

ANALISI COMPARATIVA DELLA COMPONENTE MICROBICA SUBGENGIVALE TRA PAZIENTI PARODONTOPATICI AFFETTI E NON DA DIABETE MELLITO DI TIPO 2

1. INTRODUZIONE

Il diabete è una patologia estremamente diffusa a livello mondiale, solo in Italia ne sono affette circa 4 milioni di persone (6,2% della popolazione).¹ Tale patologia di grande rilievo sociale sia per la notevole diffusione che per la gravità delle complicanze, si esprime in un'alterazione del controllo metabolico del glucosio.

Le complicanze derivanti da questa condizione sono numerose e riguardano diversi distretti tra i quali anche il cavo orale. Tra le possibili manifestazioni in tale sede anatomica, la malattia parodontale è da ritenersi la più rilevante tanto da definirla come la sesta complicanza del diabete.²

La letteratura scientifica ha chiaramente dimostrato come sussista una relazione bidirezionale tra diabete mellito e malattia parodontale. Il primo, infatti, rappresenta un fattore di rischio per l'insorgenza della seconda aumentandone la suscettibilità.³ A sua volta, la malattia parodontale può complicare il controllo metabolico e quindi lo stato diabetico.^{4,5}

Per chiarire il meccanismo sotteso nell'associazione diabete e malattia parodontale, diversi ricercatori si sono focalizzati sullo studio del microbiota parodontale, agente eziologico primario nello sviluppo della parodontite.⁶⁻¹¹

Nello specifico della microbiologia parodontale, è oramai noto come solo alcuni microrganismi siano responsabili dell'insorgenza della patologia e come gli stessi, sulla base di specifiche sinergie, possano essere raggruppati in distinti complessi microbici, ai quali è peraltro riconosciuta differente patogenicità.^{12,13} Per convenzione, tali complessi microbici vengono distinti sulla base di codici cromatici qui elencati in ordine di crescente patogenicità: complesso viola, complesso giallo, complesso verde, complesso arancione e complesso rosso.

Più approfonditamente, sono sei i batteri chiaramente associati all'insorgenza e progressione della malattia parodontale:¹⁴⁻¹⁷ *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Treponema denticola* (*Td*) e *Tannerella forsythia* (*Tf*) tutti appartenenti al complesso rosso, *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*) e *Prevotella intermedia* (*Pi*) appartenenti all'arancione, ed *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*) non rientrante in alcun complesso cromatico. Si ritiene che la prevalenza di tali microrganismi sulla carica microbica totale possa essere indicativa del grado di attività ed aggressività della patologia parodontale.¹⁸⁻²⁰

Nello specifico di *Pg* è noto come esprima un certo numero di fattori di virulenza che consentono a questo microrganismo di poter causare la malattia parodontale. Tra questi le fimbrie, uno dei principali fattori di virulenza legati alla superficie cellulare, determinanti nell'avvio e progressione della malattia parodontale mediando l'adesione e l'invasione.²¹ Le fimbrie, costituite da fibrillina, proteina codificata dal gene *FimA*, sono appendici che si protrudono all'esterno della membrana

cellulare. Fino ad ora, sono stati identificati sei genotipi di cui il tipo I e il tipo III con minor virulenti, ed il tipo II e il tipo IV associati ad alta patogenicità.²²⁻²⁵

Riguardo Aa, alcuni genotipi sembrano mostrare un maggior grado di virulenza correlato all'aumentata produzione di leucotossine, in grado di influenzare, compromettere ed uccidere le cellule del sistema immunitario umano.²⁶⁻²⁹ Il recente sviluppo di tecniche atte ad individuare la variabilità dei microrganismi, ha permesso di osservare differenze genetiche nella regione codificante la leucotossina con correlazioni dirette sulla leucotossicità.³⁰ Pertanto, genotipi altamente leucotossici (indicati con il clone JP2) possono produrre 10-20 volte più tossine rispetto agli altri, interferendo maggiormente con la difesa immunitaria innata dell'ospite.³¹

Negli ultimi anni si è ipotizzato che il diabete mellito sia in grado di modificare la composizione quantitativa assoluta e relativa dei complessi microbici responsabili dell'insorgenza e progressione della malattia parodontale. L'ipotesi su cui si fonda tale opinione, parte anche dal presupposto che gli alterati livelli glicemici del soggetto diabetico si riflettano in un aumento della componente glicemica sia a livello salivare che crevicolare.³²⁻³⁵

Come conseguenza ne potrebbe derivare un microambiente subgingivale favorevole all'insediamento e sviluppo di un biofilm batterico parodontopatogeno.

