

SKŁADNIKI MIKROBIOMU JAMY USTNEJ JAKO CZYNNIKI RYZYKA ZAKAŻEŃ LOKALNYCH I UOGÓLNIONYCH U PACJENTÓW BEZ ORAZ Z WADAMI WRODZONYMI NARZĄDU ŻUCIA

Konrad Perkowski^{1*}, Paweł J. Zawadzki², Bohdan Starościek³, Monika Dybicz⁴,
Marcin Padzik⁵, Magdalena Marczyńska-Stolarek¹, Lidia Chomicz⁵

¹Zakład Ortodoncji WUM; ²Klinika Chirurgii Czaszkowo-Szczękowo-Twarzowej, Jamy Ustnej i Implantologii WUM

³Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej WUM; ⁴Katedra i Zakład Biologii Ogólnej i Parazytologii WUM

⁵Zakład Biologii Medycznej WUM

Wpłynęło w kwietniu 2015 r.

Zaakceptowano w październiku 2015 r.

1. Czynniki wpływające na dynamikę środowiska jamy ustnej 2. Mikrobiota jamy ustnej u pacjentów bez wrodzonych wad narządu żucia 3. Wpływ wad narządu żucia i ich leczenia na środowisko jamy ustnej 4. Mikrobiota w jamie ustnej pacjentów z wrodzonymi wadami narządu żucia 4.1. Bakterie w jamie ustnej pacjentów z wadami narządu żucia leczonych ortodontycznie 4.2. Patogeniczne Protista w mikrobiomie jamy ustnej pacjentów z wadami narządu żucia leczonych ortodontycznie 4.3. Grzyby w jamie ustnej pacjentów z wadami narządu żucia leczonych ortodontycznie 5. Podsumowanie

Components of oral microbiome as potential risk factors of local and general infections in patients with and without congenital malformations of masticatory system

Abstract: The oral cavity is an open system with complex and dynamic relations between the human host and the microbiota. Stomatognathic disorders, cleft lip and palate are the most common congenital malformations. Incidence varies from 1/500 to 1/2500 live births. In Poland, it appears every year in 800 newborns, as a single disorder or in syndromes. The environmental and hereditary factors, both have influence on the development of this pathology. Treatment of patients with cleft malformations is comprehensive and long-lasting, and includes orthodontic treatment. Both the malformation and the use of orthodontic appliances change significantly the condition of the patients' oral cavities. Such changes have an impact on the oral cavity microbiota, shifting the composition of physiological microorganisms and evoking the appearance of opportunistic and potentially pathogenic bacteria, fungi and/or protists.

Analysis of the available literature implicates that co-infections with different opportunistic/ pathogenic strains are potentially serious risk factors of local and general complications in patients with various congenital malformations. It should be emphasized that the human oral cavity may act as a major, yet poorly known, reservoir of microorganisms that can induce clinically important infections. However, there are scarce data concerning the presence of opportunistic bacteria, fungi and protists in patients with congenital cleft malformations, thus, further studies are highly important to decrease a risk of medical complications.

1. Factors influencing the dynamics of oral cavity environment. 2. Oral cavity microbiota in patients without congenital malformations of the masticatory system. 3. Influence of malformations of the masticatory system and specific treatment on oral cavity environment. 4. Oral cavity microbiota in patients with malformations of masticatory system. 4.1. Bacteria in the oral cavity of patients with congenital malformations of the masticatory system treated orthodontically. 4.2. Pathogenic Protista in the oral microbiome of patients with congenital malformations of the masticatory system treated orthodontically. 4.3. Fungi in the oral cavity of the patients with malformations of the masticatory system treated orthodontically. 5. Summary

Słowa kluczowe: czynniki ryzyka infekcji lokalnych i uogólnionych, leczenie ortodontyczne, mikrobiota jamy ustnej, wady wrodzone narządu żucia

Key words: local and general infection risk factors, orthodontic treatment, oral cavity microbiota, congenital malformations of masticatory system

1. Czynniki wpływające na dynamikę środowiska jamy ustnej

Jama ustna z zębami, przyzębiem i tkankami miękkimi stanowi podstawową składową narządu żucia – złożonej jednostki morfologiczno-czynnościowej. Warunki biotyczne oraz abiotyczne panujące w niej są zróżnicowane, a dynamika jej składników – zmienna w czasie i zależna od właściwości poszczególnych powierzchni. Różne warunki panują na twardych powierzchniach zębów, w przestrzeniach międzyzębo-

wych, na rozbudowanych, miękkich, odmiennie wyspecjalizowanych, nabłonkowych powierzchniach dziąseł, policzków, na brodawkowatym grzbiecie języka oraz na rogowaciejącym nabłonku podniebienia. Różnice dotyczą wielu cech, m. in.: parcjalnego ciśnienia tlenu, stężenia jonów wodorowych, składu i szybkości przepływu śliny, substancji odżywczych zawartych w ślinie, w płynie dziąsłowym i w pożywieniu człowieka, skutków działania środków higieny na poszczególne struktury jamy ustnej. Właściwości te mają wpływ na wnika-

* Autor korespondencyjny: Zakład Ortodoncji WUM, ul. Nowogrodzka 59, 02-005 Warszawa; e-mail: konrad.perkowski@gmail.com

nie struktur narządu żucia oraz namnażanie się tych drobnoustrojów. Tworzą one wielogatunkowe zbiorowisko, o złożonych oddziaływaniach – wzajemnych oraz w odniesieniu do ludzkiego organizmu [61, 65]. Poszczególne gatunki komensaliczne, symbiotyczne oraz potencjalnie chorobotwórcze, tworzące mikrobiom narządu żucia, wykazują specyficzne preferencje topiczne, różnią się pod względem nisz ekologicznych.

W zdrowej jamie ustnej pojedyncze mikroorganizmy oraz ich mikrokolonie przylegające do powierzchni stałych, miękkich i twardych tworzą biofilm; w tym zbiorze drobnoustrojów synergistyczne i antagonistyczne oddziaływania między gatunkami rezydującymi, w tym także potencjalnie chorobotwórczymi, pozostają we względnej, dynamicznej równowadze – homeostazie [31, 65, 66, 101]. Równocześnie mechanizmy obronne ludzkiego organizmu przeciwdziałają nadmiernemu namnażaniu się drobnoustrojów. Utrata homeostazy mikrobiota jamy ustnej prowadzić może do rozwoju zmian chorobowych, przy czym dochodzić może do nadmiernego namnażania niektórych rezydujących drobnoustrojów płytki nazębnej i błony śluzowej, jak też zasiedlania tych struktur przez gatunki egzogenne, w tym szczepy oportunistyczne oraz chorobotwórcze [61, 65].

Prezentowane opracowanie dotyczy badań nad składnikami mikrobiota jamy ustnej: bakteriami, pierwotniakami i grzybami. Uwzględniono dane o potencjalnych czynnikach infekcji lokalnych i uogólnionych, wykrywanych w grupie populacyjnej pacjentów z wadami narządu żucia leczonych ortodontycznie – w porównaniu do składników mikrobiota pacjentów bez wad wrodzonych narządu żucia.

2. Mikrobiota jamy ustnej u pacjentów bez wrodzonych wad narządu żucia

Dynamika składników bakteryjnych mikrobiomu jamy ustnej stanowi przedmiot badań prowadzonych w różnych grupach populacyjnych w wielu ośrodkach w Polsce i na Świecie [61, 65, 84]. Większość publikacji dotyczy patogenów, związanych z rozwojem próchnicy oraz choroby przyzębia, uważanych za choroby społeczne. Mikrobiota jamy ustnej, nie łączona związkiem przyczynowo-skutkowym bezpośrednio z tymi dwiema grupami chorób, badane były rzadziej, w niewielu kategoriach grup populacyjnych.

Wśród ponad 1000 gatunków/szczepów drobnoustrojów mogących zasiedlać jamę ustną przeważają bakterie; w różnych siedliskach jednej jamy ustnej wykrywa się kilkadziesiąt gatunków bakterii [61, 65, 66]. Najliczniej reprezentowane są Gram-dodatnie paciorkowce z rodzaju *Streptococcus*: *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *S. salivarius* – tlenowce i beztlenowce względnie. Paciorkowce te są zdolne do kolonizowania powłoki śluzowej

nabłonka i osłonki nabytej powierzchni zębów jako tzw. gatunki pionierskie, tworząc warunki do zasiedlania jamy ustnej poprzez sukcesję Gram-ujemnych ziarnokowców beztlenowych z rodzajów: *Veilonella*, *Capnocytophaga*, *Campylobacter*. Powstaje bardziej zróżnicowane gatunkowo tzw. zbiorowisko ostateczne [65]. Wykrywane są w nim bakterie – pałeczki Gram-dodatnie: *Lactobacillus acidophilus*, *L. salivarius*, *L. fermentum*, *Bifidobacterium dentium*, *Actinomyces israeli*, *A. odontolyticus*, oraz Gram-ujemne z rodzaju *Actinobacillus*, *Porphyromonas* i in. [61, 65]. Podkreśla się, że w skład tego zbiorowiska ostatecznego wchodzi osiedlone, rezydujące mikroorganizmy. Skład ten jest stosunkowo stały, pomimo dużej dynamiki związanej z wpływem różnych czynników środowiskowych oraz reakcji obronnych ludzkiego organizmu oddziałujących na bakterie. Stałość składu mikroorganizmów rezydujących opiera się na utrzymywaniu ich w labilnej równowadze dzięki kompensacji oddziaływań środowiska i organizmu człowieka przez mechanizm sprzężenia zwrotnego [65, 66].

