

CARATTERIZZAZIONE METAGENOMICA DEL MICROBIOMA PERI-IMPLANTARE: VERSO UNA NUOVA DEFINIZIONE DEI MICRORGANISMI ASSOCIATI A MUCOSITE E PERI-IMPLANTITE

Paolo Ghensi*, **Paolo Manghi***, **Moreno Zolfo***, **Edoardo Pasoli***, **Federica Armanini***, **Alberto Bertelle****, **Federico Dell'Acqua*****, **Ester Dellasega******, **Romina Waldner*******, **Claudio Soldini*******, **Cristiano Tomasi*******, **Nicola Segata***

** CIBIO (Centre for Integrative Biology), University of Trento, Trento, Italy; ** Private Practice, Trento; *** Private Practice, Pergine Valsugana; **** Private Practice, Cavalese; ***** Consultant, Trento; ***** Department of Neurosciences, University of Padova, Padova; ***** Department of Periodontology, University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden*

Abstract

Mucositis affects 50% to 90% of implants, while the prevalence of peri-implantitis ranges from 15 to 23%.

The etiology of peri-implant diseases is connected with several factors, with microbial colonization being one of the most relevant. A thorough profiling of the microorganisms associated with these diseases is thus the first step to undertake in order to develop novel prevention and therapeutic strategies. Available studies, however, adopted study designs which are not accounting for inter-subject variability, focused on few cultivable microbes, or used low-resolution microbial profiling. We recruited a large cohort of healthy/mucositis/peri-implantitis patients sampled longitudinally and with both healthy and intra-subject controls (contralateral implants/teeth). We applied high resolution shotgun metagenomics to sequence the genetic material of the entire ecosystem of microorganisms - the microbiome - present in the subgingival environment. Metagenomic profiles highlighted a very distinctive microbial signature associated with peri-implantitis implants as compared to healthy controls. Moreover there were no substantial differences between healthy contralateral controls and healthy implants in patients not affected by disease. This indicates peri-implantitis is, microbiologically, a site-specific rather than a patient-specific disease. Overall our work points at the very high potential of metagenomics and the plaque microbiome as a prognostic and predictive clinical approach for peri-implantitis.

Riassunto

La mucosite affligge dal 50 al 90% degli impianti, mentre la prevalenza della peri-implantite varia dal 15 al 23 %.

L'ipotesi alla base del nostro studio è che l'eziologia delle malattie peri-implantari sia collegata a una combinazione di diversi fattori, con la colonizzazione microbica tra i più rilevanti. Una caratterizzazione accurata dei microrganismi associati a tali malattie è quindi il primo passo da compiere per sviluppare nuove strategie preventive e terapeutiche. Gli studi disponibili, tuttavia, hanno adottato disegni di studio che non tengono conto della variabilità tra soggetti, focalizzandosi su pochi microrganismi coltivabili o utilizzando tecniche di caratterizzazione a bassa risoluzione.

Nel nostro studio abbiamo reclutato un'ampia coorte di pazienti sani, con mucosite e con peri-implantite sottoposti a prelievo microbiologico longitudinale e con controlli sani intra-soggetto (impianti/denti controlaterali). Abbiamo impiegato tecniche metagenomiche ad alta risoluzione di tipo shotgun per sequenziare il materiale genetico dell'intero ecosistema di microrganismi - il microbioma - presente nell'ambiente sottogengivale. I profili metagenomici

hanno evidenziato un tratto microbico distintivo associato agli impianti interessati dalla peri-implantite rispetto ai controlli sani. Inoltre non ci sono state differenze sostanziali tra controlli controlaterali sani e impianti sani in pazienti non affetti da malattia. Ciò indica che la peri-implantite è, da un punto di vista microbiologico, una malattia sito-specifica piuttosto che paziente-specifica. Nel complesso, il nostro lavoro punta sull'alto potenziale della metagenomica e sul microbioma della placca come approccio clinico prognostico e predittivo per la peri-implantite.

Introduzione

Mucosite e peri-implantite rappresentano serie complicanze dopo il trattamento implantare e negli ultimi tre decenni si è assistito ad una progressiva diffusione di queste due “nuove” patologie orali. Gli studi indicano che la mucosite affligge dal 50% al 90% degli impianti, mentre la prevalenza della peri-implantite è in continua crescita e varia dal 15 al 23% (1,2,3). Ciò significa che un quinto di tutti gli impianti dentali inseriti è affetto da una malattia, che nella maggior parte dei casi porta alla perdita diretta dell'impianto o comunque alla necessità di doverlo rimuovere (4).

L'eziologia precisa delle patologie peri-implantari rimane ancora non completamente nota. È appurato come la colonizzazione batterica giochi un ruolo fondamentale nell'eziologia di queste malattie, anche se permane ampio dibattito sul fatto che questa sia principalmente correlata a un problema di suscettibilità dell'ospite o a fenomeni legati alla superficie implantare o ad entrambi i fattori (5,6). Gli interventi terapeutici attuali, inoltre, si basano su un paradigma di somiglianza microbica con le malattie parodontali ma i risultati di queste terapie sono stati piuttosto modesti, con tassi di recidiva particolarmente elevati, suggerendo che la componente microbica potrebbe non essere così simile alla parodontite come precedentemente ritenuto (7,8). Sebbene alcuni patogeni parodontali noti possano essere associati anche all'eziologia della peri-implantite, è probabile che diversi microrganismi siano coinvolti in queste due condizioni così clinicamente distinte (9,10). Una caratterizzazione approfondita dei microrganismi associati alle malattie peri-implantari è quindi il primo passo da compiere per ipotizzare nuovi approcci di prevenzione e trattamento.

Indagini sui microrganismi coinvolti nelle principali malattie orali vengono eseguiti ormai da decenni, ma la recente rivoluzione nelle tecnologie per “leggere” il materiale genetico (DNA) delle comunità microbiche senza necessità della loro coltivazione ha rivoluzionato il settore (11). Tramite il sequenziamento diretto del materiale genetico presente in un campione orale (ad esempio un campione di placca sopragengivale o sottogengivale) è possibile studiare l'ecosistema di microrganismi batterici, virali, micro-eucariotici e arcaici - il cosiddetto microbioma - presente nell'ambiente dentale. Tali tecniche, chiamate metagenomiche, hanno il vantaggio fondamentale di evitare completamente la fase di coltivazione che richiede molto tempo e che può individuare con i protocolli di coltura noti solo una minima frazione di microrganismi realmente presenti (12). Ciò ha portato alla recente mappatura del microbioma in individui sani all'interno del più grande sforzo di sequenziamento metagenomico eseguito finora (Human Microbiome Project) ed ha fornito le basi per lo studio del microbioma nelle malattie orali (13).