Mentre la microbiologia parodontale nei pazienti con diabete mellito di tipo 1 è stata indagata in diversi studi, il microbiota del soggetto con il tipo 2 è stato meno investigato.³⁶⁻⁴⁰

Obiettivo principale del presente lavoro è stato quello di indagare se la prevalenza e la carica batterica dei principali parodontopatogeni in pazienti parodontopatici affetti da diabete mellito di tipo 2, differisca o meno da quella di soggetti con egual grado di patologia parodontale ma non affetti da diabete.

Obiettivo secondario è stato valutare se sussistano differenti genotipi di *Pg* ed *Aa* tra pazienti diabetici e non diabetici.

2. MATERIALI E METODI

Questo studio clinico retrospettivo è stato eseguito analizzando i dati di pazienti affetti da parodontite cronica afferenti al Reparto di Parodontologia ed Implantologia della Clinica Odontoiatrica dell'Università di Bologna durante gli anni 2010-2016.

Tutti i soggetti inclusi nello studio sono stati dettagliatamente informati sulla natura dello studio e sui potenziali benefici cui potranno usufruire.

Il protocollo di studio è stato approvato dal Comitato Etico Interaziendale di Bologna-Imola. (Numero di riferimento: CE 16044)

1,1 SELEZIONE DEL CAMPIONE

I soggetti esaminati sono stati divisi in pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2 (DM2) e pazienti non affetti da diabete mellito (NDM). La diagnosi di diabete è stata rilevata dall'anamnesi medica presente in cartella clinica. Approfondimenti con il paziente ed il medico curante sono stati effettuati qualora permanessero dubbi sull'effettiva diagnosi. La diagnosi iniziale di parodontite cronica, effettuata dall'operatore durante la prima visita, è stata rivalutata e confermata in fase di arruolamento da parte di due esaminatori indipendenti. Per entrambi i gruppi di studio sono stati identificati 20 soggetti, per un totale di 160 siti parodontali con analisi microbiologica sitospecifica (4 siti per soggetto).

I criteri d'inclusione allo studio sono stati:

- diagnosi di parodontite cronica (Armitage 1999);⁴¹
- diagnosi di diabete mellito di tipo 2 al momento dell'esecuzione del test (presente nel gruppo DM2, assente nel gruppo NDM);
- presenza di almeno 12 denti (eccetto i terzi molari);
- età maggiore di 18 anni;
- etnia caucasica.

I criteri d'esclusione sono stati:

- antibioticoteraapia sistemica nei 3 mesi precedenti al test microbiologico;
- terapia antinfiammatoria nel mese precedente la visita;
- gravidanza o allattamento in corso;
- presenza di malattie sistemiche ad esclusione del diabete mellito (artrite, colite ulcerosa, morbo di Crohn, osteoporosi o osteopenia, infezione da HIV, malattie ematologiche, malattie neoplastiche, malattie cardiovascolari o patologie che possano potenzialmente interferire con la parodontite e/o con il diabete);
- trattamento parodontale nei 6 mesi precedenti il prelievo di biofilm sottogengivale;
- disordini mentali.

Per tutti i pazienti sono stati ricavati dalla cartella clinica parametri clinici e parametri demografici/comportamentali.

I parametri demografici/comportamentali ricavati dalla cartella clinica sono stati i seguenti:

- età del soggetto al momento dell'esecuzione del test microbiologico;
- abitudine al fumo;
- genere.

Le analisi relative alle abitudini al fumo sono state effettuate in funzione del fatto che il paziente abbia dichiarato in cartella clinica di non fumare, di fumare più o meno di 10 sigarette al giorno, di essere un ex fumatore (almeno 6 mesi di astinenza dal fumo).