Badania mikrobiomu jamy ustnej koncentrowały się przez wiele lat na dwóch grupach bakterii: gatunkach próchnicotwórczych oraz na bakteriach, którym przypisuje się istotną rolę w chorobach przyzębia. Badano różnicowanie gatunkowe bakterii w zależności od etapu rozwoju uzębienia oraz od zmian warunków, panujących w jamie ustnej. Wykryto zależność zmian w składzie gatunkowym bakterii od diety, nawyków higienicznych, chorób ogólnych, ich leczenia oraz wielu innych czynników [65, 89]. Dzięki dziesięciom lat intensywnych badań poznano bakteryjną etiologię próchnicy; opisano relacje między różnymi gatunkami bakterii płytki nazębnej, a występowaniem i dynamiką próchnicy zębów w różnych okresach ontogenezy człowieka. Szczególnie istotną rolę w inicjowaniu próchnicy odgrywają paciorkowce *Streptococcus mutans*, uczestniczące we wczesnej demineralizacji szkliwa zębów oraz różne szczepy pałeczek kwasomlekowych, powodujących powstawanie ubytków i dalszy rozwój procesu próchniczego [35, 36, 61].

W ciągu ostatnich kilku lat zwrócono uwagę na nowy gatunek – *Scardovia wiggisiae*, laseczki Gram-dodatnie, które znacząco wpływają na rozwój tzw. próchnicy wczesnego dzieciństwa (early childhood caries – ECC). Są one wykrywane w początkowych zmianach próchnicowych także u dorosłych [29, 97, 99]. W wielu przypadkach próchnicy stwierdzano występowanie laseczek *Scardovia wiggisiae* zarówno ze współwystępującymi paciorkowcami *Streptococcus mutans*, jak i bez innych patogenów towarzyszących.

Znaczna liczba badań dotyczy roli drobnoustrojów w powstawaniu i przebiegu chorób przyzębia [74, 75, 102]. Periodontopatie, podobnie jak próchnica, uważane są za jedną z najczęstszych przyczyn przedwczes-

nej utraty uzębienia; z tego też powodu zaliczane są one do chorób społecznych. Schorzenia przyzębia dotyczą tkanek podtrzymujących zęby, dziąseł, ozębnej, kości wyrostka zębodołowego oraz cementu korzeniowego; mogą one obejmować wszystkie wymienione rejonu jamy ustnej lub wybrane części przyzębia, dając różny obraz kliniczny. Wyjaśnienie etiologii chorób przyzębia jest trudne ze względu na złożone, niejednokrotnie wieloczynnikowe podłoże tych chorób, utrudniające także ujednoczenie ich klasyfikacji. Jedną z klasyfikacji, zaproponowaną przez Offenbachera w 2008 roku, wiąże stan przyzębia z występowaniem bakterii *Campylobacter rectus* [47, 74]. Rola przypisywana drobnoustrojom w etiopatogenezie chorób przyzębia oraz ich źródła są nadal przedmiotem badań. Różne bakterie płytki nazębnej oraz egzogenne uważane są za czynniki etiologiczne w pewnych chorobach przyzębia, inicjujące niespecyficzny proces zapalny. Niektóre rodzaje chorób przyzębia mogą jednak mieć specyficzną etiologię, związaną z bezpośrednią aktywnością określonych gatunków bakterii, jak w agresywnym zapaleniu przyzębia, w którym główna rola przypisywana jest bakteriom z rodzaju *Actinobacillus* oraz *Porphyromonas gingivalis* [61, 65, 96].

Na powstawanie i przebieg chorób przyzębia ma wpływ szereg czynników, dotyczących zarówno drobnoustrojów, jak i reakcji obronnej ludzkiego organizmu. Rozwój chorobowych zmian wynika z utraty homeostazy mikrobiomu jamy ustnej i następuje pod wpływem wielu czynników wewnątrz- i/lub zewnątrzpochodnych [61]. Podkreślany jest m. innymi wpływ wieku, występowania chorób układowych, chorób metabolicznych, zaburzeń układu stomatognatycznego, zakażeń wirusowych, ubocznych skutków farmakoterapii. Zaburzenie równowagi między reakcjami obronnymi ludzkiego organizmu a działaniem bakterii jamy ustnej sprzyja stanom zapalnym i zmianom chorobowym o różnym nasileniu; rozwój choroby przyzębia jest więc wypadkową działania drobnoustrojów i odporności ludzkiego organizmu, modyfikowanej przez dodatkowo występujące czynniki ryzyka [46, 61].

W jamie ustnej stwierdzana jest także obecność grzybów drożdżopodobnych [61, 65].

W krajach europejskich, w tym w Polsce dominują inwazje drożdżopodobnych grzybów z rodzaju *Candida* [56, 61]. W ostatnich 20 latach znacznie wzrosła częstość zakażeń grzybami [68, 69]. Spośród opisanych ok. 500 gatunków najczęściej izolowane są szczepy *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, rzadziej: *C. pseudotropicalis* oraz *C. parapsilosis*. Drożdżopodobne grzyby są szeroko rozpowszechnione w środowisku człowieka; trafiają do wnętrza organizmu przez uszkodzoną błonę śluzową, skórę, drogą inhalacyjną, pokarmową, płciową. Wchodzą w skład różnych ontocenoz narządowych, lecz w żadnym razie nie mogą być uznane za

tw. składniki fizjologiczne [54, 55]. Podobnie jak to dzieje się w przypadku bakterii, grzyby mogą zasiedlić jamę ustną zarówno we wczesnych, jak i późniejszych etapach rozwoju osobniczego.

Grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Candida* pochodzenia egzogenne, występujące w ontocenozie jamy ustnej, lokalizują się głównie na grzbiecie języka oraz na błonie śluzowej policzków i podniebienia. U 40–60% ludzi grzyby te nie powodują wyraźnych zmian chorobowych między innymi dzięki równoważącemu działaniu histatyn śliny – inhibitorów

C. albicans. Pomimo znacznej rozbieżności danych o częstości występowania *Candida*, podawanych przez różnych autorów, istnieje zgodność co do wykrywania grzybów drożdżopodobnych u osób ze zdrową jamą ustną, także u dzieci i młodzieży; często stwierdzane jest nosicielstwo szczepów *Candida* [94, 95, 99, 104]. Kandydoza, choroba o charakterze zapalnym – rozwija się zazwyczaj jako endogenne zakażenie oportunistyczne, któremu sprzyjają czynniki podwyższonego lub wysokiego ryzyka rozwoju grzybicy: pierwotne i wtórne niedobory odporności, zabiegi chirurgiczne, immunosupresja. Rozwijają się m.in. u noworodków, osób z niedożywieniem, z chorobami układowymi, metabolicznymi, u osób upośledzonych umysłowo, przy antybiotykoterapii, u pacjentów leczonych cytostatykami, osób zakażonych wirusem HIV [45, 54, 55, 80, 90]. Zarazem składniki ściany komórkowej grzybów i produkty uwalniane przez ich komórki mogą indukować obniżenie odpowiedzi komórkowej, przez co stanowią poważne zagrożenie zdrowia, nawet u osób ze sprawnym układem immunologicznym [68, 85]. Duża gęstość populacji grzybów w jamie ustnej, gardle i krtani stanowi poważne ryzyko rozwoju grzybicy uogólnionej [83].

3. Wpływ wad narządu żucia i ich leczenia na środowisko jamy ustnej

Przyczyny powstawania wielu wad wrodzonych nie są ostatecznie wyjaśnione. Podkreśla się rolę wpływu środowiska, chorób matki, podeszłego wieku rodziców i in. Niektóre wady wrodzone powstają w pierwszych tygodniach ciąży, gdy na płód działają szkodliwe czynniki środowiskowe np.: promieniowanie RTG, niektóre leki, inne związki chemiczne. Uważa się, że takie wady jak rozszczep wargi i podniebienia, całkowity i częściowy, zależne są od czynników środowiskowych oraz genetycznych; te wrodzone wady występują z częstością od 1:500 do 1:2500 żywych urodzeń [43, 92]. Mogą występować jako jeden z objawów w zespołach wad wrodzonych, np. w zespole Treachera-Collins'a, Pierre-Robina i in., lub jako wady izolowane. W Polsce rodzi się rocznie około 800 dzieci, u których występują te wady [5, 63].

