 15,7 | 74,9 | 9,4 | 16,6 | 74,3 | 9,1 |
| TOTALE | 38,1 | 49,1 | 12,8 | 41,2 | 48,7 | 10,2 | 39,7 | 48,9 | 11,5 |

Tabella 1: estratto dai Quaderni del Ministero della Salute- Classi di età ed accesso alle cure odontoiatriche (Quaderni del Ministero della Salute, 2008).

La popolazione considerata anziana, oltre ai sessantacinque anni di età, continua a crescere molto più rapidamente della popolazione sotto i sessantacinque anni, facendo crescere ulteriormente la sua proporzione sul totale della popolazione mondiale. Le previsioni demografiche Istat indicano per la popolazione italiana una crescita di circa 2 milioni nei prossimi trent'anni, una modesta crescita dovuta prevalentemente agli effetti della maggior longevità e dell'immigrazione (Baldazzi et al., 2015).

Nel 2040 la popolazione sarà dunque più anziana e multietnica di oggi: i residenti con più di sessantacinque anni salirebbero dal 20.3 al 31.3%, di cui circa la metà ultraottantenne. È quindi necessario attuare politiche e protocolli personalizzati sul paziente anziano sia per mantenere le capacità fisiche e psichiche dello stesso, mantenendo gli elementi dentali e procrastinando l'invecchiamento funzionale, sia evitando dapprima

contaminazioni da parte di batteri patogeni orali di organi e vasi, ed anche infezioni parodontali, che minano l'omeostasi del paziente.

Questa tesi si propone di presentare le condizioni d'igiene orale e di salute generale dei pazienti anziani e dei pazienti non autosufficienti presenti all'interno del Pio Albergo Trivulzio, durante gli anni 2012-2015, riportando le esperienze ed i dati ottenuti seguendo i reparti di Diabetologia e di Stati Vegetativi Permanenti.

1.1. La popolazione anziana in Italia

Le maggiori istituzioni Italiane ed Internazionali stanno rivolgendo molta attenzione ai diversi aspetti relativi all'invecchiamento. Infatti, preoccupano maggiormente le ripercussioni che una popolazione prevalentemente anziana possa avere sia sul sistema sanitario nazionale che sul welfare dei diversi Paesi. Se questo problema è di fondamentale importanza in campo internazionale, in Italia sono presenti le più alte percentuali di anziani al mondo: nel 2009 la percentuale pari a 20,1%, pari a 12 milioni di individui, potrà vedersi arrivare al 32% nel 2050, in base a previsioni ISTAT (ISTAT, 2009). L'Italia dovrebbe quindi essere fra i maggiori esperti dell'invecchiamento, delle sue ripercussioni e dei metodi per rendere questo problema, non diciamo fruttuoso, ma il meno gravoso possibile. L'incremento della popolazione anziana in condizioni di non auto-sufficienza e un conseguente incremento delle necessità di assistenza continua e su un lungo periodo sono chiare conseguenze del fenomeno dell'invecchiamento. Tutti i paesi della Comunità Europea sono concordi nel preferire una politica sanitaria volta a mantenere gli anziani disabili nelle loro abitazioni, anziché preferire le istituzioni residenziali, al fine di garantire loro una migliore qualità della vita. "Non sempre"- come rilevato da Cavrini et al., "è la soluzione più appropriata" (Cavrini, 2011). Questo appare come manifesto soprattutto se i familiari del lungodegente non sono in grado di assistere l'anziano non autosufficiente o nei casi più estremi di abbandono (housebound). In Italia il numero dei posti letto presenti nelle RSA per anziani è inferiore a quello registrato in tutti gli altri paesi europei, con una forte eterogeneità territoriale. Se l'Italia settentrionale presenta, infatti, un'offerta adeguata alla domanda di assistenza residenziale, soprattutto per ciò che riguarda le residenze socio-sanitarie per anziani e le RSA, il Sud sembra essere completamente inadeguato a rispondere alle richieste della popolazione anziana.

L'anziano considerato *fragile* richiede cure speciali, non soltanto è affetto da malattie estensive del cavo orale, ma trascina con sé anche

problematiche mediche, di difficile gestione, che complicano ulteriormente il trattamento delle stesse.

Secondo Guaita 2% degli ultra65enni sono ricoverati in strutture residenziali, 1,8% in RSA; circa il 4,1% con assistenza domiciliare integrata, ancora molto distanti dalle medie dei paesi più virtuosi dell'EU che hanno percentuali rispettivamente del 5% e del 7% (Guaita, 2011).

Nel 2009 i posti letto delle RSA Italiane, secondo l'Annuario Statistico del ministero della Salute, sono 201.180, di cui 80,1% nell'Italia settentrionale (161 mila ca) e 590 letti disponibili ogni 100.000 residenti nel nord.

Strutture Sanitarie Residenziali⁵ - Posti letto, anno 2009.

| | Posti letto nelle Strutture residenziali | Posti letto ogni 100.000 residenti |
|------------------|--|------------------------------------|
| Nord Occidentale | 91.825 | 576,9 |
| Nord Orientale | 69.338 | 604,4 |
| Centro | 24.749 | 209,8 |
| Sud e isole | 15.268 | 73,2 |
| Italia | 201.180 | 335,0 |

Fonte: Elaborazioni su dati Ministero della Salute - Annuario statistico del servizio sanitario nazionale, anno 2009. (Gennaio 2012)

Tabella 2: Annuario statistico del servizio sanitario nazionale anno 2009 (gen 2012)

Come si evince dalla tabella soprariportata la disparità fra le varie regioni del nord Orientale ed Occidentale (fra i 576,9 e 604,4 posti letto ogni 100.000 residenti), le regioni del centro (209,8) e quelle del Sud e Isole (73,2) risultano anche ad un occhio abituato troppo discordanti.

La condizione non si è vista migliorare con i nuovi dati ISTAT dell'annuario STATISTICO italiano 2014, nel quale sono stati riscontrati dati in aumento per il Nord ovest con 731 posti letto ogni 100.000 abitanti, 551 del nord Ovest, 230 del Centro e 170 fra Sud ed Isole.

Tavola 4.4 Posti letto di assistenza residenziale e semiresidenziale per presenza della riabilitazione e per regione
Anno 2011

| ANNI REGIONI | Assistenza residenziale | | Assistenza semiresidenziale | | Assistenza residenziale per riabilitazione | | Assistenza semiresidenziale per riabilitazione | |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|--|---------------------------------|--|---------------------------------|
| | Posti letto | Posti letto per 10.000 abitanti | Posti letto | Posti letto per 10.000 abitanti | Posti letto | Posti letto per 10.000 abitanti | Posti letto | Posti letto per 10.000 abitanti |
| 2007 | 188.466 | 30,6 | 41.023 | 6,5 | 15.553 | 2,6 | 13.997 | 2,4 |
| 2008 | 191.430 | 32,0 | 42.505 | 7,1 | 15.345 | 2,6 | 14.264 | 2,4 |
| 2009 | 201.180 | 33,4 | 45.549 | 7,6 | 14.679 | 2,4 | 13.871 | 2,3 |
| 2010 | 212.875 | 35,2 | 47.779 | 7,9 | 14.211 | 2,3 | 13.691 | 2,3 |
| 2011 - PER REGIONE | | | | | | | | |
| Piemonte | 28.478 | 65,3 | 3.563 | 8,2 | 186 | 0,4 | 40 | 0,1 |
| Valle d'Aosta/Vallée d'Aoste | 149 | 11,8 | 31 | 2,4 | - | - | - | - |
| Liguria | 7.700 | 49,0 | 1.096 | 7,0 | 668 | 4,3 | 280 | 1,8 |
| Lombardia | 67.261 | 69,5 | 14.993 | 15,5 | 3.185 | 3,3 | 1.104 | 1,1 |
| Trentino-Alto Adige/Südtirol | 8.732 | 85,0 | 160 | 1,6 | 180 | 1,8 | 13 | 0,1 |
| <i>Bolzano-Bozen</i> | <i>4.184</i> | <i>83,1</i> | <i>51</i> | <i>1,0</i> | <i>106</i> | <i>2,1</i> | <i>4</i> | <i>0,1</i> |
| <i>Trento</i> | <i>4.548</i> | <i>86,8</i> | <i>109</i> | <i>2,1</i> | <i>74</i> | <i>1,4</i> | <i>9</i> | <i>0,2</i> |
| Veneto | 32.651 | 67,3 | 9.696 | 20,0 | 174 | 0,4 | 507 | 1,0 |
| Friuli-Venezia Giulia | 8.637 | 70,8 | 831 | 6,8 | 68 | 0,6 | 374 | 3,1 |
| Emilia-Romagna | 21.694 | 50,0 | 8.731 | 20,1 | 176 | 0,4 | - | - |
| Toscana | 14.046 | 38,3 | 3.526 | 9,6 | 1.152 | 3,1 | 996 | 2,7 |
| Umbria | 2.722 | 30,8 | 788 | 8,9 | 168 | 1,9 | 193 | 2,2 |
| Marche | 2.270 | 14,7 | 390 | 2,5 | 763 | 5,0 | 190 | 1,2 |
| Lazio | 7.689 | 14,0 | 1.768 | 3,2 | 1.898 | 3,5 | 2.337 | 4,3 |
| Abruzzo | 2.563 | 19,6 | 251 | 1,9 | 889 | 6,8 | 829 | 6,3 |
| Molise | 178 | 5,7 | 50 | 1,6 | 273 | 8,7 | 120 | 3,8 |
| Campania | 2.464 | 4,3 | 1.461 | 2,5 | 1.220 | 2,1 | 3.154 | 5,5 |
| Puglia | 5.990 | 14,8 | 1.174 | 2,9 | 1.105 | 2,7 | 802 | 2,0 |
| Basilicata | 581 | 10,0 | 66 | 1,1 | 451 | 7,8 | 165 | 2,9 |
| Calabria | 2.350 | 12,0 | 169 | 0,9 | 412 | 2,1 | 165 | 0,8 |
| Sicilia | 2.687 | 5,4 | 551 | 1,1 | 718 | 1,4 | 1.608 | 3,2 |
| Sardegna | 1.869 | 11,4 | 521 | 3,2 | 647 | 3,9 | 792 | 4,8 |
| Nord-ovest | 103.588 | 73,1 | 19.683 | 13,9 | 4.039 | 2,9 | 1.424 | 1,0 |
| Nord-est | 71.714 | 55,1 | 19.418 | 14,9 | 598 | 0,5 | 894 | 0,7 |
| Centro | 26.727 | 23,1 | 6.472 | 5,6 | 3.981 | 3,4 | 3.716 | 3,2 |
| Sud | 14.126 | 10,1 | 3.171 | 2,3 | 4.350 | 3,1 | 5.235 | 3,7 |
| Isole | 4.556 | 6,9 | 1.072 | 1,6 | 1.365 | 2,1 | 2.400 | 3,6 |
| ITALIA | 220.711 | 37,2 | 49.816 | 8,4 | 14.333 | 2,4 | 13.669 | 2,3 |

Fonte: Ministero della Salute

Tabella 3. Posti di letto di assistenza residenziale e semiresidenziale per presenza della riabilitazione e per regione anno 2011

Tralasciando gli sconcertanti dati sulla disparità territoriale in Italia, ma considerando soltanto la spesa complessiva annua per le RSA nel 2006 (L'assistenza agli anziani non autosufficienti in Italia - 3° Rapporto, 2011) che si aggira sui 2 milioni e ottocento euro e , come spesa del Servizio Sanitario Nazionale sui 1.500.000.000 di euro, è necessario limitare il più possibile l'insorgere di complicanze prevenibili come l'insorgenza di batteri antibiotico-resistenti nosocomiali, favorire comunque, quando e se

possibile, l'assistenza domiciliare e certamente prevenire qualsiasi patologia invalidante o peggiorativa dello stato del paziente.

Nonostante le ingenti spese sostenute anche dal paziente stesso, come si evince dalla tabella sotto riportata, la maggior parte delle RSA, in questo caso Lombarde (1/3 dei letti disponibili in Italia si trova in Lombardia), mostrino evidenti casi di difficoltà economica, soprattutto per quanto riguarda i gestori no profit (Guerrini, 2012). Economi, come Giunco, esprimono chiaramente la necessità, che sembra lampante, di snellire l'apparato burocratico, che soprattutto nel pubblico ha visto crescere di gran lunga le proprie mansioni, arrivando oggi a vedere circa il 35% del personale dipendente impiegato nei servizi generali ed amministrativi (Giunco, 2011).

Spesa complessiva per le RSA per soggetto di provenienza. Anno 2006 (importi in euro)

| | Servizio sanitario nazionale | Utente | Comune | Totale |
|--------------------------------|------------------------------|---------------|------------|---------------|
| Spesa complessiva annua | 1.428.140.118 | 1.305.516.956 | 68.456.040 | 2.802.113.114 |
| Retta mensile media | 1.505 | 1.375 | 71 | 2.951 |
| Percentuale | 51,0% | 46,6% | 2,4% | 100,0% |

Fonte: L'assistenza agli anziani non autosufficienti in Italia - 3° Rapporto⁸

Tabella 4 Spesa complessiva per le RSA per soggetto e per provenienza. Anno 2016 (importi in euro)

Se gli aspetti economici sono stati tracciati soltanto per poter ben capire la gravità sul bilancio delle residenze socio assistenziali, come odontoiatri in primo luogo e come medici ed operatori sanitari, siamo chiamati a dare la nostra parte. La domanda che ci siamo posti è se il nostro impegno nel mantenere una corretta igiene orale e quindi nel salvaguardare non solo la salute generale ma anche nel diminuire la spesa del paziente o della stessa RSA.

Chiaramente si potrebbero riprendere molti articoli della letteratura che sono riusciti a dimostrare come mantenere i propri elementi dentari sia non solo uno dei più importanti atti del prendersi cura di sé, ma anche una fondamentale riduzione della spesa a lungo termine per riabilitazioni

complesse delle arcate dentarie. Certo è che se la salute orale potesse veramente migliorare la salute generale del paziente anziano ed allontanarne oppure ritardare il suo ingresso in una casa di cura o comunque in Long Term Care sarebbe necessario rendere obbligatoria la presenza di un team di Igienisti Dentali ed Odontoiatri all'interno di ogni RSA e Casa di Cura (Brizioli e Trabucchi, 2011).

Per questa ragione nel prossimo capitolo saranno analizzati studi e revisioni della letteratura sulla Salute orale nell'anziano e nel paziente non autosufficiente come metodo di prevenzione delle malattie sistemiche che maggiormente affliggono il paziente durante l'invecchiamento.

1.2. Salute Orale e Prevenzione delle malattie sistemiche

I primi riferimenti di un'arcaica, benché presente concezione di salute orale e di alitosi sono stati riportati nella letteratura scientifica e religiosa sin dagli albori dei tempi, con numerosi riferimenti riportati nella Bibbia, Talmud e Corano (Rosenberg, 1996; Shifman et al., 2002).

Weineberger ha evidenziato nel 2005 ritrovamenti sul Papiro Ebers (1500 A.C. redatto secondo descrizioni provenienti da antichi scritti Egiziani datati 4000 A.C.) che descrivevano con uno spiccato realismo e molteplici descrizioni suggerimenti su trattamenti e sulla promozione dell'igiene orale, nello specifico si consiglia l'utilizzo di Stuzzicadenti di legno o altri materiali per mantenere la pulizia del cavo orale (Weinberger, 2005).

I concetti tradizionali di salute sono basati su un metaforico modello meccanico nel quale il corpo è visto come una macchina nella quale il succedersi di processi morbosi e di periodi di salute sono visti come un fenomeno biologico (Slade, 1997). Già dal 1997 alcuni autori, come Locker, rilevavano come la tendenza, considerata poi scorretta, nel campo odontoiatrico fosse stata quella di percepire e quindi, trattare la cavità orale come una struttura autonoma, isolata dal corpo e dalla persona (Locker, 1997). Fortunatamente sia il concetto di salute generale che quello di salute orale sono cambiati con il tempo, oggi infatti, da una visione "atomistica" del corpo umano, nel quale ogni struttura viene considerata a se stante, siamo arrivati a considerare il corpo con una prospettiva più ampia ed "olistica", nella quale la promozione e la salute orale risultano una logica estensione (Coulter et al., 1994; Watt, 2002).

La salute orale è stata definita come lo stato del cavo orale e delle strutture ad esso associate nel quale la malattia è contenuta, e la malattia futura inibita (Yewe.Dyer, 1993, pg 224). Oggi una buona salute orale è considerata una componente necessaria della salute generale, sulle basi, quindi, di queste premesse è necessario promuovere e mantenere una buona salute orale per tutti gli individui. Haden et al. pur avendo

evidenziato un grande miglioramento, sul territorio Americano durante gli ultimi 25 anni, hanno anche riscontrato la necessità di una maggior collaborazione tra le varie discipline odontoiatriche, mediche e le varie professioni sanitarie (Haden et al., 2003). Piaget, nel 1970 intuì differenti metodi di collaborazione fra professionisti: la multidisciplinarietà, l'interdisciplinarietà e la transdisciplinarietà. La multidisciplinarietà affronta le problematiche utilizzando differenti discipline, ma rimanendo all'interno dei campi specifici rispettivi, l'interdisciplinarietà, invece, analizza, sintetizza e armonizza i collegamenti fra le discipline creando un "insieme" ordinato e coerente. In ultimo, ma non per importanza nel mondo moderno, la transdisciplinarietà integra le scienze naturali, sociali e mediche in un contesto umanitario ed olistico, trascendendo i limiti e le argomentazioni delle stesse materie e specializzazioni (Piaget, 1970, Choi and Pak, 2006).

Proprio all'interno di questo innovativo percorso, che ancora oggi sta guidando le differenti "scoperte" e innovazioni, nasce il concetto di Prevenzione.

"Prevenire è meglio di curare", non abbiamo bisogno di citazioni per affermarlo, ma se fino a poche decadi fa nel campo odontoiatrico era possibile prevenire una carie, una parodontite o un carcinoma orale, seguendo i percorsi transdisciplinari abbiamo compreso come prendersi cura del proprio cavo orale sia fondamentale per la salute di tutto il corpo.

Nel paziente anziano, autosufficiente o meno, è quindi, necessario prendersi cura e consigliare di mantenere una corretta igiene orale, non soltanto per il nostro campo, ma anche per la salute generale del paziente.

Non descrivendo l'approfondimento delle correlazioni riscontrate nella letteratura scientifica sul diabete ed aterosclerosi, temi che saranno affrontati, più in dettaglio, nel capitolo 1.4, 1.5. presenteremo ora, brevemente, alcune revisioni della letteratura che analizzano le correlazioni fra malattie parodontali e neurologiche, l'osteoporosi, malattie respiratorie e artrite reumatoide tutte problematiche tipiche dell'invecchiamento e, di conseguenza in continuo aumento.

Morbo di Alzheimer e Malattia parodontale

Considerando che, benché complesso, il meccanismo di patogenesi del Morbo di Alzheimer (AD) sia stato completamente spiegato e documentato in letteratura, gli agenti che potrebbero scatenare queste reazioni sono ancora da definire (Amstrong, 2013). Questi potrebbero essere relazionati all'invecchiamento, alla degenerazione dei percorsi dei neurotrasmettitori, fattori ambientali (e.g. esposizione ad alluminio o rame; traumi cerebrali; malnutrizione), a fattori genetici (e.g. le mutazioni dei geni APP e presenilin e degli alleli APOE-e4), alla compromissione della barriera emato-encefalica, ad una disfunzione del sistema immunitario ed infine ad agenti infettivi (Amstrong, 2013). La parodontite (PD) condivide ancora una volta, molte citochine proinfiammatorie con la Malattia di Alzheimer: IL-1, IL-6, TNF-a, IL-8, IL-10. (Gaur and Agnihotri. 2015). Oltre a questo abbiamo una correlazione significativa fra perdita di elementi dentari e danno cognitivo (1336 soggetti) (Grabe et al. 2009), fra rischio di sviluppo Alzheimer e pazienti già affetti da parodontite, nei quali il rischio di un declino cognitivo fu studiato e provato su quasi 600 uomini (Kaye et al., 2010).

Rimangono molteplici possibili eventi scatenanti AD in comune con PD, come il ruolo di batteri come il *Porphyromonas*, lo stress ossidativo, polimorfismi genetici in comune etc., (Poole et al., 2014; Li, 2010; Daborg, 2010).

L'infiammazione potrebbe quindi risultare come un link di connessione fra la parodontite e AD. Però in letteratura, conclude Abbayya, non si presentano studi animali, e ben che meno umani, che siano riusciti a spiegare questa relazione.

Anche per l'Alzheimer però gli Autori concludono consigliando di mantenere una corretta igiene orale sempre per una questione di costi benefici (Abbayya, 2015).

Il mantenimento di un'igiene domiciliare del paziente Alzheimer sarà chiaramente molto impegnativa ed eccetto che seguito, risulterà difficile ottenere ottimi o discreti risultati, è necessaria quindi grande attenzione e

capacità di relazionarsi con il paziente AD per poter individuare momenti, modalità e metodi flessibili e personalizzabili (Kamer et al., 2008).

Osteoporosi e malattie parodontali

Per quanto riguarda le correlazioni fra Osteoporosi e parodontiti sono presenti fattori di confondimento che giocano un ruolo nel mantenere la cronicità di entrambi i problemi. Purtroppo, a parte per l'abuso di bifosfonati, oppure l'utilizzo di bifosfonati in endovena, non sono presenti studi con adeguato sample size, oppure senza fattori di confondimento rendendo i dati difficilmente estrapolabili o semplicemente non applicabili, rendendo complesso intendere la relazione fra le due malattie (Otomo-Corgel, 2012). Certamente l'associazione fra densità minerale ossea orale (BMDs) e misurazioni della gravità dell'osteoporosi sono descritte in letteratura; in modelli animali si è riuscito a dimostrare come una predisposizione per lo sviluppo di osteoporosi risultasse in una perdita verticale di osso alveolare mandibolare (Kyrgidis et al., 2011).

Jabbar et al. hanno studiato la relazione fra malattia parodontale e citochine plasmatiche, vitamina D e BMDs in donne post-menopausa con e senza osteoporosi, riscontrando che la malattia parodontale era maggiormente comune nelle donne con osteoporosi ed inoltre associata ad una minor vitamina D ed a più alte concentrazioni di RANKL ed Osteoprotegerina (OPG) (Jabbar et al., 2011).

Si è inoltre riscontrato che dosi sub-antimicrobiche di doxyciclina, in donne post-menopausa hanno dimostrato un possibile beneficio nel ridurre progressivamente la perdita di attacco con un effetto di riduzione sui biomarkers sistemici di perdita d'osso (Hathcock et al., 2007).

Malattie Respiratorie

I microbi, provenienti dalla cavità orale possono essere aspirati all'interno del tratto respiratorio e potrebbero essere coinvolti nella progressione o negli stadi iniziali delle malattie respiratorie, con una particolare attenzione alla pneumonia "nosocomiale" in pazienti ad alto rischio (Preston et al., 1999; DeRiso et al., 1996).

Migliorare l'igiene orale dei pazienti ventilati e non ventilati in case di cura ha ridotto l'incidenza di pneumonia nosocomiale (Yonehama, 2002; Hospital-acquired pneumonia, a consensus statement ATS 1995). È quindi necessario prevenire, soprattutto quando i costi risultano bassi come nel caso dell'Igiene dentale Professionale, e non permettere contaminazioni da parte dei batteri del cavo orale che non solo riescono a disseminarsi in tutto il corpo (oltre che ab ingestis, anche nei vasi tramite la circolazione sanguinea), ma agiscono anche come ambiente selettivo per i batteri, aumentandone la virulenza o comunque modificandone il profilo epigenetico e quindi il fenotipo.

Il costo efficacia di mantenere o ripristinare una salute orale e parodontale nei pazienti all'interno di case di cura od ospedali risulta ulteriormente necessario anche in luce dei pochi sforzi economici e reali per eseguire trattamenti volti a migliorare la salute parodontale ed inoltre sono rarissimi e minimi gli effetti avversi (Scannapieco et al., 2003).

Artrite Reumatoide

L'artrite reumatoide (RA) è una malattia sistemica infiammatoria, a base autoimmune, caratterizzata da infiammazione sinoviale, tipicamente causante dolore, rigonfiamenti ed eventualmente può terminare con il danneggiamento della cartilagine, erosione delle ossa e addirittura con la distruzione completa dell'articolazione/articolazioni colpite/e. le limitazioni imposte da questa patologia arrivano a costringere i pazienti a

significative limitazioni nell'attività, disabilità ed un rischio di morte maggiore della media (Dadoun et al., 2012).

La correlazione fra RA e parodontite è stata proposta più di 200 anni fa, come sottolineato da Rutger (Rutger et al. 2012).

Forse un ruolo del *Porphyromonas gingivalis* (attivo anche nell'aterogenesi), e di altri batteri, o una risposta autoimmune potrebbe essere condivisa da entrambe le patologie, ma la corrente evidenza non supporta un effetto positivo del trattamento parodontale sull'attività della patologia artritica (Han et al., 2012; Cecil and Angevin, 1938; de Smit et al., 2012).

Sono stati invece ritrovati miglioramenti nel punteggio dell'attività della malattia (28 articolazioni), del tasso di sedimentazione degli eritrociti e della proteina C reattiva (CRP), limitati però soltanto ai pazienti senza tasche parodontali. I risultati di questi studi propongono una correlazione fra infezione parodontale e terapia anti-TNF nei pazienti con RA, quest'ultima potrebbe, infatti, essere inficiata dalla malattia parodontale stessa (Han, 2012; Savioli, 2012).

Sarebbero ancora moltissime le patologie tipiche dell'invecchiamento che sono state correlate alla malattia parodontale, come il Parkinson, la malattia metabolica, l'obesità e addirittura con i livelli di ormoni sessuali o il consumo di alcool.

Si ritiene però che il concetto dello sbilanciamento a favore dei benefici rispetto ai costi nell'eseguire una corretta prevenzione o trattamento delle patologie parodontali in soggetti adulti, anziani e soprattutto internati, allettati o comunque in situazioni di co-morbilità sia stato ben dimostrato.

Anche se una soltanto delle patologie invalidanti e con spesso gravi conseguenze per gli anziani sopra riportate potesse essere prevenuta o comunque meglio controllata grazie a semplici sedute di ablazioni del tartaro seguite da istruzioni d'igiene orale domiciliare i benefici, anche in termini economici sarebbero sicuramente maggiori dei costi.

1.3. Il Paziente in Unresponsive Wakefulness Syndrome UWS

La Unresponsive Wakefulness Syndrome, nome entrato in vigore nel 2010, proposto da Steven Laureys, uno dei massimi esperti nel campo, potrebbe vedere la sua traduzione in italiano con Sindrome da Veglia Passiva/apatica/non reattiva. La ragione di questa proposta vede le sue radici nel tentativo, condiviso subito dalla maggior parte degli Autori del campo, di rimuovere quella connotazione negativa e persistente insita nella definizione antecedente: stato vegetativo persistente o permanente (Laureys et al., 2010).

Aumentando l'uso delle cure intensive, grazie alle nuove scoperte scientifiche e tecnologiche che rendono maggiormente conseguibile una ventilazione artificiale per sostenere la respirazione e la circolazione hanno portato ad un aumento della sopravvivenza durante il coma, con un conseguente aumento anche del numero di pazienti che sono riusciti a risvegliarsi dal coma (presentando tipici segni, come l'apertura degli occhi, segno tangibile di "mancanza" di stato di coma, impossibilitandone la diagnosi), ma che comunque rimangono non responsivi (mostrando movimenti riflessi, tipici però anche dello stato comatoso). Inizialmente chiamato *coma vigile* (Calver and Coll, 1959) o *Sindrome Apallica* (Jennet and Plum, 1972), fino al 2010 riconosciuta come *stato vegetativo persistente* (Jennet and Plum, 1972), oggi presenta questo nuovo, difficilmente traducibile nome che, a parere dell'Autore, contribuisce sì a mantenere il tono *politically correct*, che i nostri tempi necessitano, senza però, fuori da alcun dubbio, contribuire a rendere maggiormente difficile ricerche e, a mio sommo avviso, iniettando in un già complesso e delicato tema ulteriori difficoltà di comprensione, chiaramente salvaguardando una nuova considerazione "*umana*" del paziente.

Tralasciando considerazioni inutili e personali, che non interessano al lettore, un paziente in VS/UWS è in grado di respirare autonomamente, oltre a dimostrare alcuni comportamenti riflessivi, come l'apertura

spontanea degli occhi, ma non sono in grado di percepire né il proprio corpo né l'ambiente circostante (Jennett and Plum, 1972; The Multi-Society Task Force on PVS, 1994).