I parametri clinici esaminati sono stati:

- estensione e severità del danno parodontale (Armitage del 1999);⁴¹
- numero di denti mancanti;

- presenza di sanguinamento al sondaggio (BoP);
- presenza di suppurazione gengivale al sondaggio (Pus);
- profondità della tasca (Ppd);
- durata del diabete mellito;
- controllo metabolico del diabete;
- carica batterica totale e relativa;
- genotipo di *Aa*;
- genotipo di *Pg*.

Con “durata del diabete” ci si riferisce al lasso temporale intercorso fra la diagnosi di diabete e l’esecuzione del test microbiologico parodontale (superiore o inferiore ai 15 anni).

Con estensione del danno parodontale si intende la percentuale dei siti affetti da parodontite: $\leq 30\%$ (localizzata), $> 30\%$ (generalizzata). La severità del danno parodontale è stata determinata in base ai mm di perdita di attacco clinico: 1-2mm (lieve), 3-4mm (moderata), ≥ 5 mm (severa).

1,2 IDENTIFICAZIONE DEL MICROBIOTA

L’intervento è consistito nell’extrapolazione di dati microbiologici dai test microbiologici parodontali. I test microbiologici parodontali sono di regola eseguiti in occasione della prima seduta successiva alla prima visita presso il reparto. Di norma tutti i denti con prognosi infausta a breve termine, presentanti lesioni alle forcazioni, patologie endodontiche e/o estese lesione da carie, vengono esclusi dall’analisi microbiologica. È abitudine del reparto eseguire i prelievi microbiologici nei siti maggiormente rappresentativi riguardo al quadro parodontale analizzato.

La procedura di raccolta e stoccaggio del campione di biofilm sottogengivale è stata eseguita secondo una metodica standardizzata che prevede l’isolamento della zona dalla saliva tramite rulli di cotone ed aspiratore, un’attenta rimozione della placca sopragengivale evitando traumatismi ai tessuti marginali e l’inserimento nella tasca di un cono di carta sterile monouso per 10 secondi. Il tampone viene quindi posto in un’apposita provetta sterile rifuggendo qualsiasi forma di contaminazione. I campioni raccolti sono stati successivamente inviati ad un laboratorio esterno (Biomolecular Diagnostic - Firenze) dove, mediante real-time PCR quantitativa, viene misurata la carica batterica assoluta delle singole specie, la carica batterica totale del singolo sito parodontale e la percentuale dei patogeni rispetto alla carica totale, con una sensibilità di 100 cellule per tipo di patogeno. L’estrazione del DNA è stata effettuata utilizzando QIACubeHT (QIAGEN) secondo il protocollo del produttore. Le Real-time PCR esaminate con SYBR-green sono state effettuate tramite impianto RotorGeneQ (QIAGEN) per quantificare i patogeni parodontali. La metodica d’analisi è stata sottoposta a validazione dal medesimo laboratorio.

Le specie batteriche oggetto di studio sono state:

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (Aa);

Porphyromonas gingivalis (Pg);

Treponema denticola (Td);

Tannerella forsythia (Tf);

Prevotella intermedia (Pi);

Fusobacterium nucleatum (Fn).

Qualora presenti, l'analisi di *Aa* e *Pg* è proseguita con l'identificazione del genotipo.

1,3 ANALISI STATISTICA

I. DIMENSIONAMENTO CAMPIONARIO

La dimensione campionaria è stata determinata facendo riferimento alla prevalenza di *Pg* e di *Td*, come riportato nel lavoro di Yuan K, Chang.⁴² Ipotizzando tale prevalenza pari al 61% nei non diabetici ed al 56% nei diabetici; con un margine di non inferiorità al 20%, ad un livello di significatività del 5% con una potenza dell'80% , sono necessari almeno 14 pazienti per gruppo. Ipotizzando tale prevalenza pari al 36% nei non diabetici ed al 39% nei diabetici; con un margine di non inferiorità al 10%, ad un livello di significatività del 5% con una potenza dell'80% , sono necessari almeno 18 pazienti per gruppo. I valori di prevalenza utilizzati per il dimensionamento sono stati una media delle prevalenze tra siti sani e malati sia nei diabetici che nei non diabetici.