Gli studi microbiologici attualmente disponibili sulle patologie peri-implantari, tuttavia, hanno adottato disegni di studio che non tengono conto della variabilità tra i vari soggetti e, a parte le tecniche molecolari “low throughput”, il metodo più avanzato per indagare e caratterizzare il microbioma peri-implantare fino ad oggi è stato unicamente attraverso tecniche di sequenziamento a bassa risoluzione di tipo 16S (14-20).

Diversamente, il nostro gruppo ha già dimostrato le potenzialità delle innovative tecniche metagenomiche computazionali di tipo “shotgun” per caratterizzare il microbioma orale ad altissima risoluzione (21), quindi ci proponiamo di indagare anche il microbioma peri-implantare sia in stato di salute che di malattia attraverso tali tecniche di sequenziamento. Le tecniche metagenomiche di tipo “shotgun” rappresentano lo strumento attualmente più all'avanguardia per lo studio del microbioma e sono state ampiamente impiegate e validate nel corso dello Human Microbiome Project (22). (Fig. 1)

La nostra ipotesi di fondo è che l'eziologia delle malattie peri-implantari sia collegata a una combinazione di diversi fattori, con la colonizzazione microbica tra i più rilevanti. Sulla base delle lezioni apprese dalla microbiologia, dall'epidemiologia microbica e dallo studio delle malattie parodontali (23,24), vi sono ragioni per ritenere che membri specifici della diversità microbica orale rappresentino un prerequisito per l'insorgenza e la progressione della malattia. Inoltre, ipotizziamo che i fattori microbici coinvolti nella peri-implantite potrebbero essere presenti nel microbioma orale dei soggetti ancora prima della manifestazione della malattia.

Quindi, nel nostro studio abbiamo studiato il microbioma della placca associato alla peri-implantite per identificare specifici organismi microbici, geni e fattori di virulenza associati a questa condizione con l'obiettivo finale di capire quale sia il ruolo dei microorganismi e dell'ecologia microbica nell'eziologia delle malattie peri-implantari. Il nostro innovativo disegno di studio longitudinale ha incluso pazienti sani, pazienti con mucosite e pazienti con peri-implantite. Il dente controlaterale sano rispetto all'impianto è stato anch'esso campionato per regolare l'elevata variabilità tra soggetti e per testare il microbioma della placca sottogengivale di denti sani in pazienti con malattia peri-implantare. Questo approccio non è mai stato utilizzato per studiare le malattie peri-implantari e potrebbe consentire di identificare biomarkers significativi per la malattia e nuovi potenziali approcci diagnostici e terapeutici.

Materiali e Metodi

Reclutamento pazienti

Questo studio è stato concepito presso il CIBIO (Centre for Integrative Biology) dell'Università di Trento, approvato dal comitato etico dell'Università di Trento (numero 2015-024) ed è stato condotto in conformità con le linee guida della Dichiarazione di Helsinki. Pazienti sottoposti a pregressa terapia implantare sono stati arruolati in sei diversi studi privati nella provincia di Trento (Italia) per questo progetto.

I criteri di inclusione comprendevano un buono stato di salute generale, età superiore ai 18 anni, non meno di 8 denti naturali residui, almeno un impianto orale funzionante riabilitato da almeno 1 anno, disponibilità a partecipare allo studio. I criteri di esclusione comprendevano la gravidanza, l'HIV, l'uso di farmaci immunosoppressori, bifosfonati o steroidi, l'uso di clorexidina nelle 2 settimane precedenti al prelievo, procedure profilattiche orali negli ultimi 3 mesi, l'assunzione di antibiotici sistemici o probiotici negli ultimi 6 mesi.

I pazienti sono stati selezionati nei diversi studi privati e sono stati inclusi in uno dei seguenti gruppi di studio in base allo stato di salute dei loro impianti dentali: a) Stato di salute (pazienti con almeno un impianto sano ma senza impianti con mucosite o peri -

implantite), b) Mucosite (pazienti con almeno un impianto con mucosite ma senza impianti con peri-implantite), c) Peri-implantite (Pazienti con almeno un impianto con peri-implantite).

La selezione e l'inclusione dei pazienti in uno dei gruppi si è basata sulla valutazione radiografica del livello dell'osso marginale, segni clinici di infiammazione e/o presenza di suppurazione secondo i criteri delineati dal Consensus Report sulle malattie peri-implantari (25).

Raccolta dati e esame clinico

Sei parodontologi esperti e calibrati hanno esaminato tutti i pazienti.

Sono stati registrati i parametri demografici di genere ed età e una anamnesi medica e dentale completa, seguita da un esame clinico parodontale e implantare di tutta la bocca.

L'anamnesi medica comprendeva informazioni su abitudine al fumo, diabete, malattie autoimmuni o altre malattie, consumo di alcol, farmaci assunti, mentre l'anamnesi dentale comprendeva informazioni sul numero di impianti, numero di denti residui, storia di parodontite, stato parodontale attuale, peri-implantite pregressa, frequenza di igiene orale domiciliare, ore dall'ultimo spazzolamento, uso di clorexidina. Parametri clinici inclusi sito di prelievo, diagnosi dell'età dell'impianto (tempo dall'installazione), sistema implantare utilizzato, tipo di riabilitazione, tipo di ritenzione (avvitata, cementata, conometrica), perdita ossea radiografica, ampiezza mucosa cheratinizzata (KM), indice di placca (PI), sanguinamento al sondaggio (BOP), profondità di sondaggio (PPD) e suppurazione (SUP). Gli ultimi quattro parametri sono stati misurati nei siti buccali, mesiali, linguali e distali di ciascun impianto e dente selezionato. PI, BOP e SUP sono stati registrati su una scala binaria (presenza / assenza) per ogni superficie e il PPD è stato misurato al millimetro più vicino sulla scala.