Non sono presenti in letteratura dati certi, come confermato da van Erp, rimangono soltanto stime e appunto uno studio di Prevalenza dello stesso autore del 2014 che poneva il valore da 0,2 a 6,1 pazienti affetti da VS/UWS ogni 100.000 membri della popolazione (van Erp et al., 2014). La difficoltà nell'averne una stima più precisa di questa sindrome deriva dalla difficoltà relativa alla diagnosi, che si riflette in un alto tasso di diagnosi scorrette che arriva fino al 43% dei presunti pazienti in VS/UWS si rivelano essere invece in uno stato di minima coscienza, più comunemente chiamato Minimally Conscious State (MCS) (Giacino et al., 2002). Anche se la diagnosi differenziale fra i due stati di coscienza sia molto difficile, se non insidiosa, la differenza, proprio in termini prognostici, risulta essere considerevole, soprattutto sotto l'aspetto clinico, più di un autore asserisce che i pazienti in MCS abbiano prognosi più fauste e riescano a processare gli stimoli emozionali, nocicettivi e auditivi in modi molto simili alle risposte degli individui sani (Giacino and Kalmar, 1997; Giacino and Kalmar, 2005; Voss et al., 2006; Boly et al., 2005).

Se la diagnosi di VS/UWS si ottiene dall'analisi di una serie di criteri clinici rispettati (e.g. nessuna consapevolezza del sé; nessuna risposta visiva, uditiva; tattile o nocicettiva, etc...) e di condizioni cliniche (compatibili, non compatibili e compatibili, ma atipici), la diagnosi differenziale può prendere forma soltanto se le condizioni cliniche del paziente vengono analizzate attentamente (Laureys et al., 2001; Royal College of Physicians, 1996; Zeman, 1997).

È necessario, infatti, distinguere fra differenti condizioni: Minimally Conscious state (MCS), Persone con severe disabilità per tutta la vita, Locked-in Syndrome, Coma e Morte confermata da test del tronco encefalico (Royal College of Physicians, 2003).

La prognosi dei pazienti affetti da VS/UWS è influenzata dall'età, dalle cause che hanno scatenato lo stato vegetativo e dalla durata dello stesso (Laureys et al., 2010). Se le possibilità di Risveglio sono del 40% entro 1

mese dall'inizio dello stato vegetativo, queste diminuiscono con il passare del tempo diventando, quando maggiori di 6 mesi o un anno, una condizione aggravante per il paziente, con una diminuzione delle possibilità di risveglio, che rendono lo stesso stato vegetativo "permanente" (Royal College of Physicians, 2003).

Table 1. Glasgow Coma Scale (GCS).

| E | Eye opening | M | Motor function | V | Verbal |
|---|---------------|---|--------------------------|---|---------------------|
| 1 | None | 1 | None | 1 | None |
| 2 | To pain | 2 | Extends to pain | 2 | Grunts |
| 3 | To sound | 3 | Abnormal flexion to pain | 3 | Inappropriate words |
| 4 | Spontaneously | 4 | Normal flexion to pain | 4 | Confused |
| | | 5 | Localises pain | 5 | Oriented |
| | | 6 | Normal | | |

Table 2. The differential diagnosis of the vegetative state.

| Condition | Vegetative state | Minimally conscious state | Locked-in syndrome | Coma | Death confirmed by brainstem tests |
|-----------------------------|---|--|---|--|-------------------------------------|
| Awareness | Absent | Present | Present | Absent | Absent |
| Sleep-wake cycle | Present | Present | Present | Absent | Absent |
| Response to noxious stimuli | +/- | Present | Present (in eyes only) | +/- | Absent |
| Glasgow Coma Scale score | E4, M1-4, V1-2 | E4, M1-5, V1-4 | E4, M1, V1 | E1-2, M1-4, V1-2 | E1, M1-3, V1 |
| Motor function | No purposeful movement | Some consistent or inconsistent verbal or purposeful motor behaviour | Volitional vertical eye movements or eyeblink preserved | No purposeful movement | None or only reflex spinal movement |
| Respiratory function | Typically preserved | Typically preserved | Typically preserved | Variable | Absent |
| EEG activity | Typically slow wave activity | Insufficient data | Typically normal | Typically slow wave activity | Typically absent |
| Cerebral metabolism (PET) | Severely reduced | Insufficient data | Mildly reduced | Moderately to severely reduced | Severely reduced or absent |
| Prognosis | Variable: if permanent, continued vegetative state or death | Variable | Depends on cause but full recovery unlikely | Recovery, vegetative state or death within weeks | Already dead |

NB: as explained in the text, EEG and measures of cerebral metabolism are not required to make these clinical diagnoses.
 EEG = electroencephalography; PET = positron emission tomography.

Tabelle 5 e 6: Glasgow coma Scale e Diagnosi differenziale nello VS/UWS Stato vegetativo, Unresponsive Wakefulness Syndrome.

Le due tabelle sopra pubblicate chiarificano quanto la diagnosi differenziale sia necessaria per ottenere indicazioni prognostiche sul paziente (Royal College of Physicians, 2003).

1.3.1. La salute orale nei pazienti in UWS

La salute orale del paziente UWS risulta molto complicata da mantenere; non soltanto per le chiare limitazioni del paziente affetto da UWS, che chiaramente non ha possibilità di auto-eseguire una corretta pulizia del cavo orale proprio per la sua mancanza di coscienza, ma anche per una serie di complicanze più o meno gravi che presenteremo in questo capitolo. È necessario ricordare che la quasi totalità dei pazienti affetti da UWS necessita un'alimentazione artificiale, il più delle volte enterale attraverso via percutanea (PEG), quindi il cavo orale non viene utilizzato per masticare e sminuzzare il bolo, ma è comunque quasi sempre infiammato per differenti ragioni.

In primis i possibili traumi orali o dentali autoinflitti dal paziente o, se il VS/UWS è di origine traumatica, residui del trauma stesso, il bruxismo, derivante dalla spasticità e dalla rigidità presentate dai pazienti con lesioni al tronco encefalico, il reflusso gastro-esofageo (GERD) e chiaramente la mancata igiene personale del paziente non cosciente (Andrews, 2005).

Sono stati riportati in letteratura studi che riportano un contributo della salute orale e dell'educazione alla salute orale alla prevenzione della pneumonia, Bassim nel 2008 riscontrò una modificazione del rischio di mortalità da pneumonia nel paziente anziano (Yoneyama, et al., 1999; Bassim et al., 2008). Considerando la necessità di mantenere l'ambiente ospedaliero, nel quale sono ricoverati i pazienti in VS/UWS, senza infezioni nosocomiali o possibilmente con il minor numero di queste, è necessario quindi mantenere la salute orale dei pazienti allettati.

Oltre a queste limitazioni si aggiunge una lista di farmaci che sono utilizzati nel paziente in VS/UWS che complicano ulteriormente il trattamento e soprattutto il mantenimento di una corretta salute orale. Fra i sintomi più comuni troviamo: Xerostomia, Bruxismo, glossiti, disgeusia, stomatiti, gengiviti, angioedemi, sialoadeniti, edemi e pigmentazioni/depigmentazioni linguali, lesioni orali, tic motori e salivazione aumentata (Corrigan et al., 2004).

La salute orale di questi pazienti ha risvegliato inoltre posizioni radicalmente differenti nell'immaginario degli Autori che s'impegnano su questo difficile tema. Se alcune società istituzionali come la Royal college of Physicians di Londra ed autori che hanno ricoperto un ruolo di tutto rilievo come Laureys o Zeman, puntando soprattutto sulla prevenzione dello Pneumonia, affermano l'importanza dell'igiene orale e consigliano a tutti gli infermieri ed i medici di occuparsi della salute del cavo orale così come della salute e dell'igiene di tutto il corpo; alcuni più arditi, ma soprattutto specialisti dell'area odontoiatrica/logopedica, hanno iniziato a intravedere un ruolo di maggior rilievo dell'igiene orale, arrivando addirittura a pubblicare un Case report sull'Attivazione cerebrale, o meglio sull'aumento dell'attivazione cerebrale in un paziente di 75 anni con un report di Glasgow Coma Scale massimo (Laureys, 2001; Zeman, 1997; Fujii et al., 2014).

Praticare una Comprehensive Oral Care sul paziente in questo stato risulta davvero complicato, inoltre sono difficili da ritrovare protocolli specifici per questi tipi di pazienti, che ricevono sì molta attenzione talvolta mediatica, ma poca "pratica".

Seguendo principi utilizzati su pazienti con danno cerebrale da trauma (Traumatic Brain Injury-TBI) è stato formulato un protocollo personalizzato e da personalizzare ulteriormente per queste tipologie di pazienti.

L'alimentazione artificiale per la maggior parte dei pazienti risulta in una minor quantità di processi cariosi, ma un maggior accumulo di tartaro e calcoli, reflusso gastroesofageo e risultato ad alto rischio di aspirazione durante un intervento sulla poltrona odontoiatrica, soprattutto per l'irrigazione e la posizione del capo.

Questo dovrà trovarsi con lo schienale del letto a circa 30°, e assicurarsi di lavorare con la minor acqua possibile e con l'utilizzo delle nuove tecnologie, non solo quindi aiutandosi con uno spazzolino elettrico, ma utilizzando anche spazzolini sonici, che risultano maggiormente performanti.

Certamente il valore della prevenzione primaria o secondaria su questi pazienti è duplice, in primo luogo soddisfa l'esigenza medica come abbiamo

potuto evincere da questo capitolo, in secondo luogo rende più facile i “rimanenti rapporti” con il mondo esterno, come sottolineano i questionari e le opinioni dei parenti e tutori dei pazienti trattati.

1.4. Diabete

Il diabete mellito di tipo 2 è una patologia oggi in aumento, con un'incidenza crescente e correlata con l'obesità (CDC, 2013). Analizzando più a fondo questi dati, se il diabete nel 2000 aveva un'incidenza fra gli adulti intorno ai 150 milioni di pazienti, nel 2012 l'International Diabetes Federation, stimava un numero più di due volte maggiore: 371 milioni (IDF, 2013).

Boyle et al. hanno stimato che nel 2050, se le stime non vedranno una modifica, da un adulto su cinque ad un adulto su tre negli Stati Uniti potrebbe essere affetto da diabete (Boyle et al., 2010). Se per "l'iper calorica" America il dato è già preoccupante, per i Paesi emergenti, come India, Cina e alcuni paesi Africani, il dato potrebbe essere maggiormente allarmante considerando sia i bassi tassi di prevalenza attuale sia l'allungamento dell'aspettativa di vita e delle condizioni di maggior benessere che possono soltanto favorire l'obesità (Marchesini e Di Luzio, 2013).

L'aumento della sedentarietà, dell'obesità e l'aumentare della vita media non solo si risolveranno con un aumento delle stime d'incidenza del diabete, ma l'impatto più devastante si potrebbe verificare sul sistema sanitario nazionale. Non soltanto la patologia stessa, ma la miriade di complicanze croniche che trascina, con una grande attenzione verso quelle micro e macro-vascolari, grava pesantemente sulla salute e sulla qualità di vita del paziente, oltre che sulla società intera attraverso i costi gestionali correlati (Asche et al., 2011).

Ritornando agli Stati Uniti, l'American Diabetes Association ADA ha pubblicato, nel 2012, l'ultimo dei report quinquennali sui costi del diabete negli Stati Uniti, arrivando ad affermare che nel 2012 ogni 10 dollari spesi in America alla ricerca di Salute 1 dollaro viene speso a causa del diabete, in dati assoluti sono 245 miliardi di dollari (176 per i costi diretti e 69 per la perdita di produttività).

| | COSTO PERSONA SENZA DIABETE IN DOLLARI USA | COSTO PERSONA CON DIABETE IN DOLLARI USA | COSTO TOTALE DEL DIABETE IN MILIARDI DI DOLLARI USA | PERCENTUALE DEL COSTO ECONOMICO |
|-----------------------------------|--|--|--|---------------------------------------|
| CURE IN OSPEDALE | 2.147 | 3.404 | 76 | 31% |
| CURE IN CASA DI RIPOSO | 522 | 663 | 15 | 6% |
| VISITE IN STUDI MEDICI | 728 | 683 | 15 | 6% |
| PRONTO SOCCORSO | 346 | 309 | 7 | 3% |
| VISITE AMBULATORIALI IN OSPEDALE | 284 | 236 | 5 | 2% |
| ASSISTENZA DOMICILIARE | 305 | 200 | 4 | 2% |
| INSULINA | | 276 | 6 | 2% |
| ALTRI FARMACI PER IL DIABETE | | 544 | 12 | 5% |
| PRESIDI (STRISCE, AGHI, LANCETTE) | | 103 | 2 | 1% |
| ALTRI PRESIDI | 40 | 48 | 1 | 0% |
| FARMACI NON SPECIFICI PER DIABETE | 1.227 | 1.423 | 32 | 13% |
| TOTALE COSTI DIRETTI | 5.747 | 7.888 | 176 | 72% |
| GIORNATE DI LAVORO PERSE | | 300 | 5 | 2% |
| RIDOTTA PRODUTTIVITÀ SUL LAVORO | | 1.381 | 23,5 | 10% |
| NON OCCUPAZIONE PER DISABILITÀ | | 1.034 | 21,6 | 9% |
| RIDOTTO AIUTO IN CASA (*) | | 1.100 | 18,5 | 8% |
| TOTALE COSTI DIRETTI | | 2.715 | 69 | 28% |
| TOTALE | | 11.572 | 245 | 100% |

(*) Considerato pari a zero per le persone sopra i 65 anni.

Costi diretti ed indiretti del diabete negli Stati Uniti.

Dati American Diabetes Association [8].

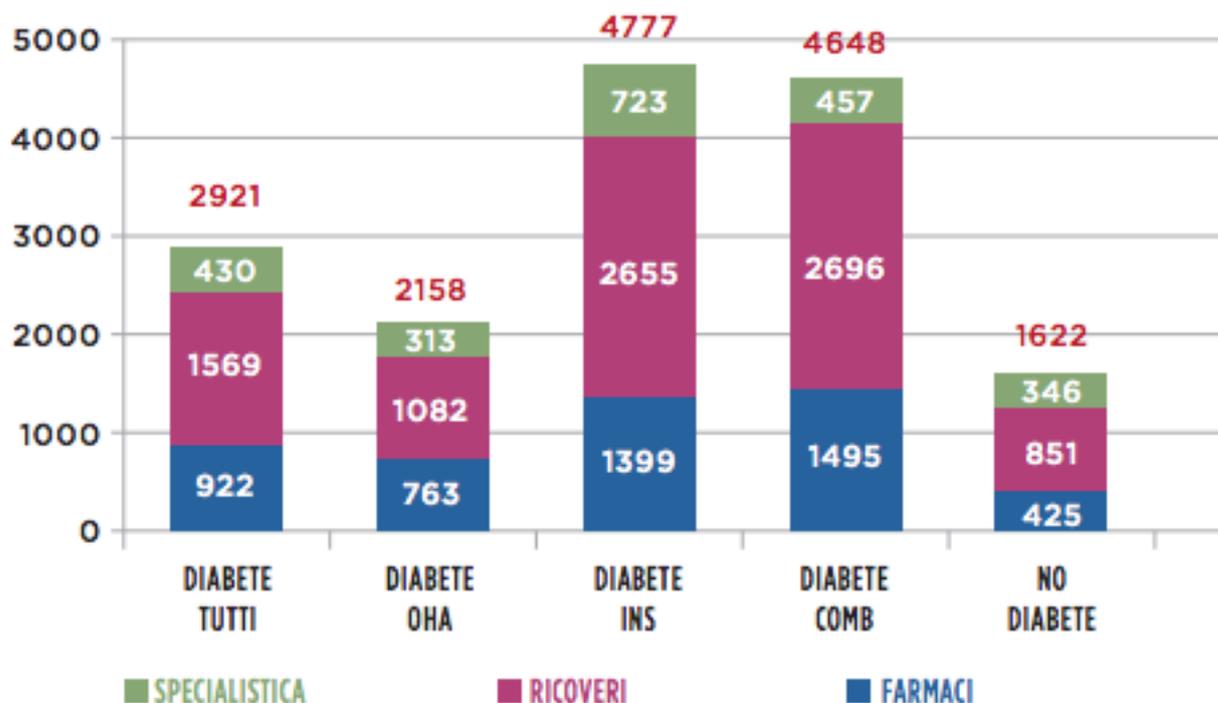
Tabella 7: costi del Diabete negli stati Uniti; Dati American Diabetes Association.

In Italia possiamo affidarci al database ARNO, una raccolta delle prescrizioni farmaceutiche, dei servizi erogati e dei ricoveri di una popolazione di 10 milioni di Italiani seguiti dal 1997. ARNO riporta una prevalenza del 5,8%, molto simile alle stime dell'ISTAT del 2012 del 5,5% (5,5% donne e 5,4% per gli uomini). ARNO ha verificato un aumento sistematico dei valori intorno al 3% del 1997, dato che rispetterebbe più o meno i dati sull'aumento mondiale della prevalenza della patologia (ISTAT, 2012; ARNO, 2011). Le tabelle ARNO riportate in seguito ben descrivono l'impegno economico, non solo del paziente, ma anche della comunità intera italiana.

I dati crudi ed economici soprariportati descrivono perfettamente l'aumento della spesa per il SSN nel trattare un paziente diabetico, rispetto ad un paziente senza diabete, tramite farmaci, prestazioni specialistiche e ricoveri (ARNO, 2011).

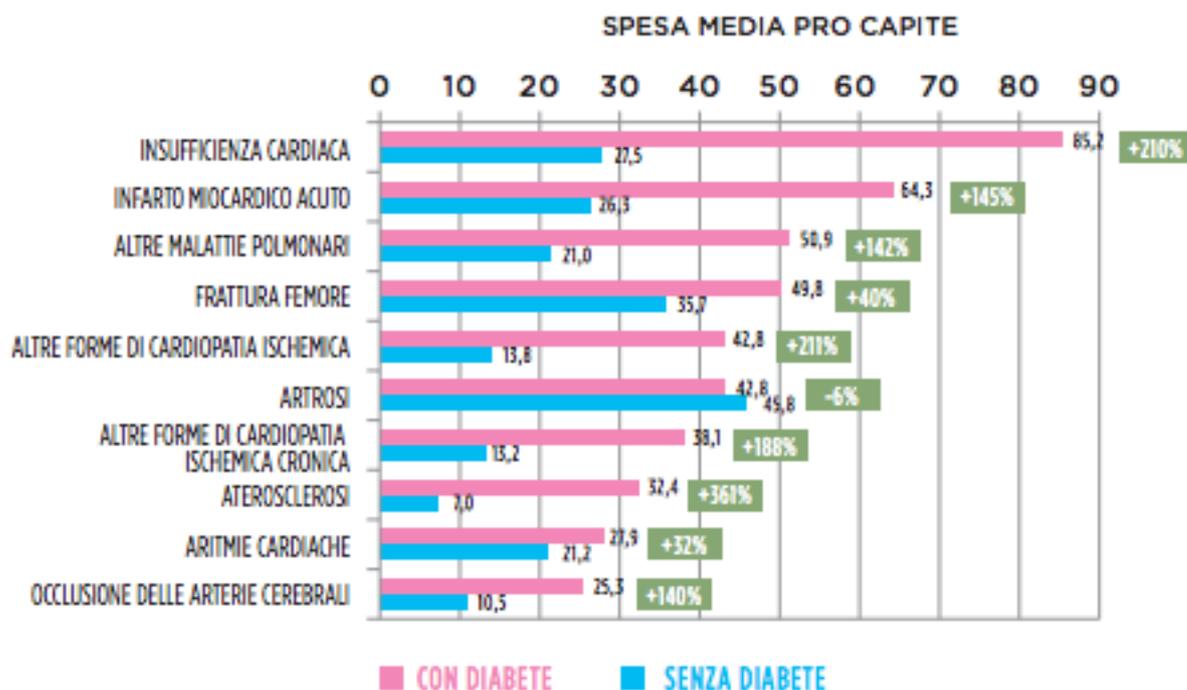
Herman nel 2013 conclude dando speranza non soltanto al paziente ma anche alla spesa pubblica spiegando come un'attenzione alla prevenzione ed al trattamento precoce delle complicanze risulti necessario anche, se non soprattutto, per la patologia diabetica (Herman, 2013).

Nelle due pagine sottostanti le tabelle 8, 9, 10 ed 11, con le relative didascalie e tutti rilevati grazie ad ARNO DIABETE.



Costo (in Euro) di una persona con diabete per il Sistema Sanitario Italiano. Il costo è suddiviso tra le persone trattate con soli antidiabetici orali (OHA), sola insulina (INS) e coloro che fanno terapia combinata (COMB).
Da: Osservatorio ARNO Diabete [10]

Tabella 8: Costo per il sistema sanitario di un paziente diabetico

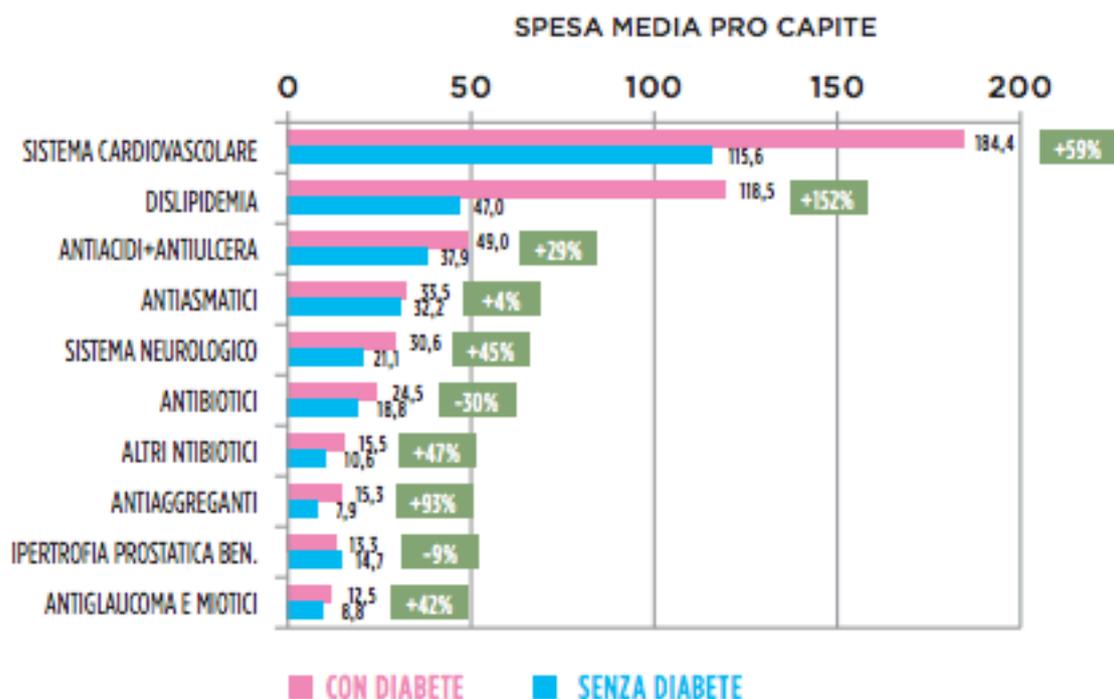


Prime 10 diagnosi di ricovero a più alta incidenza di spesa in regime di ricovero ordinario.

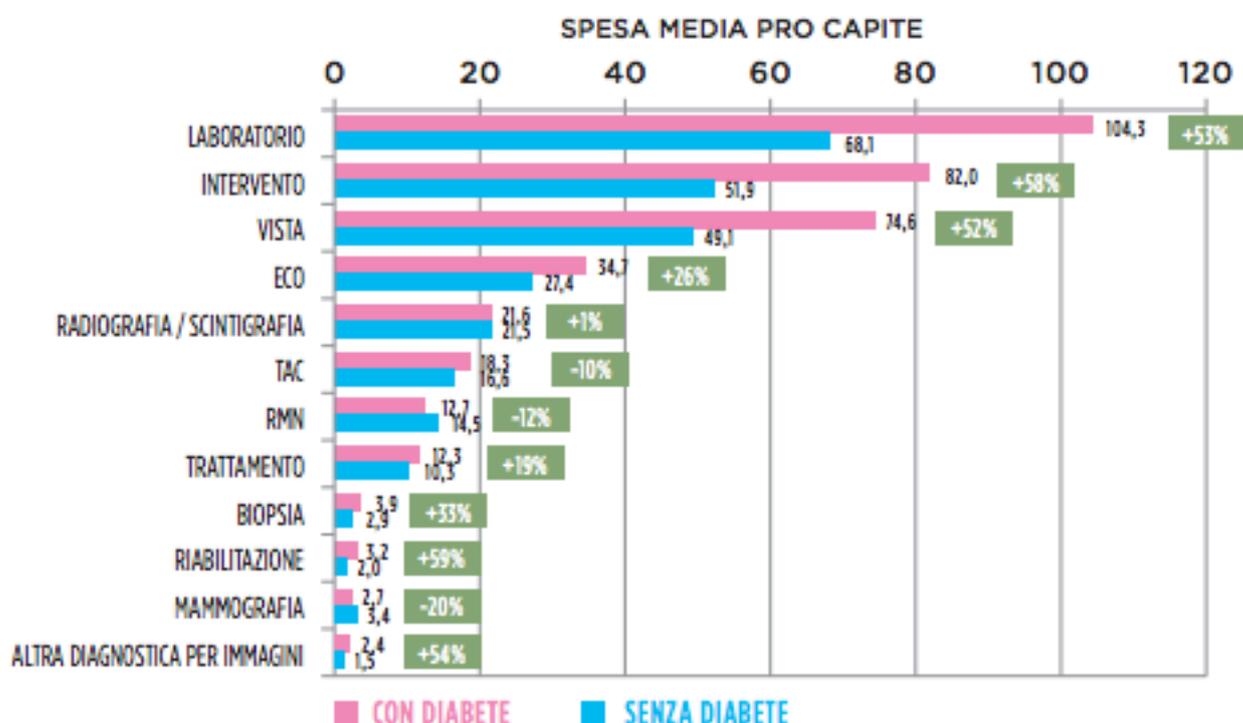
Da: Osservatorio ARNO Diabete [10]

Tabella 9: prime 10 diagnosi di ricovero a più alta incidenza di spesa.

Tabella 10: (a seguire nella pagina successiva) gruppi di farmaci a più alta incidenza e spesa per tipologia di prestazioni specialistiche.



I gruppi di farmaci a più alta incidenza di spesa
 Da: Osservatorio ARNO Diabete [10]



Spesa per tipologia di prestazioni specialistiche
 Da: Osservatorio ARNO Diabete [10]

1.4.1. La correlazione biunivoca fra Diabete e Malattia Parodontale

Il Diabete mellito, come in precedenza sottolineato, è una malattia sistemica con serie complicanze che affliggono la qualità della vita del paziente e la durata della stessa (Pihlstrom, 2001; Iacopino, 2000). Alcune di queste possono risolversi con danni agli occhi e ai differenti sistemi nervoso, cardiovascolare e renale, oltre a causare difetti nella cura della ferite (Mealey, 2000). Molti sono anche gli articoli che riportano un aumentato rischio di malattia parodontale e della sua aumentata severità nei pazienti affetti da diabete (Pihlstrom, 2001; Soskolne, 1998; Serrano and Corbaton, 2005). Rimane però ancora controverso il meccanismo che sottostà a quest'associazione, non si conosce ancora se le due patologie possano avere un comune inizio (Emrich et al., 1991); altri suggeriscono come l'azione di AGEs (Advanced Glication End Products) possa produrre un fenotipo iper-infiammatorio in alcune cellule (Pihlstrom, 2001; Grossi and Genco, 1998; Serrano and Corbaton, 2005). Alcuni, come Bascones et al., sostengono che la malattia parodontale potrebbe aumentare ulteriormente i livelli di citochine, già elevati e quindi contribuire all'infiammazione sistemica, inoltre l'accumulo di AGEs nei tessuti, causa delle più frequenti complicazioni del diabete, potrebbe causare uno stato pro-infiammatorio che amplifichi ulteriormente la risposta delle citochine (Bascones et al., 2011).