II. ELABORAZIONE DEI DATI

I dati categoriali sono stati descritti tramite proporzioni. I dati continui, dopo averne verificato l'adattamento alla distribuzione Gaussiana tramite il Test di Shapiro-Wilk, sono stati descritti con media e deviazione standard o mediana e range interquartile. Il confronto dei dati quantitativi utilizzando come unità di analisi il paziente è stato di conseguenza eseguito o con il test T di Student o con il test U di Mann-Whitney.

Il confronto dei dati categorici è stato eseguito con il test Chi quadrato di Mc Nemar per dati appaiati. L'analisi delle correlazioni tra dati quantitativi è stata effettuata con il tau di Kendall.

L'appaiamento 1:1 dei pazienti è stato eseguito utilizzando come variabili di matching l'estensione del danno parodontale e la severità di tale danno.

L'analisi delle differenze delle cariche batteriche tra diabetici e non diabetici nei due campioni appaiati è stata effettuata con il test di Wilcoxon; il confronto dei dati categorici è stato effettuato con il test Chi quadrato di McNemar.

Il livello di significatività alfa è stato a priori fissato a 0.05.

3. RISULTATI

Le variabili demografiche/comportamentali relative ai 40 pazienti oggetto di studio, suddivisi equamente fra diabetici e non diabetici, sono riportate nella *tabella 1*. I due gruppi sono risultati bilanciati in termini di parametri clinici e demografici/comportamentali ad eccezione della suppurazione.

I pazienti diabetici erano 9 donne e 11 maschi con un'età media di $56,5 \pm 9$ anni mentre i pazienti non diabetici, costituiti da 10 donne e 10 maschi, avevano un'età media di $49,5 \pm 14$ anni.

Riguardo l'abitudine al fumo, l'85% dei diabetici e il 70% dei non diabetici si sono dichiarati non fumatori; 2 diabetici e 1 non diabetico si possono considerare fumatori (≥ 10 sigarette al giorno). Non è stata osservata differenza statisticamente significativa tra i due gruppi per quanto riguarda il comportamento nei confronti del fumo ($p=0,331$).

Per quanto concerne i pazienti diabetici, il 100% era sottoposto a un regime di controllo metabolico (metformina, insulina e/o controllo con dieta). Al 65% è stato diagnosticato il diabete da meno di 15 anni, al restante da più di 15 anni.

<i>Variabili demografiche/ comportamentali</i>	<i>DM2</i>	<i>NDM</i>	<i>p</i>
Età media (ds)	56,5 (8,67)	49,5 (14,02)	0,065
N° maschi (%)	11 (55%)	10 (50%)	0,752
Mediana elementi dentari mancanti (range interquartile)	6 (1-8)	2 (1-5)	0,096
N° non fumatori (%)	17 (85%)	15 (75%)	
N° fumatori ≥ 10 (%)	2 (10%)	1 (5%)	0,331
N° fumatori < 10 (%)	1 (5%)	4 (20%)	

Tabella 1. Confronto variabili demografiche/comportamentali tra diabetici (DM2) e non diabetici (NDM).

La *tabella 2* riassume i dati relativi alle variabili cliniche sito-specifiche dei 160 siti esaminati.

Nei siti oggetto del test microbiologico (4 per ogni paziente) la profondità di sondaggio media nei diabetici non differiva significativamente da quella dei non diabetici ($p=0,706$) ed era rispettivamente $6,33 \pm 1,62$ mm nei primi e $6,42 \pm 1,77$ nei secondi.

La presenza di sanguinamento nei siti dei pazienti diabetici non differiva significativamente da quella dei non diabetici ($p=0,878$) mentre i siti con suppurazione erano 5 nel gruppo diabetico e 25 nell'altro ($p=0,0001$).

Non sono emerse correlazioni statisticamente significative tra profondità di sondaggio e cariche batteriche sia nei diabetici che nei non diabetici.

<i>Variabili sito specifiche</i>	DM2	NDM	<i>p</i>
Ppd Media (ds)	6,33 (1,62)	6,42 (1,77)	0,706
N° siti con BoP+ (%)	44 (55%)	42 (52,5%)	0,878
N° siti con Pus+ (%)	5 (6,3%)	25 (31,3%)	0,0001

Tabella 2. Confronto variabili sito specifiche tra diabetici (DM2) e non diabetici (NDM). Ppd = profondità di sondaggio (mm); BoP+ = siti con sanguinamento al sondaggio; Pus+ = siti con suppurazione al sondaggio.