Raccolta dei campioni, estrazione del DNA e sequenziamento shotgun con Illumina

I campioni microbiologici sono stati prelevati in modo completamente non invasivo utilizzando un protocollo basato su quello validato e adottato nel corso dello Human Microbiome Project (HMP) (22). I campioni sono stati raccolti con repliche tecniche (2 campioni/ogni sito) da un singolo impianto e dal dente/impianto controlaterale sano (se presente, un impianto sano è stato preferito come sito sano controlaterale) per ciascun paziente in ciascun gruppo di studio.

I campioni sono stati raccolti al baseline (T0), dopo 1 mese (T1) e dopo 7 mesi (T2). Il prelievo T1 è stato eseguito esclusivamente nei gruppi Mucosite e Peri-implantite per valutare l'effetto del trattamento sul microbioma peri-implantare dopo 1 mese oltre che dopo 7 mesi.

I siti selezionati sono stati isolati usando rulli di cotone per prevenire la contaminazione con la saliva e delicatamente asciugati, e la placca sopragengivale è stata rimossa usando pellets di cotone sterili. I campioni di placca subgengivali sono stati prelevati dal sito di sondaggio più profondo con singole curettes di Gracey sterili e posizionati immediatamente in provette Eppendorf da 1,5 mL contenenti soluzione buffer SCF-1 sterile (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 8,0; 0,5% Tween-20) e congelate a -80 °C per analisi successive.

Il DNA genomico totale è stato isolato utilizzando il kit QIAamp DNA Mini (Qiagen, Hilden, Germania) con un'ulteriore fase di distruzione meccanica per la lisi completa

delle specie gram-positive e gram-negative. Il DNA isolato è stato conservato a -20°C . Ciascun metagenoma è stato quantificato e in caso di materiale sufficiente ($> 1\text{ ng}$) sono state preparate le librerie attraverso il kit DNA Nextera-XT (Illumina Inc, San Diego, USA) seguendo il protocollo del produttore. Le librerie sono state sequenziate ($2 \times 100\text{ bp}$) sulla piattaforma Illumina HiSeq-2000.

Sequenze, controllo qualità e sottocampionamento

I metagenomi grezzi generati sono stati elaborati con FastqMcf (26) tagliando le posizioni con qualità <15 , rimuovendo letture di bassa qualità (qualità media <25) e scartando read più brevi di 90 nt. DNA umano e batteriofago phiX174 (Illumina spike-in) sono stati quindi rimossi usando BowTie2 (27) per mappare le read contro genomi di riferimento.

Profili tassonomici e funzionali

I campioni metagenomici sono stati tassonomicamente caratterizzati utilizzando MetaPhlAn 2 (28, 29) con impostazioni parametriche predefinite. MetaPhlAn è uno strumento che mappa le shotgun read rispetto a un database di marcatori specifici di specie ed è in grado di produrre una risoluzione a livello di specie e le abbondanze relative di ogni specie in un campione.

Per il profilo funzionale dei metagenomi è stato usato HUMAnN (30) (con impostazioni parametriche di default), che è basato su pathways e moduli KEGG. (31)

Analisi della diversità

Per garantire l'equità del confronto, la diversità alfa e beta sono stata calcolata su campioni spaiati a 50k read (dopo la rimozione del DNA umano) ciascuno. La ricchezza totale delle specie per ciascun campione è stata calcolata come il numero totale di specie identificate usando MetaPhlAn 2. Sono state calcolate la diversità tra metagenomi dello stesso individuo (diversità intra-beta) e tra individui (diversità inter-beta) usando la matrice di distanza Bray-Curtis. (33)

Analisi machine-learning

Classificazione random forest. È stata valutata la forza di predizione dei dati metagenomici nel collegare il microbioma peri-implantare allo stato di salute o di malattia. Questo compito è stato valutato attraverso un approccio classificativo di apprendimento automatico Random Forest (34) in cui sono state usate l'abbondanza delle specie o le caratteristiche funzionali per discriminare tra campioni sani e malati. (35)

L'intera analisi è stata condotta attraverso un approccio di cross-validation. In particolare, l'accuratezza della predizione è stata valutata mediante validazione incrociata 10 volte, ripetuta e calcolata su 20 esecuzioni indipendenti. Le prestazioni di classificazione sono state valutate in termini di AUC statistica.

Il framework del software utilizzato per questi esperimenti è disponibile online all'indirizzo <http://segatalab.cibio.unitn.it/tools/metaml>. (35)

Risultati

Coorte e caratteristiche cliniche dei pazienti

108 pazienti (55 maschi, 53 femmine, età media 61.9 ± 9.8 anni) che hanno contribuito con un impianto e un dente controlaterale (due impianti se anche il sito controlaterale sano era un impianto) per paziente sono stati arruolati per questo studio tra Marzo 2016 e Ottobre 2017.

Di seguito verranno presentati i risultati preliminari, provvisori ed ongoing relativi al T0, mentre i dati longitudinali relativi al T1 e al T2 sono ancora in fase di raccolta, di sequenziamento metagenomico o di elaborazione computazionale.

L'analisi delle caratteristiche demografiche e dei parametri clinici della popolazione campionata ha mostrato che i gruppi di studio che comprendevano soggetti con un impianto sano (H, N = 47), un impianto con mucosite (M, N = 29) e un impianto con peri-implantite (P, N = 32) sono stati confrontati per età, sesso, sito implantare, tipo di impianto, età dell'impianto, tipo di restauro e tipo di ritenzione e non sono emerse differenze significative tra questi tre gruppi ($p > 0,05$). I pazienti con storia di parodontite comprendevano il 38,9 % del campione, i fumatori il 20,4%, ed i pazienti diabetici il 7,4%; anche per queste tre caratteristiche i gruppi di studio risultavano omogenei tra loro ($p > 0,05$).

Quando i parametri clinici sono stati considerati a livello di impianto, PPD, PI, BOP e la perdita di tessuto osseo era significativamente più alta nella peri-implantite rispetto al gruppo di salute perimplantare ($p < 0,05$). Differenze significative tra i gruppi sono state osservate per i parametri clinici che li hanno definiti ($p < 0,0001$).

Campioni microbiologici

In seguito alle varie fasi di estrazione del DNA, preparazione delle librerie, sequenziamento genomico, analisi primaria, analisi secondaria e validazione, un totale di 111 campioni microbiologici sono risultati idonei ad essere sottoposti ad analisi computazionale per lo studio delle caratteristiche del microbioma.