Risulta inoltre interessante ed ancora aperta la discussione sull'efficacia del trattamento parodontale sul controllo glicemico nei pazienti diabetici, se questo fosse realmente possibile la connessione fra malattie parodontali e diabete si farebbe ancora più forte, dato che molte complicazioni del diabete derivano proprio da una non controllata glicemia. Gli studi riportati nella tabella sottostante riportano le analisi effettuate su HbA1c prima e dopo Igiene professionale. Dai dati molti discordanti presentati in letteratura oggi non si può ancora conoscere se e quanto la salute del cavo

orale sia correlata direttamente con l'esordio o la complicazione del Diabete (Llambes et al., 2015).

| | Ref. | Design | Sample | Follow-up | Outcome | Results |
|--------|-------------------------------------|---------------------------|--------------|-----------|---------|------------------------------|
| Type 1 | Aldridge et al ^[55] | Randomized clinical trial | 23 subjects | 2 mo | HbA1c | No changes |
| | Smith et al ^[57] | Controlled clinical trial | 18 subjects | 2 mo | HbA1c | No changes |
| | Christgau et al ^[55] | Cohort study | 7 subjects | 4 mo | HbA1c | No changes |
| Type 2 | Llambés et al ^[53] | Randomized clinical trial | 30 subjects | 3 mo | HbA1c | 0.06% reduction (no changes) |
| | Stewart et al ^[55] | Controlled clinical trial | 72 subjects | 10 mo | HbA1c | 6% reduction |
| | Kiran et al ^[51] | Randomized clinical trial | 44 subjects | 3 mo | HbA1c | 0.8% reduction |
| | Faria-Almeida et al ^[46] | Cohort study | 20 subjects | 6 mo | HbA1c | 5.7% reduction |
| | Dağ et al ^[55] | Controlled clinical trial | 45 subjects | 3 mo | HbA1c | No changes |
| | Auyeung et al ^[57] | Cohort study | 75 subjects | 12 mo | HbA1c | No changes |
| | Engelbreton et al ^[59] | Randomized clinical trial | 257 subjects | 6 mo | HbA1c | No changes |
| | Gay et al ^[59] | Randomized clinical trial | 126 subjects | 4 mo | HbA1c | No changes |

Tabella 11: studi diabete tipo 1 e tipo 2 e cambiamento HbA1c secondo Llambes et al., 2015.

Concludendo la Malattia parodontale è una malattia infettiva ad alta prevalenza, e presenta una correlazione con alcune patologie, fra le quali anche il diabete. Il controllo metabolico e la persistenza della malattia da anni sembra influire sul rischio di sviluppare malattia parodontale. Anche se è stato riscontrata una diminuzione in alcuni studi dei valori di HbA1c, non si può affermare che il trattamento parodontale possa limitare i valori di emoglobina glicata per la mancanza di adeguati controlli sui cambiamenti eseguiti anche sulla dieta, l'esercizio fisico e le prescrizioni farmacologiche alle quali sono sottoposti i pazienti. Inoltre solitamente si assiste ad una riduzione minore del 0,5% di HbA1c, e fino ad oggi non sono presenti studi in letteratura che provino una significatività clinica di questo miglioramento (Lalla et al., 2000; Llambes et al., 2015).

Nei capitoli seguenti saranno analizzate le correlazioni fra le aterosclerosi e le malattie parodontali ed altre patologie tipiche dell'invecchiamento.

1.5 Aterosclerosi e Batteri parodontopatogeni

Otomo-Corgel et al. descrivono nel 2012 come affrontare il tema di queste sempre più numerose associazioni fra parodontite ed altre patologie dell'invecchiamento, che non solo imperversano in letteratura, ma anche nei social media e nei canali di comunicazione più conosciuti, anche pubblicitari, creando grande confusione in primo luogo al paziente ed, inoltre, probabilmente anche agli operatori sanitari del settore e non (Otomo-Corgel et al 2012). Oggigiorno non è ancora presente un consenso fra gli esperti sulla natura di queste associazioni, probabilmente dobbiamo questa mancanza alla rapidità di crescita di questo "settore" della scienza. Se risulta facile infatti descrivere la co-presenza di una o più delle malattie sopracitate, non risulta affatto altrettanto facile descrivere i meccanismi di causa-effetto che caratterizzano correlazioni più certe (Bascones et al., 2011).

Dopo il diabete, probabilmente le malattie che maggiormente hanno attratto le attenzioni dei ricercatori sono quelle cardiovascolari. Entrambe le patologie sono, infatti, progressive, croniche anche se chiaramente a differenza delle malattie parodontali, quelli cardiovascolari (malattia ischemica, malattie cardiovascolari e malattie dei vasi periferici) portano morte e forti disabilità in tutto il mondo. In comune condividono, inoltre, le cause multifattoriali di alta prevalenza e molteplici fattori di rischio (Otomo-Corgel et al., 2012).

Molti marker dell'infiammazione sistemica comuni alle problematiche cardiovascolari sono associati anche alle malattie parodontali, citando soltanto i più studiati: matrix metalloproteinases, IL-6 e soprattutto CRP (Kaptoge et al., 2010). Questi marker sono implicati nell'aterogenesi della placca ateromasica oppure nella rottura della stessa nei pazienti con malattia parodontale (Loos et al., 2005).

I batteri patogeni parodontali, attraverso il flusso sanguigno e le conseguenti batteriemie potrebbero depositarsi, inducendo una risposta pro-coagulante o invadendo le cellule vascolari. La parodontite è stata anche studiata in merito ad una sua possibile associazione con la

disfunzione endoteliale (Higashi et al., 2008). Fino al 2009 sono state pubblicate revisioni sistematiche della letteratura e meta-analisi con una lieve anche se statisticamente significativa associazione fra le due patologie (Janket et al., 2003, Khader et al., 2004, Mustapha et al., 2007, Humphrey et al., 2008, Blaizot et al., 2009, Bahker et al., 2007). Si è dovuto attendere fino al 2012 per avere, a firma di tre eminenti autori parodontologi ed esperti nella correlazione fra malattie parodontali, Lockhart, Bolger e Papapanou, uno statement della American Heart Association che potesse chiarificare il tema oramai divenuto complesso. Gli autori dopo aver revisionato la maggior parte degli studi ritenuti coerenti e senza bias trassero forti conclusioni, ritenendo ingiustificati gli articoli ed altri statement che consigliavano interventi terapeutici volti a scongiurare questa correlazione. Purtroppo questo statement è stato criticato soprattutto perché a parere dei più non presentava dati certi per asserire l'inutilità degli interventi terapeutici, e inoltre, tema sul quale è difficile disserire, non considerava il razionale del costo-versus-beneficio, come sottolineato da Rethman nello stesso anno (Rethman et al., 2012).

Certamente la scienza non si è fermata, e soltanto in tre anni gli autori sono riusciti a ottenere informazioni che potessero perlomeno far emergere con maggior chiarezza se e come i batteri del cavo orale hanno un impatto significativo sull'infiammazione sistemica e forse contribuire nell'aterogenesi. Kholy, Genco e Van Dyke nel giugno del 2015 presentarono una revisione che analizzando studi in vitro ed in vivo concludeva con un interessante raccomandazione, in relazione agli studi sulla regolazione dell'espressione genica. Recentemente infatti sono aumentate esponenzialmente le capacità dei laboratori di conoscere, processare e studiare le sequenze geniche degli stessi batteri, permettendo la nascita della trascrittomica (Kholy et al., 2015).

Questa branca della Omica, progredendo ha messo in luce differenze precedentemente non analizzate; per esempio sono state riscontrati aumenti dei fattori di virulenza in organismi batterici, quando confrontati fra pazienti parodontopatici e pazienti a livello parodontale sani (Hasturk, 2007). Non soltanto quindi, secondo le più recenti ed autorevoli

pubblicazioni vediamo presente una correlazione fra batteri patogeni parodontali ed aterosclerosi, ma possiamo anche interrogarci su quanto influente sia il fenotipo, quando i batteri, dopo essere stati “selezionati” ed dopo aver visto “attivarsi” loci genici prima disattivati, potrebbero influenzarsi fra di loro, tramite interazioni che possono aumentare grandemente il potenziale patogenico (Kholý et al., 2015).

CAPITOLO 2

MATERIALI E METODI

In questo studio sono stati reclutati pazienti da differenti reparti dell'Azienda dei Servizi alla Persona Pio Albergo Trivulzio: Pazienti anziani (>60 anni) affetti da Diabete di tipo II, Pazienti con necessità d'intervento di Endoarterectomia delle Carotidi, Pazienti in VS/UWS ed i relativi controlli sani.

Degli 84 pazienti analizzati in totale sono stati reclutati 38 pazienti test affetti dalle suddette patologie (9 VS/UWS, 10 pazienti con diabete di tipo II e 32 pazienti controllo (12 VS/UWS e 20 sani per studio aterosclerosi) per un totale di 70 pazienti reclutati.

Stato Vegetativo

Nello studio riguardante i pazienti affetti da VS/UWS (Vegetative State/Unresponsive Wakefulness Syndrome) sono stati reclutati 21 affetti da tale patologia, di cui 9 pazienti test (1 deceduto) e 12 controllo (3 deceduti) all'interno del reparto "Stati Vegetativi", diretto dal Dottor Monti e dalla Dottoressa Di Vincenzo, dell'Azienda dei Servizi alla Persona: "Pio Albergo Trivulzio" di Milano. Sono stati raccolti da Novembre 2013 tutti i dati riguardanti la salute sistemica, la scala del coma di Glasgow, la terapia farmacologica seguita, l'alimentazione, la cartella parodontale (quando possibile corredata dal sondaggio parodontale completo, reso molto difficile dai movimenti incondizionati ed incontrollabili del paziente).

Tutti i pazienti, anche quando edentuli sono stati inseriti nel gruppo di mantenimento ed igiene orale, ad eccezione dei pazienti i quali tutori non fossero concordi al progetto, manifestando la non volontà alla

partecipazione. Questi sono stati comunque controllati dalla dottoressa Di Vincenzo ed hanno comunque fornito dati sulla salute sistemica ed orale e sono stati utilizzati come gruppo controllo.

Come consigliato dalla letteratura sono stati utilizzati differenti protocolli personalizzati per ogni paziente che però si possono riassumere con alcune indicazioni utili alla cura dei pazienti allettati, non coscienti e con cannula tracheostomica. È stato utilizzato il Modified OAG Oral Assessment Scale sotto riportato su tutti i pazienti.

| Category | Tools for Assessment | Methods of Measurement | Numerical and Descriptive Ratings | | |
|--------------------------------------|-------------------------|--|--|--|---|
| | | | 1 | 2 | 3 |
| Swallow | Observation | Ask patient to swallow. To test gag reflex, gently place blade on back of tongue and depress (<i>may move ETT to test gag</i>) | Normal swallow | Some pain on swallow; impaired (<i>Assume intubated patient has pain = minimum score of 2</i>) | Unable to swallow (<i>CN IX, X, XII; sedated, or absent gag</i>) |
| Lips | Visual/palpatory | Observe and feel tissue (<i>Lubricate finger and palpate</i>) | Smooth and pink and moist | Dry or cracked | Ulcerated or bleeding (<i>HSV, candidiasis, and/or cheilitis</i>) |
| Tongue | Visual/palpatory | Feel and observe appearance of tissue | Pink and moist and papillae present | Coated or loss of papillae with a shiny appearance with or without redness | Blistered or cracked (<i>bleeding, lacerations, ulcers</i>) |
| Saliva | Mouth mirror | Insert blade into mouth, touching the center of tongue and floor of mouth (<i>Slide a mouth mirror along the buccal mucosa</i>) | Watery (<i>No friction between the mirror and mucosa</i>) | Thick or ropy (<i>Slightly increased friction, no tendency for the mirror to adhere to the mucosa</i>) | Absent (<i>Significantly increased friction, the mirror adhering or tending to adhere to mucosa</i>) |
| Mucous Membranes | Visual | Observe appearance of tissue | Pink and moist | Reddened or coated (increased whiteness) without ulcerations | Ulcerations with or without bleeding |
| Gingiva (<i>rate the worst</i>) | Tongue blade and visual | Gently press tissue with tip of blade (<i>press triangle gum area between teeth</i>) | Pink and stippled and firm | Edematous with or without redness | Spontaneous bleeding or bleeding with pressure |
| Teeth | Visual | Observe appearance of teeth (<i>Wait at least 1 min after applying disclosing solution w/ swab</i>) | Clean and no debris | Plaque or debris in localized areas (between teeth if present) (< 50% surface areas; > 50% surface area with thin biofilm coating) | Plaque or debris generalized along gum line or denture bearing areas (> 50% surface areas; heavy plaque and debris) |
| Odor* | Nose | Smell | Normal | Slight to moderately foul | Strong, foul odor |

I pazienti sono stati inclusi nello studio a condizione che fossero maggiorenni, con un report di Glasgow Coma Scale maggiore di sette punti (De Feo et al. 2012), che fossero portatori di tracheocannula o lo fossero stati (guarigione della cicatrice) ed alimentati tramite Nutrizione Enterale (PEG Gastrostomia Endoscopica Percutanea), era, inoltre, necessario risultassero alla cartella SOSIA con una mobilità M1, cognitivtà C2 e comorbilità S1 e la firma dei loro tutori sul consenso informato. Sono stati quindi preparati due consensi il primo per il trattamento igienico delle arcate dentarie e l'inserimento all'interno del protocollo studio, ed un

secondo per il solo controllo delle cartelle e dei dati personali. Il primo è stato firmato dai soli partecipanti al gruppo test (gruppo igiene orale domiciliare) e il secondo da tutti i tutori/parenti dei pazienti.

I criteri di esclusione utilizzati sono stati: la mancanza di firma del consenso informato o del consenso al trattamento dei dati.

Il campione di pazienti reclutati consisteva di 17 pazienti (dei quali 9 test e 8 controllo, in totale sono stati seguiti 21 pazienti ma 4 sono deceduti, 3 gruppo controllo, 1 gruppo testi) di età compresa fra 21 e 80 anni (media: 59,6; deviazione Standard 17,5) dei quali il 10 donne e 7 uomini. La mediana del Glasgow Coma Scale (GCS) era di 7,7 con DS di 0,8 per il gruppo test e 8,1 con DS di 0,6 nel gruppo controllo. Tre pazienti del gruppo controllo ed un paziente del gruppo test non sono stati reclutati nello studio per morte dovuta a sepsi. Ugualmente sono state segnalate le ragioni della morte che saranno presentate nella sezione Risultati.

Sono stati utilizzati spazzolini manuali o elettrici, comunque con setole medio, morbide e con testine di dimensioni piccole per facilitare l'utilizzo nelle zone posteriori, ove possibile è stato preferito l'utilizzo di spazzolini elettrici, per facilità di utilizzo sul paziente non collaborante.

Gli apribocca Optragate o comunque in materiale elastomerico, termoplastico o propilenico hanno permesso una corretta pulizia del versante vestibolare delle arcate dentarie dei pazienti, le zone palatali e linguali sono invece igienizzate grazie all'utilizzo di cunei in gomma dura con la funzione di mantenere il cavo orale del paziente aperto, prevenendo i movimenti di chiusura incontrollabili e soprattutto permettendo una corretta igiene del cavo orale anche nei pazienti che presentavano bruxismo. Lo spazzolino è stato utilizzato lungo la linea gengivale a 45° permettendo alle setole di massaggiare le gengive e di rimuovere la placca allontanandola dalla giunzione gengivale. Quando un sanguinamento veniva riscontrato era segnalato e registrato nella cartella parodontale del paziente così come la quantità di placca presente. Nel paziente in stato vegetativo o comunque non naturalmente fedato, ma alimentato tramite PEG, la placca (formata prevalentemente da residui alimentari) non dovrebbe formarsi, infatti, quello che si viene ritrovando sono dei grandi

accumuli soprattutto a livello linguale ed anche palatale dovute ad un probabile e comune GERD o reflusso gastro-esofageo che permette quindi al bolo ingerito grazie PEG di depositarsi sulla superficie dentaria, provocando però le stesse conseguenze infiammatorie riscontrate nella placca.

L'impossibilità dell'utilizzo di acqua o soluzioni acquose nel paziente in stato vegetativo permanente, dovuta all'alta probabilità di aspirazione della stessa e quindi di problematiche potenzialmente legate anche al decesso del paziente, rende difficile detergere il cavo orale del paziente fino ad ottenere una perfetta igiene. Le uniche soluzioni acquose o in parte costituite da acqua sono state quelle a base di clorexidina utilizzata per "imbibire" lo spazzolino prima dell'utilizzo sul paziente.

Chiaramente però, e questo è riscontrato anche dai dati clinici dei pazienti, abbassare il livello della flora batterica, come nel paziente sano, rende maggiormente controllabile l'infiammazione gengivale.

Sono stati rilevati dati riguardanti la salute sistemica, i farmaci utilizzati, la condizione della salute orale e gengivale tramite OAG, ed i principali esami sanguinei da effettuarsi regolarmente sul paziente ospitalizzato.

Grande aiuto è stato ottenuto dai parenti/tutori e dalle stesse infermiere del reparto, alle quali è stato consegnato un questionario "di Soddisfazione" del trattamento aggiuntivo di igiene orale eseguito una volta ogni 3-4 giorni dal Corso di Laurea di Igiene Dentale (già presieduto durante l'inizio dello studio dal Professor Farronato oggi presieduto dal Prof. Sardella).

I questionari sono stati analizzati e i dati raccolti e confrontati.

Ultimo dato registrato sono stati i decessi ed i miglioramenti riscontrati clinicamente sia da un punto di vista di medicina generale, e di salute orale comprendente l'aspetto logopedico analizzato da gennaio a settembre 2014, deglutologico e dentale.

Molto utili per eseguire una corretta igiene dentale sono stati i massaggi eseguiti fra i quali ricordiamo: il massaggio esterno ed interno delle labbra con stiramenti passivi dei singoli gruppi muscolari, portare le labbra a contatto con loro, coprire il labbro superiore con quello inferiore e viceversa, inserire il pollice sotto il mento e ruotare, ponendo la mandibola

contatto con la mascella, effettuare una rotazione della mandibola (ponendo la mano sul mento) nei due sensi, lateralizzazione della mandibola, apertura chiusura della bocca, contrazioni isometriche dei muscoli masseteri e temporali anche contro resistenza, posizionamento dell'indice di entrambi le mani all'interno della bocca il pollice all'esterno tra le arcate dentali e la parete interna delle guance compiendo un movimento rotatorio in entrambi i sensi, contrazione isometrica della lingua contro resistenza (con abbassalingua), innalzamento abbassamento della lingua, spostamento della lingua in alto a destra a sinistra internamente esternamente alla bocca utilizzando le dita, pressione sulla regione retro molare inferiore per stimolazione dell'apertura della bocca (Shindler et al., 2001).

Protocolli Operativi

Nella fase sperimentale si è reso necessario approntare specifici protocolli d'igiene orale sia professionale, che di mantenimento in relazione alle difficoltà del trattamento e dalle esigenze cliniche del paziente in stato vegetativo a tal riguardo si è fatto di effettuare queste sedute sono i pazienti affiancati sempre da un caregiver, ho comunque sempre con il consenso firmato dai familiari.

È stata studiata un'apposita cartella e sono stati progettati organizzati strumenti a procedure che permettessero di effettuare terapie direttamente al letto del paziente seduto in carrozzina. Non meno importante dal punto di vista clinico di mantenimento è stata l'istruzione dell'attivazione dei parenti e degli infermieri che hanno contribuito al controllo di buono stato di salute orale. Sono stati formulati differenti protocolli operativi in base alle caratteristiche del cavo orale del paziente di relazione alla presenza della cannula tracheostomica che purtroppo limita la durata delle sedute e non permette procedure troppo invasive. La cannula, dispositivo temporaneo permanente che sopperisce una mancata coordinazione respiratoria, rappresenta uno stress aggiuntivo per i pazienti in stato vegetativo, disfagico, unicamente i rischi legati

all'ingestione di acqua e di residui di tartaro se non si attua una adeguata aspirazione.

T0: spesse volte dividendo in più sedute, Compatibilmente con le risposte soggettive del paziente È stata eseguita una prima visita con compilazione della cartella clinica e dell'anamnesi del paziente, Durante queste visite in collaborazione con il direttore del reparto è stata approntata una cartella dedicata al paziente stato vegetativo costituita da una parte anamnestica specifica allo scopo di ottenere un quadro clinico completo ed accurato. L'anamnesi non deve soltanto indagare la causa del problema della successiva condizione di stato vegetativo ma anche dare riscontri sui valori della scala di Glasgow, nell'eventuale tracheotomia e della data del ricovero.

T1: esame obiettivo extra ed intra orale, compilazione della cartella parodontale, e indici clinici (placca e sanguinamento).

La condizione di ipertonìa muscolare e la totale mancanza di collaborazione da parte del paziente non consentono l'immediata apertura del cavo orale, per questo motivo è stato in parte impossibile rilevare tutti i pazienti dati clinici in tutti I sestanti, molto utili sono state anche documentazioni fotografiche intraorali eseguite in tutte le fasi dello studio.

T2: in questa terza fase si è programmato il piano di trattamento comprendente terapia causale quando possibile e manovre di disinfezione del cavo orale specifiche per ogni singolo paziente, cerca degli ausili chimici da utilizzare e della necessità di utilizzare profilassi antibiotica prima della terapia causale, Istruzione e motivazione dei familiari e/o dei caregiver. Aver effettuato la rilevazione di tutti i dati necessari si assegna paziente uno dei tre protocolli in seguito riportati: protocollo uno paziente con dentatura completa o parziale protocollo due pazienti edentuli infine protocollo tre terapia di mantenimento.

Durante le visite con cadenza bi/tri-settimanale sono stati rilevati gli indici gengivali ed orali e sono state controllate le condizioni di salute generali del paziente.

Diabete e HbA1c

Nel 2014 da marzo a maggio sono stati reclutati 10 pazienti per uno studio pilota sul ruolo dell'igiene dentale nell'omeostasi del paziente diabetico.

I pazienti sono stati reclutati su un campione iniziale di 34 pazienti diabetici del reparto di "Diabetologia" del Pio Albergo Trivulzio, o residenti nel reparto RSA (Residenza Sanitaria Assistenziale), Pio XI (nucleo 1-2 e nucleo 3-4). I criteri di inclusione erano presenza nel cavo orale di almeno 4 denti per arcata, valori di HbA1c maggiori di 42 mmol/mol (6,0%) e minori di 70 mmol/mol (9,6 %), pazienti autosufficienti e non fragili, presenza di infiammazione gengivale attiva (BOP positivo su almeno 4 siti), presenza di malattia parodontale (presenza di almeno due tasche su denti non contigui della profondità di 4mm o maggiore), bleeding on Probing (BOP) >15 % età compresa fra 60 anni e 80 anni, firma del consenso informato. I criteri di esclusione utilizzati sono stati edentulia anche solo di un'arcata, concomitanza di patologie quali aterosclerosi, malattie cardiovascolari o neurodegenerative, presenza d'impianti o restauri protesici su impianti (all on four, riabilitazioni parziali o complete su impianto/i). 24 pazienti sono stati esclusi dallo studio, 16 per edentulia totale o protesi su impianti, 4 per età maggiore agli 80 anni, 2 per età inferiore a 60 anni e 2 per aver espresso la non volontà alla partecipazione allo studio. Non sono stati riscontrati pazienti con almeno 4 elementi per arcata senza malattia parodontale.

Degli iniziali 34 pazienti soltanto 10 sono stati reclutati per lo studio pilota nel quali sono stati controllati i valori dell'infiammazione gengivale del paziente a T0, quindi prima della terapia causale e a T4 dopo 3 mesi dall'igiene professionale. Oltre agli indici parodontali sono stati raccolti i valori di HbA1c a T0 e a T1, tramite metodo HPLC.

Sono state eseguite sessioni scaling e root planing su tutti i pazienti se necessario utilizzando più sedute per paziente, dopo aver raccolto gli indici parodontale ed il sondaggio parodontale per poter eseguire le levigature

radicolari. Quando sono stati incontrati processi cariosi, protesi debordanti, o qualsiasi problematica dentale si è provveduto con la risoluzione della stessa, nell'intento di ristabilire una corretta igiene dentale.

Dobbiamo osservare però che la totalità dei pazienti trattati è stata internata per problematiche mediche differenti o per anzianità nel mese precedente alla terapia parodontale.

I dati sono stati confrontati grazie al test t di student per dati in o il Mann-Whitney U test. Per comparare la differenza fra i valori della baseline e il risultato dopo tre mesi sono stati utilizzati il Student t test per dati non appaiati e il Wilcoxon rank-sum test.

Protocolli Operativi

Sono state eseguite 4 sedute di detartrasi, levigature e polishing su ogni paziente. Nella prima seduta dopo un'iniziale scaling della placca per la quantificazione degli indici di placca e sanguinamento è stato eseguito un sondaggio parodontale (PSR), per diagnosticare la presenza di malattia parodontale. Tutti i 10 pazienti selezionati sono stati trattati con terapia parodontale tramite scaling attraverso strumenti ultrasonici e levigature radicolari con strumenti manuali (curette e mini-five).

T0: raccolta indici parodontali e scaling e sondaggio parodontale, pianificazione appuntamenti per root planing

T1: controllo indici parodontali e levigatura 1, se possibile due sestanti

T2: controllo indici parodontali e levigatura 1, se possibile due sestanti

T3: controllo indici parodontali e levigatura 1, se possibile due sestanti

T4: Raccolta dei nuovi valori di HbA1c

Aterosclerosi e batteri parodontopatogeni

Nello studio riguardante i pazienti affetti da aterosclerosi, sono stati arruolati 19 soggetti "malati", ricoverati presso l'Ospedale di Circolo di Varese Fondazione Macchi Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Morfologiche, affetti da aterosclerosi dei tronchi sovraortici con stenosi di grado severo e sintomatologia clinica tale da necessitare un intervento di endoarterectomia delle carotidi. L'intervento consiste in una arteriotomia longitudinale con esportazione della placca ateromasica, utilizzando come piano di clivaggio la tonaca media, che viene quindi in parte asportata, tutto ciò con clampaggio a monte e a valle della biforcazione carotidea. Di 12 dei 19 soggetti "malati", sono pervenuti sia un campione di placca omogenata che un campione di plasma prelevato subito prima dell'intervento. Dei restanti 7 soggetti "malati" erano disponibili solo le sezioni di tessuto di placca, ma non il corrispondente campione di plasma.

Parallelamente sono stati arruolati 20 soggetti "sani", così suddivisi:

- 10 soggetti con età > 40 anni (reclutati presso il Pio Albergo Trivulzio di Milano)
- 10 soggetti con età < 40 anni (reclutati presso il 4° piano dell'Edificio U8 dell'Università di Milano-Bicocca)

I criteri di inclusione per i pazienti analizzati erano: necessità di intervento di endoarterectomia delle carotidi, età > 60 anni.

Per i pazienti controllo questi non dovevano essere affetti da patologie invalidanti, ed essere parodontalmente sani: assenza d'inflammation gengivale attiva (BOP minore 15%), assenza di malattia parodontale (assenza di due tasche su denti non contigui della profondità di 4mm o maggiore), età compresa fra 60 anni e 80 anni, firma del consenso informato. I criteri di esclusione utilizzati sono stati edentulia anche solo di un'arcata, concomitanza di patologie quali aterosclerosi, malattie cardiovascolari o neurodegenerative,

Per i pazienti invece del gruppo test i criteri d'inclusione sono stati presenza di inflammation gengivale attiva (BOP positivo su almeno 4 siti), presenza di malattia parodontale (presenza di almeno due tasche su denti

non contigui della profondità di 4mm o maggiore), bleeding on Probing (BOP) >15 % età compresa fra 60 anni e 80 anni, firma del consenso informato. I criteri di esclusione utilizzati sono stati edentulia anche solo di un'arcata, concomitanza di altre patologie.

Campioni analizzati

- Campioni omogenati di placca carotidea: 12 (soggetti "malati")
- Ciascun campione di placca analizzato è stato precedentemente omogeneizzato - mediante specifica procedura, come sotto riportato.
- Campioni di plasma: 32 (12 soggetti "malati", 20 soggetti "sani")
- Sezioni di tessuto di placca carotidea: 7 (soggetti "malati").

Preparazione dei campioni

I campioni omogenati di placca carotidea, sono stati ottenuti mediante la seguente metodica eseguita presso il Dipartimento di Farmacologia dell'Università Insubria di Varese.

Metodica per la disgregazione meccanica della placca carotidea

La disgregazione della placca mediante il sistema automatico Becton-Dickinson Medimachine, utilizzato nello studio e condotto presso il Dipartimento di Farmacologia dell'Università Insubria di Varese, è una metodica innovativa. Fino al 2009 la disgregazione delle placche aterosclerotiche era, infatti, eseguita mediante disgregazione enzimatica, una tecnica molto più costosa e laboriosa.

La disgregazione della placca è stata eseguita grazie all'utilizzo del sistema automatico Becton-Dickinson Medimachine (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) che ne permette la disgregazione meccanica. Successivamente l'omogenato cellulare viene filtrata tramite Filicons ripetutamente e utilizzando filtri con diametro di pori diminuente da 70,50 e 30 µm. Successivamente il campione viene centrifugato a 400 g per 10 min e il

pellet recuperato viene risospeso in 10 ml di RPMI 1640 e si procede alla conta ed alla valutazione della vitalità cellulare.