La carica batterica totale ha mostrato una differenza statisticamente significativa ($p=0,001$) tra pazienti diabetici e pazienti non diabetici (*Tabella 3*).

<i>Carica batterica totale</i>	DM2	NDM	<i>P</i>
<i>mediana</i>	$2,9 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	0,001
<i>range interquartile</i>	$1,0 \times 10^6 - 2,01 \times 10^7$	$1,2 \times 10^6 - 3,4 \times 10^6$	

Tabella 3. Confronto delle cariche totali tra diabetici e non diabetici.

La *tabella 4* mostra il numero dei siti positivi al microrganismo esaminato nei due gruppi oggetto di studio. Non sono emerse differenze statisticamente significative nelle frequenze di rilevamento dei singoli patogeni nei siti dei due gruppi di soggetti.

	<i>DM2</i>	<i>NDM</i>
<i>Aa</i>	9	2
<i>Pg</i>	64	64
<i>Tf</i>	67	60
<i>Td</i>	65	70
<i>Fn</i>	74	76
<i>Pi</i>	35	26

Tabella 4. Confronto delle frequenze di rilevamento sito-specifiche di ogni patogeno tra diabetici (DM2) e non diabetici (NDM).

Le cariche batteriche dei parodontopatogeni in esame (*Tabella 5* e *Tabella 6*) sono risultate mediamente maggiori nei pazienti diabetici ad eccezione di *Aa* e di *Pi* che presentano il medesimo carico mediano in entrambi i gruppi, inferiore alla sensibilità del test ($<1,0 \times 10^2$). I batteri maggiormente rappresentati sia come carica mediana sia come percentuale rispetto alla carica totale erano in entrambi i gruppi *Td* seguito successivamente da *Pg*.

Nel complesso rosso è stata registrata una differenza statisticamente significativa nella carica batterica di *Pg* ($p=0,031$), *Td* ($p=0,030$) e *Tf* ($p=0,0001$). Il confronto delle cariche di ogni patogeno in rapporto alla carica totale (%) tra diabetici e non diabetici ha mostrato una differenza significativa solo per *Tf* ($p=0,0001$) mentre *Pg* e *Td* non differiscono statisticamente (rispettivamente $p=0,943$ e $p=0,392$).

I confronti delle cariche mediane dei batteri appartenenti al complesso arancione hanno mostrato una differenza statisticamente significativa per *Fn* ($p=0,01$), con un confronto della carica di *Fn* in rapporto alla carica totale che non differiva tra i due gruppi ($p=0,392$). La scarsa quantità di *Aa* e *Pi* in entrambi i gruppi non ha permesso un'elaborazione statistica.

Carica batterica				
		<i>DM2</i>	<i>NDM</i>	p
<i>Pg</i>	mediana	$3,1 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$	0,031
	range inter-quartile	$6,7 \times 10^2 - 4,3 \times 10^5$	$7,4 \times 10^2 - 1,8 \times 10^5$	
<i>Td</i>	mediana	$7,8 \times 10^4$	$4,3 \times 10^4$	0,030
	range inter-quartile	$2,3 \times 10^3 - 5,1 \times 10^5$	$2,6 \times 10^3 - 3,1 \times 10^5$	
<i>Tf</i>	mediana	$1,9 \times 10^4$	$3,2 \times 10^3$	0,0001
	range inter-quartile	$8,4 \times 10^2 - 3,6 \times 10^5$	$1,1 \times 10^2 - 3,1 \times 10^4$	
<i>Pi</i>	mediana	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	nd
	range inter-quartile	$1,0 \times 10^2 - 7,4 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2 - 1,3 \times 10^3$	
<i>Fn</i>	mediana	$1,4 \times 10^4$	$7,6 \times 10^3$	0,392
	range inter-quartile	$2,3 \times 10^3 - 8,2 \times 10^4$	$2,1 \times 10^3 - 2,1 \times 10^4$	
<i>Aa</i>	mediana	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	nd
	range inter-quartile	$1,0 \times 10^2 - 1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2 - 1,0 \times 10^2$	

Tabella 5. Confronto delle cariche mediane dei batteri appartenenti al Complesso Rosso, Complesso Arancione e *Aa* tra diabetici (DM2) e non diabetici (NDM).

