



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ESPECIALIZACIÓN EN ENDOPERIODONTOLOGÍA

***“CAMBIOS EN LA MICROFLORA AL CONCLUIR LA
FASE I
DE LA TERAPIA PERIODONTAL”***

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN ENDOPERIODONTOLOGÍA
PRESENTA:**

C.D. LUISA ADRIANA LÓPEZ OSUNA

DIRECTOR DE LA TESIS:

DR. SALVADOR ARRÓNIZ PADILLA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE:

INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	3
JUSTIFICACION	4
MARCO TEORICO	5
HIPOTESIS	21
MATERIAL Y METODOS	21
RESULTADOS	26
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	33
BIBLIOGRAFÍA	35

CAMBIOS EN LA MICROFLORA AL CONCLUIR LA FASE I DE LA TERAPIA PERIODONTAL

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, numerosas investigaciones han demostrado el papel que desempeñan los microorganismos en el establecimiento y progresión de la enfermedad periodontal.

Dentro los avances más significativos se encuentra la identificación de los patógenos periodontales específicos, así como el reconocimiento de la placa dental bacteriana como biopelícula, lo cual significa que existen relaciones sinérgicas entre los microorganismos que la conforman, logrando así incrementar su resistencia.

El papel etiológico que desempeñan las especies de la microflora subgingival en relación con la gingivitis y periodontitis ha sido ampliamente documentado.

Hoy en día se sabe que entre los patógenos periodontales específicos que se presentan con mayor frecuencia y proporción, se pueden incluir los siguientes: *Actinobacillus acinomycetemcomitans*, *Porphyromona gingivalis* y *Tannerella forsythensis*.

Diversos artículos aportan evidencia de que la terapia periodontal no quirúrgica provoca cambios que favorecen a los tejidos periodontales.

La terapia periodontal no quirúrgica consiste en el desbridamiento mecánico de las superficies supra y sub gingivales del diente con el objetivo de eliminar la placa dental bacteriana y el cálculo. Además incluye la instrucción al paciente para llevar a cabo procedimientos de control personal de placa (técnica de cepillado, control personal de placa, uso de hilo dental). Lo anterior encaminado a reducir la carga bacteriana y alterar su composición. Como resultado de estos cambios microbiológicos, se tendrá una disminución en la inflamación y una estabilidad relativa de los niveles de inserción periodontal.

OBJETIVOS:

- ≅ Determinar los cambios que se presentan en la comunidad bacteriana periodontopatógena, al concluir la fase I del tratamiento que se realiza tanto en la clínica de Periodoncia de la licenciatura de Cirujano Dentista como en la clínica de Especialización en Endoperiodontología.
- ≅ Correlacionar los cambios en la comunidad bacteriana periodontopatógena con las condiciones periodontales clínicas del paciente.

JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades periodontales son infecciones causadas por las bacterias que residen en las biopelículas subgingivales.

Mediante diferentes alternativas, se puede llevar a cabo el tratamiento del componente infeccioso de estas enfermedades y lograr cambios en el tejido dañado o perdido por su causa.

La terapia periodontal no quirúrgica ha sido ampliamente documentada como parte del tratamiento periodontal.

El tratamiento inicial (Fase I) para los pacientes que acuden a la clínica de Periodoncia en la licenciatura de Cirujano Dentista y en la especialización en Endoperiodontología, consiste en una terapia periodontal no quirúrgica que comienza con la instrucción del paciente sobre la técnica de cepillado específica, limpieza interdental, y control personal de placa. Además, se lleva a cabo el raspado y alisado radicular para remover la capa de cemento contaminada por diversos microorganismos patógenos presentes en bolsas periodontales.

De esta forma, la remoción de todos los depósitos que se encuentran sobre los dientes, se considera el primer paso en la terapia dirigida a reducir la inflamación y profundidad al sondeo.

Los conceptos actuales sugieren que las diversas manifestaciones de la enfermedad periodontal son causadas por un limitado número de los llamados patógenos periodontales que se acumulan en la superficie de los dientes, iniciando una serie de eventos relacionados con la respuesta del hospedero conduciendo a la destrucción de las estructuras de soporte del diente.

El desarrollo de la microbiología y la genética, ha ampliado el entendimiento de la naturaleza infecciosa y la patogenicidad de la enfermedad periodontal.

A pesar de estos significativos avances en el conocimiento de la patogénesis y factores que afectan la progresión de la enfermedad periodontal, diversas investigaciones, permiten dar un soporte científico a la terapéutica dirigida a eliminar o modificar biopelícula bucal, así como la remoción de los factores que facilitan su formación.

Por lo anterior, evaluar los cambios existentes en la microflora patógena periodontal, permitirá establecer una correlación entre esta última y las condiciones periodontales del paciente.