I **Campioni di plasma** sono stati ottenuti centrifugando il sangue intero a 400rpm per 20 minuti.

Le sezioni di tessuto di placca carotidea sono state ottenute dopo fissaggio in paraformaldeide al 4% in tampone fosfato per 24h a temperatura ambiente, il tessuto è stato disidratato ed incluso in paraffina, successivamente sono state tagliate fette di spessore di 3µm.

Sono stati presi in esame 4 metodi riprodotti in letteratura da differenti studi:

- 1) PrepSEQ™ RESIDUAL DNA SAMPLE PREPARATION KIT (TISSUE) di Applied Biosystems Life Technologies;
- 2) InviMag® DNA Mini Kit di BIOSPA;
- 3) NucliSENS® easyMAG® di bioMèrieux (metodo automatizzato)
- 4) CTAB (metodo “in house”)

Il **DNA totale estratto** (ng/µl) è stato quantificato tramite lettura al Nanodrop (The Thermo Scientific NanoDrop 2000c). Tutti i valori sono stati ottenuti mediante saggi Real-time PCR (AB Prisma 7900 HT).

Al fine di valutare la resa di estrazione, i valori sono stati normalizzati in funzione del recupero di DNA del calibratore e del volume di eluizione del campione biologico. In particolare la resa è stata calcolata applicando la seguente formula:

Resa = [(copie calibratore estratto / copie del calibratore controllo) x volume di eluizione] x 100.

Il Dna è stato estratto e analizzato nel Laboratorio di Microbiologia del San Gerardo di Monza, afferente all'Università Bicocca, dal gruppo della Prof. Cocuzza, dal dottor Musumeci e dal dott. Oggioni.

Analisi Statistica

I dati ottenuti sono stati analizzati mediante i test statistici Wilcoxon Mann Whitney test e Fisher exact test.

CAPITOLO 3

RISULTATI

Aterosclerosi e batteri Parodontopatogeni

Scelta metodica di estrazione DNA

Nella fase preliminare del nostro studio è stato necessario valutare in letteratura l'efficienza delle possibili metodiche di estrazione di DNA batterico e virale da matrici biologiche complesse come può essere la placca carotidea. Da questa ricerca è emersa la difficoltà di reperire una metodica ufficiale standardizzata di cui sia nota l'efficienza di estrazione. In virtù di ciò abbiamo deciso di confrontare nel nostro laboratorio 4 metodi di estrazione (PrepSEQ™, InviMag® , NucliSENS® easyMAG® , CTAB) al fine di individuare il metodo più efficiente in termini di resa e facilità di esecuzione da utilizzarsi per l'analisi quantitativa dei nostri campioni.

Come mostrato nella Tabella 12 sono stati presi in considerazione differenti fattori tra cui il tempo di processamento, i volumi iniziali e di eluizione e i parametri relativi alla quantificazione del DNA estratto rispetto allo "spike" di controllo.

Il metodo "in house" CTAB è risultato richiedere un tempo di processamento superiore alle 24h a differenza dei 3 metodi commerciali i cui i tempi erano nell'ordine dei 60 min, su entrambe le matrici biologiche. La quantità degli estratti di DNA da entrambe le matrici, misurati al Nanodrop (The Thermo Scientific NanoDrop 2000c) e i relativi rapporti che descrivono la purezza dell'estratto, suggeriscono NucliSENS® easyMAG® come miglior metodo.

Analogamente, il calcolo dell'efficienza di estrazione, ottenuto mediante la formula precedentemente riportata (Tabella 13), ha indicato che il metodo NucliSENS® easyMAG® è risultato possedere, in entrambe le matrici

biologiche analizzate, l'efficienza di estrazione maggiore, pari al 78 % (plasma) e al 72 % (placca) rispetto ad un'efficienza che variava dal 7% al 57% per i metodi di estrazione alternativi.

Riassumendo, i dati riportati, confermano come questo metodo sia in grado di garantire una buona efficienza di estrazione a partire anche da una matrice complessa come la placca carotidea, permettendo una più accurata determinazione quantitativa della presenza di DNA microbico da questi campioni.

Pertanto per tutte le analisi effettuate in questo studio, relative alla ricerca molecolare di DNA microbico, sono stati utilizzati estratti di DNA da campioni biologici ottenuti mediante **metodica NucliSENS® easyMAG®**.

| METODO DI ESTRAZIONE | TEMPO | VOL. INIZIALE | VOL. ELUZIONE | ng/μl DI DNA ESTRATTO | RAPPORTO 260/280 | RAPPORTO 260/230 | COPIE CALIBRATORE ESTRATTO (n° copie/μl) | COPIE CALIBRATORE CONTROLLO (n° copie tot di spike) |
|----------------------|--------|---------------|---------------|-----------------------|------------------|------------------|--|---|
| PrepSEQ™ | 80 min | 100 μl | 50 μl | 50,4 | 1,89 | 0,55 | 14,1 | 2460 |
| InviMag® tissue | 62 min | 200 μl | 100 μl | 46,9 | 1,54 | 0,93 | 2,0 | 2460 |
| NucliSENS easyMAG® | 60 min | 200 μl | 50 μl | 80,3 | 1,45 | 0,60 | 35,5 | 2460 |
| CTAB | > 24h | 100 μl | 50 μl | 69,2 | 1,66 | 0,82 | 28,0 | 2460 |

| METODO DI ESTRAZIONE | TEMPO | VOL. INIZIALE | VOL. ELUZIONE | ng/μl DI DNA ESTRATTO | RAPPORTO 260/280 | RAPPORTO 260/230 | COPIE CALIBRATORE ESTRATTO (n° copie/μl) | COPIE CALIBRATORE CONTROLLO (n° copie tot di spike) |
|----------------------|--------|---------------|---------------|-----------------------|------------------|------------------|--|---|
| PrepSEQ™ | 80 min | 100 μl | 50 μl | 43,4 | 1,67 | 0,65 | 9,1 | 2460 |
| InviMag® bacterial | 62 min | 200 μl | 100 μl | 41,0 | 1,76 | 0,27 | 1,8 | 2460 |
| NucliSENS easyMAG® | 60 min | 200 μl | 50 μl | 89,8 | 1,58 | 0,63 | 38,5 | 2460 |
| CTAB | > 24h | 100 μl | 50 μl | 31,3 | 1,94 | 0,36 | 7,6 | 2460 |

$$\text{Resa} = [(\text{copie calibratore estratto} / \text{copie del calibratore controllo}) \times \text{volume di eluzione}] \times 100$$

Tabella 12. Confronto tra i metodi di estrazione, nella placca (A) e nel plasma (B). tempo di processamento, i volumi iniziali e di eluzione e i parametri relativi alla quantificazione del DNA estratto.

| METODO DI ESTRAZIONE | EFFICIENZA (%) | |
|----------------------|----------------|--------|
| | Plasma | Placca |
| PrepSEQ™ | 18 | 29 |
| InviMag® | 7 | 8 |
| NucliSENS® easyMAG® | 78 | 72 |
| CTAB | 15 | 57 |

Tabella 13 Efficienza (%) dei metodi di estrazione confrontati nei campioni di plasma e placca.

Dati anagrafici

Lo studio è stato eseguito su un totale di 32 soggetti, di cui 12 “malati” con aterosclerosi carotidea in stadio avanzato e 20 “sani” dal punto di vista cardiovascolare. I dati anagrafici della coorte dei soggetti studiati sono riportati nella Tabella 14.

| | SOGGETTI “MALATI” (n=12) | SOGGETTI “SANI” (n=20) |
|-------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| ETA' (media±DS) | 72±7 | 36±11 |
| SESSO (maschi/femmine) | 11/1 | 9/11 |

Tabella 14. Dati anagrafici dei soggetti arruolati.

Presenza e quantificazione dei patogeni ricercati in campioni clinici

In tutti i campioni è stata valutata la presenza e la carica degli agenti infettivi nella placca e nel plasma di 8 batteri parodontali (*P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *T. forsythia*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, *C. rectus*, *H. pylori*), di 3 β -herpesviruses (CMV, HHV-6, HHV-7) e di 1 γ -herpesviruses (EBV) ed il gene CCR5 quale indicatore della cellularità del campione.

Quantificazione dei patogeni nel plasma e nella placca

Nel plasma di tutti i soggetti, sia “sani” che “malati”, i virus ricercati sono risultati assenti. Al contrario il plasma di tutti i soggetti “malati” (100 %) e nel 45 % (9/20) dei soggetti “sani”, è risultato essere positivo per la presenza di almeno uno dei batteri ricercati (Tabella 15). Come mostrato nella tabella 16 nei “malati” 2/12 sono risultati essere positivi ad un solo patogeno, 7/12 a due patogeni, mentre 3/12 a più di tre patogeni. Nei “sani” invece tutte le positività riscontrate (9/20) risultavano dalla presenza di un solo patogeno; i restanti soggetti sono risultati negativi.

| GRUPPI | PREVALENZA NELLA PLASMA (%) | | | |
|---------------|-----------------------------|------------------|---------------------|--------------------|
| | PRESENZA DI VIRUS | ASSENZA DI VIRUS | PRESENZA DI BATTERI | ASSENZA DI BATTERI |
| “MALATI” (12) | 0 (0%) | 12 (100%) | 12 (100%) | 0 (0%) |
| “SANI” (20) | 0 (0%) | 20 (100%) | 9 (45 %) | 11 (55 %) |

Tabella 15. Prevalenza (%) di virus e batteri nei campioni di plasma.

| | UN PATOGENO | DUE PATOGENI | 3 O PIU' PATOGENI | NEGATIVI |
|--------------------------|-------------|--------------|-------------------|----------|
| PLASMA | | | | |
| "MALATI" (12) | 2/12 | 7/12 | 3/12 | 0/12 |
| "SANI" (20) | 9/20 | - | - | 11/20 |

Tabella 16. . Polimicrobismo nei campioni di plasma

Per quanto riguarda i batteri, tutti i soggetti "malati" sono risultati essere positivi almeno per una specie ricercata (Tabella 17). Nello specifico i campioni di plasma S1,S12 hanno mostrato una positività solamente a *P. gingivalis*; il campione S2 ha mostrato positività a *P. gingivalis* e *T. denticola*; i campioni S3,S5,S6,S8,S10,S11 erano positivi per *P. gingivalis* e *F. nucleatum*; il campione S4 ha mostrato positività a *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e *T. denticola*; il campione S7 è risultato positivo a *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *T. forsythia*; infine il campione S9 ha mostrato positività a *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e *T. forsythia*.

Sei dei soggetti "sani", facenti parte del gruppo con età > 40 anni, hanno mostrato una positività alla presenza di batteri nel plasma. Nello specifico i plasmi S2, S4, S6 e S9 sono risultati positivi solamente a *F. nucleatum*, mentre S1 ed S3 solamente a *P. gingivalis*. Tre dei soggetti "sani", facenti parte del gruppo con età < 40 anni, hanno mostrato una positività alla presenza di batteri nel plasma. Nello specifico i plasmi S15, S16, S19 sono risultati positivi solo a *P. gingivalis* (Tabella 18).

| PLASMA SOGGETTI "MALATI" | PATOGENO | | | | | | | | | | | |
|--|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | S11 | S12 |
| <i>F. nucleatum</i> copie/ml | 0 | 0 | 178 | 338 | 665 | 330 | 0 | 489 | 1188 | 828 | 399 | 0 |
| <i>T. denticola</i> copie/ml | 0 | 80 | 0 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>P. gingivalis</i> copie/ml | 1017 | 8500 | 5000 | 3500 | 1667 | 1283 | 1716 | 4671 | 3493 | 1996 | 2147 | 3570 |
| <i>C. rectus</i> copie/ml | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>P. intermedia</i> copie/ml | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 550 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>T. forsythia</i> copie/ml | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 275 | 0 | 56 | 0 | 0 | 0 |
| <i>H. pylori</i> copie/ml | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>A. actinomycetemcomitans</i> copie/ml | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Sommatoria carica microbica</i> Copie/ml | 1017 | 8580 | 5178 | 3853 | 2332 | 1613 | 2541 | 5160 | 4737 | 2824 | 2546 | 3570 |
| | | | | | | | | | | | | |
| *CCRS in 1 µl di estratto/2 | 27 | 4 | 6 | 8 | 5 | 6 | 3 | 3 | 10 | 34 | 8 | 7 |

*Il gene del CCR5 è presente in duplice copia in ogni cellula umana, il valore ottenuto dal saggio in Real-Time PCR è stato diviso per 2.

Tabella 17. Quantificazione dei patogeni (copie/ml) nel plasma dei 12 soggetti "malati", mediante saggio in Real-Time PCR.

| PLASMA SOGGETTI SANI | SOGGETTI CON ETA' > 40 ANNI | | | | | | | | | | SOGGETTI CON ETA' < 40 ANNI | | | | | | | | | |
|--|-----------------------------|-----|-----|------|----|-----|----|----|-----|-----|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | S11 | S12 | S13 | S14 | S15 | S16 | S17 | S18 | S19 | S20 |
| <i>F. nucleatum</i> copie/ml | 0 | 208 | 0 | 1108 | 0 | 375 | 0 | 0 | 274 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>T. denticola</i> copie/ml | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>P. gingivalis</i> copie/ml | 918 | 0 | 738 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 564 | 325 | 0 | 0 | 285 | 0 |
| <i>C. rectus</i> copie/ml | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>P. intermedia</i> copie/ml | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>T. forsythia</i> copie/ml | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>H. pylori</i> copie/ml | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>A. actinomycetemcomitans</i> copie/ml | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Sommatoria carica microbica</i> Copie/ml | 918 | 208 | 738 | 1108 | 0 | 375 | 0 | 0 | 274 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 564 | 325 | 0 | 0 | 285 | 0 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CCRS in 1 µl di estratto/2 | 15 | 4 | 7 | 11 | 3 | 1 | 13 | 2 | 9 | 13 | 7 | 8 | 6 | 4 | 3 | 17 | 1 | 2 | 5 | 1 |

Tabella 18. Quantificazione dei patogeni (copie/ml) nel plasma dei 20 soggetti "sani", mediante saggio in Real-Time PCR.

Nei campioni di placca carotidea, analogamente al plasma i virus sono risultati assenti e i batteri presenti in tutti i soggetti “malati” (Tabella 19). Come mostrato nella tabella 20 4/12 sono risultati essere positivi ad un solo patogeno, 7/12 a due patogeni, mentre 1/12 a più di tre patogeni.

| GRUPPI | PREVALENZA NELLA PLACCA (%) | | | |
|---------------|-----------------------------|------------------|---------------------|--------------------|
| | PRESENZA DI VIRUS | ASSENZA DI VIRUS | PRESENZA DI BATTERI | ASSENZA DI BATTERI |
| “MALATI” (12) | 0 (0%) | 12 (100%) | 12 (100%) | 0 (0%) |

Tabella 19. Prevalenza (%) di virus e batteri nei campioni di placca.

| PLACCA | UN PATOGENO | DUE PATOGENI | 3 O PIU' PATOGENI | NEGATIVI |
|---------------|-------------|--------------|-------------------|----------|
| “MALATI” (12) | 4/12 | 7/12 | 1/12 | 0/12 |

Tabella 20. Polimicrobico nei campioni di placca

Per quanto riguarda i batteri, tutti i soggetti “malati” sono risultati essere positivi almeno per una specie ricercata (Tabella 21). Nello specifico i campioni di placca S1,S6,S7,S12 hanno mostrato una positività solamente a *P. gingivalis*; il campione S2,S4 ha mostrato positività a *P. gingivalis* e *T. denticola*; i campioni S5,S8,S9,S10,S11 erano positivi per *P. gingivalis* e *F. nucleatum*; infine il campione S3 ha mostrato positività a *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *T. denticola* e *C. rectus*.

| PLACCA SOGGETTI "MALATI" | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | S11 | S12 |
|--|------|-----|------|------|------|------|-----|------|------|-------|-------|-------|
| PATOGENO | | | | | | | | | | | | |
| <i>F. nucleatum</i> copie/ml | 0 | 0 | 190 | 0 | 330 | 0 | 0 | 1446 | 299 | 1226 | 460 | 0 |
| <i>T. denticola</i> copie/ml | 0 | 315 | 125 | 105 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>P. gingivalis</i> copie/ml | 967 | 341 | 545 | 145 | 311 | 145 | 621 | 1790 | 2913 | 898 | 1038 | 2394 |
| <i>C. rectus</i> copie/ml | 0 | 0 | 213 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>P. intermedia</i> copie/ml | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>T. forsythia</i> copie/ml | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>H. pylori</i> copie/ml | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>A. actinomycetemcomitans</i> copie/ml | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Sommatoria carica microbica</i> Copie/ml | 967 | 656 | 1073 | 250 | 641 | 145 | 621 | 3236 | 3212 | 2124 | 1498 | 2394 |
| | | | | | | | | | | | | |
| CCRS in 1 µl di estratto/2 | 2169 | 744 | 1333 | 8292 | 4938 | 2854 | 882 | 8485 | 3474 | 11083 | 21919 | 10928 |

Tabella 21 . Quantificazione dei patogeni (copie/ml) nella placca dei 12 soggetti "malati", mediante saggio in Real-Time PCR.

Nella Tabella 22 viene riportata la simultanea presenza dei patogeni *P. gingivalis* (A), *F. nucleatum* (B), *T. denticola* (C), i quali sono risultati essere i più rappresentativi in termini di positività nel gruppo dei 12 soggetti "malati". *P. gingivalis* è compresente in tutti i campioni di placca e plasma. *F. nucleatum* è risultato essere compresente in entrambi i campioni (placca e plasma) in 6 soggetti "malati", in 2 soggetti "malati" solo nel campione plasma e non nel corrispettivo campione placca. In 4 soggetti "malati" è risultato assente sia nel campione di placca che in quello di plasma. *T. denticola* è compresente in entrambi i campioni (placca e plasma) in 2 soggetti "malati", in nessun soggetto malato è stata riscontrata positività solamente per il campione plasma. In 1 soggetto malato questo patogeno è risultato positivo solo nella placca, in 9 soggetti "malati" è risultato assente in entrambi i campioni (placca e plasma).

| | | PLACCA | | | |
|--------------------|------|--------|------|------|---|
| | | + v0 | - v0 | TOT. | A |
| PL AS M A | + v0 | 12 | 0 | 12 | |
| | - v0 | 0 | 0 | 0 | |
| | TOT. | 12 | 0 | 12 | |

| | | PLACCA | | | |
|--------------------|------|--------|------|------|---|
| | | + v0 | - v0 | TOT. | B |
| PL AS M A | + v0 | 6 | 2 | 8 | |
| | - v0 | 0 | 4 | 4 | |
| | TOT. | 6 | 6 | 12 | |

| | | PLACCA | | | |
|--------------------|------|--------|------|------|---|
| | | + v0 | - v0 | TOT. | C |
| PL AS M A | + v0 | 2 | 0 | 2 | |
| | - v0 | 1 | 9 | 10 | |
| | TOT. | 3 | 9 | 12 | |

Tabella 22. Coesistenza di *P.gingivalis* (A), *F. nucleatum* (B), *T.denticola* (C) nei campioni di placca e plasma dei soggetti "malati".

Nella Tabella 23 sono stati riportati i patogeni più rappresentativi nella placca e nel plasma, ovvero i patogeni più frequentemente ritrovati e la cui carica rappresentava la più alta % sul totale. Per ciascuno di essi sono riportati l'intervallo, la mediana e lo scarto interquartile (IQR) dei patogeni risultati positivi espresso come numero di copie di DNA rapportato al

volume di 1 ml di campione iniziale. E' inoltre riportato il rapporto dei campioni positivi verso i singoli patogeni sul totale, indicato come positività. *P. gingivalis* è risultato essere il microrganismo (m.o.) con il più alto numero di copie sia nella placca che nei campioni di plasma, a seguire *F. nucleatum* e *T. denticola*.

| PATOGENO | RANGE (copie/ml) | MEDIANA | IQR | POSITIVITA' |
|--------------------------------------|---------------------|---------|-------------|-------------|
| PLACCA SOGGETTI "MALATI" (12) | | | | |
| <i>P. gingivalis</i> | 145 - 2913 | 759 | 326 - 1414 | 12/12 |
| <i>F. nucleatum</i> | 190 - 1446 | 395 | 299 - 1226 | 6/12 |
| <i>T. denticola</i> | 105 - 315 | 125 | 105 - 315 | 3/12 |
| <i>Sommatoria carica microbica</i> | 145 - 3236 | 1020 | 631 - 2259 | - |
| PLASMA SOGGETTI "MALATI" (12) | | | | |
| <i>P. gingivalis</i> | 1017 - 8500 | 2820 | 1691 - 4120 | 12/12 |
| <i>F. nucleatum</i> | 178 - 1188 | 444 | 334 - 746 | 8/12 |
| <i>Sommatoria carica microbica</i> | 1017 - 8580 | 3197 | 2436 - 4948 | - |
| PLASMA SOGGETTI "SANI" (20) | | | | |
| <i>P. gingivalis</i> | 285 - 918 | 564 | 325 - 738 | 5/20 |
| <i>F. nucleatum</i> | 208 - 1108 | 324 | 241 - 741 | 4/20 |
| <i>Sommatoria carica microbica</i> | 208 - 1108 | 375 | 279 - 828 | - |

Tabella 23. Range, mediana e IQR relativi alle quantità dei patogeni risultati positivi nella placca (soggetti "malati") e nel plasma (soggetti "malati" e "sani").

Nelle Figure 1 e 2 viene mostrata la percentuale dei patogeni nei campioni di placca e plasma dei soggetti "malati". Nei campioni di placca (Figura 1) il m.o. percentualmente più rappresentato è *P. gingivalis*, seguito da *F. nucleatum*, *T. denticola* e *C. rectus*. Nei campioni di plasma (Figura 2) il m.o. percentualmente più rappresentato è *P. gingivalis*, seguito da *F. nucleatum*, *P. intermedia* e *T. forsythia*.

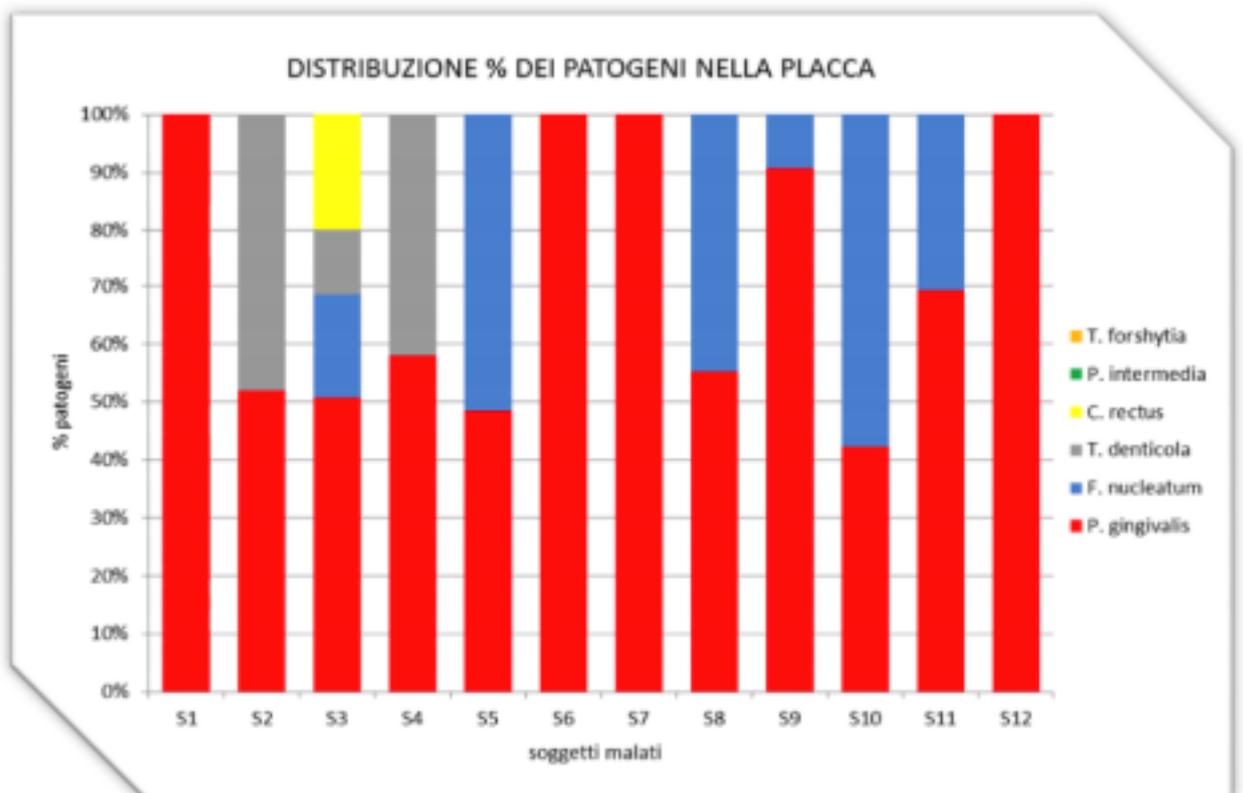


Figura 1 Distribuzione % dei patogeni nella placca ateromasica

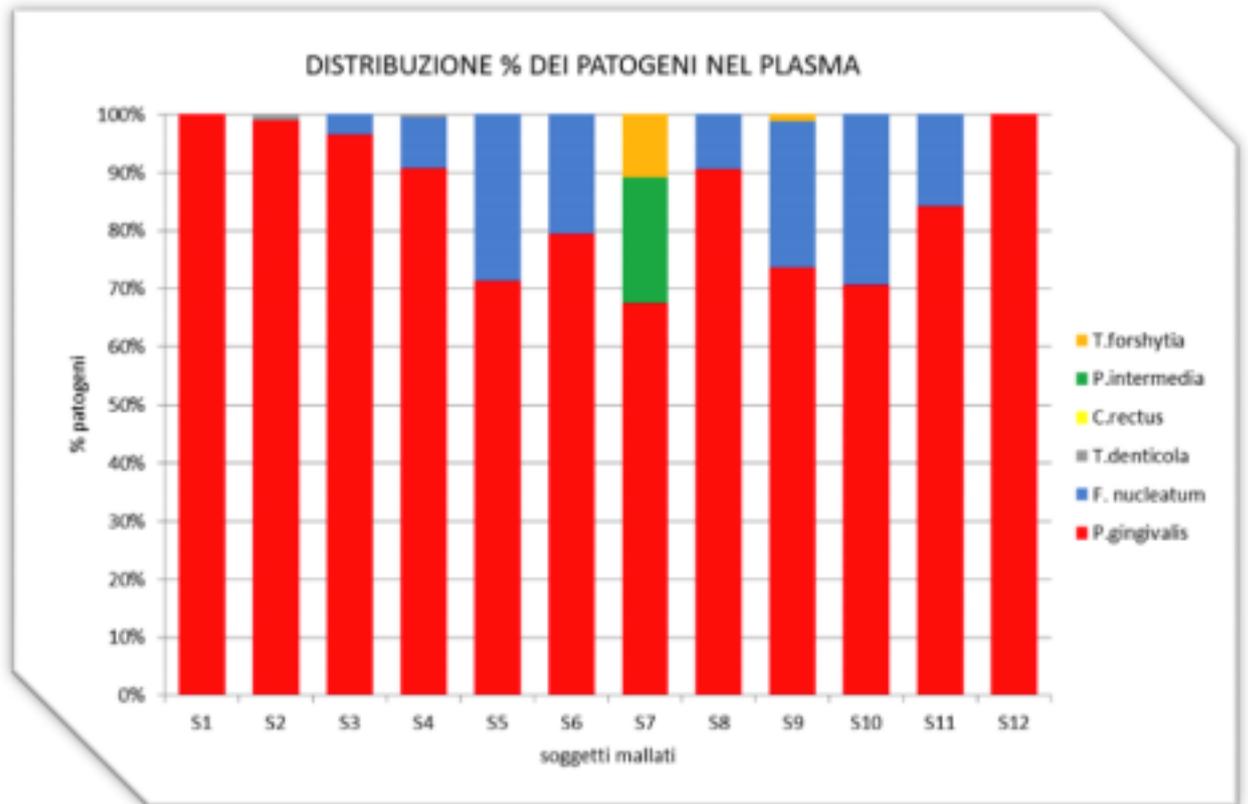


Figura 2 Distribuzione % dei patogeni nel plasma.

Per valutare l'esistenza di un'associazione tra la carica di *P. gingivalis* e la sommatoria delle cariche totali dei patogeni quantificate nei campioni di placca e plasma, è stato effettuato un test di correlazione lineare. Nelle Figure 16 e 17 sono riportate le linee di tendenza ottenute rispettivamente per la placca e per il plasma dei soggetti "malati". Il coefficiente di correlazione lineare è risultato essere pari a 0,81 per la placca (Figura 3) e 0,97 per il plasma (Figura 4). Tali valori sono indicativi di una buona associazione tra il *P. gingivalis* e il totale dei patogeni.