Zwykle trudno ustalić jednoznacznie przyczynę powstania rozszczepu; przyjmuje się, że zaburzenie powstało na skutek działania wielu czynników – na istniejącą predyspozycję genetyczną nałożył się wpływ środowiska, sprzyjający rozwojowi deformacji [41, 70, 100].

Deformacje rozszczepowe powstają w czasie tworzenia się odpowiednich struktur podniebienia. Brak ciągłości anatomicznej i zniekształcenia struktury prowadzą do zaburzeń czynności: żucia, połykania, oddychania, a także mowy i słuchu. Rozszczepy wargi oraz podniebienia są zamykane operacyjnie. Obecnie stosuje się różne harmonogramy operacji – terminy zabiegów zależą od przyjętej metody [3]. Podkreślenia wymaga rola szczególnych warunków panujących w jamie ustnej pacjentów z rozszczepem wargi i podniebienia [2, 23, 63, 90]. U osób z wadami wrodzonymi narządu żucia, po zabiegu chirurgicznego zamknięcia rozszczepów pozostają blizny, a często także szczeliny na podniebieniu oraz na wyrostku zębodołowym, stanowiące miejsca zalegania śliny, a także resztek pokarmowych. Zabiegi higieniczne w tych okolicach są utrudnione, co zmienia zarówno warunki morfologiczne jak i fizjologiczne panujące w jamie ustnej. Zaburzenia homeostazy mikrobiota mogą sprzyjać powstawaniu lokalnych stanów zapalnych [61, 79]. U pacjentów z wadami rozszczepowymi stwierdza się wysokie wartości parametrów określających stan jamy ustnej: wskaźnika płytki, krwawienia oraz liczby PUW (wskaźnik intensywności próchnicy), znacznie wyższe niż w innych grupach populacyjnych [18, 22, 37, 80]. Pacjenci z rozszczepem wargi i podniebienia wymagają leczenia zespołowego – chirurgicznego, laryngologicznego, stomatologicznego, ortodontycznego, rehabilitacji logopedycznej i in. Prowadzenie leczenia ortodontycznego wiąże się ze stosowaniem aparatów ortodontycznych.

W ortopedii szczękowo-twarzowej (ortodoncji) stosowane są aparaty stałe i zdejmowane, różniące się budową i wskazaniem do stosowania.

Aparaty zdejmowane stosowane są zarówno u dzieci jak i u pacjentów dorosłych. Zasadniczymi wskazaniami do stosowania zdejmowanych aparatów ortodontycznych są: modyfikacja wzrostu, niewielkie przesunięcia zębowe, rozszerzanie łuku zębowego, korekta niewielkich nieprawidłowości zębowych. Stosowane są także w celu leczenia chorób stawu skroniowo-żuchwowego oraz jako aparaty retencyjne, utrzymujące efekty właściwego leczenia ortodontycznego, prowadzonego wcześniej zarówno z zastosowaniem aparatów stałych jak i zdejmowanych.

Aparaty stałe zbudowane są z zamków, pierścieni oraz łuków ortodontycznych. Zamki ortodontyczne mogą być wykonane ze stopów metali oraz materiałów niemetalicznych (kompozyty, materiały ceramiczne); przyklejane są klejem kompozytowym w określonej pozycji do powierzchni zębów siecznych, kłów i zębów

przedtrzonowych. Pierścienie ortodontyczne cementowane są zwykle na pierwszych zębach trzonowych. Zasadniczą część aparatu ortodontycznego mieści się w przedsiönku jamy ustnej, lub, w przypadku pewnych rodzajów aparatów, w jamie ustnej właściwej.

Stosowanie aparatów ortodontycznych wpływa na warunki panujące w jamie ustnej. Wyniki badań wskazują, że może ono powodować lokalne działania niepożądane, takie jak mechaniczne uszkodzenia tkanek jamy ustnej czy reakcje alergiczne na materiały, z których wykonano aparat [6, 44]. Jednocześnie, elementy aparatów utrudniają samooczyszczanie zębów śliną, sprzyjają retencji resztek pokarmowych i pogorszeniu higieny jamy ustnej. Wzrasta akumulacja płytki nazębnej i płytki na elementach aparatu. Dlatego też stosowanie aparatów ortodontycznych może zwiększać ryzyko rozwoju próchnicy zębów i chorób przyzębia [1, 4, 22, 24, 25, 81]. Utrudnione oczyszczanie zębów i wzrost ilości płytki nazębnej, mierzony tzw. wskaźnikiem płytki, związane ze stosowaniem aparatów ortodontycznych, sprzyjają wzrostowi bakterii próchnicotwórczych z rodzaju *Streptococcus* i *Lactobacillus* [7, 40, 100]. W innych badaniach stwierdza się, że w trakcie leczenia aparatami ortodontycznymi u części pacjentów rozwijają się zmiany zapalne w obrębie przyzębia [44, 72, 73, 76]. Badano także ogólnoustrojowe skutki leczenia aparatami ortodontycznymi, szczególnie w grupach podwyższonego ryzyka. Prace koncentrowały się na takich schorzeniach jak zębopochodne zapalenie wsierdzia, gorączka reumatyczna [8, 11, 12, 67]. Autorzy wskazywali na potrzebę stosowania antybiotykowej profilaktyki przed włączeniem przeprowadzaniem procedur, takich jak cementowanie ortodontycznych pierścieni, mogących wywoływać bakteremię, szczególnie u pacjentów należących do grup podwyższonego ryzyka.

4. Mikrobiota w jamie ustnej pacjentów z wrodzonymi wadami narządu żucia

Dane piśmiennictwa wskazują, że wady rozszczepowi wargi i podniebienia wpływają na warunki panujące w jamie ustnej; zwłaszcza stosowanie aparatów ortodontycznych nie pozostaje bez wpływu na składniki mikrobiomu. U pacjentów z wrodzonymi wadami narządu żucia dochodzi do adhezji drobnoustrojów na elementach aparatów ortodontycznych; obecność aparatów sprzyja akumulacji płytki nazębnej, co przyczynia się do zmian składu gatunkowego oraz liczby wykrywanych bakterii [1, 7, 23]. Aparaty ortodontyczne zaliczane są do czynników, zaburzających homeostazę składników mikrobiomu jamy ustnej, podkreślane jest zagrożenie bakteriami, związane z cementowaniem i zdejmowaniem pierścieni aparatów ortodontycznych oraz z towarzyszącym im zwykle urazem błony śluzo-

wej [33, 67]. We krwi pacjentów, u których zdejmowano aparaty stałe, wykrywano m.in.: *Streptococcus sanguinis*, *S. mitis*, *S. constelatus*, *S. mutans* oraz gatunki z rodzaju *Veillonella*, *Actinomyces*, bakterie oportunistyczne, czynniki często ciężkich schorzeń lokalnych oraz ogólnoustrojowych [12].

4.1. Bakterie w jamie ustnej pacjentów z wadami narządu żucia leczonych ortodontycznie

Wyniki badań prowadzonych w różnych ośrodkach wykazały wzajemną zależność między leczeniem ortodontycznym a częstszym występowaniem bakterii próchnicotwórczych z grupy *Streptococcus mutans* oraz z rodzaju *Lactobacillus* [43, 81, 98]. Stwierdzano obecność bakterii *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, które wymienia się jako charakterystyczne dla pewnych chorób przyzębia, a także wzrost liczby beztlenowych i względnie beztlenowych bakterii oraz form ruchomych [72, 82].

W badaniach własnych, u pacjentów rozszczepowych leczonych ortodontycznie, oprócz szczepów z grupy *S. viridans* wykryto 14 gatunków innych bakterii, których obecność może stwarzać zagrożenie ogólnoustrojowe [18, 79, 80].