% sulla carica totale				
		DM2	NDM	p
<i>Pg</i>	mediana	1,48%	0,86%	0,943
	range inter-quartile	0,02% -7,64%	0,05% -7,63%	
<i>Td</i>	mediana	2,66%	2,94%	0,392
	range inter-quartile	0,11% -10,49%	0,15% -12,57%	
<i>Tf</i>	mediana	1,14%	0,25%	0,0001
	range inter-quartile	0,06% -3,19%	0,01% -7,83%	
<i>Pi</i>	mediana	0%	0%	nd
	range inter-quartile	0%-0,20%	0%-0,04%	
<i>Fn</i>	mediana	0,40%	0,32%	0,392
	range inter-quartile	0,09%-1,40%	0,11%-0,99%	
<i>Aa</i>	mediana	0%	0%	nd
	range inter-quartile	0%-0%	0%-0%	

Tabella 6. Confronto delle cariche di ogni patogeno in rapporto alla carica totale (%) dei batteri appartenenti al Complesso Rosso, Complesso Arancione e *Aa* tra diabetici (DM2) e non diabetici (NDM).

L'esigua quantità di *Aa* in entrambi i gruppi non ha permesso l'utilizzo di analisi statistiche per i genotipi presenti.

Relativamente al confronto nella distribuzione dei genotipi di *Pg* (*Tabella 7*), analizzando in particolare il genotipo I verso il II, si è rilevato come tra diabetici e non diabetici non vi fossero differenze statisticamente significative ($p=0,25$). Nessuna differenza è stata inoltre osservata nell'associazione dei genotipi II+IV tra diabetici e non diabetici ($p=0,68$).

<i>DM</i>	<i>NDM</i>					<i>Totale</i>
	I	II	IV	I+II	II+IV	
I	0	0	0	0	4	4
II	3	12	0	4	0	19
I+II	2	0	4	0	0	6
II+IV	0	2	0	0	0	2
<i>Totale</i>	5	14	4	4	4	31

Tabella 7. Confronto dei genotipi di *Pg* tra diabetici e non diabetici.

4. CONCLUSIONE

Il presente studio retrospettivo, condotto con l'obiettivo principale di comparare le componenti microbiche subgingivali tra pazienti parodontopatici affetti e non da diabete mellito di tipo 2, ha ottenuto una forte congruenza e bilanciamento tra i due campioni analizzati sia per le variabili demografiche/comportamentali che per le sito specifiche. In questo contesto di equilibrio tra campioni, i risultati della presente ricerca sostengono l'ipotesi dell'esistenza di differenze microbiologiche in quadri di parodontite cronica tra soggetti affetti e non da diabete mellito di tipo 2. Dall'analisi effettuata è emerso *Tf* quale batterio maggiormente associato alla parodontite nel paziente diabetico.

I risultati del confronto dei genotipi delle fimbrie di *Pg* all'interno dei due gruppi di studio suggeriscono che il diabete mellito di tipo 2 non influisca su questo fattore di virulenza.