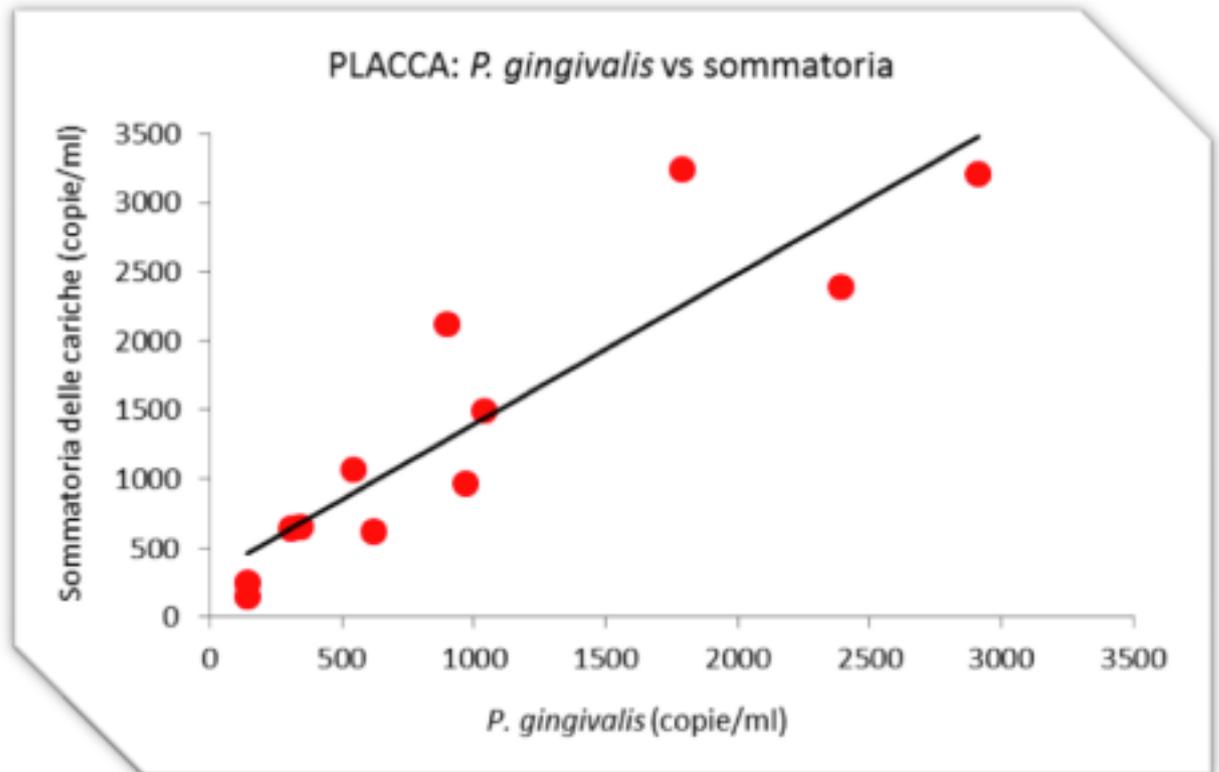


Figura 3. Correlazione lineare tra la carica di *P. gingivalis* e la sommatoria delle cariche totali dei patogeni ritrovati nella placca dei soggetti “malati”.

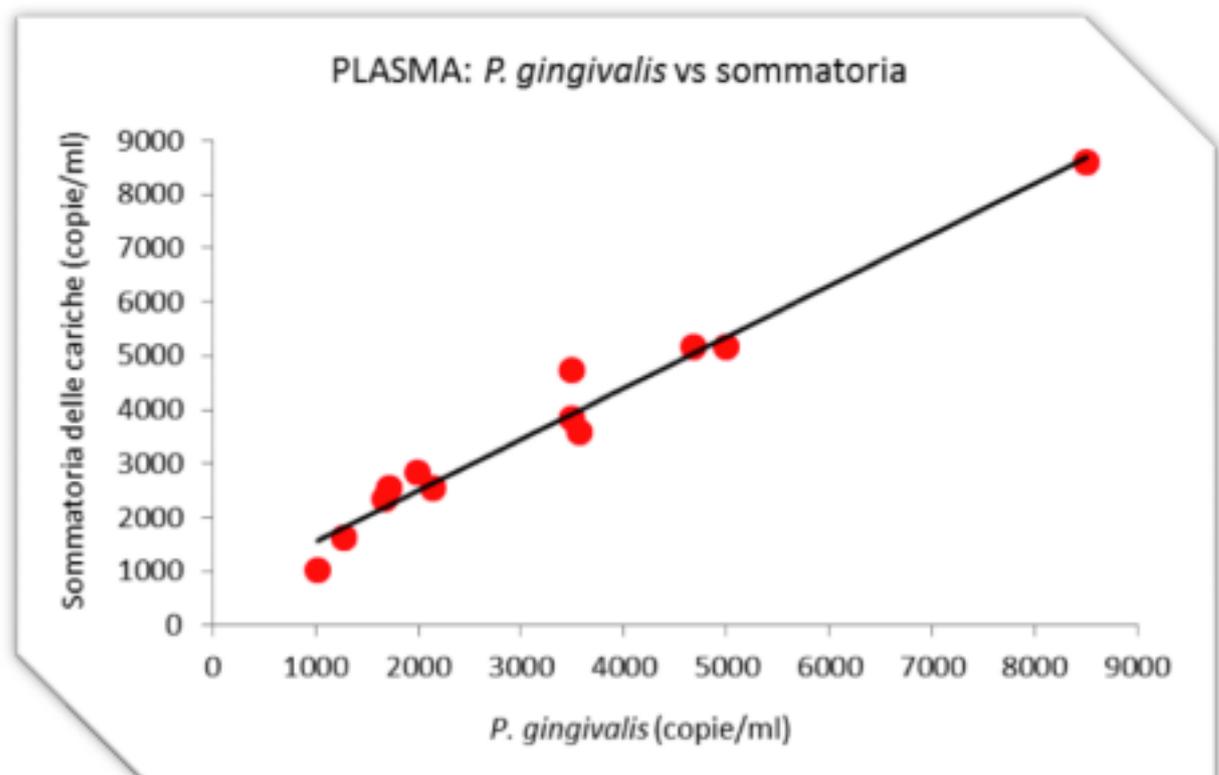


Figura 4 Correlazione lineare tra la carica di *P. gingivalis* e la sommatoria delle cariche totali dei patogeni ritrovati nel plasma dei soggetti “malati”.

Nella Tabella 24 sono riportate le positività dei patogeni ritrovati nel plasma per i soggetti “malati”. Come si può osservare, nel plasma dei soggetti “malati” sono stati ritrovati in ordine di percentuale *P. gingivalis* (100 %), *F. nucleatum* (66.7 %), *T. denticola* e *T. forsythia* (16.7 %) e *P. intermedia* (8.3 %). Nella placca sono stati ritrovati in ordine di percentuale *P. gingivalis* (100 %), *F. nucleatum* (50 %), *T. denticola* (25%) e *C. rectus* (8.3 %). Comparando le percentuali in plasma e placca non sono state evidenziate differenze statisticamente significative. Nella Tabella 25 sono riportati i valori di mediana e di IQR calcolati sulle cariche relative ai patogeni risultati positivi per entrambi le matrici. Sono risultate statisticamente significative le differenze per quanto riguarda *P. gingivalis* e la sommatoria della carica microbica in campioni di plasma e placca.

| PATOGENO | PLASMA SOGGETTI “MALATI” (%) | PLACCA SOGGETTI “MALATI” (%) | p-value* |
|----------------------|---|---|-----------------|
| <i>F. nucleatum</i> | 8/12 (66.7) | 6/12 (50.0) | 0.68 |
| <i>T. denticola</i> | 2/12 (16.7) | 3/12 (25.0) | - |
| <i>P. gingivalis</i> | 12/12 (100.0) | 12/12 (100.0) | - |
| <i>C. rectus</i> | 0/12 (0.0) | 1/12 (8.3) | - |
| <i>P. intermedia</i> | 1/12 (8.3) | 0/12 (0.0) | - |
| <i>T. forsythia</i> | 2/12 (16.7) | 0/12 (0.0) | 0.48 |
| ≥1 Microorganismo | 12/12 (100) | 12/12 (100) | - |

*Fisher exact test

Tabella 24. Positività dei patogeni riscontrati nel plasma e nella placca di soggetti

| PATOGENO | PLASMA SOGGETTI "MALATI", MEDIANA (IQR) | PLACCA SOGGETTI "MALATI", MEDIANA (IQR) | p-value* |
|--|--|--|-----------------|
| <i>F. nucleatum</i> , copie/ml | 444 (334-746,5) | 395 (299-1.226) | 0.95 |
| <i>T. denticola</i> , copie/ml | 47.5 (15-80) | 125 (105-315) | 0.08 |
| <i>P. gingivalis</i> , copie/ml | 2.820 (1691.5-4120.5) | 759.5 (326-1.414) | 0.002 |
| Sommatoria carica microbica copie/ml | 3.197 (2436.5-4948.5) | 1.020 (631-2.259) | 0.002 |

IQR: Scarto Interquartile

*Wilcoxon Mann Whitney test

Tabella 25 Confronto tra le cariche dei patogeni nel plasma e nella placca di soggetti.

Nella Tabella 26 sono riportate le positività dei patogeni ritrovati nel plasma dei soggetti "sani" e "malati". Come si può osservare, nel plasma dei soggetti "sani" sono stati ritrovati in ordine di percentuale *P. gingivalis* (25 %) e *F. nucleatum* (20 %). Nel plasma dei soggetti "malati" sono stati ritrovati in ordine di percentuale *P. gingivalis* (100 %), *F. nucleatum* (66.7 %), *T. denticola* e *T. Forsythia* (16.7 %), e *P. intermedia* (8.3 %). Comparando le percentuali nei due gruppi di plasma sono state evidenziate differenze statisticamente significative per *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e per la presenza di più patogeni (≥ 1 Microorganismo). Nella Tabella 27 sono riportati i valori di mediana e di IQR calcolati sulle cariche relative ai patogeni risultati positivi per i campioni di plasma. Sono risultate statisticamente significative le differenze per quanto riguarda *P. gingivalis* e la sommatoria della carica microbica in campioni di plasma di "sani" e "malati".

| PATOGENO | PLASMA SOGGETTI "SANI" (%) | PLASMA SOGGETTI "MALATI" (%) | p-value* |
|---------------------------------|---------------------------------------|---|-------------------|
| <i>F. nucleatum</i> | 4/20 (20.0) | 8/12 (66.7) | 0.021 |
| <i>T. denticola</i> | 0/20 (0.0) | 2/12 (16.7) | 0.13 |
| <i>P. gingivalis</i> | 5/20 (25.0) | 12/12 (100.0) | <0.0001 |
| <i>C. rectus</i> | 0/20 (0.0) | 0/12 (0.0) | - |
| <i>P. intermedia</i> | 0/20 (0.0) | 1/12 (8.3) | 0.37 |
| <i>T. forsythia</i> | 0/20 (0.0) | 2/12 (16.7) | 0.13 |
| <i>H. pylori</i> | - | - | - |
| <i>A. actinomycetemcomitans</i> | - | - | - |
| ≥1 Microorganismo | 9/20 (45.0) | 12/12 (100.0) | 0.002 |

*Fisher exact test

Tabella 26. . Confronto tra le cariche dei patogeni nel plasma e nella placca di soggetti "malati".

| PATOGENO | PLASMA SOGGETTI "SANI", MEDIANA (IQR) | PLASMA SOGGETTI "MALATI", MEDIANA (IQR) | p-value* |
|--|--|--|-----------------|
| <i>F. nucleatum</i> , copie/ml | 324.5 (241-741.5) | 444 (334-746.5) | 0.50 |
| <i>T. denticola</i> , copie/ml | - | 47.5 (15-80) | - |
| <i>P. gingivalis</i> , copie/ml | 564 (325-738) | 2820 (1691.5- 4120.5) | 0.002 |
| <i>C. rectus</i> , copie/ml | - | - | - |
| <i>P. intermedia</i> , copie/ml | - | 550 (550-550) | - |
| <i>T. forsythia</i> , copie/ml | - | 165.5 (56-275) | - |
| Sommatoria carica microbica copie/ml | 375 (285-738) | 3197 (2436.5-4948.5) | 0.0002 |

IQR: Scarto Interquartile

*Wilcoxon Mann Whitney test

Tabella 27 confronto fra le mediane delle cariche dei patogeni nel plasma dei soggetti "malati"

Quantificazione dei patogeni e microscopia nelle sezioni di placca

Nei campioni di sezioni di placca carotidea, analogamente ai campioni di plasma e alle placche precedenti i virus sono risultati assenti e i batteri presenti in tutti i soggetti "malati" (Tabella 28). Come mostrato nella Tabella 29 3/7 sono risultati essere positivi ad un solo patogeno, 4/7 a due patogeni.

| GRUPPI | PREVALENZA NELLE SEZIONI DI PLACCA (%) | | | |
|--------------|--|------------------|---------------------|--------------------|
| | PRESENZA DI VIRUS | ASSENZA DI VIRUS | PRESENZA DI BATTERI | ASSENZA DI BATTERI |
| "MALATI" (7) | 0 (0%) | 7 (100%) | 7 (100%) | 0 (0%) |

Tabella 28 Prevalenza (%) di virus e batteri nei campioni di sezioni placca

| SEZIONI PLACCA | UN PATOGENO | DUE PATOGENI | 3 O PIU' PATOGENI | NEGATIVI |
|----------------|-------------|--------------|-------------------|----------|
| "MALATI" (7) | 3/7 | 4/7 | - | 0/7 |

Tabella 29. Polimicrobismo nei campioni di sezioni placca.

Per quanto riguarda i batteri, tutti i soggetti "malati" sono risultati essere positivi almeno per una specie ricercata (Tabella 29). Nello specifico le sezioni di placca 11-05 B, 11-04 C, 11-10 C hanno mostrato una positività solamente a *P. gingivalis*; i campioni 11-13 BB, 11-09 A, 11-09 B e 11-04 B ha mostrato positività a *P. gingivalis* e *F. nucleatum*.

| SEZIONI PLACCA SOGGETTI "MALATI" PATOGENO | 11-13 BB | 11-04 C | 11-05 B | 11-09 A | 11-10 C | 11-09 B | 11-04 B |
|---|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| <i>F. nucleatum</i> copie/ml | 0 | 0 | 31 | 21 | 0 | 46 | 30 |
| <i>T. denticola</i> copie/ml | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>P. gingivalis</i> copie/ml | 3354 | 1587 | 1285 | 1392 | 1988 | 1731 | 1808 |
| <i>C. rectus</i> copie/ml | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>P. intermedia</i> copie/ml | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>T. forsythia</i> copie/ml | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>H. pylori</i> copie/ml | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>A. actinomycetemcomitans</i> copie/ml | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Sommatoria carica microbica</i> Copie/ml | 3354 | 1587 | 1316 | 1413 | 1998 | 1777 | 1838 |
| CCRS in 1 µl di estratto/2 | 5342 | 9326 | 11256 | 3874 | 1983 | 3521 | 8958 |

Tabella 29. Quantificazione dei patogeni (copie/ml) nelle sezioni di placca dei 7 soggetti “malati”, mediante saggio in Real-Time PCR.

Nella Tabella 30 sono stati riportati i patogeni più rappresentativi nelle sezioni di placca. Per ciascuno di essi sono riportati l'intervallo, la mediana e IQR dei patogeni risultati positivi espresso come numero di copie di DNA rapportato al volume di 1 ml. E' inoltre riportato il rapporto dei campioni positivi verso i singoli patogeni sul totale, indicato come positività. *P. gingivalis* è risultato ancora una volta essere il microrganismo (m.o.) con una più elevata prevalenza e un più alto numero di copie, a seguire *F. nucleatum*.

| PATOGENO | RANGE | MEDIANA | IQR | POSITIVITA' |
|---|-------------|---------|-------------|-------------|
| SEZIONI PLACCA SOGGETTI "MALATI" (7) | | | | |
| <i>P. gingivalis</i> | 1285 - 3354 | 1731 | 1489 - 1898 | 7/7 |
| <i>F. nucleatum</i> | 21 - 46 | 30 | 28 - 35 | 4/7 |

Tabella 30. Range, mediana e media relativi alle quantità dei patogeni più rappresentativi nelle sezioni di placca dei soggetti “malati”.

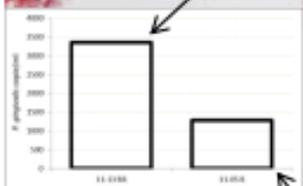
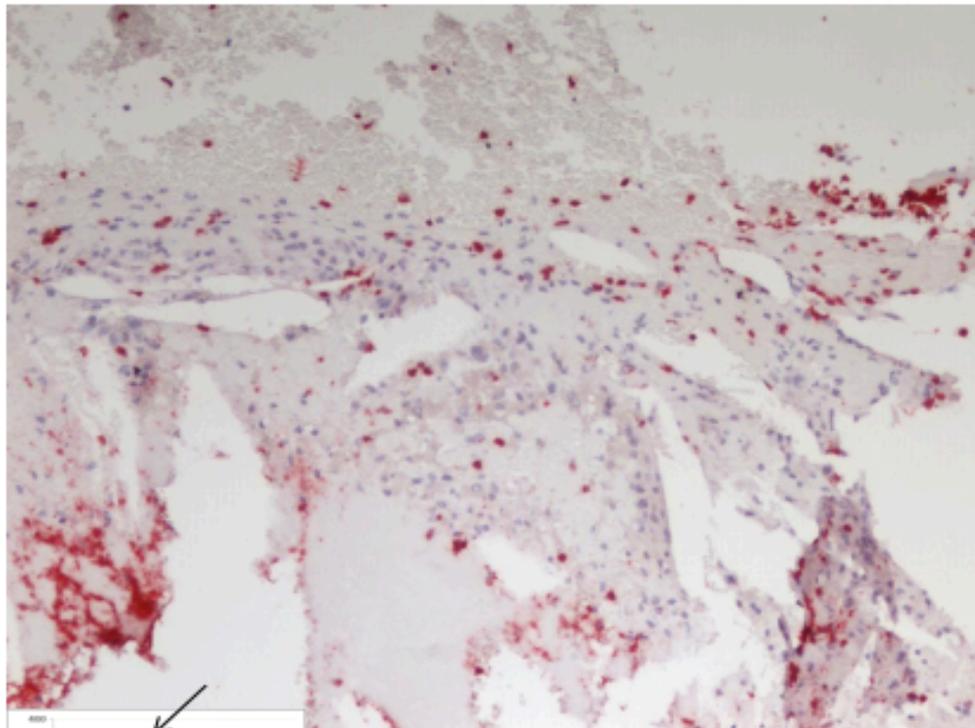
Le analisi di immunistochemica per l'identificazione dei neutrofili nelle sezioni di placca sono state effettuate mediante l'utilizzo di anticorpi specifici per il CD66. A titolo di esempio sono state riportate due fotografie corrispondenti ai campioni in cui sono state trovate rispettivamente la più alta e la più bassa carica di *P. gingivalis* (Figura 5).

La sezione 11-13 BB mostra il core di una placca aterosclerotica con un'elevata presenza di neutrofili, mentre la sezione 11-05 B mostra sempre il core di una placca ma con un numero inferiore di neutrofili.

In entrambi i casi è stata ricercata e quantificata la presenza di *P. gingivalis* all'interno delle placche. Come mostrato dalle frecce nella Figura 5 notiamo come la presenza di un alto numero di neutrofili nella sezione 11-13 BB sembra correlare con un'alta carica del patogeno.

Analogamente nella sezione 11-05 B notiamo una netta diminuzione del numero di neutrofili associato ad un'apparente abbassamento della carica di *Porphyromonas gingivalis*.

11-13 BB



11-05 B

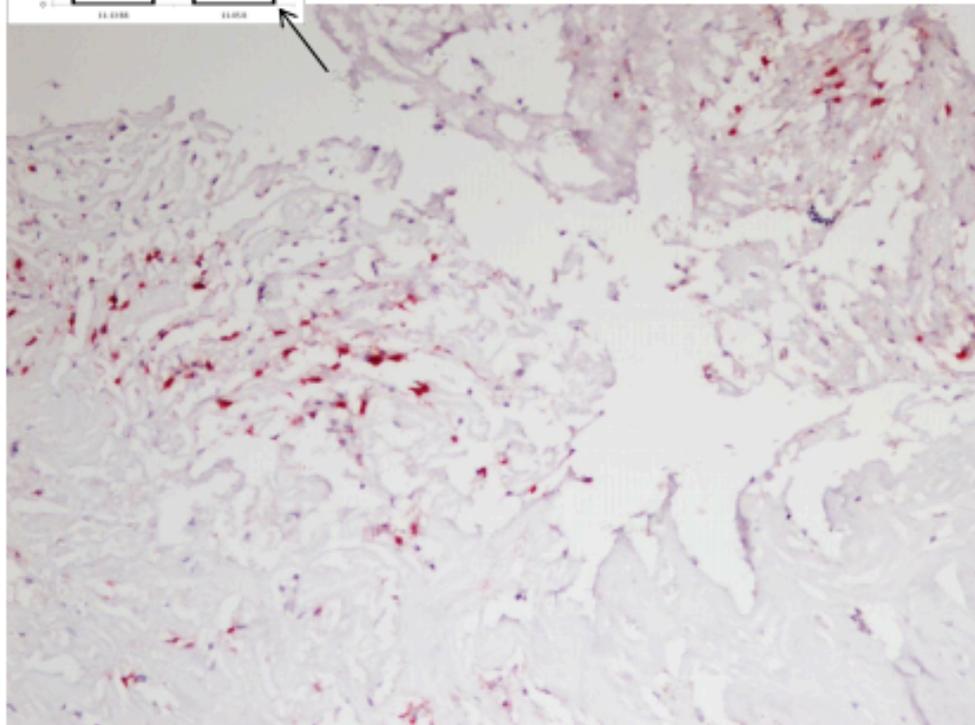


Figura 5. Fotografie al microscopio ottico “in campo chiaro” (ingrandimento 10x) di sezioni di placca carotidea dei soggetti 11-13 BB (in alto) e 11-05 B (in basso). Le cellule colorate in rosso corrispondono ai neutrofilo.

Diabete: HbA1c

L'età media dei pazienti reclutati è di 70,7 anni con una deviazione standard di 7,2, il 40 % era uomo (età: 66,75 media, DS 8,1) ed il 60% donna (età: 73,3 media, DS: 5,0).

I valori di HbA1c analizzati alla baseline erano di 56 mmol/mol, DS: 8.01, ed i controlli a 3 mesi di distanza di 52,2, DS_ 5,7. La differenza fra i due valori non è stata riscontrata come significativa $p: 0,24$ ($p>0,05$), anche se la diminuzione riportata in letteratura è stata riscontrata anche nello studio pilota qui riportato.

Purtroppo l'analisi delle differenti terapie aggiuntive, cambiamento della dieta, delle abitudini e dello stile di vita, raccolto tramite un questionario verbale presentato ai pazienti, dimostra quanto il paziente diabetico, quando intercettato dall'equipe medica sia sottoposto ad un trattamento che potrebbe definirsi di Life Chagement, come definito in letteratura che analizzeremo successivamente. L'80 % dei pazienti dei 10 pazienti analizzati ha riportato un cambiamento anche nello stile alimentare (cambiamento di dieta imposto dal dottore, il diabetologo che ha in cura i pazienti), il 90 % ammette di aver applicato per la prima volta tecniche di spazzolamento personalizzate ed apprese durante le sedute di igiene e levigature, il 40 % ha aumentato la propria attenzione verso il suo aspetto fisico (molte volte i pazienti analizzati avevano difficoltà oggettive alla deambulazione 40%), il 10 % ha cambiato il suo trattamento insulinico, proprio questo paziente, un signore di 80 anni ha visto i valori di HbA1c scendere di 9 mmol/mol circa il 2% di diminuzione (estremamente alta e non considerabile dato il cambiamento di farmaci).

I valori invece parodontali si sono rivelati, come atteso, molto confortanti, infatti si è verificata una riduzione della profondità di sondaggio dalla baseline 2.9 Ds: 0,8 a 2.1 Ds: 0.3 nei tre mesi successivi al primo incontro, riduzione statisticamente significativa $P=0.0001$ ($p<0.05$).

I siti con PD minore di 3mm alla baseline erano di 95.1 Ds 31.1, dopo tre mesi aumentarono a 121.7 Ds 34.5, presentando un aumento statisticamente significativo ($P= 0.001$).

Se i valori clinici parodontali delle profondità di sondaggio sono molto confortanti, valutando anche l'esiguità del campione in analisi, ancor maggiormente significative risultano le diminuzioni di indice di placca e sanguinamento come riportate nella tabella 31, con una significatività statistica molto alta (P: <0.0001) in entrambi i valori.

| Variabile | Gruppo studio Pilota |
|--------------------------------------|---|
| Uomini (n) | 4 |
| Donne (n) | 6 |
| Età (anni) | 70,7 Ds 7,2 |
| Profondità di sondaggio media | BASELINE: 2.9 Ds 0.8 3 MESI: 2.1 Ds 0.3 P value: 0.0001 |
| Siti con PD < di 3mm | BASELINE: 95.1 Ds 31.1 3 MESI: 121.7 Ds 34.5 P value: 0.001 |
| PI (%) | BASELINE: 59.7 Ds 18.8 3 MESI: 37.5 Ds 19.0 P value: < 0.0001 |
| BOP (%) | BASELINE: 49.1 Ds 18.5 3 MESI: 14.2 Ds 12.5 P value: < 0.0001 |

Tabella 31: Variazioni dei valori degli indici parodontali della Baseline (T0) e dopo tre mesi da T0 (T4)

| Variabile | Gruppo studio pilota |
|----------------------------|--|
| HbA1c Baseline | 56 mmol/mol, DS: 8.01. |
| HbA1c dopo tre mesi | 52,2, DS_ 5,7 |
| P Value | p: 0,24 non statisticamente significativa |

Tabella 32: confronto dei valori HbA1c espressi in mmol/mol nel plasma dei pazienti trattati

Analizzando i valori di HbA1c dei pazienti analizzati nella maggior parte dei casi il diabete era ben compensato, tranne in due pazienti di 78 e 80 anni rispettivamente una femmina ed un maschio con valori lievemente scompensati, ma comunque nei range di selezione: 70 mmol/mol (8.6%) e 66 mmol/mol (8.2%).

Stato vegetativo (VS/UWS)

I pazienti analizzati erano di età compresa fra 21 anni ed 80 (media: 60,2, Ds: 17,7; gruppo Test: media: 53,5, Ds: 21,2; gruppo Controllo: media: 66,2, Ds:10,7). Tutti i pazienti sono stati classificati nelle cartelle SOSIA (Scheda di osservazione intermedia assistenza) M1 per la mobilità, C2 per Cognitività e S1 per Comorbilità all'analisi medica per la cartella SOSIA. Tutti i pazienti hanno necessità di una gestione dell'incontinenza e di alimentazione artificiale affidata alla PEG. 2 pazienti: uno in ogni gruppo è affetto da diabete mellito di tipo II e quindi trattato anche nel controllo insulinico e della glicemia. Un solo paziente del gruppo "Test" necessita di insulina, e 2 pazienti per gruppo sono trattati con O2 costante (4 pazienti in totale) e uno per gruppo con O2 per 6 ore al giorno (2 pazienti in totale). Nessun paziente né all'inizio del trattamento né oggi ha avuto bisogno di dialisi peritoneale, ano artificiale, ventilatore o dialisi extracorporea.

4 pazienti del gruppo "test" e 6 del gruppo controllo avevano un catetere extracorporeo per la raccolta delle urine.

I pazienti sono stati osservati per 3 mesi fra marzo e giugno 2015 e sono state raccolte a parte anche tutti medicinali che ogni paziente riceve

giornalmente o a frequenza variabile, per ottenere un quadro generico della complessità di trattamento che questi pazienti necessitano anche soltanto dal punto di vista orale.