Bakterie potencjalnie chorobotwórcze wykryte u pacjentów z wadami rozszczepowymi, leczonych ortodontycznie z zastosowaniem aparatów stałych:

Bakterie Gram-dodatnie

Enterococcus faecalis
Enterococcus faecium
Micrococcus luteus
Staphylococcus aureus
Staphylococcus epidermidis

Bakterie Gram-ujemne

Escherichia coli
Enterobacter cloacae
Enterobacter agglomerans
Klebsiella pneumoniae
Klebsiella oxytoca
Pseudomonas aeruginosa
Proteus mirabilis
Moraxella catarrhalis
Neisseria flava

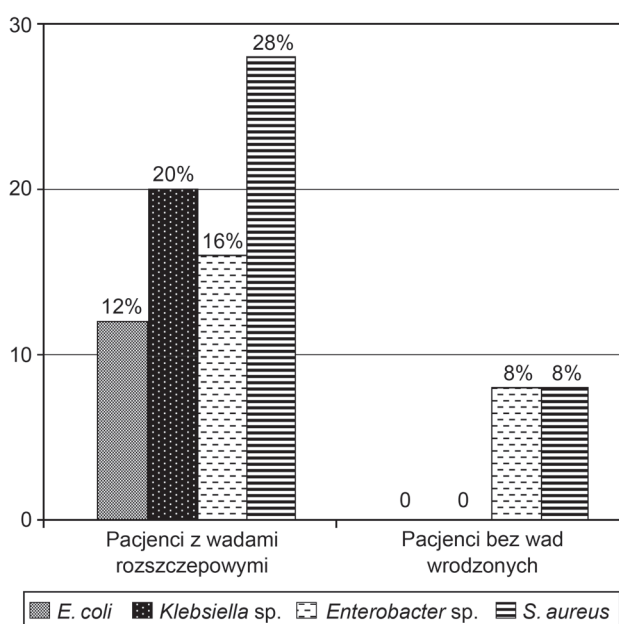
Stosunkowo często, u ok. 44% pacjentów z wadami rozszczepowymi, w jamie ustnej wykrywane były Gram-dodatnie paciorkowce fekalne *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, mikrokoki *Micrococcus luteus* oraz Gram-ujemne ziarenkowce *Moraxella catarrhalis* i *Neisseria flava* (12% u pacjentów bez wad rozszczepowych). Jama ustna tych pacjentów jako rezerwuuar właśnie takich paciorkowców, mikrokoków oraz ziarenkowców stanowić może źródło czynników etiologicznych infekcji lokalnych (ropnie) oraz rozsianych/uogólnionych (zakażeń dróg moczowych, dróg żółciowych, wśierdzia i in.),

w tym czynników zakażeń szpitalnych. Infekcje jamy ustnej powodowane przez te bakterie, które są trudne do leczenia ze względu na lekooporność, są zarazem szczególnie groźne dla osób z obniżoną odpornością.

Spośród Gram-ujemnych różne szczepy pałeczek *Enterobacteriaceae*: *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *E. agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, a także pałeczka ropy błękitnej *Pseudomonas aeruginosa* występowały u 48% pacjentów z wadami narządu żucia. Relatywnie małe wymagania odżywcze tych bakterii ułatwiają im kolonizację różnych ontocenoz. Rozsianie ich z jamy ustnej może powodować ciężkie zakażenia, szczególnie groźne dla osób z malformacjami, zaburzeniami odporności (ostre infekcje układowe, zakażenia szpitalne, także posocznice). W kontrolnej grupie populacyjnej osób bez wad, nie leczonych ortodontycznie, ekstensywność tych bakterii była dużo niższa, wynosiła ok.8%.

Wśród mikrobiota jamy ustnej analizowanych pacjentów z wadami wrodzonymi narządu żucia izolowano też szczepy bakterii Gram-dodatnich: gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus* [18, 79, 80] występujących często w środowisku człowieka, co sprzyja nosicielstwu tych bakterii w przedsionku nosa, w gardle. Gronkowiec złocisty rozprzestrzenia się z miejsca kolonizacji w jamie ustnej dość łatwo, powodując ropnie, bardzo groźne zakażenia układowe, zakażenia endodontyczne, zapalenia kości żuchwy, ślinianek.

Porównanie ekstensywności niektórych bakterii potencjalnie chorobotwórczych wykrytych w badaniach własnych u pacjentów z wadami rozszczepowymi oraz bez wad wrodzonych narządu żucia przedstawiono na Rys. 1.



Rys. 1. Porównanie ekstensywności niektórych bakterii potencjalnie chorobotwórczych, wykrytych u pacjentów z wadami rozszczepowymi oraz bez wad wrodzonych narządu żucia

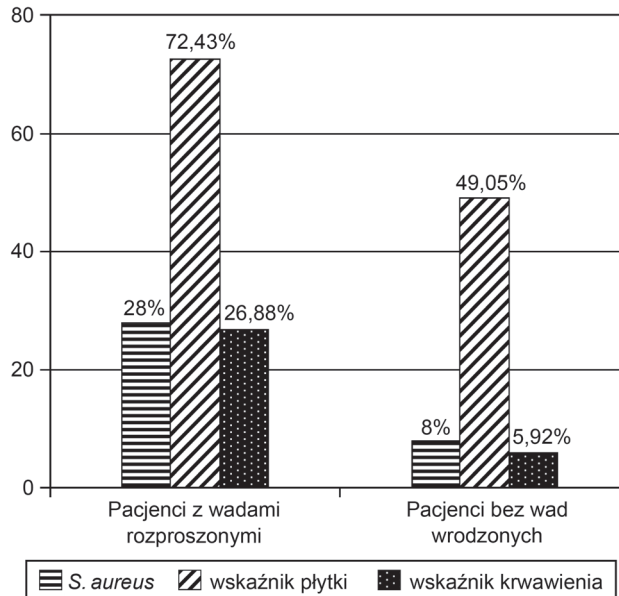
U pacjentów rozszczepowych występował też gronkowiec *S. epidermidis*, dawniej uważany za gatunek niechorobotwórczy, izolowany często ze śliny, nosogardzieli, z płytek nazębnych; stwierdzano obecność tego gronkowca na protezach zębowych. Występowanie *S. epidermidis* wśród mikrobiota jamy ustnej analizowanych pacjentów wskazuje na zagrożenie zakażeniami lokalnymi, zwłaszcza, że wg danych piśmiennictwa gronkowiec ten może być czynnikiem etiologicznym zapalenia kości żuchwy, dziąseł oraz zakażeń endodontycznych [65,66].

U analizowanych pacjentów z wadami rozszczepowymi stwierdzono korelację między ekstensywnością *S. aureus* i niektórymi wartościami oceny klinicznej: wskaźnikiem płytki nazębnej (który stanowi wykładnik stanu higieny jamy ustnej) i wskaźnikiem krwawienia (jako wykładnikiem stanu zapalnego jamy ustnej) [18, 79, 80]. Wyższa ekstensywność bakterii *S. aureus* i wyższe wartości wskaźników klinicznych występowały u pacjentów z wadami rozszczepowymi leczonych przy pomocy stałych aparatów ortodontycznych niż u pacjentów z grupy kontrolnej, bez wad narządu żucia, nie leczonych z użyciem tych aparatów. Ekstensywność *S. aureus* oraz wartości procentowe wymienionych wskaźników klinicznych u pacjentów z wadami rozszczepowymi oraz bez wad wrodzonych narządu żucia przedstawiono na Rys. 2.

4.2. Patogeniczne Protista w mikrobiomie jamy ustnej pacjentów z wadami narządu żucia leczonych ortodontycznie

W skład mikrobiomu jamy ustnej mogą także wchodzić dwa gatunki pasożytniczych pierwotniaków (Protista): należący do wiciowców rzęśistek policzkowy *Trichomonas tenax* oraz pełzak dziąsłowy *Entamoeba gingivalis*; pierwotniaki te tylko sporadycznie występują u dzieci poniżej 14 roku życia. Kosmopolityczny wiciowiec *T. tenax* bytujący w formie trofozoitu o gruszkowatym kształcie i wymiarach od 3 µm do 15 µm transmitowany jest przez bezpośredni kontakt, podczas pocałunku, ale też pośrednio przez wspólnie używane naczynia. *E. gingivalis* to także gatunek kosmopolityczny; występuje jako trofozoit mierzący ~ 5 µm × 35 µm, o zmiennym kształcie z płatowatymi pseudopodiami; ameba ta przenoszona jest przez kontakt bezpośredni podczas pocałunku oraz za pośrednictwem przyborów do utrzymywania higieny jamy ustnej oraz używanych wspólnie naczyń.

Pierwotniaki te rzadko uwzględniano w badaniach klinicznych narządu żucia; niektórzy autorzy opisują je jako nieszkodliwe komensale, pomimo, że od kilkadziesiąt lat znany jest udział tych Protista w stanach patologicznych w jamie ustnej. Wyniki prac, prowadzonych w ośrodkach światowych i w niewielu polskich,



Rys. 2. Ekstensywność *S. aureus* a procentowe wartości niektórych wskaźników klinicznych u pacjentów z wadami rozszczepowymi oraz bez wad wrodzonych narządu żucia

nad wpływem tych drobnoustrojów na stan narządu żucia, wykazały korelację między ich występowaniem w przyzębiu, w ubytkach próchnicowych, w przyległych węzłach chłonnych, w śliniankach a zmianami zapalnymi stwierdzanymi w tych strukturach [26, 30, 34, 59]. Rzęśistek policzkowy był wykrywany także poza jamą ustną: w stanach zapalnych oskrzeli, gruczołu mlekowego, w ropniach wątroby [38, 48, 55, 57, 58]. Wiciowce te znajdowano w jamie ustnej, a także w treści rozstrzeni oskrzeli, ropni płuc, wysięku opłucnej, u osób z chorobami układowymi poddanych immunosupresji [16, 17, 42, 62, 64, 93].