De esta forma se logrará enfatizar la importancia de implementar la Fase I como tratamiento periodontal de inicio, ya que en ocasiones tanto el dentista de práctica general como el especialista en Endoperiodontología subestiman su importancia.

MARCO TEÓRICO

Las biopelículas, son comunidades microbianas estructuradas metabólicamente y espacialmente dentro de una matriz de polímero extracelular y situadas en una interfase. Como regla, las biopelículas se forman en sistemas de flujo en presencia del sustrato necesario para su crecimiento.

De acuerdo con los conceptos actuales, en un ambiente natural, del 95 al 99% de los microorganismos existen en forma de biopelícula.

Existen diversos tipos de interfases en las cuales se puede llevar a cabo la asociación bacteriana como son: líquido (medio acuoso)-superficie sólida, líquido-aire, aquella que se forma entre dos líquidos que no se mezclan y sólido-aire.

Las más comunes y mejor estudiadas formas de biopelícula son aquellas que se encuentran en la interfase líquida-sólida, siendo la biopelícula dental (PLACA DENTAL BACTERIANA) una de ellas. (2)

Los 215cm² de superficie que integran la cavidad bucal, presentan numerosas superficies para la colonización bacteriana.

Las superficies mucosas, están cubiertas con diferentes tipos de epitelios, mientras que las superficies sólidas están representadas por los dientes o diversos tipos de restauraciones.

Estas superficies se encuentran constantemente en contacto con la saliva formando la película adquirida que provee de un ambiente excelente para el desarrollo de la biopelícula. (1)

Los microorganismos que colonizan estas superficies producen biopelículas de diferentes complejidades dependiendo de su localización intra bucal, aspectos genéticos y factores individuales relativos a cada sujeto.

Por complejo que pueda parecer, las aproximadamente 500 especies detectadas en la placa subgingival (cualquier individuo puede albergar 150 o más especies diferentes), son solo una fracción minúscula del billón o más bacterias que se ha estimado habitan en el planeta Tierra y que tienen el potencial de colonizar la cavidad bucal. (1)

La ecología microbiana habla de la interrelación entre los microorganismos y sus ambientes. Los ecologistas que estudian el hábitat, incluyendo los microbiólogos periodontales, examinan los microorganismos de un hábitat en particular, analizando los efectos de estos en su ambiente y la influencia del hábitat sobre los residentes.

El ECOSISTEMA es un complejo de organismos en un ambiente específico y su asociación con el entorno que los rodea. El ecosistema incluye el conjunto de especies y los constituyentes orgánicos e inorgánicos que caracterizan a un sitio en particular.

Cada ecosistema tiene una colección de organismos y componentes no microbianos únicos.

Los organismos que habitan un sitio determinado constituyen una comunidad. El conjunto de organismos que constituyen una comunidad, contiene a las poblaciones de especies microbianas individuales.

La COMUNIDAD es la unidad biológica superior de la jerarquía ecológica compuesta por individuos y poblaciones.

Una comunidad microbiana es un conjunto de poblaciones microbianas que interactúan entre ellas y coexisten en un espacio y tiempo determinado, denominado HABITAT.

Marshall, indicó que la ecología microbiana tiene tres objetivos principales con respecto a la comprensión del papel de los microorganismos en su hábitat natural:

1. Definir la dinámica poblacional en las comunidades
2. Definir las características físico-químicas de los microambientes
3. Comprender los procesos metabólicos realizados por microorganismos en un hábitat determinado.

Para conseguir estos objetivos, es esencial determinar el papel de los organismos individuales en el contexto de las comunidades en funcionamiento en el ambiente.

Las poblaciones de una comunidad interactúan entre ellas de manera integrada, y lo hacen en un espacio físico, el hábitat. Las poblaciones que conforman la comunidad en un hábitat tienen un papel funcional especializado, llamado NICHOS.

Las poblaciones compiten para ocupar los nichos disponibles. En una comunidad, cada una de las poblaciones que han logrado mantenerse allí desempeña un papel funcional que contribuye al mantenimiento de esa comunidad.

Las poblaciones de una comunidad que utilizan los mismos recursos, muestran a menudo una intensa competitividad. En algunos casos, los primeros organismos en llegar y colonizar una zona tienen una ventaja selectiva y pueden conservar un nicho en la comunidad superando a otros organismos. En otros casos, se produce una sucesión de poblaciones, en la cual las mejor adaptadas desplazan a las que ocupaban el nicho originalmente. (20)

SUCESION EN LAS COMUNIDADES MICROBIANAS

En la comunidad, cada población ocupa un nicho determinado del ecosistema. Con el tiempo algunas poblaciones son sustituidas por otras mejor adaptadas para desempeñar un papel funcional (nicho ecológico) en el ecosistema; es decir la estructura de la comunidad evoluciona con el tiempo.