Due pazienti del gruppo "Controllo" ricevevano terapia endovenosa (Rocefin 2g 1fl ev; tavanic 1fl ev, amikacina 500mg fl ev), nel gruppo "Test" 4 pazienti erano sottoposti a terapia endovenosa (Urbason 20mg 1 fl, Rocefin 2g, Sg5% 500 cc, SF 500 cc; Rocefin 2g, Amikacina 500mg 1 fl, SG 5% 500cc; reidratante III 500cc, fisiologica 250cc+ Urbason 40mg, lasix 20mg 1fl, Merrem 1g, Urbason 20mg, perfalgan 1fl, Rocefin 2g; Perfalgan 1 fl, plasil 1 fl, nexium 1 fl, lasix ½ fl, SF 500cc, Sg5% 500 cc, levofloxacina 500 mg 1fl). Tutti i pazienti del gruppo "Test" e 6 del gruppo "Controllo" erano sottoposti a terapia intramuscolare o sottocutanea (gruppo "Test": Fondaparinux 7,5mg fl SC, Lantus 20U SC; 4 pazienti con Clexane 4000 1 fl SC; 1 con Clexane 2000 1fl SC; 3 pazienti con Buscopan 1 fl *nello specifico era necessario somministrare Buscopan se presente scialorrea e non somministrare Clexane quando presenti le mestruazioni nelle pazienti donne; gruppo "Controllo": 1 paziente con Valium 1 fl IM se presenti clonie; 1 paziente con buscopan 1 fl SC; 3 pazienti con Clexane 4000 SC; infine due pazienti HR 7 U sc se DTX+ 300 oppure HR 5 U sc se DTX + 250).¹

Nella tabella 33 sottostante sono riportati tutti i farmaci somministrati al paziente in VS/UWS durante 3 mesi di osservazione, oltre chiaramente a quelli già riportati poco sopra, quindi eccetto i farmaci e le terapie EV, IM e SC.

¹ Rocefin: Ceftriaxone, antibiotico beta lattamico; Tavanic: Levofloxacina; antimicrobico Fluorchinolone di terza generazione; Amikacina: antibiotico aminoglicoside; Urbason: metilprednisolone, glucocorticoide, SG: soluzione di glucosio; SF: Soluzione Fisiologica; Lasix: furosemide, diuretico; Merrem: meropenem triidrato, Antimicrobico beta-lattamico; Perfalgan: paracetamolo, analgesico, antipiretico; Plasil: Metoclorpramide,monocloridrato monoidrato protettore gastrico; Nexium; esomeprazolo inibitore della pompa protonica, Fondaparinux; anticoagulante inibitore fattore Xa; Lantus; insulina controllo diabete; Clexane: Enoxaparina sodium, profilassi trombotici; Buscopan: N-butilbromuro di joscina (Butilscolamina), Spasmolitico.

Test Cognitivi

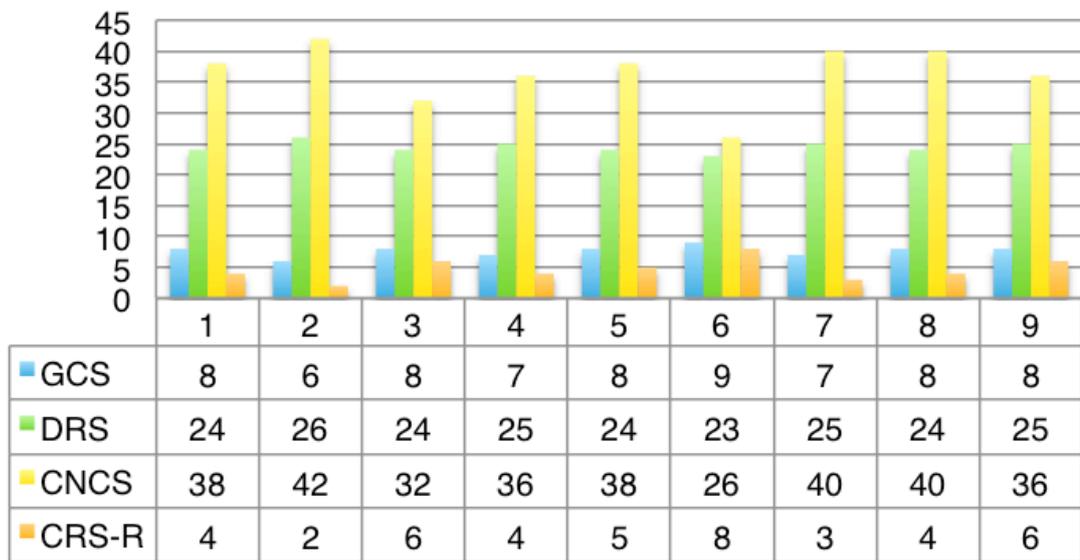


Tabella 34: Valori dei differenti Test Cognitivi eseguiti sui pazienti gruppo “controllo”
GCS=GLASGOW COMA SCALE; DRS=DISABILITY RATING SCALE;CNCS=COMA/NEAR
COMA SCALE;CRS-R=COMA RECOVERY SCALE-REVISED

Test Cognitivi Pazienti Trattati

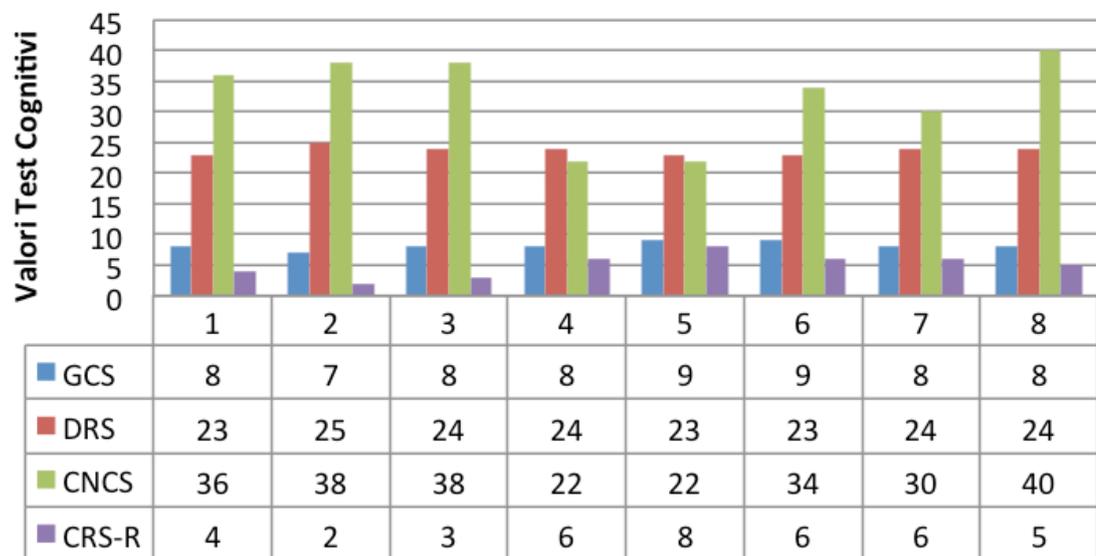


Tabella 35: Valori dei differenti Test Cognitivi eseguiti sui Pazienti gruppo “test”

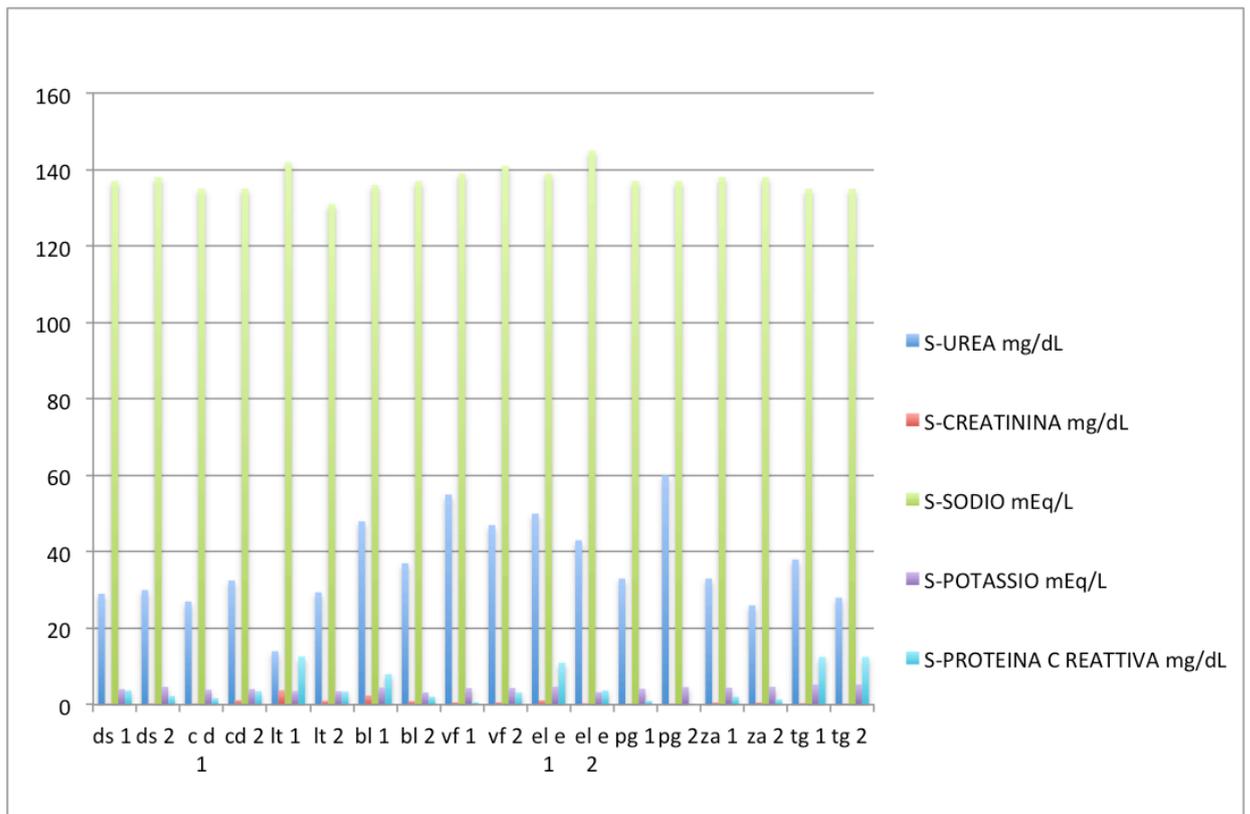


Figura 6: Differenza fra i valori esami sanguinei eseguiti su Pazienti gruppo “controllo”

I test cognitivi eseguiti sui pazienti sono riportati nelle tabelle 34 e 35, e si sono ottenuti valori di Modified Glasgow coma scale (GCS) compresi fra un minimo di 6 (1 paziente) ad un massimo di 9 (3 pazienti), la maggior parte dei pazienti avevano un GCS di 8 (10 pazienti).

In due pazienti uno nel gruppo controllo ed uno del gruppo testi si è arrivati ad un valore di Coma Recovery Scale – Revised CRS-R di 8.

I valori di Sodio, potassio, creatinina nel gruppo controllo sono rimasti stabili o comunque non hanno subito variazioni statisticamente significative ($p > 0,05$), i valori di s-urea nel sangue sono aumentati nel 33% dei pazienti e nei restanti è diminuito ($p > 0,05$). Sempre nel 33% dei pazienti i valori di S-urea sono stati maggiori di 40mg/dL ed in un caso pari a 60 mg/dL (Figura 6).

Nel gruppo test invece (Figura 7) sono stati trovati valori di Sodio, Potassio, Creatinina stabili fra le due analisi ($p > 0,05$), ma i valori di S-urea erano maggiormente controllati sempre minori di 40mg/dL.

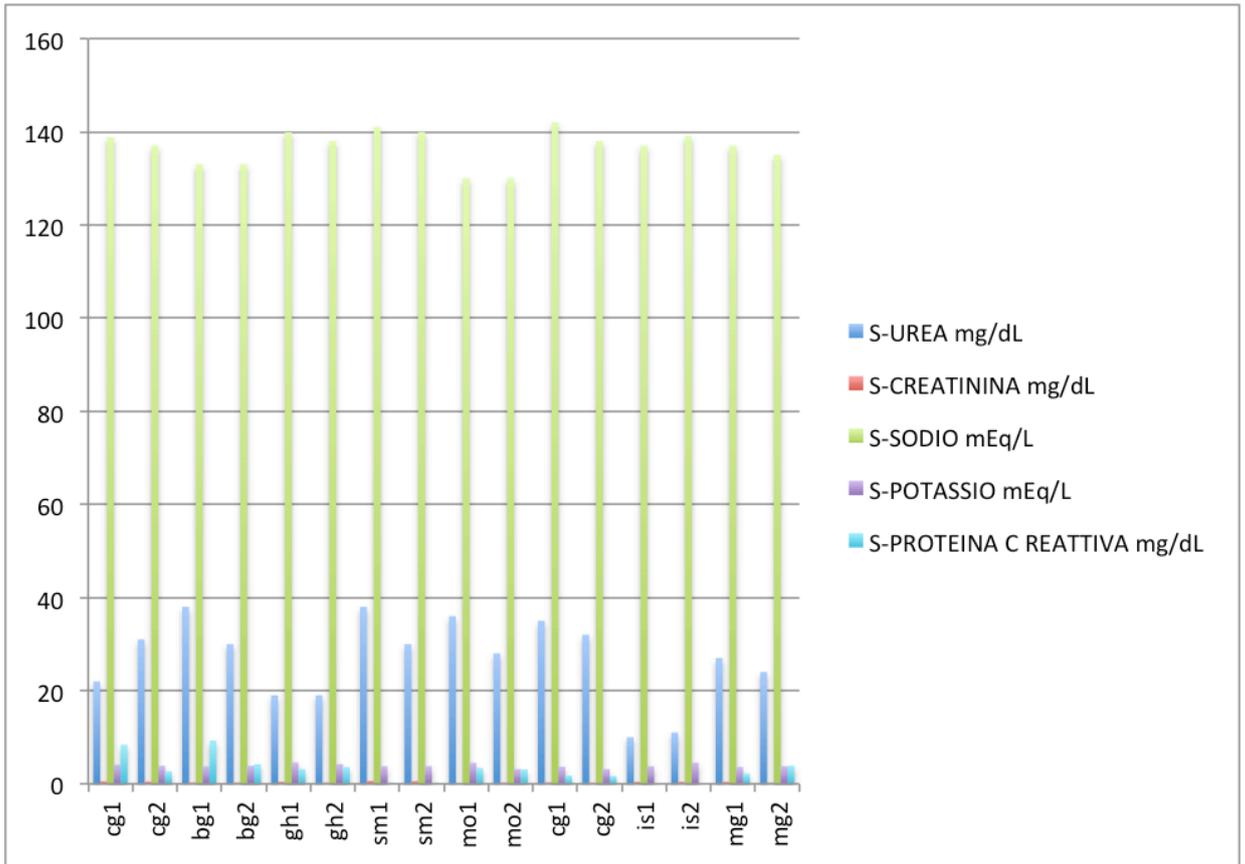


Figura 7: Differenza fra i valori esami sanguinei eseguiti su Pazienti gruppo "test"

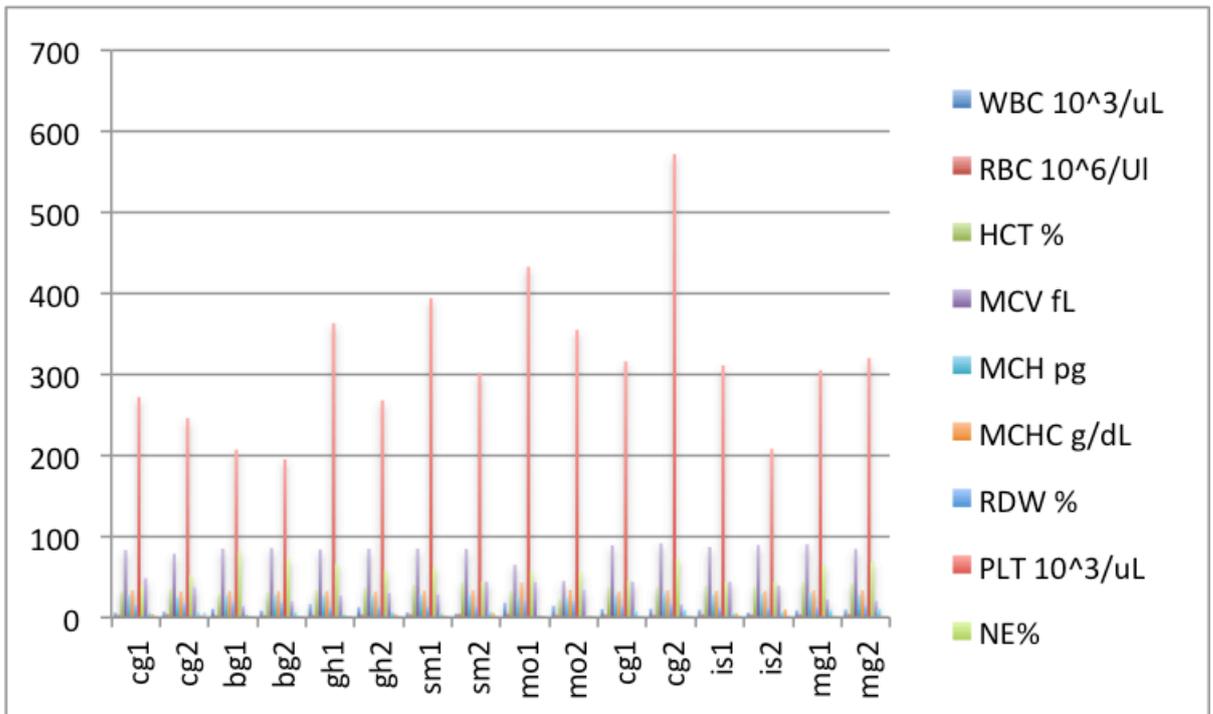


Figura 8: Differenza fra i valori esami sanguinei eseguiti su Pazienti gruppo "test"

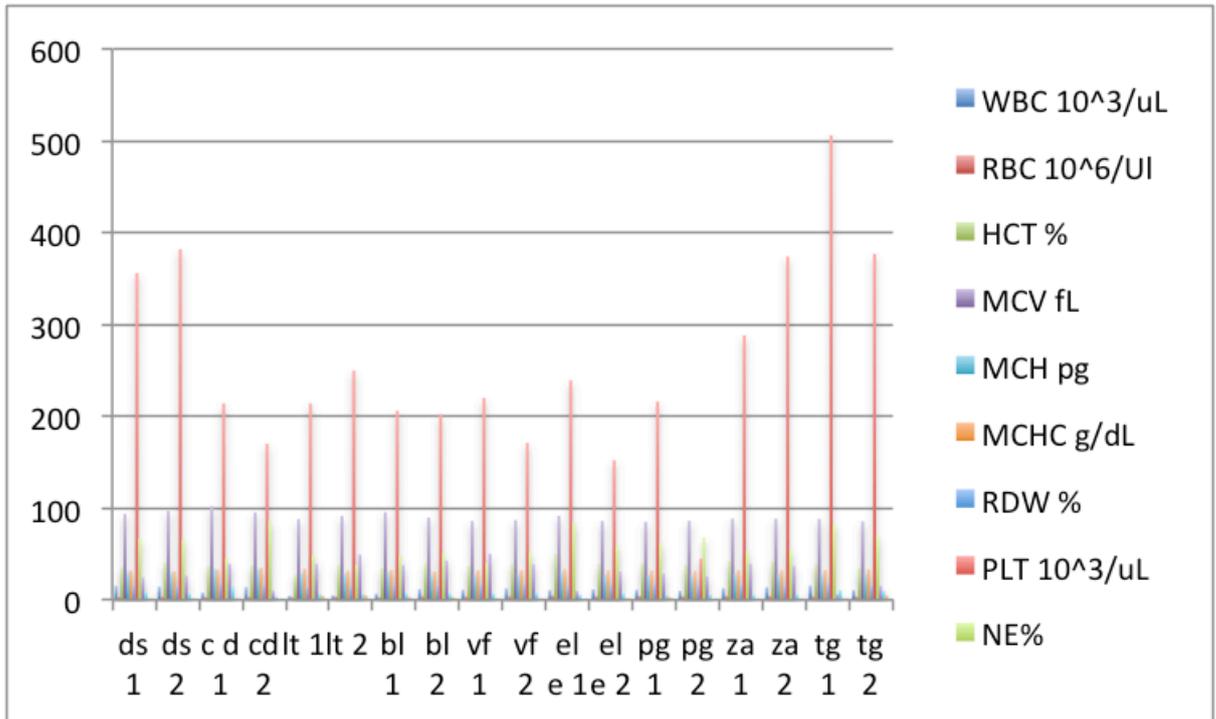


Figura 9: Differenza fra i valori esami sanguinei eseguiti su Pazienti gruppo "controllo "

Gli esami ematochimici presentati nelle figure 8 e 9 riportano variazioni non statisticamente significative presenti fra i gruppi ed i due prelievi ($p > 0,05$).

La variazione dei valori di proteina C reattiva non è risultata statisticamente significativa in nessuno dei due gruppi (gruppo test: $p = 0,42$; gruppo controllo: $p = 0,28$) presentando quindi una diminuzione maggiore nel gruppo controllo rispetto a quello test.

Le modifiche dell'Eiler's OAG Modified sono risultate statisticamente significative per il gruppo test e non statisticamente significative per il gruppo controllo, nel quale abbiamo invece riscontrato un peggioramento non statisticamente significativo.

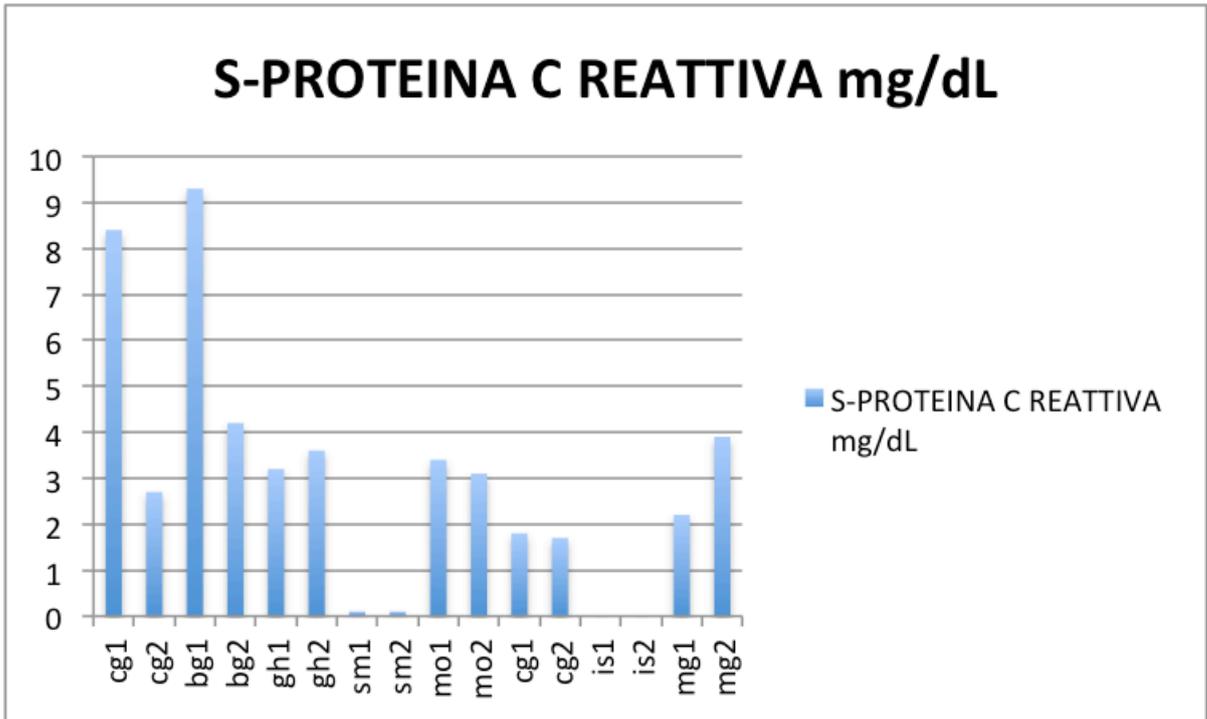


Figura 10: Differenza fra i valori Proteina C reattiva eseguiti su Pazienti gruppo "test "

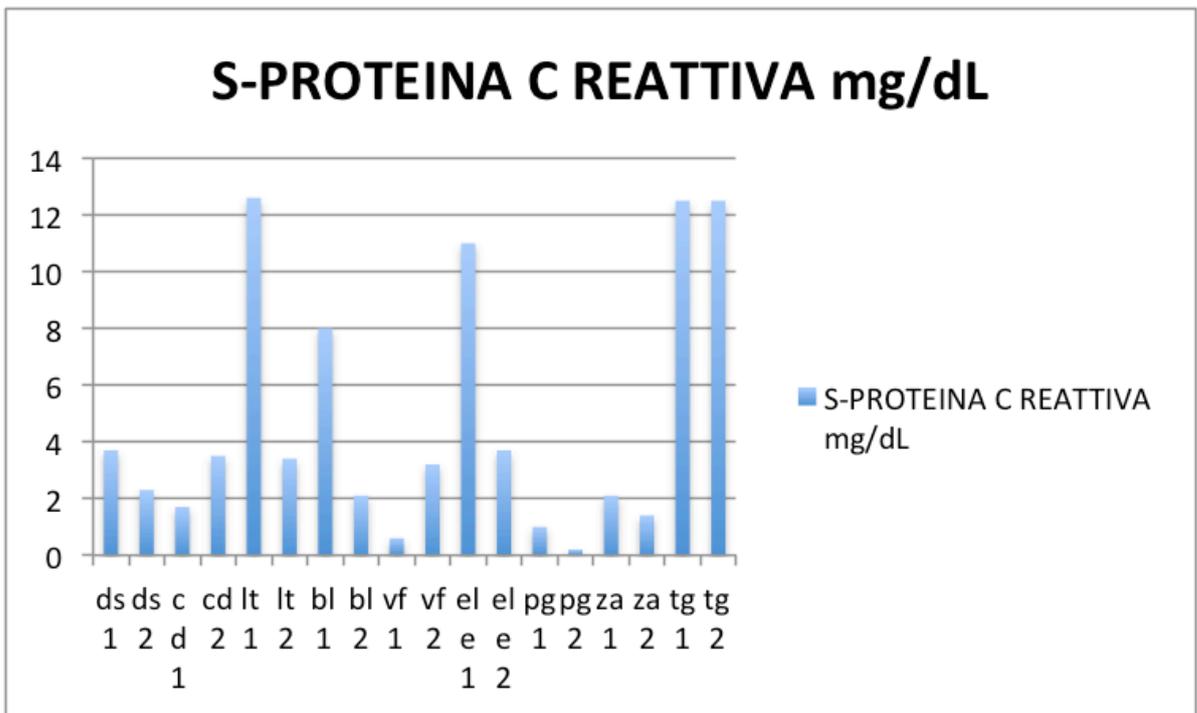


Figura 11: Differenza fra i valori di Proteina C reattiva eseguiti su Pazienti gruppo "controllo "

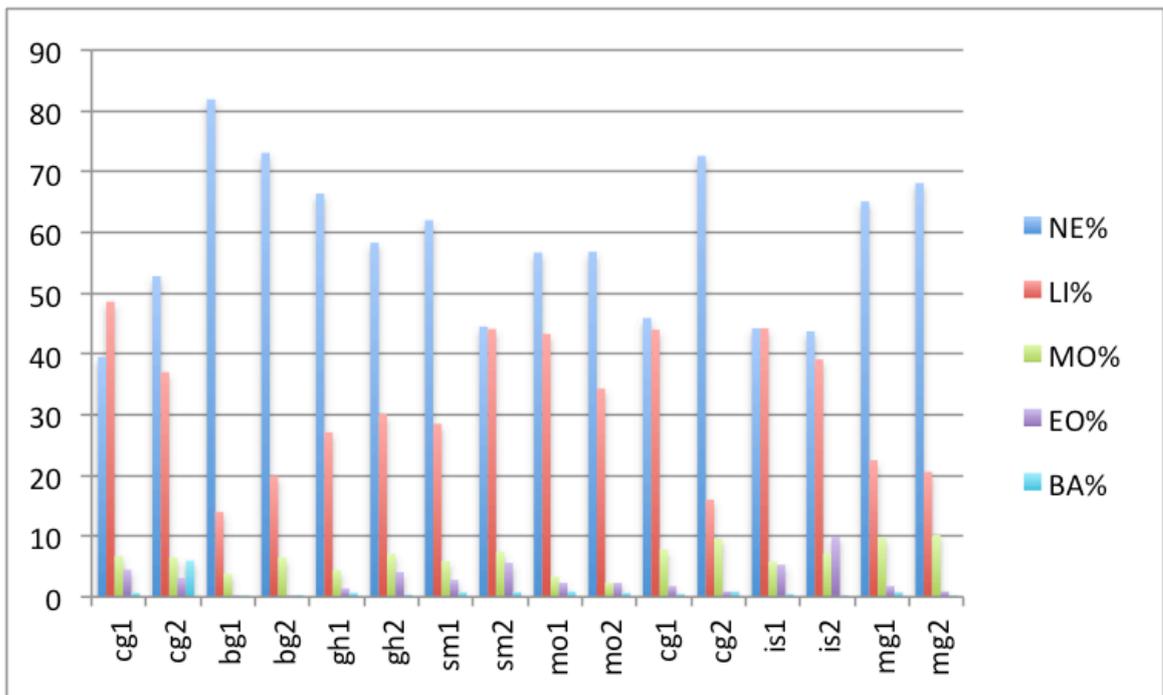


Figura 12: Differenza fra i valori neutrofili, linfociti, monociti, eosinofili e basofili eseguiti su Pazienti gruppo "test "