Destrukcyjne oddziaływanie tych rzęśistek na tkanki jamy ustnej wykryli m. innymi Bóznier i wsp. [10], Ribaux i wsp. [88] oraz Linke i wsp. [59]. Wykazana została zdolność adhezyjna i wysoka aktywność pozakomórkowa proteinaz rzęśistek, rozkładanie przez nie różnych typów kolagenu, a także hemolityczne działanie na błonę śluzową i inne struktury narządu żucia [10, 71, 88, 91]. W polskich badaniach wykazano *T. tenax* w różnych grupach populacyjnych [14, 21, 51–53]; u pacjentów ze stwierdzoną rzęśistkowicą jamy ustnej często występowały równocześnie drożdżaki *Candida albicans* [49, 50].

Dane piśmiennictwa z wielu krajów ukazują różnice w częstości występowania u ludzi pełzaków *E. gingivalis* w zależności od rodzaju grup populacyjnych, a zarazem wykazują, że ekstensywność tych ameb nasila się wraz z wiekiem badanych [9, 13,30, 87]. Pełzaki te, podobnie jak rzęśistki *T. tenax*, nie należą do mikroorganizmów rezydujących, a mogą wchodzić w skład mikrobiomu jamy ustnej wskutek inwazji. Wykrywa się je głównie w wymazach z przyzębia, rzadko w ślinie, u osób z roz-

ległą próchnicą, zaawansowaną chorobą przyzębia, na błonie śluzowej dziąseł, w patologicznych kieszonkach. Inwazje tych pełzaków mogą obejmować przyzębie, a także zatoki przynosowe, wykrywano je w stanach zapalnych migdałków podniebiennych, w treści ropni płuc [13, 24, 34, 39, 78]. Autorzy cytowanych badań wskazują na aktywną rolę *E. gingivalis* w rozwoju stanów patologicznych przyzębia.

W badaniach własnych ekstensywność *T. tenax* wynosiła 13.5% u osób z rozszczepowymi wadami leczonych aparatami stałymi z grupy 16–23 lata, a 8% u pacjentów zdrowych z tej samej grupy wiekowej [18, 79, 80]. Wyższa niż u młodszych ekstensywność inwazji tego rzęsistka występowała u zdrowych osób w wieku 30–50 lat; wynosiła ona średnio 20% [15, 17, 103], a u chorych z niepełnosprawnością ruchową, mentalną i wadami wrodzonymi w takim samym przedziale wieku – od 45% do 87% [14, 103]. Ekstensywność ameb jamy ustnej *E. gingivalis* u pacjentów z wadami rozszczepowymi leczonych aparatami stałymi różniła się w zależności od wieku badanych; u osób w wieku 16–23 lata była niższa niż rzęsistka, 8% i trochę wyższa niż u osób z grupy kontrolnej, 4% [18, 20, 78]. U chorych starszych, 30–50 lat z niepełnosprawnością mentalną i wadami wrodzonymi ekstensywność tych pełzaków sięgała 36%; u zdrowych osób w tym samym przedziale wieku – od 4% do 13.5% [19, 21, 103].

Wyniki cytowanych badań własnych wskazują, że wady rozszczepowe oraz leczenie ich z użyciem aparatów stałych mogą sprzyjać utrzymywaniu się inwazji *T. tenax*; potwierdzają rzadsze występowanie pierwotniaków w jamie ustnej u osób w młodym wieku i częstsze w wieku starszym, zarówno u osób zdrowych jak i z niepełnosprawnościami oraz wadami wrodzonymi.

Należy podkreślić, że oprócz własnych prac, nadal brak badań umożliwiających uzyskanie danych wystarczających do oceny częstości/skutków występowania pasożytniczych Protista w mikrobiomie jamy ustnej osób z wadami rozszczepowymi leczonych przy użyciu aparatów ortodontycznych.

4.3. Grzyby w jamie ustnej pacjentów z wadami narządu żucia leczonych ortodontycznie

Dynamika występowania grzybów w ontocenoze jamy ustnej pacjentów leczonych ortodontycznie poznana jest w niewielkim stopniu [20, 79, 86]. Problem ten ma szczególne znaczenie w przypadku pacjentów z wadami rozszczepowymi narządu żucia, u których potrzeba ortodontycznego leczenia sięga 100% [60, 77, 94, 95].

Kandydoza jamy ustnej może przybierać różne formy kliniczne: ostrą rzeżomobłonową, przewlekłą atroficzną, rozrostową. Inwazyjne szczepy *Candida* mogą występować w formie drożdżopodobnej (blasto-

sporowej) lub pseudostrzępkowej (pseudomycelialnej); opinie na temat większej patogeniczności formy blastosporowej czy pseudomycelialnej są podzielone.

Wystąpieniu kandydozy mogą też sprzyjać czynniki miejscowe: zła higiena jamy ustnej, mikrourazy, obecność ciał obcych (szczególnie oddziałujących na powierzchniach ściśle przylegających do błony śluzowej) – akrylowych uzupełnień protetycznych (stomatopatia protetyczna) czy aparatów ortodontycznych [61, 66, 82, 90]. Inwazja grzybów z jamy ustnej do dalszych części przewodu pokarmowego oraz innych narządów drogą krwi przebiegać może szczególnie łatwo, ponieważ na błonie śluzowej często występują otarcia i mogą pojawiać się ubytki powierzchni. Grzyby mogą być czynnikiem patogenicznym zapalenia błony śluzowej przełyku, żołądka i dwunastnicy [28]. U osób z grzybiczym zapaleniem błony śluzowej przewodu pokarmowego stwierdzano równocześnie występowanie zakażenia *Candida* w jamie ustnej.

Aktywna rola grzybów drożdżopodobnych w rozwoju poważnych stanów patologicznych – lokalnych i uogólnionych stwierdzona została w wielu badaniach [32, 45, 56, 83]; m.in. wykazano, że w trakcie zabiegów grzyby mogą dostawać się bezpośrednio do krwi i tą drogą przenosić się do różnych narządów [61].

W badaniach własnych wykryto wyraźną zbieżność między występowaniem rozszczepów i stosowaniem aparatów stałych a częstością izolowania *Candida*. Ekstensywność *C. albicans* była skorelowana z wysokimi wartościami wskaźników płytki i krwawienia, świadczących o złej higienie jamy ustnej i występowaniu stanów zapalnych przyzębia. Znamiennie częściej szczepy *C. albicans* występowały u pacjentów rozszczepowych w wieku 16–23 lata leczonych ortodontycznie, 48%, niż u osób zdrowych z tego samego przedziału wiekowego, 8% [18–20, 79]. Najwyższą prevalencję grzybów grupy *C. albicans*, ok. 50% stwierdzano u pacjentów z najwyższymi wartościami wskaźników płytki i krwawienia, odzwierciedlającymi niezadowolający stan jamy ustnej, wzmożoną akumulację płytki nazębnej oraz nasilenie procesów zapalnych.

5. Podsumowanie

U pacjentów z wadami wrodzonymi narządu żucia zmienione warunki anatomiczne oraz stosowanie aparatów ortodontycznych zaburzają homeostazę mikrobiomu jamy ustnej; może to powodować zmiany w jego składzie wpływając na wzrost ryzyka wystąpienia zakażeń lokalnych i uogólnionych.

W dostępnym piśmiennictwie istnieje niewiele danych, dotyczących oceny częstości występowania bakterii oportunistycznych, pasożytniczych pierwotniaków oraz grzybów drożdżopodobnych w jamie ustnej

osób z wadami wrodzonymi narządu żucia leczonych ortodontycznie. Znaczna dysproporcja między wciąż niedostateczną wiedzą, dotyczącą zagrożeń generowanych przez składniki mikrobiomu pacjentów z wadami rozszczepowymi w porównaniu do innych, bez takich wad stanowi argument na rzecz prewencji przedzabiegowej i monitorowania ontocenozy jamy ustnej w przebiegu leczenia.

W badaniach własnych, w tej grupie pacjentów wykryto kilkanaście gatunków bakterii; większość z nich stanowiły gatunki oportunistyczne, także czynniki zakażeń szpitalnych, których obecność może stwarzać zagrożenia lokalne i ogólnoustrojowe. Stosunkowo często w jamie ustnej u tych pacjentów wykrywane były bakterie Gram-dodatnie: paciorkowce fekalne, mikrokoki oraz Gram-ujemne ziarenkowce i pałeczki. Wśród mikrobiota jamy ustnej analizowanych pacjentów występowały też potencjalnie patogeniczne szczepy gronkowców.

Koncentracja bakterii oportunistycznych oprócz miejscowego, szkodliwego działania na przyzębie, może negatywnie wpływać na odległe tkanki i narządy i stwarza ryzyko rozwoju chorób odogniskowych.

Stwierdzono większą ekstensywność inwazji rzęsiatka policzkowego *T. tenax* niż pełzaka dziąsłowego *E. gingivalis*, a zarazem rzadsze występowanie pierwotniaków w jamie ustnej u pacjentów w młodym wieku i częstsze w wieku starszym, u osób zdrowych oraz z wadami wrodzonymi i mentalną i ruchową niepełnością.