Il pool è risultato costituito da 25 campioni da impianti sani, 16 campioni da impianti con mucosite, 22 campioni da impianti con peri-implantite, 48 campioni da elementi (denti/impianti) sani controlaterali.

Risultati generali - Heatmap (Fig. 2)

Nella heatmap, dove all'aumentare dell'intensità di colore corrisponde un maggiore abbondanza relativa delle specie microbiche, sono rappresentati sull'asse delle X i 111 campioni microbiologici mentre sull'asse delle Y le 50 specie batteriche più abbondanti.

L'analisi computazionale dei 111 campioni microbiologici ha individuato in totale la presenza di 325 specie batteriche, con una media di 51 specie batteriche per ogni campione.

Nessuna specie microbica è risultata presente contemporaneamente in tutti i campioni, sottolineando come ogni campione possieda una propria composizione altamente individuale e specifica in termini di microbioma.

Un forte tratto del microbioma nei siti con peri-implantite (Fig. 3)

In questo grafico di ordinamento gli assi X e Y consentono una distribuzione spaziale dei campioni microbiologici e ogni punto rappresenta un campione diverso. La distanza tra i campioni non riflette alcuna misura biologica ed è il più proporzionale possibile rispetto alla reale distanza tra i campioni sulla base del loro microbioma. In questo modo è possibile osservare quali campioni tendono a clusterizzare insieme, colorarli sulla base della loro condizione e osservare la presenza di schemi macroscopici evidenti.

In questo grafico è stato scelto il colore verde per i campioni sani, il colore rosso per i campioni di mucosite e il blu per i campioni di peri-implantite.

In primo luogo, il grafico mostra chiaramente come i campioni di peri-implantite, sulla sinistra, possono essere riconosciuti distintamente dai campioni sani, sulla destra, e questo denota come il nucleo del microbioma dei campioni di peri-implantite sia nettamente diverso da quello di campioni sani. In secondo luogo, ma non meno importante, vi è una chiara tendenza dei campioni di peri-implantite a clusterizzare insieme e questa è un'indicazione di come i campioni di peri-implantite siano significativamente più simili tra loro rispetto ai campioni sani.

Da questo grafico è quindi chiaro che un tratto distintivo del microbioma è molto più evidente negli impianti con peri-implantite rispetto agli impianti in stato di salute.

La mucosite mostra un tratto microbico intermedio tra peri-implantite e stato di salute (Fig. 4)

In questo grafico di ordinamento deve essere focalizzata l'attenzione sui campioni microbiologici prelevati da siti implantari con mucosite. Tali campioni, in rosso, sono ben distribuiti tra campioni di peri-implantite e campioni sani, con una maggiore tendenza verso i campioni di peri-implantite. Ciò significa che la mucosite mostra un tratto microbico intermedio e non definito tra peri-implantite e stato di salute, cioè in alcuni pazienti la composizione del microbioma associato alla mucosite è più simile a un microbioma sano mentre in altri pazienti, la maggior parte, è più simile al microbioma associato alla peri-implantite.

Questa osservazione è molto importante in quanto sottolinea che ci sono probabilmente diversi livelli di gravità della mucosite, ma questa osservazione potrà essere confermata solo con i dati longitudinali attualmente in fase di elaborazione. Alcuni casi, vedi quelli con un microbioma più simile alla peri-implantite, potrebbero essere probabilmente più difficili da trattare e potrebbero avere un maggiore rischio di evoluzione in peri-implantite mentre quelli con un microbioma più sano potrebbero essere mucositi più lievi. In tale contesto, tuttavia, si dovrà indagare se la mucosite con un microbioma più simile allo stato di salute sia dovuta al fatto che la mucosite si trovi in uno stato iniziale o in realtà abbia effettivamente un'aggressività inferiore.

A prescindere da ciò, va sottolineato, tuttavia, l'importanza che l'analisi del microbioma associato alla mucosite potrebbe avere al fine di comprendere l'effettivo stato della malattia e il rischio individuale di sviluppare peri-implantite.

Il microbioma della peri-implantite è sito specifico (Fig. 5)

Questo grafico di ordinamento mostra campioni microbiologici prelevati da un dente controlaterale sano (o impianto sano) nella bocca di pazienti con un impianto/i sani, colore verde, con almeno un impianto con mucosite, colore rosso, e con almeno un impianto con peri-implantite, colore blu.

Dalla distribuzione è chiaro come i campioni controlaterali sani appartenenti ai tre diversi gruppi siano diffusi e ben distribuiti e non presentino differenze sostanziali tra loro in termini di composizione del microbioma. Inoltre, la distribuzione sembra molto simile a quella dei campioni microbiologici prelevati da impianti test sani. Campioni controlaterali sani hanno naturalmente una loro composizione microbica propria ma non è presente né un marcato tratto microbico né alcun tipo di clusterizzazione.

Questa informazione è di fondamentale importanza perché permette di dedurre come il microbioma associato alla peri-implantite sia sito-specifico. Nel dettaglio, si dimostra come il microbioma di siti sani, sia in pazienti sani che in pazienti con peri-implantite, sia sovrapponibile e quindi come il microbioma della peri-implantite dipenda dal singolo sito implantare e non sia legato alla bocca del paziente. Di conseguenza, appare come sia molto probabile che la previsione della peri-implantite non possa essere effettuata a priori in pazienti implantari sani in base alla composizione del loro microbioma dentale generale, ma solo attraverso la valutazione di possibili cambiamenti nella composizione del microbioma peri-implantare locale.

Alte capacità predittive di un sistema di apprendimento automatico (Fig. 6)

E' stata valutata la capacità di un sistema di apprendimento automatico (Machine learning) attraverso l'algoritmo statistico random forest di decifrare lo stato di salute o di malattia di un campione sulla base della composizione del microbioma peri-implantare.

È emerso come la peri-implantite possa essere essere predetta quasi perfettamente rispetto allo stato di salute (Auc 0.92) in base alla composizione microbica, confermando il tratto altamente distintivo del microbioma della peri-implantite.

Il sistema di apprendimento automatico ha confermato come la mucosite rappresenti una condizione intermedia, essendo essa più difficilmente predicibile rispetto allo stato di salute (Auc 0.81) ed ancora di più rispetto alla peri-implantite (Auc 0.75).