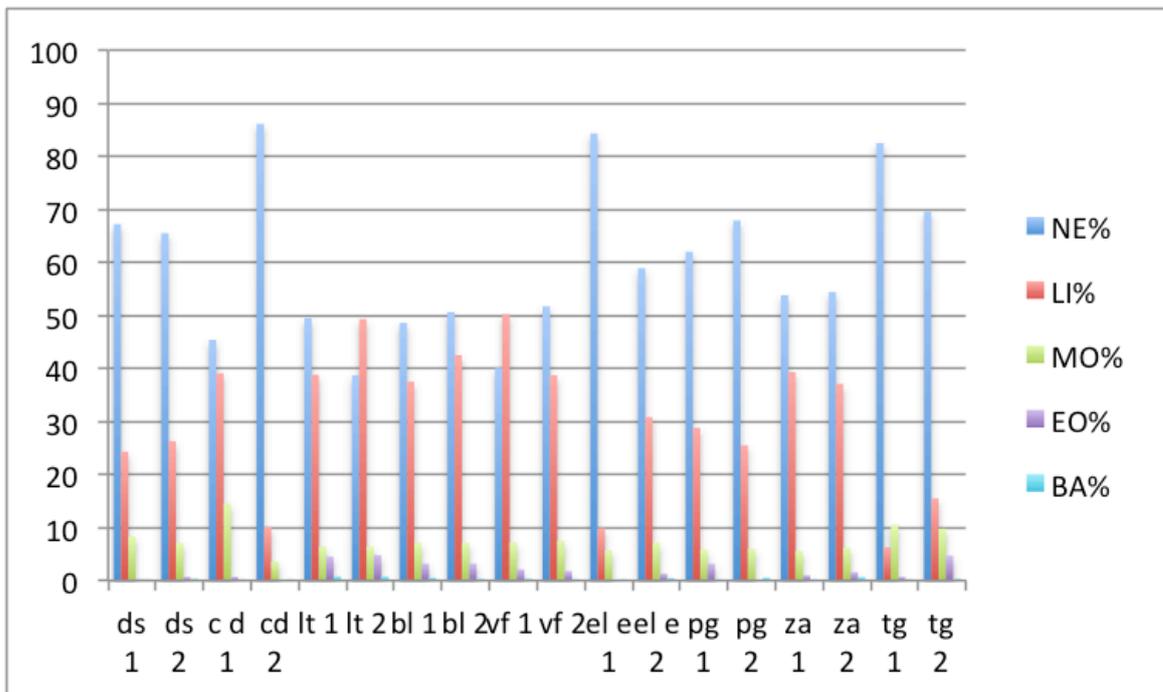


Figura 13: Differenza fra i valori neutrofili, linfociti, monociti, eosinofili e basofili eseguiti su Pazienti gruppo "controllo "

CAPITOLO 4

DISCUSSIONE

4.1. Stato Vegetativo (VS/UWS)

Come verificato dal controllo delle cartelle cliniche, farmacologiche e patologiche dei pazienti in stato vegetativo VS/UWS abbiamo potuto constatare la safety dell'igiene orale domiciliare e professionale anche in pazienti con patologie intracraniche, complicanze, quadri disfagici, senza riflesso di deglutizione, nei quali non abbiamo avuto nessun tipo di complicanze né durante le manovre professionali né in seguito a queste. Non sono state riscontrate variazioni statisticamente significative nei valori ematochimici analizzati. Chiaramente la possibilità di eseguire manovre d'igiene orali che possano risolversi in una "perfetta" salute orale è risultato in quasi tutti i casi impossibile da mantenere nel tempo, per differenti ragioni sia per lesioni autoinflitte, che peggioravano il quadro clinico e l'OAG, sia per impossibilità da parte dei care giver di eseguire igiene orale professionale o domiciliare per l'insorgere di problematiche quali ipersalivazione incontrollata (causa di reflusso e vomito non prevedibile), bruxismo (con impossibilità di apertura del cavo orale se non grazie a iniezioni di botulino) ed altre complicanze.

Chiaramente la presenza di bias, riscontrati da molti autori (Shadish et al. 2002; Polit and Beck 2008; Melnik and Fineout-Overholt 2010) rendono la maggior parte degli studi cosiddetti nosocomiali di difficile interpretazione. In questa tesi, il cosiddetto attrition bias soprattutto per i pazienti diabetici e quelli in stato è stato abbastanza alto. Nel gruppo controllo si sono verificati il 30% dei decessi sui pazienti iniziali nei pazienti invece del gruppo testa i decessi sono stati inferiori al 10%. Questi dati certamente confortanti non sono però scientificamente validi data l'esiguità del numero di pazienti e le condizioni differenti che i pazienti presentavano all'ingresso nel reparto.

Gli autori, infatti ritengono che probabilmente I pazienti non trattati riversavano in condizioni di salute generale peggiori rispetto ai pazienti trattati, ricordiamo che criterio prima inclusione nello studio era proprio la firma dei consensi informato da parte del tutore o dei familiari. Quest'aspetto è stato analizzato anche da altri autori in pazienti intubati, o comunque in cura intensiva (Prendergast 2012).

Analizzando ora la *sicurezza (safety)* dell'igiene orale nel paziente in Stato Vegetativo, considerato uno stato critico è necessario performare un protocollo personalizzato per ogni paziente, analizzando a priori la risposta involontaria del paziente, la presenza di spasmi, il tempo di collaborazione del paziente, la presenza di traumi o lesioni auto inflitte E le condizioni generali di salute. La difficoltà maggiore nell'eseguire manovre di igiene orale professionale nel paziente in VS/UWS è l'assenza del riflesso deglutizione; e la necessità di eseguire la maggior parte delle manovre di igiene professionale e lo spazzolamento dei denti a secco o meglio con lo spazzolino imbevuto di clorexidina. La safety del trattamento è stata analizzata sia dalla raccolta di eventi avversi, ma anche dallo studio delle cartelle cliniche dei pazienti trattati e non, per monitorare i valori ematochimici dei pazienti. Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative, come in altri studi eseguiti prevalentemente su pazienti ICU internati in Svezia dalla Dott.sa Prendergast (Prendergast 2012). Non sono però presenti in letteratura studi su numeri considerevoli di pazienti in stato vegetativo dove sia stata osservata la safety dello stesso trattamento.

Oltre alla sicurezza del trattamento di igiene dentale sul paziente in stato vegetativo sarebbe interessante nei prossimi studi investigare anche se la stimolazione multisensoriale derivante dalla igiene orale eseguita sul paziente (stimolazione gusto, olfatto, tatto, vista e udito) possa essere di qualche utilità sul paziente (Tolle and Reimer 2003). Come già presentato nell'introduzione Fuji nel 2014 ottenne una attivazione cerebrale valutata utilizzando una spettroscopia funzionale definita più frequentemente fNIRS (Functional near infrared spectroscopy) (Fuji 2014). Riguardo all'efficacia del trattamento di igiene dentale nei pazienti in stato vegetativo non è stato

possibile trovare la letteratura dati con cui comparare i promettenti risultati ottenuti in questo studio. Credo non sia per certo competenza di un odontoiatra e ben che meno di un igienista dentale valutare la necessità, la rilevanza sociale anche economica del tenere in vita, o meglio non permetterne un'eutanasia, certamente, in Italia dove, anche se con una prevalenza non altissima, sono presenti pazienti in stato vegetativo per molti anni riteniamo che non occuparsi anche dell'igiene orale del paziente sia eticamente e praticamente scorretto. Autori come Wise, Klompas, Laurence e Needleman riportano come fondamentale il controllo dell'igiene orale nei protocolli di mantenimento del paziente intubato, fragile o in condizioni critiche per diminuire il frequente Ventilator-associated Pneumonia VAP. In questo studio sono stati raccolti gli eventi classificabili come patologie polmonari o infettive (polmonite ab ingestis) e la diminuzione verificatasi risulta promettente anche se dato il numero esiguo dei pazienti si necessitano altre conferme dalla letteratura. Purtroppo non è stato possibile trovare articoli in letteratura che analizzassero la correlazione fra salute orale e malattie sistemiche in pazienti con VS/UWS, ma grazie alla forte presenza di studi su pazienti in terapia intensiva si ritiene che grazie ad ulteriori studi su un numero maggiore di pazienti si riesca ad ottenere una evidenza scientifica dei benefici non solo derivanti dalla soddisfazione dei parenti, ma anche da un miglior controllo delle condizioni generali del paziente.

In un caso trattato durante i tre anni di frequenza in reparto Stati Vegetativi si sono verificati forti miglioramenti grazie alle continue attenzioni del *care giver*, in questo caso il marito della signora, che da uno stato catatonico (GCS: 4) è riuscita a ristabilire una corretta deglutizione ed ad oggi viene nutrita (anche se non esclusivamente) per via orale. Certo il miglioramento della paziente non può essere attribuito, né esclusivamente, né in parte alla ristabilita igiene dentale, ma sarebbe interessante studiare se il continuo stimolo neuronale, a cui l'igiene orale domiciliare quotidiana contribuisce (Fuji 2014) potrebbe risultare interessante replicare questo studio su più larga scala con l'utilizzo di un controllo tramite fNIRS.

Vorrei permettermi all'interno della conclusione di esprimere un giudizio totalmente personale sull'operato dell'igienista dentale all'interno di reparti come quello seguito all'interno del Pio albergo Trivulzio, dedicato al paziente in stato vegetativo, e più in generale sull'operato di gran parte del personale medico, o del personale sanitario. Trovo, infatti un ruolo di aiuto non soltanto nel mantenimento, come nel caso dell'igienista dentale della salute orale, ma anche nell'appoggio psicologico alle famiglie, alle persone care che chiaramente vivono un percorso molto complicato. Tralasciando temi più filosofici concludendo qualsiasi paziente, in qualsiasi condizione fisica, anche nelle condizioni più disperate E in grado di sopportare una terapia di supporto parodontale senza manifestare eventi avversi. Anche se promettenti i dati sulla salute generale del paziente stato vegetativo non possono essere considerati come statisticamente significativi data la difficoltà nel trovare, ma soprattutto nel poter assistere numeri di pazienti ingenti. Il progetto sopra riportato è infatti visto lo sforzo quantificato in 400 ore all'anno per un totale di 1200 ore nei tre anni della durata del progetto per il trattamento di 11 pazienti. Analizzando più a fondo questo dato si ottiene una media di 36,4 ore a paziente in un anno quindi 42 minuti settimanali paziente. Quanto riguardati quindi la fattibilità di un progetto di cura dell'igiene orale all'interno del Pio albergo Trivulzio si è rivelata possibile anche con costi per nulla ingenti. Si ritiene inoltre che il progetto sia scalabile su base Regionale, Nazionale qualora possibile anche internazionale.

4.2. Diabete e HBA1C

Il diabete è uno dei temi maggiormente discussi nella letteratura sia scientifica che divulgativa, e si pone come una delle problematiche legate al progresso con maggior peso anche economico sulla popolazione. Dai dati, pur poco numerosi che abbiamo potuto raccogliere colpisce il fatto che oltre i 10 pazienti dello studio pilota sul diabete anche 2 pazienti in VS/UWS sono risultati diabetici e all'interno delle case di cura italiane come presentato nell'introduzione arrivano a numeri sempre in aumento. È certo che, come presentato nell'introduzione grazie ai dati ARNO-DIABETE, i costi per trattare pazienti diabetici aumentano anche per il trattamento delle infezioni nosocomiali alle quali sono sottoposti, quindi risulta importante qualsiasi presidio medico che possa, facilmente e con costi relativamente bassi o comunque minori, diminuire la spesa pubblica sanitaria, già ingente.

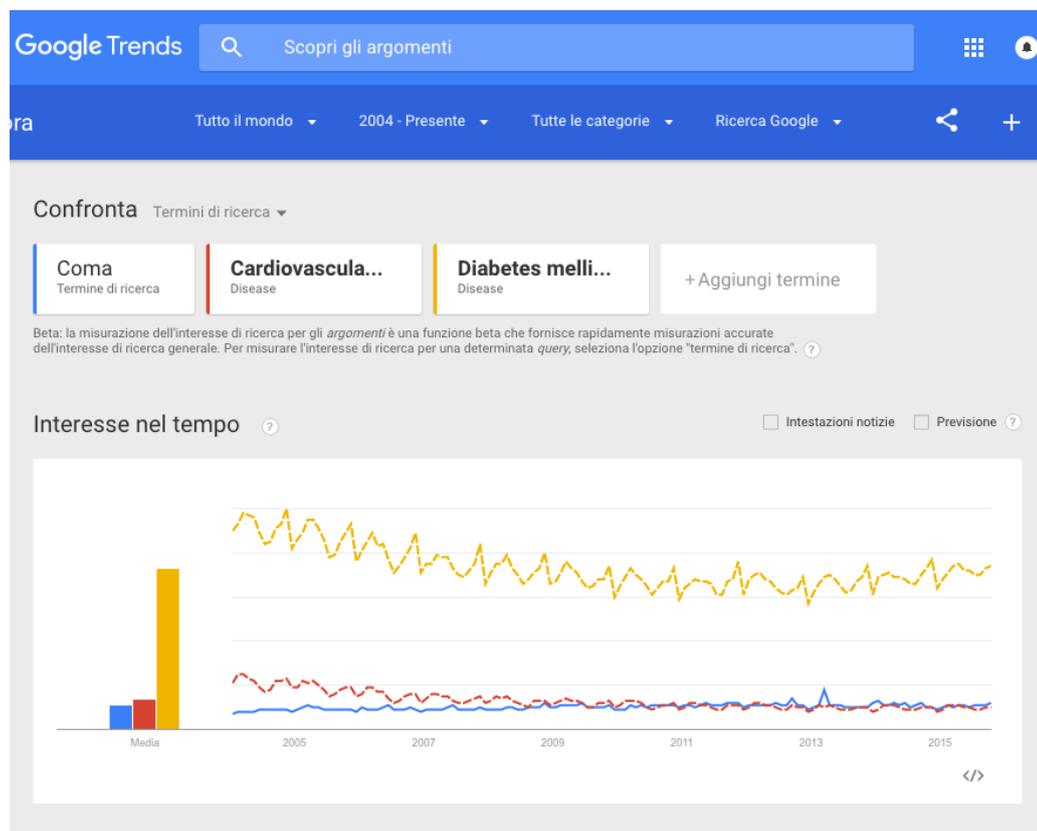


Figura 14: schermata di Google trends, nella quale si evince la maggior “popolarità” del diabete II rispetto al Coma e alle malattie Cardiovascolari.

Alcuni autori sostengono che i tessuti parodontali infiammati sono maggiormente vascolarizzati e questo potrebbe risultare in una fonte endocrina di mediatori pro-infiammatori, che, dopo essere entrati nella circolazione sistemica, potrebbero alterare il metabolismo dei lipidi e del glucosio ed indurre una insulino resistenza (Grossi and Genco 1998; Lalla and Papapanou 2011). In letteratura anche le più recenti pubblicazioni a riguardo della diminuzione dei valori di HbA1c nel plasma dei pazienti trattati con scaling e root planing descrivono due tipologie di studi, che con gruppi di pazienti molto più rappresentativi del nostro hanno ottenuto risultati contrastanti. Nell' studio diabete e HbA1c abbiamo rilevato una diminuzione dei valori non statisticamente significativo per il 90% dei pazienti trattati. Anche se questo risultato potrebbe sembrare confortante ad un' attenta analisi compaiono grandi complessità per disegnare uno studio sul diabete e l'igiene orale. Se da una parte si verifica su molti pazienti trattati una diminuzione dei valori di HbA1c, altri studi non hanno valutato i vari cofattori quali la dieta, le abitudini, sia viziate che motorie o gli stili di vita che il paziente adotta nel momento in cui si sottopone ad un processo oggi necessario nel campo medico ed chiaramente nel campo della salute orale che è quello della "istruzione". Per istruire il paziente ad un corretto mantenimento dell'igiene orale infatti questo è stato sottoposto anche ad una attenta e personalizzata spiegazione di come mantenere domiciliariamente la salute orale, di come mantenere il suo peso corporeo dal dietista, di come mantenere controllato il suo livello di glicemia/insulina (se utilizzata), di quanto i farmaci orali per il controllo della glicemia siano importati anche nel controllo delle complicanze del diabete stesso, etc.

Bisogna quindi porre una grandissima attenzione sull'altissima quantità di bias presenti interno della popolazione da noi osservata, e più in generale di tutta la popolazione anziana. Infatti, non soltanto nella popolazione ultrasessantacinquenne possiamo ritrovare una grandissima quantità di pazienti affetti queste patologie che potrebbero quindi apparire come dovute all'invecchiamento dell'organismo più che ad una correlazione diretta, ma abbiamo rilevato che il cambiamento della dieta, dei farmaci,

delle abitudini del paziente diabetico, sono altrettanto influenti sulla diminuzione di valori, quali l'emoglobina glicata. È quindi maggiormente difficile considerare come attendibili quegli studi che hanno contraddistinto gli ultimi grandi convegni internazionali che ponevano in luce quanto una corretta salute orale mantenuta professionalmente e domiciliariamente fosse anche utile a controllare diabete o limitare i danni di malattie aterosclerotiche.

4.3. Aterosclerosi e Patogeni Parodontali

Il notevole interesse per lo studio delle malattie cardiovascolari è giustificato dal fatto che rappresentano la principale causa di mortalità nei paesi industrializzati. Alla base della malattia cardiovascolare vi è un processo infiammatorio cronico associato alla formazione di lesioni specifiche che interessano i vasi di medio e grosso calibro, allo sviluppo delle quali contribuiscono diversi fattori di rischio. Negli ultimi anni è stato preso in considerazione il potenziale ruolo di patologie ad eziologia infettiva quale fattore indipendente di rischio nell'eziopatogenesi dell'aterosclerosi. Diverse indagini epidemiologiche e studi su modelli animali hanno dimostrato un possibile coinvolgimento di singoli agenti infettivi, tra i quali *Chlamydomphila pneumoniae*, *P. gingivalis*, *H. pylori*, CMV ed EBV nello sviluppo e progressione delle lesioni aterosclerotiche (Zebrack et al., 2003) . Più recentemente l'ipotesi maggiormente accreditata suggerisce, piuttosto del ruolo di specifici singoli patogeni, che sia invece la compresenza di più patogeni a contribuire all'aggravarsi del processo infiammatorio (ipotesi del "pathogen burden") (Epstain, 2002). Il possibile contributo dei diversi microorganismi nella patogenesi dell'aterosclerosi potrebbe essere attribuibile ad una loro presenza a livello vascolare, associata ad una risposta infiammatoria locale, o tramite un effetto indiretto con il rilascio di citochine sistemiche da infezioni in sedi non vascolari. In particolare è stato riportato che infezioni croniche associate alla co-presenza di più microorganismi possa contribuire allo sviluppo e progressione delle patologie cardiovascolari (Bouchard et al., 2010). Tra queste, la malattia parodontale, una delle infezioni croniche ad eziologia polimicrobica con maggior prevalenza nell'uomo, è stata ipotizzata rappresentare un fattore di rischio indipendente per la malattia cardiovascolare (Sanz et al., 2004). Si stima, infatti, che la malattia parodontale colpisca circa il 34% di tutti gli adulti sopra i 30 anni di età, causando una patologia infiammatoria cronica al livello del cavo orale. I patogeni parodontali, il cui habitat è stato identificato risiedere nel biofilm subgingivale, sono stati ritrovati nel sangue di soggetti con paradontite, in

seguito a normali e quotidiane azioni quali la masticazione e la pulizia dentale (Castillo et al., 2011). Tali "batteriemie" sono ritenute essere coinvolte nella traslocazione e colonizzazione di altri siti, seppur distanti dalla sede primaria (parodonto), di batteri patogeni, tramite il flusso circolatorio. Uno dei primi passi intrapresi dalla comunità scientifica, con il fine di confermare la correlazione diretta tra patogeni parodontali e aterosclerosi, ha previsto la ricerca e l'identificazione dei patogeni putativi all'interno delle placche ateromatose. Fu nel 1999 il primo lavoro che identificò la presenza di DNA di batteri parodontali in campioni di placca carotidea umana (Figueró et al., 2011). Negli anni seguenti sono stati eseguiti numerosi studi analoghi con risultati nel complesso contrastanti, attribuibili alle differenze nei protocolli clinici adottati, alle difficoltà nella standardizzazione delle metodiche pre-analitiche e analitiche utilizzate per determinare la presenza microbica e alla ricerca mirata a singoli o ad un pannello limitato di microorganismi. Pertanto, lo scopo di questa ricerca è stato la valutazione della presenza di un pannello di patogeni parodontali a livello sia della placca carotidea che a livello del torrente ematico in soggetti affetti da aterosclerosi carotidea in stadio avanzato confrontandone i livelli plasmatici con quelli di soggetti "sani", mediante l'utilizzo di metodiche molecolari quantitative. Per valutare una loro possibile azione infiammatoria locale tramite la stimolazione della risposta innata, sezioni di tessuto di placca sono state analizzate per la presenza dei neutrofili. I risultati ottenuti da questo studio permettono di osservare come nella totalità (100 %) dei campioni sia di plasma che di placca dei soggetti "malati", è stata ritrovata la presenza di almeno un patogeno. Nel plasma dei soggetti "sani" la positività è risultata viceversa pari al 45 %. È importante inoltre sottolineare che la positività ottenuta nella maggior parte dei campioni di plasma (10/12; 83 %) e placca (8/12; 67 %) dei soggetti "malati" evidenziavano la presenza di almeno due o più patogeni, al contrario dei campioni di plasma nei soggetti "sani" in cui le positività ottenute si riferiscono sempre alla presenza di un singolo patogeno, indicando l'assenza di co-infezione. La contemporanea presenza di due o più delle specie batteriche ricercate, sia nella placca ateromasica che nel

plasma, dei pazienti affetti da aterosclerosi carotidea di grave entità avvalorata l'ipotesi precedentemente descritta del "pathogen burden". Un'attenzione a parte dovremo prestare verso il *Porphyromonas Gingivalis* che si è dimostrato essere presente in tutte le placche ateromasiche analizzate durante lo studio, ed anche nel plasma dello stesso paziente, al contrario di altre specie batteriche quali *Fusobacteriaceae* ed altri. Nonostante tali evidenze, l'associazione tra aterosclerosi e patogeni è tutt'ora oggetto di studi e di conferme; infatti la semplice presenza del patogeno all'interno del vaso non spiega la malattia, in quanto potrebbe essere solamente un "innocent bystander", ovvero un semplice spettatore, piuttosto che un agente causale della malattia, oppure, più semplicemente, si potrebbe anche ritenere che i vasi aterosclerotici possano essere più vulnerabili alle infezioni. Importante sembra essere il ruolo della co-infezione di differenti batteri, infatti, nei campioni di plasma e placca dei pazienti affetti da aterosclerosi carotidea sono state riscontrate la presenza di almeno due o più patogeni, al contrario dei campioni di plasma nei soggetti "sani" in cui le positività ottenute si riferiscono sempre alla presenza di un singolo patogeno, indicando l'assenza di co-infezione. Nei campioni analizzati, quando il paziente riportava lesioni aterosclerotiche nel plasma e nell'ateroma stesso si sono rilevate tracce di *Porphyromonas Gingivalis*. Chiaramente sono necessari altri studi, se possibile multicentrici, per abbattere ulteriormente i bias e per verificare la presenza di *Porphyromonas* nelle placche ateromasiche dei pazienti.

In termini qualitativi i microorganismi maggiormente ritrovati nel plasma e nella placca dei soggetti "malati" sono *P. gingivalis* (100 % e 100 % rispettivamente) e *F. nucleatum* (66.7 % e 50 % rispettivamente), seguiti da *T. forsythia* (17 % e 0 % rispettivamente), *P. intermedia* (8 % e 0 % rispettivamente) e *C. rectus* (0 % e 8 % rispettivamente). Nessun campione di plasma e placca è risultato positivo per la presenza di DNA di *H. pylori* e *A. actinomycetemcomitans*. Nel plasma dei soggetti "sani" invece *P. gingivalis* è risultato essere presente nel 25 % dei campioni e *F. nucleatum* nel 20 % mentre sono risultati negativi tutti gli altri agenti batterici ricercati. La differenza riscontrata nella prevalenza delle singole specie

batteriche ricercate nei campioni di plasma dei soggetti “malati” rispetto ai controlli “sani” è risultata statisticamente significativa per *P. gingivalis* ($p=0.0001$) e per *F. nucleatum* ($p=0.021$); come anche la positività ad almeno un patogeno negli stessi campioni di soggetti “malati” rispetto ai “sani” ($p=0.002$).

Anche per quanto riguarda le cariche microbiche, la differenza nei valori per *P. gingivalis* riscontrati nel plasma di soggetti “malati” (mediana= 2820 copie/ml) rispetto ai soggetti “sani” (mediana= 564 copie/ml) è stata statisticamente significativa ($p=0.002$), contrariamente a quella di *F. nucleatum* ($p=0.5$). Inoltre anche la differenza nella sommatoria della carica batterica nel plasma dei “malati” (mediana= 3197 copie/ml) rispetto ai controlli “sani” (mediana= 375 copie/ml) è risultata altamente statisticamente significativa ($p= 0.0002$).

Ancora una volta la presenza di più patogeni nella placca ateromasica e sangue dei soggetti “malati” che contribuiscono ad elevate cariche microbiche totali sono in supporto dell’importanza del “pathogen burden” nello sviluppo della malattia ateromasica.

Pertanto, sebbene questo studio di tipo esplorativo abbia analizzato un numero limitato di soggetti con aterosclerosi carotidea di grave entità, i dati ottenuti mostrano un’importanza rilevante non solo della presenza di *P.gingivalis* ma anche della carica microbica totale nel torrente ematico di questi pazienti rispetto al gruppo di controllo, aspetto che non appare essere stato in precedenza descritto in letteratura.

Un ulteriore importante risultato che è emerso dall’analisi di questi dati, è che la positività per i batteri patogeni nei campioni di plasma e placca dei soggetti “malati” non è risultata statisticamente differente, lasciando intendere che gli stessi microorganismi sono contemporaneamente presenti in entrambe le matrici.

Le cariche di questi microorganismi sono risultate anch’esse non significativamente differenti in plasma e placca di soggetti con aterosclerosi carotidea ad eccezione di *P. gingivalis*, la cui mediana della carica è risultata essere di circa quattro volte superiore nel plasma (mediana = 2820 copie/ml) rispetto alla placca (mediana= 759.5 copie/ml), e della

sommatoria della carica microbica totale nel plasma (mediana = 3197 copie/ml) e nella placca (mediana= 1020 copie/ml), $p=0.002$ rispettivamente.

Questi risultati sono in parte in accordo con uno studio recente, condotto su 42 soggetti a cui è stato prelevato un campione di placca ateromasi (Castillo et al., 2011). Gli autori riportano che i patogeni più frequentemente ritrovati sono *P. gingivalis* (78.57%), *A. actinomycetemcomitans* (66.67%) e *T. forsythia* (61.90%). Questi risultati tuttavia sono in completo disaccordo con un altro lavoro nel quale non è stata ritrovata la presenza specifica di DNA batterico nelle placche analizzate (Padilla et al., 2006). Tali discordanze possono essere in parte dovute alle metodiche preanalitiche ed analitiche utilizzate per la ricerca dei microrganismi; la mancanza di standardizzazione dei metodi può rappresentare un ostacolo nel confronto dei risultati ottenuti nei diversi studi effettuati per definire il ruolo microbico nell'aterosclerosi.

In questo studio, parallelamente alla ricerca del DNA batterico, è stato ricercato anche quello virale. In nessun campione ne è stata riscontrata la presenza. Questa osservazione è in accordo con quanto riportato da un recente lavoro per quanto riguarda la ricerca di EBV e CMV in campioni di placca carotidea (Tremolada et al., 2011).