Obserwowano zbieżność między występowaniem rozszczepu wargi i podniebienia oraz stosowaniem leczenia ortodontycznego a częstością izolowania grzybów drożdżopodobnych, z rodzaju *Candida*. Zakażenia tymi grzybami wykrywane w różnych ontocenozach ludzkiego organizmu, w rozwoju zakażeń oportunistycznych, często o ciężkim przebiegu, stanowią poważny problem medyczny u pacjentów z zaburzeniami i defektami reakcji obronnej. Stwierdzono istnienie korelacji między częstością występowania grzybów drożdżopodobnych a wskaźnikami klinicznymi odzwierciedlającymi niezadowolający stan jamy ustnej i nasilone procesy zapalne.

Kontynuacja badań nad skutkami zmian w składzie gatunkowym mikrobiota jamy ustnej pacjentów z wadami wrodzonymi struktur jamy ustnej jest konieczna ze względu na poważne ryzyko zakażeń lokalnych, a także ryzyko transmisji chorobotwórczych mikroorganizmów do innych tkanek i narządów. Wyniki takich badań uwzględniane przy podejmowaniu działań prewencyjnych umożliwią ograniczenie/wyeliminowanie zagrożenia powikłaniami okołoterapeutycznymi. Dotyczy to zwłaszcza – wymagającej szczególnej opieki medycznej – grupy populacyjnej pacjentów z wadami narządu żucia leczonych ortodontycznie.

Piśmiennictwo

- Ahn S.J., Lee S.J., Lim B.S., Nahm D.S.: Quantitative determination of adhesion patterns of cariogenic streptococci to various orthodontic brackets. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* **132**, 815–821 (2007)
- Akcam M.O., Evirgen S., Uslu O., Memikoglu U.T.: Dental anomalies in individuals with cleft lip and/or palate. *Eur. J. Orthod.* **32**, 207–213 (2010)
- Al-Nawas B., Wriedt S., Reinhard J., Keilmann A., Wehrbein H., Wagner W.: Influence of patient age and experience of the surgeon on early complications after surgical closure of the cleft palate – a retrospective cohort study. *J. Craniomaxillofac. Surg.* **41**, 135–139 (2013)
- Andrucioli M.C., Nelson-Filho P., Matsumoto M.A., Saraiva M.C., Feres M., de Figueiredo L.C., Martins L.P.: Molecular detection of in-vivo microbial contamination of metallic orthodontic brackets by checkerboard DNA-DNA hybridization. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* **141**, 24–29 (2012)
- Antoszewski B.: Wielkość środowiska pochodzenia a częstość występowania rozszczepów wargi i (lub) podniebienia u noworodków z terenu województwa łódzkiego. *Now. Lek.* **76**, 414–417 (2007)
- Baricevic M., Mravak-Stipetic M., Majstorovic M., Baranovic M., Baricevic D., Lorcar B.: Oral mucosal lesions during orthodontic treatment. *Int. J. Paediatr. Dent.* **21**, 96–102 (2011)
- Batoni G., Pardini M., Giannotti A., Ota F., Giuca M.R., Gabriele M., Campa M., Senesi S.: Effect of removable appliances on oral colonisation by mutans streptococci in children. *Eur. J. Oral Sci.* **109**, 388–392 (2001)
- Biancaniello T.M., Romero J.R.: Bacterial endocarditis after adjustment of orthodontic appliances. *J. Pediatr.* **118**, 248–249 (1991)
- Bonner M., Santi-Rocca J i wsp.: Detection of the amoeba *Entamoeba gingivalis* in periodontal pockets. *Parasite*, **21**, 30 (2014)
- Bóznér P., Demeš P.: Degradation of collagen types I, III, IV and V by extracellular proteinases of an oral flagellate *Trichomonas tenax*. *Arch. Oral Biol.* **36**, 765–770 (1991)
- Burden D.J., Mullally B., Sandler J.: Orthodontic treatment of patients with medical disorders. *Eur. J. Orthod.* **23**, 363–372 (2001)
- Burden D.J., Coulter W.A., Johnston C.D., Mually B., Stevenson M.: The prevalence of bacteremia on removal of fixed orthodontic appliances. *Eur. J. Orthod.* **26**, 443–447 (2004)
- Čechová L., Leifertová I., Lisa M.: The incidence of *Entamoeba gingivalis* in the oral cavity. *Acta Univ. Carol. Med.* **33**, 549–559 (1987)
- Cielecka D., Chomicz L., Piekarczyk J., Walski M., Zawadzki P.J., Bednarczyk A., Szubińska D.: Oral cavity condition and occurrence of parasitic protozoans in patients with genetic diseases. *Acta Parasitol.* **45**, 2, 107–112 (2000)
- Chomicz L., Piekarczyk J., Zawadzki P.J., Piekarczyk B., Świderski Z., Bednarczyk A.: Occurrence of oral protozoans in relation to oral cavity status in patient of different population groups. *Eur. J. Cell Biol.* **52**, 130 (2000)
- Chomicz L., Piekarczyk J., Fiedor P., Starościak B., Szubińska D., Wojtowicz A.: Screening evaluation of oral cavity microorganisms in dialyzed and kidney allograft recipients under chronic immunosuppression. *Transplant. Proc.* **34**, 675 (2002)
- Chomicz L., Piekarczyk J., Starościak B., Fiedor P., Piekarczyk B., Szubińska D., Zawadzki P.J., Walski M.: Comparative studies on the occurrence of protozoans, bacteria and fungi in the oral cavity of patients with systemic disorders. *Acta Parasitol.* **47**, 147–153 (2002)
- Chomicz L., Piekarczyk P., Zawadzki P., Korczyk A., Piekarczyk B., Perkowski K., Starościak B.: Fungal and protozoan