Diverse specie microbiche caratterizzano ogni condizione clinica

Il tool LEFSE ha permesso di valutare in termine di presenza e di abbondanza le specie microbiche maggiormente differenziali tra le diverse condizioni cliniche (Peri-implantite vs Mucosite, Peri-implantite vs Sano, Mucosite vs Sano) e valutato la dimensione dell'effetto (Effect size) di tale differenza attraverso la Linear discriminant analysis (LDA).

È emerso come *Porphyromonas Gingivalis*, *Tannerella Forsythia*, *Porphyromonas Endodontalis*, *Prevotella Intermedia* e *Fretibacterium Fastidiosum* siano le specie microbiche maggiormente differenzianti il microbioma della peri-implantite rispetto sia allo stato di salute che alla mucosite.

È emerso invece come le specie microbiche differenzianti la mucosite rispetto allo stato di salute (*Fusobacterium Nucleatum*, *Eubacterium brachy*, *Parvimonas unclassified*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Treponema denticola*) ed alla peri-implantite (*Prevotella Oris*, *Prevotella Nigrescens*, *Veilonella parvula*, *Selenomonas noxia*, *Neisseria unclassified*) non siano univoche, ma ben diverse tra loro con nessuna specie in comune, sottolineando ancora una volta come il microbioma associato alla mucosite abbia un tratto intermedio significativamente meno distintivo di quello della peri-implantite e dello stato di salute.

Conclusioni

La caratterizzazione del microbioma sottomucoso peri-implantare attraverso tecniche di sequenziamento metagenomico ad alta risoluzione di tipo shotgun si rileva come un potente predittore di malattia suggerendo possibili approcci diagnostici e terapeutici basati sull'analisi dei tratti microbici.

I dati hanno mostrato chiaramente come il microbioma della peri-implantite sia sito-specifico e non paziente-specifico, caratterizzato da un marcato tratto microbico distintivo e predittivo di patologia.

La mucosite, oltre che clinicamente, anche dal punto di vista microbico rappresenta una condizione intermedia, in alcuni casi più simile allo stato di salute e in altri alla peri-implantite lasciando presupporre l'esistenza di mucositi con severità e risposta al trattamento differente.

È risultata evidente l'impossibilità di individuare antecedentemente alla terapia implantare pazienti a maggior rischio di sviluppare peri-implantite sulla base del loro microbioma dentale/implantare sano, in quanto anche nella bocca di pazienti che sviluppano patologia il microbioma sano non manifesta alterazioni evidenti.

Il microbioma specifico della peri-implantite sembra essere caratterizzato da specie batteriche ulteriori e diverse rispetto a quelle dei complessi microbici di Socransky tradizionalmente associati alla eziologia delle malattie parodontali. Pur rimanendo evidente il legame con due delle tre specie del Red complex quali *Porphyromonas Gingivalis* e *Tannerella Forsythia*, è chiara una forte associazione della peri-implantite rispetto alla parodontite con “nuove specie” batteriche quali *Porphyromonas Endodontalis* e *Fretibacterium Fastidiosum*.

Ringraziamenti

Si ringraziano tutti i pazienti volontari che hanno partecipato a questo progetto, tutto il personale degli studi dentistici privati, il Laboratorio di Metagenomica Computazionale del CIBIO per il supporto nelle analisi metagenomiche, il Dipartimento di Parodontologia dell'Università di Gothenburg per i confronti e le discussioni costruttive.

Questo progetto è stato supportato dalla Società Italiana di Parodontologia e Implantologia (SIdP), dall'Eklund Foundation e dall'International Team for Implantology (ITI).

Bibliografia

1. Heitz-Mayfield LJ, Needleman I, Salvi GE, Pjetursson BE. Consensus statements and clinical recommendations for prevention and management of biologic and technical implant complications. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2014;29 Suppl:346-50.
2. Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol* 2008;35:286-291.

3. Derks J, Schaller D, Håkansson J, Wennström JL, Tomasi C, Berglundh T. Effectiveness of Implant Therapy Analyzed in a Swedish Population: Prevalence of Peri-implantitis. *J Dent Res.* 2016;95(1):43-9.
4. Smeets R, Henningsen A, Jung O, Heiland M, Hammächer C, Stein JM. Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis--a review. *Head Face Med* 2014 Sep 3;10:34.
5. Klinge B et al. The patient undergoing implant therapy. Summary and consensus statements. The 4th EAO Consensus Conference 2015. *Clin Oral Implants Res* 2015 Sep;26 Suppl 11:64-67.
6. Amoroso PF, Adams RJ, Waters MG, Williams DW. Titanium surface modification and its effect on the adherence of *Porphyromonas gingivalis*: an in vitro study. *Clin Oral Implants Res* 2006 Dec;17(6):633-7.
7. Rakic M, Grusovin MG, Canullo L. The Microbiologic Profile Associated with Peri-Implantitis in Humans: A Systematic Review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2016;31(2):359-68.
8. Faveri M, Figueiredo LC, Shibli JA, Pérez-Chaparro PJ, Feres M. Microbiological diversity of peri-implantitis biofilms. *Adv Exp Med Biol* 2015;830:85-96.
9. Lafaurie GI, Sabogal MA, Castillo DM, Rincón MV, Gómez LA, Lesmes YA, Chambrone L. Microbiome and Microbial Biofilm Profiles of Peri-Implantitis: A Systematic Review. *J Periodontol* 2017 Oct;88:1066-1089.
10. Charalampakis G, Belibasakis GN. Microbiome of peri-implant infections: lessons from conventional, molecular and metagenomic analyses. *Virulence.* 2015;6(3):183-7.
11. Segata N, Boernigen D, Tickle TL, Morgan X, Garrett WS, Huttenhower C. Computational meta'omics for microbial community studies. *Mol Syst Biol* 2013; 9: 1-15..
12. Bragg L, Tyson GW. Metagenomics using next-generation sequencing. *Methods Mol Biol* 2014;1096:183-201.
13. Segata N, Haake SK, Mannon P, Lemon KP, Izard J. Composition of the adult digestive tract microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome Biol* 2012; 13: R42.
14. Apatzidou D, Lappin DF, Hamilton G, Papadopoulos CA, Konstantinidis A, Riggio MP. Microbiome of peri-implantitis affected and healthy dental sites in patients with a history of chronic periodontitis. *Arch Oral Biol* 2017;83:145-152.
15. Sanz-Martin I, Doolittle-Hall J, Teles RP, Patel M, Belibasakis GN, Hämmerle CHF, Jung RE, Teles FRF. Exploring the microbiome of healthy and diseased peri-implant sites using Illumina sequencing. *J Clin Periodontol* 2017 Aug 2.
16. Schincaglia GP, Hong BY, Rosania A, Barasz J, Thompson A, Sobue T, Panagakos F, Burleson JA, Dongari-Bagtzoglou A, Diaz PI. Clinical, Immune, and Microbiome Traits of Gingivitis and Peri-implant Mucositis. *J Dent Res* 2017;96(1):47-55.
17. Yu XL, Chan Y, Zhuang LF, Lai HC, Lang NP, Lacap-Bugler DC, Leung WK, Watt RM. Distributions of *Synergistetes* in clinically-healthy and diseased periodontal and peri-implant niches. *Microb Pathog* 2016;94:90-103.
18. Li ZJ, Wang SG, Li YH, Tu DX, Liu SY, Nie HB, Li ZQ, Zhang JM. Study on Microbial Diversity of Peri-implantitis Subgingival by High-throughput Sequencing. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2015;46(4):568-72. Chinese.