Cada población desarrolla un conjunto de procesos específicos, que constituye el nicho de dicha población en ese ecosistema. Los ecosistemas varían según los nichos que tengan disponibles.

Algunos ecosistemas tienen diferentes nichos y en ellos puede darse una alta diversidad. Otros tienen menos nichos y su grado de diversidad es menor incluso cuando todos los nichos están ocupados, y por ello su diversidad es también baja; esto ocurre por ejemplo en ecosistemas alterados en mayor o menor grado, en los que hay una falta de poblaciones fisiológicamente aptas para ocupar alguno de los nichos disponibles.

Las interrelaciones entre las poblaciones de una comunidad, así como las adaptaciones dentro de las diferentes poblaciones, contribuyen a la estabilidad ecológica de la comunidad.

El desarrollo de una comunidad más o menos estable implica una sucesión de poblaciones, un cambio secuencial ordenado en las poblaciones de la comunidad.

La sucesión empieza con la colonización o invasión de un hábitat por las poblaciones microbianas. Si el hábitat no ha sido previamente colonizado, el proceso se conoce como SUCESIÓN PRIMARIA.

Cuando la sucesión ocurre en un hábitat con una colonización y con una historia sucesional previas, se llama SUCESIÓN SECUNDARIA, que es consecuencia de algún acontecimiento catastrófico que ha interrumpido y alterado el curso de la sucesión primaria.

Los primeros colonizadores de un ambiente virgen reciben el nombre de ORGANISMOS PIONEROS los cuales poseen mecanismos de dispersión efectivos.

La colonización inicial ocurre cuando los organismos pioneros alteran las condiciones del hábitat, dificultando una sucesión posterior. Esta colonización puede ampliar el dominio de los organismos pioneros, pero generalmente otras poblaciones mejor adaptadas al hábitat ya colonizado, y por tanto alterado, desplazan a los organismos pioneros.

A medida que este hábitat sufre cambios adicionales, los invasores secundarios también son desplazados. La sucesión finaliza cuando se llega a un conjunto de poblaciones relativamente estables; es lo que se denomina COMUNIDAD CLIMAX.

Según la concepción ecológica clásica, una comunidad clímax representa un estado de equilibrio, sin embargo, la concepción actual considera que el equilibrio y las comunidades clímax se dan raramente, ya que las perturbaciones interrumpen al azar el proceso sucesional, impidiendo así que la comunidad alcance el equilibrio completo.

En algunos procesos sucesionales los microorganismos modifican el hábitat, lo cual permite el desarrollo de nuevas poblaciones; por ejemplo, la creación de condiciones anóxicas por la presencia de anaerobios facultativos permite el crecimiento de poblaciones anaerobias estrictas. Esto se conoce como SUCESIÓN AUTOGÉNICA.

Cuando los factores ambientales, tales como los cambios estacionales son los que alteran el hábitat, esta se conoce como SUCESIÓN ALOGÉNICA.

Aunque un proceso sucesional siga una secuencia de cambios poblacionales predecibles, los factores responsables de esta secuencia ordenada a menudo son poco conocidos.

Los tiempos de generación rápidos de muchos microorganismos pueden causar grandes fluctuaciones en las poblaciones, los cambios ambientales pueden imposibilitar la sucesión ordenada de comunidades microbianas.

También puede ocurrir que los acontecimientos iniciales al azar determinen que organismos ocuparan los nichos del ecosistema y dirigirán la secuencia de acontecimientos posteriores, por tanto en muchos hábitat no se da la sucesión hacia una comunidad clímax.

Incluso cuando se alcanza el equilibrio respecto a la diversidad de especies, éste raramente persiste ya que surgen perturbaciones que alteran el equilibrio interactivo conseguido entre las poblaciones de la comunidad. Esto provoca la extinción acelerada de algunas especies y facilita la inmigración de nuevas especies. (20)

SUCESIÓN EN COMUNIDADES DE BIOPELICULAS

Las biopelículas son comunidades microbianas complejas que se desarrollan formando una sucesión que se inicia con la colonización de una superficie. Las poblaciones adherentes de los hábitats naturales se encuentran en un flujo constante. En un proceso denominado EPIBIOSIS, las especies colonizadoras iniciales son sustituidas por otras antes que otros organismos con requerimientos evolutivos entren a formar parte del consorcio de la superficie. La sucesión se basa en una secuencia de acontecimientos físicos y biológicos, que se inicia por la adsorción de películas orgánicas y va seguida, muy de cerca, por la colonización de la superficie por especies bacterianas.

El tiempo en el que se dan las fases iniciales de la colonización superficies es relativamente corto; en pocos minutos, se puede formar una película molecular y la colonización bacteriana ya es significativa a las 24 horas.