La migliore comprensione della relazione tra diabete, biofilm parodontale e risposta dell'ospite è un prerequisito per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per affrontare con maggior efficacia la parodontite. Sono raccomandabili ulteriori ricerche su un campione più ampio di soggetti volte ad esaminare un maggior numero di batteri al fine di valutare l'influenza di differenti specie microbiche nell'ambiente subgingivale del paziente affetto da diabete di tipo 2. Rilevante importanza assume inoltre la determinazione dei singoli patogeni in rapporto alla carica batterica totale.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Osservatorio ARNO diabete. Il profilo assistenziale della popolazione con diabete. Rapporto 2015
- 2) Loe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1993;16:329-34.
- 3) Papapanou PN. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol* 1996;1:1-36.
- 4) Bascones-Martínez A, González-Febles J, Sanz-Esporrín J. Diabetes and periodontal disease. Review of the literature. *Am J Dent*. 2014 Apr;27(2):63-7.
- 5) Kumar M, Mishra L, Mohanty R, Nayak R. "Diabetes and gum disease: the diabolic duo". *Diabetes Metab Syndr*. 2014 Oct-Dec;8(4):255-8.
- 6) Campus G, Salem A, Uzzau S, Baldoni E, Tonolo G. Diabetes and periodontal disease: A case-control study. *J Periodontol* 2005;76:418-425.
- 7) Davila-Perez C, Amano A, Alpuche-Solis AG, et al. Distribution of genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in type 2 diabetic patients with periodontitis in Mexico. *J Clin Periodontol* 2007;34:25-30.
- 8) Ojima M, Takeda M, Yoshioka H, et al. Relationship of periodontal bacterium genotypic variations with periodontitis in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2005;28:433-434.
- 9) Sbordone L, Ramaglia L, Barone A, Ciaglia RN, Iacono VJ. Periodontal status and subgingival microbiota of insulin-dependent juvenile diabetics: A 3-year longitudinal study. *J Periodontol* 1998;69:120-128.
- 10) Hintao J, Teanpaisan R, Chongsuvivatwong V, Ratarasan C, Dahlen G. The microbiological profiles of saliva, supragingival and subgingival plaque and dental caries in adults with and without type 2 diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22: 175-181.
- 11) Field CA, Gidley MD, Preshaw PM, Jakubovics N. Investigation and quantification of key periodontal pathogens in patients with type 2 diabetes. *J Periodontal Res* 2012;47:470-478.
- 12) Sanz M, van Winkelhoff AJ; Working Group 1 of Seventh European Workshop on Periodontology. Periodontal infections: understanding the complexity-consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2011 Mar;38 Suppl 11:3-6.
- 13) Topcuoglu N, Kulekci G. 16S rRNA based microarray analysis of ten periodontal bacteria in patients with different forms of periodontitis. *Anaerobe*. 2015 Jan 29.
- 14) Socransky SS, Haffajee AD. The Bacterial Etiology of Destructive Periodontal Disease: Current Concepts. *Journal of Periodontology*, April 1992, Vol. 63, No. 4s, Pages 322-331.

- 15) Mdala I, Olsen I, Haffajee AD, Socransky SS, de Blasio BF, Thoresen M. Multilevel analysis of bacterial counts from chronic periodontitis after root planing/scaling, surgery, and systemic and local antibiotics: 2-year results. *J Oral Microbiol.* 2013 Jul 9;5.
- 16) Yang NY, Zhang Q, Li JL, Yang SH, Shi Q. Progression of periodontal inflammation in adolescents is associated with increased number of Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Tannerella forsythensis, and Fusobacterium nucleatum. *Int J Paediatr Dent.* 2014 May;24(3):226-33.
- 17) Tomita S, Komiya-Ito A, Imamura K, Kita D, Ota K, Takayama S, Makino-Oi A, Kinumatsu T, Ota M, Saito A. Prevalence of Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythia in Japanese patients with generalized chronic and aggressive periodontitis. *Microb Pathog.* 2013 Aug-Sep;61-62:11-5.
- 18) Papapanou PN, Baelum V, Luan WM, Madianos PN, Chen X, Fejerskov O, Dalhén G. Subgingival microbiota in adult Chinese: prevalence and relation to periodontal disease progression. *J Periodontol* 1997;68: 651-666.
- 19) Haffajee AD, Socransky SS, Smith C, Dibart S. Relation of baseline microbial parameters to future periodontal attachment loss. *J Clin Periodontol* 1991;18:744-750.
- 20) Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agent of destructive periodontal disease. *Periodontol 2000* 1994;5:78-111.
- 21) Nakagawa I, Amano A, Kuboniwa M, Nakamura T, Kawabata S, Hamada S. Functional differences among fimA variants of Porphyromonas gingivalis and their effects on adhesion to and invasion of human epithelial cells. *Infect Immun.* 2002; 70: 277-85
- 22) Amano A, Kuboniwa M, Nakagawa I, Akiyama S, Morisaki I, Hamada S. Prevalence of specific genotypes of Porphyromonas gingivalis fimA and periodontal health status. *J Dent Res.* 2000 Sep;79(9):1664-8.
- 23) Miura M, Hamachi T, Fujise O, Maeda K. The prevalence and pathogenic differences of Porphyromonas gingivalis fimA genotypes in patients with aggressive periodontitis. *J Periodontal Res.* 2005 Apr;40(2):147-52.
- 24) Nakagawa I, Amano A, Ohara-Nemoto Y, Endoh N, Morisaki I, Kimura S, Kawabata S, Hamada S. Identification of a new variant of fimA gene of Porphyromonas gingivalis and its distribution in adults and disabled populations with periodontitis. *J Periodontal Res.* 2002 Dec;37(6):425-32.
- 25) Nakano K, Kuboniwa M, Nakagawa I, Yamamura T, Nomura R, Okahashi N, Ooshima T, Amano A. Comparison of inflammatory changes caused by Porphyromonas gingivalis with distinct fimA genotypes in a mouse abscess model. *Oral Microbiol Immunol.* 2004 Jun;19(3):205-9.
- 26) Henderson B, Ward JM, Ready D. Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans: a triple A* periopathogen? *Periodontol 2000* 2010; 54: 78105.