19. Tsigarida AA, Dabdoub SM, Nagaraja HN, Kumar PS. The Influence of Smoking on the Peri-Implant Microbiome. *J Dent Res* 2015;94(9):1202-17.
20. Dabdoub SM, Tsigarida AA, Kumar PS. Patient-specific analysis of periodontal and peri-implant microbiomes. *J Dent Res*. 2013 Dec;92(12 Suppl):168S-75S.
21. Donati C, Zolfo M, Albanese D, Tin Truong D, Asnicar F, Iebba V, Cavalieri D, Jousson O, De Filippo C, Huttenhower C, Segata N. Uncovering oral Neisseria tropism and persistence using metagenomic sequencing. *Nat Microbiol* 2016;1(7):16070.
22. NIH HMP Working Group et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res* 2009;19:2317-23
23. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998 Feb;25(2):134-44.
24. Zenobia C, Hajishengallis G. Porphyromonas gingivalis virulence factors involved in subversion of leukocytes and microbial dysbiosis. *Virulence* 2015;6(3):236-43.
25. Lindhe J, Meyle J; Group D of European Workshop on Periodontology. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 2008 Sep;35(8 Suppl):282-5.
26. Aronesty E. Comparison of sequencing utility programs. *Open Bioinforma J* 2013;7:1-8.
27. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 2012;9:357-359.
28. Truong DT et al. MetaPhlan2 for enhanced metagenomic taxonomic profiling. *Nat Methods* 2015;12: 902-903.
29. Segata N et al. Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes. *Nat. Methods* 2012; 9, 811-814.
30. Abubucker S et al. Metabolic reconstruction for metagenomic data and its application to the human microbiome. *PLoS Comput Biol* 2012;8:e1002358.
31. Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Furumichi M, Tanabe M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res* 2012;40: D109-D114.
32. Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 2010;26:2460-2461.
33. Bray JR, Curtis JT. An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. *Ecol Monogr* 1957;27:325-349.
34. Breiman L. Random forests. *Mach Learn* 2001; 45:5-32.
35. Pasolli E, Truong DT, Malik F, Waldron L, Segata N. Machine learning meta-analysis of large metagenomic datasets: tools and biological insights. *PLoS Comput Biol* 2016;12:e1004977.