Sebbene vi siano delle indicazioni secondo le quali i virus erpetici umani siano correlabili all'aterosclerosi, in letteratura sono riportati pochi lavori in cui la presenza del DNA virale è ricercata in campioni di plasma e/o placca. La maggior parte degli studi ha riguardato la ricerca della sieroprevalenza di questi virus in campioni di plasma di soggetti con patologia aterosclerotica conclamata, mostrando un'alta positività in termini di livelli anticorpali (IgG) (Ihira et al., 2002). Da queste considerazioni è possibile ipotizzare che non ci sia una correlazione diretta tra la presenza di anticorpi nel siero e il ritrovamento del DNA del relativo patogeno sia nella placca che nel sangue di soggetti con malattia cardiovascolare.

Il presente studio ha previsto inoltre analisi di immunoistochimica su 7 sezioni di tessuto di placca carotidea al fine di ricercare la presenza dei neutrofili correlandoli con la presenza del DNA dei patogeni studiati. Dati

recenti indicano non solo un importante ruolo, fino ad oggi sottostimato, dei neutrofili nella patogenesi dell'aterosclerosi (Drechsler et al., 2011) ma anche una loro attivazione associata alla presenza di patogeni parodontali a livello endoteliale (Delbosc et al., 2011).

Tuttavia sono stati riportati pochi lavori riguardanti la presenza dei neutrofili in campioni di placca aterosclerotica. Un recente lavoro ha dimostrato come un'alta presenza di neutrofili all'interno della placca correli positivamente con stadi avanzati della patologia prossimi alla rottura (Drechsler et al., 2011; Ionita et al., 2010).

Sulla base di ciò, in questo studio è stata posta particolare attenzione all'esame istologico delle sezioni di placca con il fine di ricercare la presenza sia dei neutrofili che dei medesimi patogeni, analogamente a quanto effettuato sui campioni di placca omogenata. Per quanto riguarda la presenza microbica, *P. gingivalis* è risultato essere presente e predominante in tutte le sezioni di tessuto analizzate, analogamente a quanto è stato ottenuto nei campioni di placca omogenata. L'osservazione istologica ha evidenziato che tutte le sezioni analizzate provenivano da placche in stadio avanzato, caratterizzate da tratti morfologici comuni come un'alta frammentazione e presenza di trombi, associabili ad un'alta instabilità.

I risultati di immunistochemica mostrano pertanto una correlazione tra la numerosità dei neutrofili all'interno della placca con un'elevata carica di *P. gingivalis* determinata su sezioni del medesimo campione, sebbene l'esiguo numero di campioni analizzati non abbia permesso l'analisi statistica.

Questa osservazione è in accordo con un recente studio in cui gli autori dimostrano il coinvolgimento di *P. gingivalis* nei meccanismi di reclutamento e attivazione dei neutrofili (Delbosc et al., 2011).

In conclusione, questo studio esplorativo ha evidenziato il possibile ruolo del *Porphyromonas gingivalis* e di co-infezione con altri patogeni parodontali, associato ad un coinvolgimento dei neutrofili, nell'evoluzione della placca aterosclerotica, contribuendo così all'elucidazione dei meccanismi alla base della patogenesi della malattia cardiovascolare. Inoltre, la presenza di *P. gingivalis* in entrambe le matrici dei soggetti "malati", e

soprattutto la sua più alta carica a livello plasmatico rispetto a quello riscontrato in soggetti “sani”, suggerisce un suo possibile impiego come potenziale biomarcatore per la prevenzione della malattia aterosclerotica. Future ricerche dovranno valutare e approfondire alcuni aspetti, quali la possibile associazione clinica con la patologia parodontale in pazienti affetti da aterosclerosi e correlarne la gravità con la malattia cardiovascolare e con la presenza di DNA microbico sia nel plasma che nella placca ateromasica. Altri aspetti che sarà necessario valutare con ulteriori ricerche sono la vitalità dei microrganismi, il cui DNA è stato rilevato nel plasma e nella placca ateromasica, e i livelli di marker infiammatori correlati sia alla malattia parodontale che alla patologia cardiovascolare, quali le metalloproteasi.

CONCLUSIONI ED IMPLICAZIONI CLINICHE

Come si è potuto evincere dai tre differenti studi riportati in questa tesi è difficile, ad oggi, affermare con sicurezza che la malattia parodontale possa essere evento scatenante o comunque essere correlata a malattie sistemiche invalidanti e considerate fra le più probabili cause di morte della società odierna e di quella prossima, come aterosclerosi o diabete.

Sicuramente, come messo in luce dallo studio eseguito sui batteri parodontopatogeni e l'aterosclerosi, la malattia parodontale può essere un ulteriore elemento aggravante e di difficile controllo per la salute generale. Pur mancando quella correlazione diretta che fino a pochi anni fa speravamo di riuscire a dimostrare l'importanza di una corretta igiene orale professionale domiciliare all'interno di una casa di riposo, di cura, o anche un ospedale sono fondamentali per ridurre l'incidenza di infezioni nosocomiali soprattutto dello pneumonìa, responsabile di gravissime infezioni che talvolta possono portare anche alla morte del paziente soprattutto quando anziano, o già malato.

Crediamo quindi che l'inserimento di reparti specializzati d'igiene dentale all'interno di ospedali e in particolar modo di aziende di servizi alla persona, case di riposo o di cura possa riflettersi in un miglioramento, non solo nello stato di salute orale e quindi anche psicologico del paziente, ma anche con il diretto riscontro per la salute generale del paziente ed anche per l'economia sanitaria.

Durante l'anno 2014-2015 il Corso di Igiene Dentale dell'Università degli Studi di Milano – Sezione Pio Albergo Trivulzio ha eseguito 689 prestazioni (Levigature radici 4 quadranti, Ablazioni Tartaro, sondaggio/visite di controllo, sigillature, applicazione fluoro, trattamenti rimineralizzanti tooth mousse, Igiene a pazienti RSA) per un totale di 498 pazienti trattati. Tutti

questi pazienti appartengono a quei cluster di popolazioni che per ragioni differenti (età, classe sociale, economica, etc) possono usufruire del sistema sanitario nazionale anche per le cure odontoiatriche (dati aggiornati a 5/10/15).

CAPITOLO 5

BIBLIOGRAFIA

- Abbayya K, Puthankar N, Naduwinmani S, Chidambar YS Association between Periodontitis and Alzheimer's Disease: N Am J Med Sci. 2015 Jun; 7(6): 241–246.
- Andrews, K. (2005) Rehabilitation practice following profound brain damage. *Neuropsychological Rehabilitation* 12(3): 461–472
- CINECA-SIS. Ossertvatorio ARNO Diabete: il profilo assistenziale della popolazione con diabete. Bologna: Centauro s.r.l, Edizioni scientifiche; 2011.
- Armstrong RA. What causes alzheimer's disease? *Folia Neuropathol* 2013; 51: 169–188.
- Asche C, LaFleur J, Conner C. A review of diabetes treatment adherence and the association with clinical and economic outcomes. *Clin Ther* 2011;33:74-109.
- Barbara Baldazzi – Enrica Aureli Dati Istat 2011, Qualità della vita in Italia: venti anni di studi attraverso l'indagine Multiscopo dell'Istat Roma, 27-28 Gennaio 2015
- Bartlett JG. Pneumonia. In: Hazzard WR, Bierman EL, Blass JP et al., editors. *Principles of geriatric medicine and gerontology*, 3rd ed. New York: McGraw-Hill; 1994. 565-73.
- Barlattani A, Ottria L, ISTAT 2008
<http://www.quadernidellasalute.it/download/press-area/cartella-stampa/7-gennaio-febbraio-2011/dott.alberto-barlattani-e-dott.ssa-liliana-ottria.pdf> 2011
- Bascones-Martinez A, Matesanz-Perez P, scribano-Bermejo M, González-Moles MA, Bascones-Ilundain J, Meurman JH. Periodontal disease and diabetes-Review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011 Sep 1;16 (6):e722-9.

- Bahekar AA, Singh S, Saha S, Molnar J, Arora R. The prevalence and incidence of coronary heart disease is significantly increased in periodontitis: a meta-analysis. *Am Heart J* 2007;154:830-7.
- Blaizot A, Vergnes JN, Nuwwareh S, Amar J, Sixou M. Periodontal diseases and cardiovascular events: meta-analysis of observational studies. *Int Dent J* 2009;59:197-209. 22.
- Boyle JP, Thompson TJ, Gregg EW, Barker LE, Williamson DF. Projection of the year 2050 burden of diabetes in the US adult population: dynamic modeling of incidence, mortality, and prediabetes prevalence. *Popul Health Metr* 2010;8:29.
- Bouchard P, Boutouyrie P, D'Aiuto F, Deanfield J, Deliargyris E, Fernandez-Avilés F, Hughes F, Madianos P, Renvert S, Sanz M (2010) European workshop in periodontal health and cardiovascular disease consensus document. *European Heart Journal Supplements* 12 (Supplement B), B13-B22.
- Brizioli E., Trabucchi M., Gestire le strutture residenziali nel 2020, in *Network Non Autosufficienza (a cura di), L'assistenza agli anziani non autosufficienti in Italia. Rapporto 2009, Maggioli, Rimini, 2009.*
- Calvet J, Coll J: Meningitis of sinusoid origin with the form of coma vigil. *Rev Otoneuroophthalmol* 1959, 31:443-445.
- Castillo DM, Sánchez-Beltrán MC, Castellanos JE, Sanz I, MayorgaFayad I, Sanz M, Lafaurie GI. (2011) Detection of specific periodontal microorganisms from bacteraemia samples after periodontal therapy using molecular-based diagnostics. *J Clin Periodontol* 38:418-427.
- Cavrini G, A.Battisti, C. Di Priamo, A. Solipaca, L. Sicuro, G. de Girolamo Differenze di salute negli anziani istituzionalizzati e non: un confronto in cinque regioni italiane Roma 15 16 sett 2011.
- Cecil RL, Angevin DM. Clinical and experimental observations on focal infection, with an analysis of 200 cases of rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 1938;12:577-84. 74.
- Center for Disease Control and Prevention. Number (in millions) of persons with diagnosed diabetes, United States, 1980–2005 [Online]. Atlanta: CDC; 2012a. Diabetes data & trends. Available: <http://>

www.cdc.gov/diabetes/pubs/factsheet11.htm [Accessed September 18 2013]

Center for Disease Control and Prevention. Overweight and obesity. US Obesity Trends 1985–2006 [Online]. Atlanta: CDC; 2012b. Diabetes data & trends. Available: <http://www.cdc.gov/obesity/data/adult.html> [Accessed September 18 2013]

Choi BC, Pak AW, Multidisciplinarity, interdisciplinarity and transdisciplinarity in health research, services, education and policy: 1. Definitions, objectives, and evidence of effectiveness.. [Clin Invest Med](#). 2006 Dec;29(6):351-64.

Chou HH, Yumoto H, Davey M, Takahashi Y, Miyamoto T, et al. (2005) Porphyromonas gingivalis fimbria-dependent activation of inflammatory genes in human aortic endothelial cells. *Infect Immun* 73: 5367–5378

Corrigan, J.D., Whiteneck, G., Mellick, D. (2004) Perceived needs following traumatic brain injury. *J Head Trauma Rehabi.* (3):205–16.

Coulter ID, Marcus M, et al. (1994). "Measuring oral health status: theoretical and methodological challenges." *Soc Sci Med* **38**(11): 1531-41.

Daborg J, von Otter M, Sjölander A et al. Association of the RAGE G82S polymorphism with Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2010; 117: 861–867.

Dadoun S, Zeboulon-Ktorza N, Combescure C, Elhai M, Rozenberg S, Gossec L, et al. Mortality in rheumatoid arthritis over the last fifty years: Systematic review and meta-analysis. *Joint Bone Spine* 2012.

De Feo G. Il ruolo del Glasgow Scale nel paziente in stato Vegetativo ediermes 2012

DeRiso AJ 2nd, Ladowski JS, Dillon TA, Justice JW, Peterson AC. Chlorhexidine gluconate 0.12% oral rinse reduces the incidence of total nosocomial respiratory infection and nonprophylactic systemic antibiotic use in patients undergoing heart surgery. *Chest* 1996;109:1556-61

- de Smit MJ, Brouwer E, Westra J, Nesse W, Vissink A, van Winkelhoff AJ. [Effect of periodontal treatment on rheumatoid arthritis and vice versa]. *Ned Tijdschr Tandheelkd* 2012;119:191-7. Dutch.
- Ettinger RL, Beck JD. Geriatric dental curriculum and the needs of the elderly. *Spec Care Dentist* 1984;4:207-13.
- Delbosc S, Alsac JM, Journe C, Louedec L, Castier Y, Bonnaure-Mallet M, Ruimy R, Rossignol P, Bouchard P, Michel JB, Meilhac O. (2011) *Porphyromonas gingivalis* participates in pathogenesis of human abdominal aortic aneurysm by neutrophil activation. Proof of concept in rats. *PLoS One*. 136:e18679.
- Drechsler M, Döring Y, Megens RT, Soehnlein O. (2011) Neutrophilic granulocytes-promiscuous accelerators of atherosclerosis. *Thromb Haemost* 106:839-848.
- Facchini C., Guaita A., Tramonto o crisi di crescita delle Rsa di grandi dimensioni? Considerazioni in margine ad una ricerca nella provincia di Milano, I luoghi della cura, 2004, in Gori C. (a cura di), *Come cambia il welfare lombardo. Una valutazione delle politiche regionali*, Maggioli, Rimini, 2010.
- Figuro E, Sánchez-Beltrán M, Cuesta-Frechoso S, Tejerina JM, del Castro JA, Gutiérrez JM, Herrera D, Sanz M. (2011) Detection of periodontal bacteria in atheromatous plaque by Nested Polymerase Chain Reaction. *J Periodontol* 82:1469-1477.
- Gaur S, Agnihotri R. Alzheimer's disease and chronic periodontitis: is there an association? *Geriatr Geontol Int* 2015; 15_ 391-404
- Giacino JT, Ashwal S, Childs NL, et al. The minimally conscious state: definition and diagnostic criteria. *Neurology* 2002; 58: 349–353.
- Giacino JT, Kalmar K. The vegetative state and minimally conscious states: a comparison of clinical features and functional outcome. *J Head Trauma Rehabil* 1997; 12: 36–51.
- Giacino JT, Kalmar K. Diagnostic and prognostic guidelines for the vegetative and minimally conscious states. *Neuropsychol Rehabil* 2005; 15: 166–174.

- Giunco F: "Rette RSA: siamo sicuri che il problema sia solo l'efficienza gestionale?" – Lombardia Sociale
- Grabe HJ, Schwahn C, Völzke H et al. Tooth loss and cognitive impairment. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 550–557.
- Grossi SG, Genco RJ (1998) Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. *Ann Periodontol* 3, 51-61.
- Guerrini: "Come cambia il welfare lombardo". Maggioli Editore
- Guerrini, G., I servizi residenziali, in Gori C. (a cura di), Come cambia il welfare lombardo. Una valutazione delle politiche regionali, Maggioli, Rimini, 2010.
- Haden NK, Catalanotto FA, et al. (2003). "Improving the oral health status of all Americans: roles and responsibilities of academic dental institutions: the report of the ADEA President's Commission." *J Dent Educ* 67(5): 563-83.
- Han JY, Reynolds MA. Effect of anti-rheumatic agents on periodontal parameters and biomarkers of inflammation: a systematic review and meta-analysis. *J Periodont Implant Sci* 2012;42:3-12. 73.
- Hasturk, H. et al. (2007) Resolvin E1 regulates inflammation at the cellular and tissue level and restores tissue homeostasis in vivo. *J. Immunol.* 179, 7021–7029
- Hathcock JN, Shao A, Vieth R, Heaney R. Risk assessment for vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2007;85:6-18
- Helgeson, J. Smith, Johnsen, Ebert, Dental Considerations for the Frail Elderly. *Spec Care Dentist* 22(3):40S-55S, 2002
- Herman WH. The economic costs of diabetes: is it time for a new treatment paradigm? *Diabetes Care* 2013;36:775-776.
- Higashi Y, Goto C, Jitsuiki D, et al. Periodontal infection is associated with endothelial dysfunction in healthy subjects and hypertensive patients. *Hypertension* 2008;51:446-53.
- Holmlund A, Hedin M, Pussinen PJ, Lerner UH, Lind L (2011) *Porphyromonas gingivalis* (Pg) a possible link between impaired oral health and acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 148: 148–153

- Hospital-acquired pneumonia in adults: diagnosis, assessment of severity, initial antimicrobial therapy, and preventive strategies. A consensus statement, American Thoracic Society, November 1995. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1711-25.
- Humphrey LL, Fu R, Buckley DI, Freeman M, Helfand M. Periodontal disease and coronary heart disease incidence: a systematic review and meta-analysis. *J Gen Intern Med* 2008;23:2079-86. 21.
- Iacopino AM, Cutler CW. Pathophysiological relationships between periodontitis and systemic disease: recent concepts involving serum lipids. *J Periodontol*. 2000;71:1375-84.
- International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas Update 2012. 2013; Disponibile a: <http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/Update2012>
- Ionita MG, van den Borne P, Catanzariti LM, Moll FL, de Vries J-PPM, Pasterkamp G, Vink A, de Kleijn DPV. (2010) High neutrophil numbers in human carotid atherosclerotic plaques are associated with characteristics of rupture-prone lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:1842-1848.
- Istituto Nazionale di Statistica. *Annuario Statistico Italiano* 2012; 2012.
- Marchesini G, Di Luzio R. *Italian Health Policy Brief Anno III - N° 5 Speciale* 2013
- Kamer AR, Craig RG, Dasanayake AP, Brys M, Glodzik-Sobanskad L, de Leon MJ. Inflammation and Alzheimer's disease: Possible role of periodontal diseases. *Alzheimers Dement*. 2008;4:242-50. [PubMed: 18631974]
- Kaptoge S, Di Angelantonio E, Lowe G, et al. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet* 2010;375:132-40.
- Kaye EK, Valencia A, Baba N, Spiro A 3rd, Dietrich T, Garcia RI. Tooth loss and periodontal disease predict poor cognitive function in older men. *J Am Geriatr Soc* 2010; 58: 713-718.
- Khader YS, Albashaireh ZS, Alomari MA. Periodontal diseases and the risk of coronary heart and cerebrovascular diseases: a meta-analysis. *J Periodontol* 2004;75:1046-53. 19.

- Kholy K, Genco R, Van Dyke T. Oral infections and Cardiovascular disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism* Kune 2015 Vol 26, No. 6
- Klompas M, Speck K, Howell MD, Greene LR, Berenholtz SM. Reappraisal of Routine Oral Care With Chlorhexidine Gluconate for Patients Receiving Mechanical Ventilation: Systematic Review and Meta-Analysis. *JAMA Intern Med.* 2014;174(5):751-761. doi:10.1001/jamainternmed.2014.359.
- Kyrgidis A, Tzellos TG, Toulis K, Antoniadis K. The facial skeleton in patients with osteoporosis: a field for disease signs and treatment complications. *J Osteoporos* 2011;2011:147689.
- Jabbar S, Drury J, Fordham J, Datta HK, Francis RM, Tuck SP. Plasma vitamin D and cytokines in periodontal disease and postmenopausal osteoporosis. *J Periodontal Res* 2011;46:97-104.
- Janket SJ, Baird AE, Chuang SK, Jones JA. Meta-analysis of periodontal disease and risk of coronary heart disease and stroke. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;95:559-69. 18.
- Jennett B, Plum F. Persistent vegetative state after brain damage. A syndrome in search of a name. *Lancet* 1972; 1: 734-737.
- Lalla E, Lamster IB, Drury S, Fu C, Schmidt AM. Hyperglycemia, glycoxidation and receptor for advanced glycation endproducts: potential mechanisms underlying diabetic complications, including diabetes-associated periodontitis. *Periodontol* 2000 2000; 23: 50-62 [PMID: 11276765 DOI: 10.1034/j.1600-0757.2000.2230104.x]
- Lalla E, Papapanou PN (2011) Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases. *Nat Rev Endocrinol* 7, 738-748.
- Llambés F, Arias-Herrera S, Caffesse R Relationship between diabetes and periodontal infection *World J Diabetes* 2015 July 10; 6(7): 927-935 Baishideng Publishing Group Inc.
- Laureys S, Berre J, Goldman S. Cerebral function in coma, vegetative state, minimally conscious state, locked-in syndrome, and brain death. *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine* 2001:386-96.

- Laureys S, Celesia GG, Cohadon F, et al. Unresponsive wakefulness syndrome: a new name for the vegetative state or apallic syndrome. *BMC Med* 2010; 8: 68.
- L'assistenza agli anziani non autosufficienti in Italia - 3° Rapporto: Il monitoraggio degli interventi e il punto sulla residenzialità - Novembre 2011, Maggioli Editore.
- Leon J, Lai RT. Functional status of the non-institutionalized elderly: Estimates of ADL and IADL difficulties. Rockville (MD): U.S. Department of Health and Human Services, Agency for Health Care Policy and Research. 1990. DHHS Publication No. (PHS) 90-3462.
- Li K, Dai D, Zhao B et al. Association between the RAGE G82S polymorphism and Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2010; 117: 97-104.
- Locker D (1997). Concepts of Oral Health, Disease and the Quality of Life. Measuring Oral Health and Quality of Life, Chapel Hill: University of North Carolina, Department of Dental Ecology.
- Lockhart PB, Bolger AF, Papapanou PN, et al. Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: does the evidence support an independent association? A scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2012;125:2520-44.
- Longo, F., I costi della vecchiaia. Diagnosi interpretativa e suggestioni di policy, Cergas Bocconi, Milano giugno 2010.
- Loos BG. Systemic markers of inflammation in periodontitis. *J Periodontol* 2005;76:2106-15.
- Mealey BL. Diabetes and periodontal disease: two sides of a coin. *Compend Contin Educ Dent*. 2000;21:943-6, 948, 950.
- Melnyk B, and Fineout-Overholt E, (2010). Evidence-based practice in nursing & healthcare: a guide to best practice. Philadelphia, Lippincott Williams &Wilkins.
- Mulligan R, Navazesh M. Relationship between oral conditions and systemic diseases in the elderly. *J Dent Res* 1992;71 (Spec Iss) (Abstract) 1681:316.
- Mustapha IZ, Debrey S, Oladubu M, Ugarte R. Markers of systemic bacterial exposure in periodontal disease and cardiovascular disease risk: a

- systematic review and meta-analysis. *J Periodontol* 2007;78:2289-302.
20.
- The Multi-Society Task Force on PVS. Medical aspects of the persistent vegetative state (1). *N Engl J Med* 1994; 330: 1499–1508.
- National Center for Health Statistics. Nursing home care. Available at: <http://www.cdc.gov/nchs/fastats/nursingh.htm>. Accessed February 1, 2001.
- Needleman I, Hyun-Ryu J, Brealey D, et al. The impact of hospitalization on dental plaque accumulation: an observational study. *J Clin Periodontol*. 2012;39 (11):1011-1016.
- Otomo-Corgel J, Pucher JJ, Rethman MP, Reynolds M. State of the science: chronic periodontitis and Systemic Health, *J Evid Base Dent Pract* 2012:S1: [20-28]
- Otomo-Corgel J. Osteoporosis and osteopenia: implications for periodontal and implant therapy. *Periodontology* 2000 2012;59:111-39.
- Padilla C, Lobos O, Hubert E, González C, Matus S, Pereira M, Hasbun S, Descouvieres C. (2006) Periodontal pathogens in atheromatous plaques isolated from patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 41:350-353.
- Piaget J. 1970, La pluridisciplinarité et l'interdisciplinarité dans les universités, *Le Monde* 10 sept, Paris
- Pihlstrom BL. Periodontal risk assessment, diagnosis and treatment planning. *Periodontol* 2000. 2001;25:37-58.
- Polit DF, and Beck CT, (2008). *Nursing research: generating and assessing evidence for nursing practice*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Poole S, Singhrao SK, Chukkapalli S et al. Active Invasion of *Porphyromonas gingivalis* and Infection-Induced Complement Activation in ApoE^{-/-} Mice Brains. *J Alzheimers Dis* 2014. doi: 10.3233/JAD-140315.
- Prendergast V, Jakobsson U, Renvert S, Hallberg IR, Effect of a Standard Versus Comprehensive Oral Care Protocol Among intubated neuroscience ICU Patients: Results of a Randomized Controlled Trial *Journal of Neuroscience Nursing* 2012;44:134-146.

- Preston AJ, Gosney MA, Noon S, Martin MV. Oral flora of elderly patients following acute medical admission. *Gerontology* 1999;45:49-52. 46.
- Pussinen PJ, Kononen E, Paju S, Hyvarinen K, Gursoy UK, et al. (2011) Periodontal pathogen carriage, rather than periodontitis, determines the serum antibody levels. *J Clin Periodontol* 38: 405–411
- Rethman MP. The AHA scientific statement on periodontal disease and ASVD: how should clinicians respond? *Compend Contin Educ Dent* 2012;33:392-3.
- Rosenberg M (1996). "Clinical assessment of bad breath: current concepts." *J Am Dent Assoc* **127**(4): 475-82.
- Royal College of Physicians. *The permanent vegetative state*. A working party report. London: RCP, 1996.
- Royal College of Physicians. *The vegetative state, Guidance on diagnosis and management, a Working party report*. London: RCP, 2003.
- Rutger Persson G. Rheumatoid arthritis and periodontitis - inflammatory and infectious connections. Review of the literature. *J Oral Microbiol* 2012;4.
- Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A. (2004) Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol* 31:1034-1047.
- Satcher D. Oral health in America: A report of the Surgeon General. Department of Health and Human Services: U.S. Public Health Service. Available at: <http://www.nidcr.nih.gov/sgr/sgr.htm> Accessed May 30, 2000.
- Savioli C, Ribeiro AC, Fabri GM, Calich AL, Carvalho J, Silva CA, et al. Persistent periodontal disease hampers anti-tumor necrosis factor treatment response in rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol* 2012;18:180-4
- Scannapieco FA, Rethman MP. The relationship between periodontal diseases and respiratory diseases. *Dent Today* 2003;22:79-83.

- Serrano-Ríos M, Corbatón A. Diabetes mellitus, heart failure and mortality. *Med Clin (Barc)*. 2005;125:182-3.
- Shifman A, Orenbuch S, et al. (2002). "Bad breath--a major disability according to the Talmud." *Isr Med Assoc J* 4(10): 843-5.
- Slade G (1997). *Measuring Oral Health and Quality of Life*. Chapel Hill: University of North Carolina, Department of Dental Ecology.
- Shadish WR, Cook TD, et al. (2002). *Experimental and quasi-experimental designs for generalized causal inference*. Boston, Houghton Mifflin Company.
- Shindler O, Ruoppolo g, Shindler A. *Deglutologia*, Omega edizioni 2001
- Soskolne WA. Epidemiological and clinical aspects of periodontal diseases in diabetics. *Ann Periodontol*. 1998;3:3-12.
- SPI CGIL Nazionale, *Indagine sulle case di riposo*, Roma 2011.
- Tolle P, Reimer M Do we need stimulation programs as a part of nursing care for patients in "persistent vegetative state"? A conceptual analysis. [Axone](#). 2003 Dec;25(2):20-6.
- Tremolada S, Delbue S, Ferraresso M, Carloni C, Elia F, Larocca S, Bortolani E, Ferrante P. (2011) Search for genomic sequences of microbial agents in atherosclerotic plaques. *Int J Immunopathol Pharmacol* 24:243-246.
- Yang J, Wu J, Huang J, Lu Z, Liping X, Sun W, Ji Y *Porphyromonas gingivalis* Infection Reduces Regulatory T Cells in Infected Atherosclerosis Patients *PLoS One*. 2014; 9(1): e86599. Published online 2014 Jan 23.
- Yewe-Dyer M (1993). "The definition of oral health." *Br Dent J* 174(7): 224-5.
- Yoneyama T, Yoshida M, Ohru T, Mukaiyama H, Okamoto H, Hoshiba K, et al. Oral care reduces pneumonia in older patients in nursing homes. *J Am Geriatr Soc* 2002;50:430-3.
- Van Erp WS, Lavrijsen JCM, van de Laar FA, Vos PE, Laureys S, Koopmans RTCM. The vegetative state/unresponsive wakefulness syndrome: a systematic review of prevalence studies *European Journal of Neurology* 2014 doi:10.1111/ene.12483

- Weinberger B (2005). *An Introduction to the History of Dentistry: With Medical & Dental Chronology & Bibliographic Data*. Eastford, CT, USA, Martino Publishing.
- Watt R (2002). "Emerging theories into the social determinants of health: implications for oral health promotion." *Community Dent Oral Epidemiol* **30**: 241-7.
- Wise MP, Cole JM, Williams DW, Lewis MA, Frost PJ. Efficacy of oral chlorhexidine in critical care. *Crit Care*. 2008;12(3):419.
- Zebrack JS, Anderson JL. (2003) The role of infection in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Nurs* 18:42-49.
- Zeman A. Persistent vegetative state. *Lancet* 1997;**350**:795-9.