- 27) Baehni PC, Tsai C-C, McArthur WP, Hammond BF, Shenker BJ, Taichman NS. Leukotoxic activity in different strains of the bacterium *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from juvenile periodontitis in man. *Arch Oral Biol* 1981; 26: 6716.
- 28) Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol 2000* 1999; 20: 13667.
- 29) Johansson A. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin: a powerful tool with capacity to cause imbalance in the host inflammatory response. *Toxins* 2011; 3: 24259. 13.
- 30) Brogan JM, Lally ET, Poulsen K, Kilian M, Demuth DR. Regulation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin expression: analysis of the promoter regions of leukotoxic and minimally leukotoxic strains. *Infect Immun.* 1994;62:501-8
- 31) Zambon JJ, Haraszthy VI. The laboratory diagnosis of periodontal infections. *Periodontol 2000.* 1995;7:69–82.
- 32) Dwivedi S, Verma SJ, Shah M, Jain K. Can gingival crevicular blood be relied upon for assessment of blood glucose level? *N Y State Dent J.* 2014 Nov;80(6):38-42.
- 33) Mussavira S, Dharmalingam M, Omana Sukumaran B. Salivary glucose and antioxidant defense markers in type II diabetes mellitus. *Turk J Med Sci.* 2015;45(1):141-7.
- 34) Gupta S, Sandhu SV, Bansal H, Sharma D. Comparison of salivary and serum glucose levels in diabetic patients. *J Diabetes Sci Technol.* 2015 Jan;9(1):91-6.
- 35) Yamaguchi M, Takada R, Kambe S, Hatakeyama T, Naitoh K, Yamazaki K, Kobayashi M. Evaluation of time-course changes of gingival crevicular fluid glucose levels in diabetics. *Biomed Microdevices.* 2005 Mar;7(1):53-8.
- 36) Feitosa AC, de Uzeda M, Novaes AB Jr. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Brazilian insulin-dependent individuals with diabetes mellitus. *Braz Dent J* 1992; 3:25–31.
- 37) Mashimo PA, Yamamoto Y, Slots J, Park BH, Genco RJ. The periodontal microflora of juvenile diabetics. Culture, immunofluorescence, and serum antibody studies. *J Periodontol* 1983;54:420–430.
- 38) Sastrowijoto SH, Hillemans P, van Steenberghe TJ, Abraham-Inpijn L, de Graaff J. Periodontal condition and microbiology of healthy and diseased periodontal pockets in type 1 diabetes mellitus patients. *J Clin Periodontol* 1989;16:316–322.
- 39) Ohlrich EJ, Cullinan MP, Leichter JW. Diabetes, periodontitis, and the subgingival microbiota. *J Oral Microbiol* 2010;2: 5818. 18)
- 40) Taylor J. J., Preshaw P. M., Lalla E. A review of the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *Journal of Periodontology.* 2013;84(4, supplement):S113–S134.
- 41) Armitage GC Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999 Dec;4(1):1-6.

- 42) Yuan K, Chang CJ, Hsu PC, Sun HS, Tseng CC, Wang JR. Detection of putative periodontal pathogens in non-insulin-dependent diabetes mellitus and non-diabetes mellitus by polymerase chain reaction. *J Periodontal Res.* 2001 Feb;36(1):18-24.