FIGURE

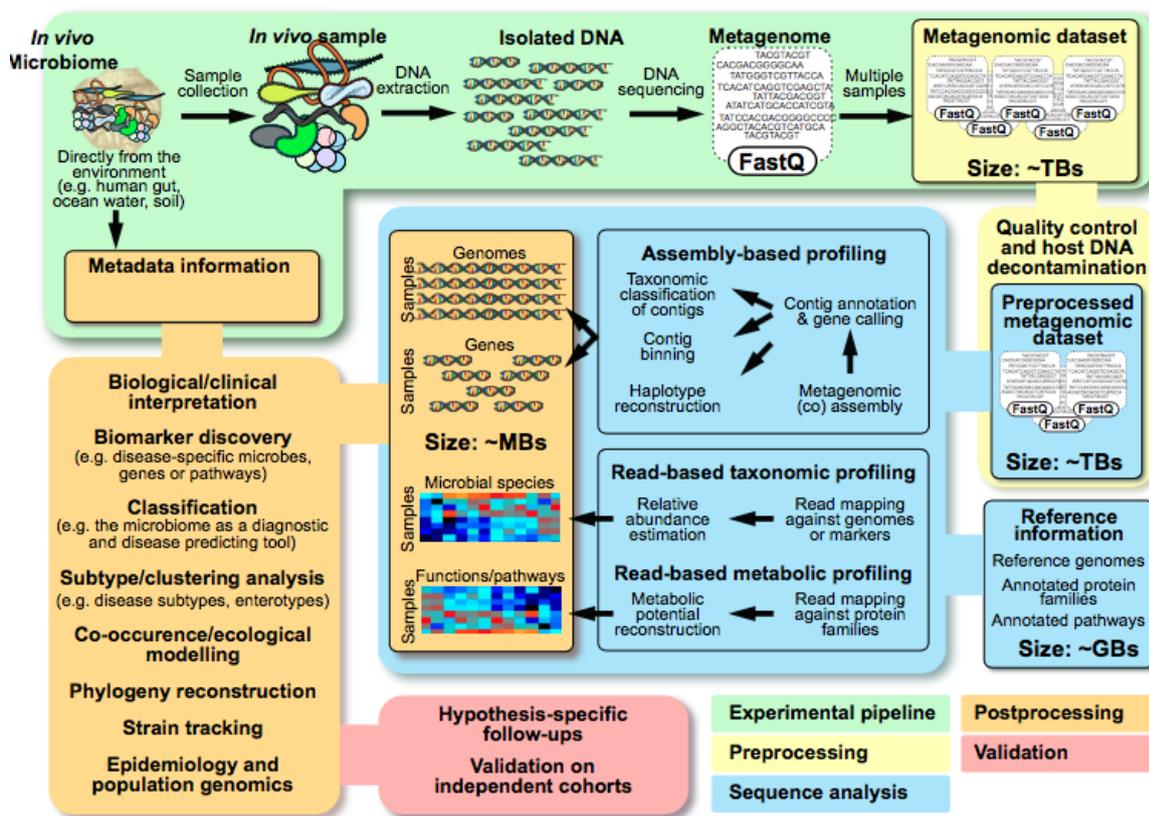


Figura 1. Workflow del sequenziamento metagenomico di tipo Shotgun

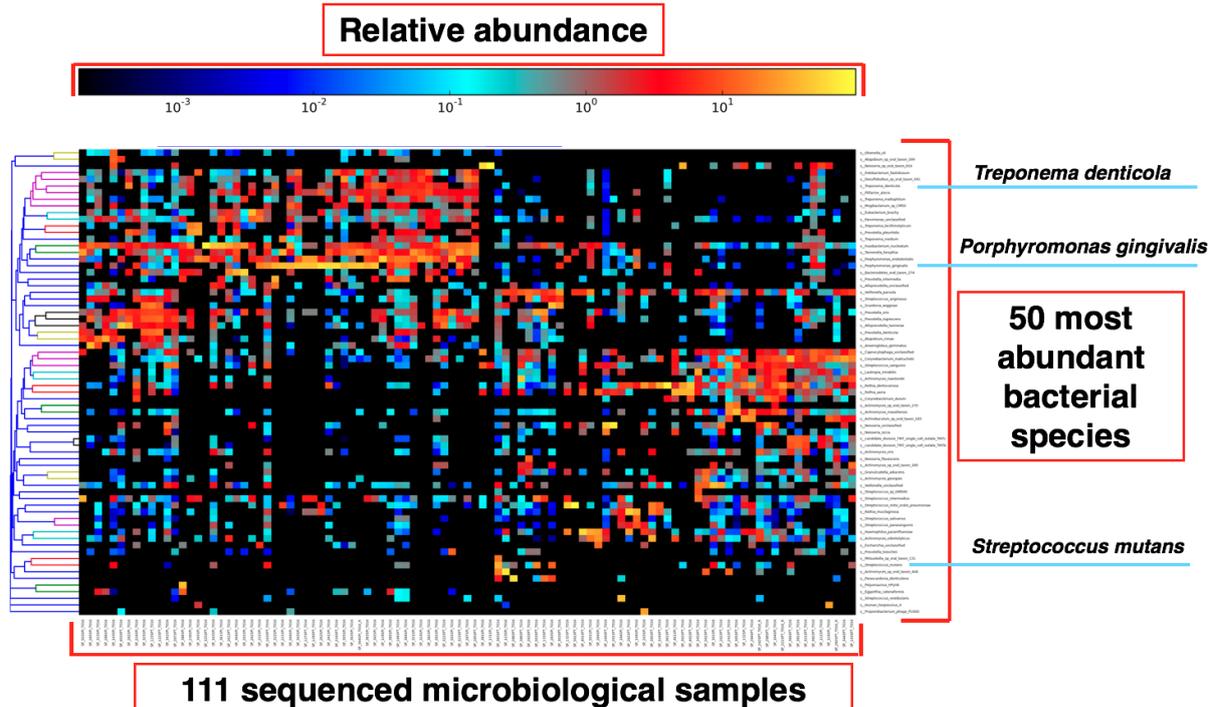


Figura 2. Heatmap in cui vengono riportati sull'asse delle X i 111 campioni microbiologici mentre sulla delle Y le 50 specie batteriche relativamente più abbondanti

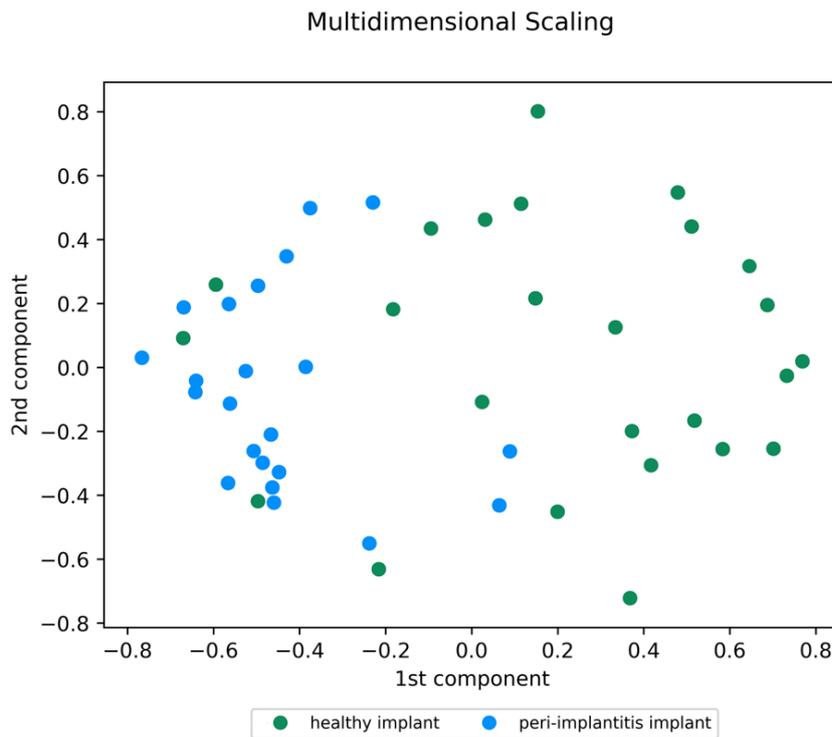


Figura 3. Grafico di ordinamento con campioni sani (colore verde) e campioni di peri-implantite (colore blu)