- pathogens in oral cavity as potential factors of complications in the patients with chronic diseases. *Tropical Medicine and International Health Proceedings*, MJ Boeree (ed.), Medimond S. r l, 117–120 (2007a)
19. Chomicz L., Zawadzki P., Piekarczyk P., Siemińska B., Perkowski K., Starościk B., Szałwiński M., Korczyk A.: Ocena wybranych składników ontocenozy jamy ustnej jako potencjalnych czynników powikłań przed i pozabiegowych. I. Grzyby oportunistyczne i pierwotniaki w jamie ustnej pacjentów chorych przewlekłe z zaburzeniami stomatognatycznymi. (Assessment of selected components of the oral cavity ontocenosis as potential factors of before and after surgery complications. I. Opportunistic fungi and protozoans in the oral cavity of patients with chronic diseases and stomatognathic disorders). *Chirurgia Czaszkowo-Szczękowo-Twarzowa i Ortopedia Szczękowa*, 1, 1–2, 26–32, (2007b)
 20. Chomicz L., Perkowski K., Siemińska-Piekarczyk B., Starościk B., Piekarczyk P., Graczyk Z., Szałwiński M., Olędzka G., Graczyk T.K., Zawadzki P.: Assessment of various components of oral cavity ontocenosis as potential factors for pre and post-surgery complications. II. Opportunistic fungi and protozoans in the oral cavity of orthodontic patients. *Chir. Czaszk. Szczęk. Twarz. Ortop. Szczęk.* 4, 67–76 (2009a)
 21. Chomicz L., Starościk B., Olędzka G., Zawadzki P. Piekarczyk P., Graczyk Z., Piekarczyk B., Padzik M., Graczyk T.K.: Studies on the oral cavity microorganisms as the risk factors of local/general infections in patients of different population groups requiring the surgical procedure. *Chir. Czaszk. Szczęk. Twarz. Ortop. Szczęk.* 4, 149–156 (2009b)
 22. Costa M.R., da Silva V.C., Miqui M.N., Colombo A.P., Cirelli J.A.: Effects of ultrasonic, electric, and manual toothbrushes on subgingival plaque composition in orthodontically banded molars. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* 137, 229–235 (2010)
 23. Dahllof G., Ussisoo-Joandi R., Ideberg M., Modeer T.: Caries, gingivitis, and dental anomalies in preschool children with cleft lip and/or palate. *Cleft Palate Craniofac. J.* 26, 233–238 (1989)
 24. Dao A.H., Robinson D.P., Wong S.W.: Frequency of *Entamoeba gingivalis* in human gingival scrapings. *Am. J. Clin. Path.* 80, 380–383 (1983)
 25. Demling A., Heuer W., Elter C., Heidenblut T., Bach F.W., Schweska-Polly R., Stiesch-Scholz M.: Analysis of supra- and subgingival long-term biofilm formation on orthodontic bands. *Eur. J. Orthod.* 31, 202–206 (2009)
 26. Dimasuy K.G.B., Rivera W.L.: First report of *Trichomonas tenax* infections in the Philippines. *Parasitol. Int.* 63, 400–402 (2014)
 27. Doboucher C., Mogenet M., Perie G.: Salivary Trichomoniasis. A case report of infestation of a submaxillary gland by *trichomonas tenax*. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 119, 277–279 (1995)
 28. Doboucher C., Farto-Bensasson F., Chéron M., Peltier J., Beau-fils F., Périé G.: Lymph node infection by *Trichomonas tenax*: report of a case with co-infection by *Mycobacterium tuberculosis*. *Hum. Pathol.* 31, 1317–1321 (2000)
 29. Downes J., Mantzourani M., Beighton D., Hooper S., Wilson M.J., Nicholson A., Wade W.G.: *Scardovia wiggisiae* sp. nov., isolated from the human oral cavity and clinical material, and emended descriptions of the genus *Scardovia* and *Scardovia inopinata*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 25–29 (2011)
 30. Feki A., Molet B.: Importance des protozoaires *Trichomonas tenax* et *Entamoeba gingivalis* dans la cavité buccale humaine. *Rev. Odontostomatol.* 19, 37–45 (1990)
 31. Filoche S., Wong L., Sissons C.H.: Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. *J. Dent. Res.* 89, 8–18 (2010)
 32. Fortak B., Płaneta-Małecka I., Trojanowska-Lipczyk J., Czkwianianc E., Dyńska E., Kozieł B.: Rola grzybów z rodzaju *Candida* w etiopatogenezie zapalenia błony śluzowej przelyku, żołądka i dwunastnicy u dzieci. *Wiad. Parazytol.* 50, 381–386 (2004)
 33. Freitas A.O., Marquezan M., Nojima M.C., Alviano D.S., Maia L.C.: The influence of orthodontic fixed appliances on the oral microbiota: a systematic review. *Dental Press J. Orthod.* 19, 46–55 (2014)
 34. Ghabanchi J., Zibaei M., Afkar M.D., Sarbazie A.H.: Prevalence of oral *Entamoeba gingivalis* and *Trichomonas tenax* in patients with periodontal disease and healthy population in Shiraz, southern Iran. *Indian J. Dent. Res.* 21, 89–91 (2010)
 35. Gizani S., Papaioannou W., Haffajee A.D., Kavadia K., Quirynen M., Papagiannoulis L.: Distribution of selected cariogenic bacteria in five different intra-oral habitats in young children. *Int. J. Paediatr. Dent.* 19, 193–200 (2009)
 36. Gomar-Vercher S., Cabrera-Rubio R., Mira A., Montiel-Company J.M., Almerich-Silla J.M.: Relationship of children's salivary microbiota with their caries status: a pyrosequencing study. *Clin. Oral Investig.* 18, 2087–2094 (2014)
 37. Hadler-Olsen S., Sandvik K., El-Agroudi M.A., Øgaard B.: The incidence of caries and white spot lesions in orthodontically treated adolescents with a comprehensive caries prophylactic regimen – a prospective study. *Eur. J. Orthod.* 34, 633–639 (2012)
 38. Jacobsen E.B., Friis-Møller A., Friis J.: *Trichomonas* species in subhepatic abscess. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 6, 296–297 (1987)
 39. Jian B., Kolansky A.S., Baloach Z.W., Gupta P.K.: *Entamoeba gingivalis* pulmonary abscess-diagnosed by fine needle aspiration. *Cytojournal*, 30, 5–12 (2008)
 40. Jordan C., LeBlanc D.J.: Influences of orthodontic appliances on oral populations of mutans streptococci. *Oral Microbiol. Immunol.* 17, 65–71 (2002)
 41. Jugessur A., Farlie P.G., Kilpatrick N.: The genetics of isolated orofacial clefts: from genotypes to subphenotypes. *Oral Dis.* 15, 437–453 (2009)
 42. Kaczkowski H., Sarowska J., Wojnicz D., Nowicka J., Kozłowski Z., Jankowski S.: Występowanie *Entamoeba gingivalis* i *Trichomonas tenax* w jamie ustnej u chorych na ostre białaczki i nowotwory układu limforetikularnego. *Dent. Med. Probl.* 41, 683–685 (2004)
 43. Kamble V.D., Parkhedkar R.D., Sarin S.P., Patil P.G.: Presurgical nasoalveolar molding (PNAM) for a unilateral cleft lip and palate: a clinical report. *J. Prosthodont.* 22, 74–80 (2013)
 44. Kim K., Heimisdottir K., Gebauer U., Persson G.R.: Clinical and microbiological findings at sites treated with orthodontic fixed appliances in adolescents. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* 137, 223–228 (2010)
 45. King G.N., Healy C.M., Glover M.T., Kwan J.T., Williams D.M., Leigh I.M., Thornhill M.H.: Prevalence and risk factors associated with leukoplakia, hairy leukoplakia, erythematous candidiasis, and gingival hyperplasia in renal transplant recipients. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 78, 718–726 (1994)
 46. Kornman K.S.: Host modulation as a therapeutic strategy in the treatment of periodontal disease. *Clin. Infect. Dis.* 28, 520–526 (1999)
 47. Kowalski J.: *Campylobacter rectus* – charakterystyka drobnoustroju oraz jego rola w zapaleniach dziąseł i przyzębia. *Dent. Med. Probl.* 47, 478–481 (2010)
 48. Krvavac S.: Trichomoniasis of the breast diseased by fibrocystic mastopathy: pathogenic rather than saprophytic relationship (*Trichomonas* in fibrocystic mastopathy process). *Med. Arh.* 52, 143–145 (1998)
 49. Kurnatowska A.J.: Współzależność między występowaniem zmian chorobowych a *Trichomonas tenax* oraz grzybami w ontogenezie jamy ustnej. *Czas. Stomatol.* 1, 17–22 (1984)
 50. Kurnatowska A.: Wartości wskaźników zalecanych przez WHO do oceny stanu jamy ustnej u pacjentów z rozpoznaną inwazją *Trichomonas tenax*. *Wiad. Parazytol.* 36, 245–249 (1990)