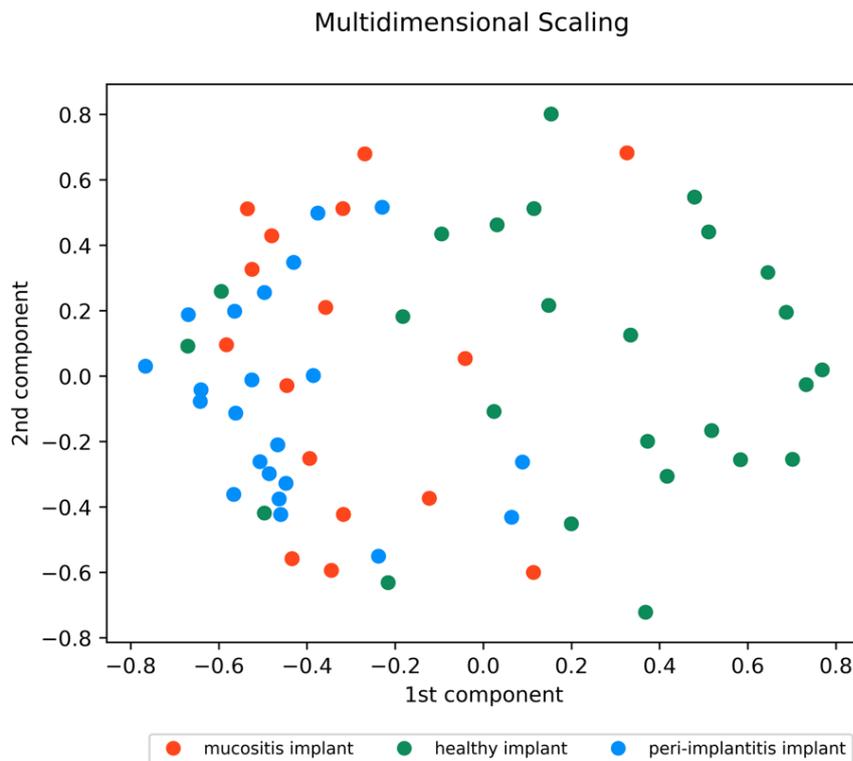


Figura 4. Grafico di ordinamento con campioni sani (colore verde), campioni di mucosite (colore rosso) campioni di peri-implantite (colore blu)

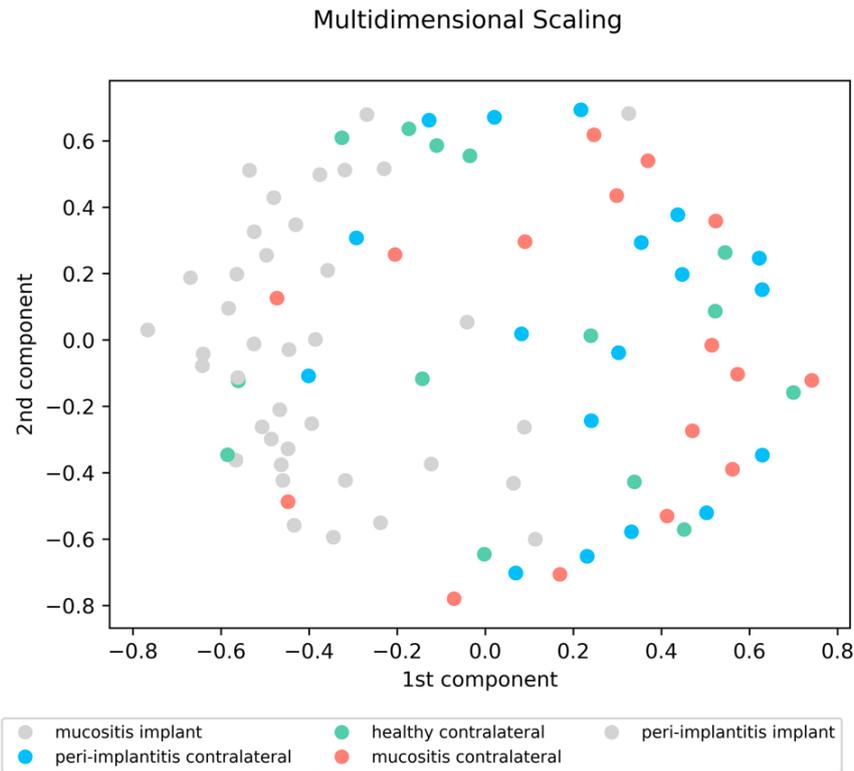


Figura 5. Grafico di ordinamento con campioni sani controlaterali di tutti e tre i gruppi (stato di salute - verde, mucosite - rosso, peri-implantite - blu). In grigio i campioni di mucosite e peri-implantite

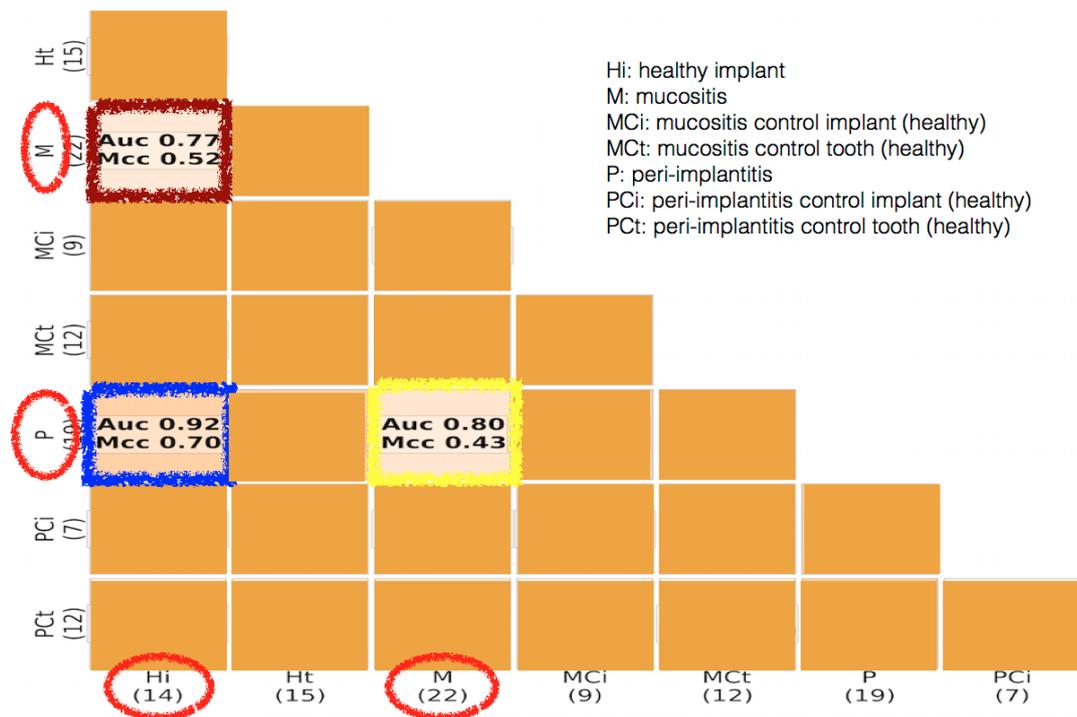


Figura 6. Capacità di predizione di un sistema di apprendimento automatico (Machine learning)