51. Kurnatowska A.J.: Występowanie pierwotniaków *Trichomonas tenax* (O.F. Müller, 1773) Dobell, 1939 i *Entamoeba gingivalis* (Gross, 1879) Brumpt, 1913 w jamie ustnej. *Med. Biol.* **1**, 21–23 (1995)
52. Kurnatowska A.J., Kurnatowski P.: Trichomonosomycosis of the oral cavity. *Wiad. Parazytol.* **45**, 129–133 (1999)
53. Kurnatowska A.J., Dudko A.: *Trichomonas tenax* w ontocenozie jamy ustnej. *Czas. Stomatol.* **55**, 559–562 (2002)
54. Kurnatowska A.J.: Występowanie grzybów w ontocenozie jamy ustnej a zmiany błony śluzowej. *Mikol. Lek.* **10**, 295–298 (2003)
55. Kurnatowski P.: Niektóre aspekty grzybic wieloogniskowych i uogólnionych. *Wiad. Parazytol.* **50**, 359–365 (2004)
56. Kurnatowski P., Tyczkowska-Sieroń E.: Wybrane czynniki sprzyjające zarażeniom grzybami w populacji człowieka. *Wiad. Parazytol.* **50**, 367–372 (2004)
57. Leterrier M., Morio F., Renard B.T., Poirier A.S., Miegville M., Chambreuil G.: Trichomonads in pleural effusion: case report, literature review and utility of PCR for species identification. *New Microbiol.* **35**, 83–87 (2012)
58. Lewis K.L., Doherty D.E., Ribes J., Seabolt J.P., Bensadoun E.S.: Empyema caused by *Trichomonas*. *Chest* **123**, 291–292 (2003)
59. Linke H.A.B., Gannon J.T., Obin J.N.: Clinical survey of *Entamoeba gingivalis* by multiple sampling in patients with advanced periodontal disease. *Int. J. Parasitol.* **19**, 803–808 (1989)
60. Lucas V.S., Gupta R., Ololade O., Gelbier M., Roberts G.J.: Dental health indices and caries associated microflora in children with unilateral cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac. J.* **37**, 447–452 (2000)
61. Łuczak M., Swoboda-Kopeć E.: Wybrane zagadnienia z mikrobiologii jamy ustnej. Czelej, Lublin (2004)
62. Mahmoud M.S., Rahman G.A.: Pulmonary trichomoniasis: improved diagnosis by using polymerase chain reaction targeting *Trichomonas tenax* 18S rRNA gene in sputum specimens. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* **34**, 197–211 (2004)
63. Małkiewicz E., Pisulska-Otremba A.: Orthodontic treatment within the programme of Multidisciplinary Care of Children with Clefts of the Primary and/or Secondary Palate. *Dent. Med. Probl.* **41**, 263–266 (2004)
64. Mallat H., Podglajen I., Lavarde V., Mainardi J.L., Frappier J., Cornet M.: Molecular characterization of *Trichomonas tenax* causing pulmonary infection. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 3886–3887 (2004)
65. Marsh P.D.: The significance of maintaining the stability of the natural microflora of the mouth. *Br. Dent. J.* **171**, 174–177 (1991)
66. Marsh P.D.: Dental plaque: biological significance of a biofilm community lifestyle. *J. Clin. Periodontol.* **32**, 7–15 (2005)
67. McLaughlin J.O., Coulter W.A., Coffey A., Burden D.J.: The incidence of bacteremia after orthodontic banding. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* **109**, 639–644 (1996)
68. Mierzwińska-Nastalska E.: Udział mechanizmów odpornościowych w zakażeniach grzybiczych. *Prot. Stom.* **49**, 305–310 (1999)
69. Miskiewicz A., Szparecki G., Nowak M., Górska R.: Analiza epidemiologiczna występowania *Candida* species oraz ich lekooporności u pacjentów ze stomatopatią protetyczną. *Nowa Stomatol.* **3**, 141–144 (2013)
70. Mossey P.A., Little J., Munger R.G., Dixon M.J., Shaw W.C.: Cleft lip and palate. *Lancet*, **374**, 1773–1785 (2009)
71. Nagao E., Yamamoto A., Igarashi T., Goto N., Sasa R.: Two distinct hemolysins in *Trichomonas tenax* ATCC 30207. *Oral Microbiol. Immunol.* **15**, 355–359 (2000)
72. Naranjo A.A., Triviño M.L., Jaramillo A., Betancourth M., Botero J.E.: Changes in the subgingival microbiota and periodontal parameters before and 3 months after bracket placement. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* **130**, 17–22 (2006)
73. Nelson-Filho P., Valdez R.M., Andruccioli M.C., Saraiva M.C., Feres M., Sorgi C.A., Faccioli L.H.: Gram-negative periodontal pathogens and bacterial endotoxin in metallic orthodontic brackets with or without an antimicrobial agent: an in-vivo study. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* **140**, 281–287 (2011)
74. Offenbacher S., Barros S.P., Beck J.D.: Rethinking periodontal inflammation. *J. periodontol.* **79**, 1577–1584 (2008)
75. Panczerz-Łoś M., Kmiec Z., Bereznowski Z., Witali A.: Miejsce i ogólnoustrojowe konsekwencje periodontitis i peri-implantitis. Przegląd piśmiennictwa. Local and general consequences of periodontitis and peri-implantitis: A literature review. *Protet. Stomatol.* **LX**, 1, 44–49 (2010)
76. Paolantonio M., Festa F., di Placido G., D'Attilio M., Catamo G., Piccolomini R.: Site-specific subgingival colonization by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in orthodontic patients. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* **115**, 423–428 (1999)
77. Perdikogianni H., Papaioannou W., Nakou M., Oulis C., Papagiannoulis L.: Periodontal and microbiological parameters in children and adolescents with cleft lip and/or palate. *Int. J. Paediatr. Dent.* **19**, 455–467 (2009)
78. Perez-Jaffe L., Katz R., Gupta P.K.: *Entamoeba gingivalis* identified in a left upper neck nodule by fine-needle aspiration: a case report. *Diagn. Cytopathol.* **18**, 458–461 (1998)
79. Perkowski K.: Badania nad ontocenozą jamy ustnej pacjentów leczonych ortodontycznie. Praca doktorska WUM (2006)
80. Perkowski K., Chomicz L., Starościak B., Zadurska M., Szałwiński M., Zawadzki P., Piekarczyk P., Ołędzka G.: Occurrence of pathogenic bacteria in the oral cavity of the orthodontic patients requiring surgical treatment. *Stomatol. Współcz.* **19**, 8–13 (2012)
81. Perzyńska K., Grygorczuk A., Cwalina L., Herud B.: Ocena stanu przyzębia i higieny jamy ustnej pacjentów leczonych aparatami stałymi i ruchomymi. *Czas. Stomatol.* **49**, 636–640 (1996)
82. Petti S., Barbato E., Simonetti D'Arca A.: Effect of orthodontic therapy with fixed and removable appliances on oral microbiota: a six-month longitudinal study. *New Microbiol.* **20**, 55–62 (1997)
83. Piątkowska-Jakubas B., Skotnicki A.N.: Zakażenia grzybicze u chorych z granulocytopenią – problem diagnostyczny i terapeutyczny. *Med. po Dypl.* **3**, 7–12 (1995)
84. Piekarczyk J., Fiedor P., Chomicz L., Szubińska D., Starościak B., Piekarczyk B., Zawadzki P., Żebrowska J., Dudziński T.: Oral cavity as potential source of infections in recipients with diabetes mellitus. *Transplant. Proc.* **35**, 2207–2208 (2003)
85. Pietruski J.K.: Zaburzenia odporności w kandydiazie jamy ustnej. Przegląd piśmiennictwa. *Czas. Stomatol.* **43**, 282–286 (1995)
86. Pietrzak-Bilińska B.: Grzybice jamy ustnej u dzieci leczonych ortodontycznie. *Czas. Stomatol.* **51**, 125–132 (1998)
87. Reczyk J., Głębski J., Nierychlewska A.: Występowanie pierwotniaków w jamie ustnej w zależności od chorób i zabiegów operacyjnych w okolicy szczękowo-twarzowej. *Czas. Stomatol.* **33**, 237–244 (1980)
88. Ribaux C.L., Couble M.L., Magloire H., Herbage D.: Degradation of type I collagen by *Trichomonas tenax*: a biochemical study. *J. Dent. Res.* **60**, 1202 (1981)
89. Sampaio-Maia B., Monteiro-Silva F.: Acquisition and maturation of oral microbiome throughout childhood: An update. *Dent. Res. J.* **11**, 291–301 (2014)
90. Schultes G., Gaggl A., Karcher H.: Comparison of periodontal disease in patients with clefts of palate and patients with unilateral clefts of lip, palate, and alveolus. *Cleft Palate Craniofac. J.* **36**, 322–327 (1999)
91. Segovic S., Buntak-Kobler D., Galic N., Katunaric M.: *Trichomonas tenax* proteolytic activity. *Coll. Antropol.* **22**, 45–49 (1998)
92. Shafer W.G., Hine M.K., Levy B.M.: *Shafer's Textbook of Oral Pathology* (ed 6). St. Louis, Elsevier, 16–17 (2009)

93. Shiota T., Arizono N., Morimoto T., Shimatsu A., Nakao K.: *Trichomonas tenax* empyema in an immunocompromised patient with advanced cancer. *Parasite*, **5**, 375–377 (1998)
94. Słotwińska S.M., Wierzbicka M.: Zakażenie grzybami w zapaleniu przyzębia. *Czas. Stomatol.* **51**, 237–240 (1998)
95. Śmiech-Słomkowska G., Białasiewicz D., Kurnatowska A.: Zakażenia grzybami jamy ustnej dzieci leczonych ortodontycznie. *Czas. Stomatol.* **49**, 189–193 (1996)
96. Socransky S.S., Haffajee A.D., Cugini M.A., Smith C., Kent R.L. Jr: Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* **25**, 134–144 (1998)
97. Tanner A.C., Mathney J.M., Kent R.L., Chalmers N.I., Hughes C.V., Loo C.Y., Pradhan N., Kanasi E., Hwang J., Dahlan M.A., Papadopolou E., Dewhirst F.E.: Cultivable anaerobic microbiota of severe early childhood caries. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1464–1474 (2011)
98. Tanner A.C., Sonis A.L., Lif Holgerson P., Starr J.R., Nunez Y., Kressler C.A., Paster B.J., Johansson I.: White-spot lesions and gingivitis microbiotas in orthodontic patients. *J. Dent. Res.* **91**, 853–858 (2012)
99. Tanner A.C.: Anaerobic culture to detect periodontal and caries pathogens. *J. Oral Biosci.* **57**, 18–26 (2015)
100. Thornton J. B., Nimer S., Howard P.S.: The incidence, classification, etiology and embryology of oral clefts. *Semin. Orthod.* **2**, 162–168 (1996)
101. Thuy D., Devine D., Marsh P.: Oral biofilms: molecular analysis, challenges, and future prospects in dental diagnostics. *Clin. Invest. Dent.* **5**, 11–19 (2013)
102. Turkkahraman H., Sayin O., Bozkur Y., Yetkin Z., Kaya S., Onal S.: Archwire ligation techniques, microbial colonization and periodontal status in orthodontically treated patients. *Angle Orthodontist.* **75**, 227–231 (2005)
103. Zawadzki P. Ocena stanu jamy ustnej ze szczególnym uwzględnieniem występowania drobnoustrojów jako czynników ryzyka infekcji u pacjentów z upośledzeniem umysłowym. Praca doktorska. WUM. Warszawa 2005.
104. Żurowski M., Szponar-Żurowska A., Jarzębowska M., Masiota J., Palicka M., Szukalska D., Śnieć M.: Występowanie grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* w jamie ustnej młodzieży licealnej. *Czas. Stomatol.* **47**, 259–262 (1994)