Algunas de las poblaciones microbianas que colonizan las superficies producen exopolímeros durante su crecimiento. La producción de polímeros extracelulares es fundamental para el desarrollo de las comunidades en superficies porque suministra una interfase entre la célula y el medio exterior, influyendo en las tasas de intercambio químico y en la disponibilidad de nutrientes, y facilitado la creación de micro nichos.

Además la presencia de exopolímeros reduce el estrés y facilita la interacción entre las células. Los organismos de la biopelícula, que con frecuencia representan diferentes grupos funcionales y fisiológicos, se benefician del crecimiento en agregado por la protección que ofrece la matriz polimérica contra las perturbaciones externas. (20)

LA PLACA DENTAL BACTERIANA COMO BIOPELICULA

La placa dental como depósito microbiano natural representa una verdadera biopelícula, compuesta de bacterias en una matriz constituida principalmente por polímeros bacterianos extracelulares o productos salivales o de exudado gingival.

La biopelícula provee un medio protector para la colonización de microorganismos y promueve las propiedades metabólicas que no serían posibles si las especies existiesen en un estado de libertad. (3)

El desarrollo de la GINGIVITIS, es un ejemplo de la sucesión microbiana y de la interacción entre las especies.

Los resultados del estudio realizado por Løe y cols. (5) iniciaron un cambio en el entendimiento de la microflora supragingival y el papel patológico de la placa bacteriana en la inflamación gingival.

Løe y cols. demostraron que la PLACA DENTAL BACTERIANA es la causante de la gingivitis. Al suspender el cepillado de dientes durante 28 días, en pacientes con un estado de salud gingival, se observó una rápida acumulación de placa sobre los dientes.

La gingivitis se desarrolló en un periodo de 10-21 días. El restablecimiento de la higiene bucal removió la placa y revirtió los efectos de la gingivitis.

Las muestras obtenidas durante el curso de los 28 días, mostraron que la colonización inicial está dada por cocos y bacilos gram positivos, seguidos de cocos y bacilos gram negativos, así como fusobacterias y filamentos, para finalizar con espirilos y espiroquetas.

Para un mejor entendimiento de la ecología microbiana, la placa dental puede ser dividida en supra y subgingival. Después de que la placa subgingival se establece en las bolsas periodontales, la placa supragingival puede no tener ningún efecto sobre los nichos ecológicos de la placa subgingival. Sin embargo el paso inicial para la formación de la placa subgingival es el soporte de la placa supragingival.

En la actualidad, la dinámica del proceso secuencial de la formación de la biopelícula de la placa dental bacteriana es la siguiente:

- Las bacterias se adhieren a la película adquirida en la superficie del esmalte; cocos gram positivos.
- Estas bacterias crecen en número y se diseminan sobre la superficie del diente siendo los colonizadores primarios. En esta etapa los estreptococos se pueden detectar un día después del establecimiento de la gingivitis experimental.
- Existe auto agregación o coagregación de las células.
- La población crece dentro de una comunidad o biopelícula; sucesión primaria.
- El micro ambiente de la comunidad interna cambia de aerobio a anaerobio facultativo.

- El nicho ecológico cambia y la comunidad se reorganiza; sucesión secundaria.
- El micro ambiente de la comunidad interna cambia de facultativo a anaerobio obligado.
- Ocurre un cambio en el nicho ecológico y la comunidad se reorganiza.
- Una comunidad establece una comunidad clímax. Al final de esta etapa, se detectan espiroquetas y microorganismos móviles 7 días después del establecimiento de la gingivitis.(6)

Otro esquema de la formación de la biopelícula dental, es el siguiente:

TIEMPO	EFFECTOS
15 MINUTOS DESPUES DEL CEPILLADO	Adsorción de proteínas salivales y glicoproteínas sobre las superficies del diente para producir la PELICULA ADQUIRIDA
15 MINUTOS A 2 HORAS	Los COLONIZADORES PRIMARIOS (AEROBIOS, gram +) se adhieren y agregan a la película adquirida para formar la BIOPELICULA DENTAL
2 HORAS A 2 DÍAS	Multiplicación bacteriana, agregación y co agregación, aparecen formas FACULTATIVAS y la biopelícula duplica su masa.
2-5 DÍAS	Ocurren cambios rápidamente, se encuentran presentes bacterias filamentosas, espiroquetas, bacilos y cocos; la biopelícula se vuelve fundamentalmente ANAEROBIA. LOS BACILOS Y COCOS GRAM POSITIVOS SE ENCUENTRAN EN LA SUPERFICIE DEL DIENTE Y LOS FILAMENTOS GRAM NEGATIVOS ADYACENTES A LA ENCÍA. LAS BACTERIAS REPRESENTAN DEL 60-70% DE LA BIOPELICULA.
MAS DE 5 DÍAS	MADURACIÓN DE LA BIOPELICULA. Existen muy pocos cambios en su composición.

Las relaciones sinérgicas que existen entre las bacterias presentes en las biopelículas permiten que los microorganismos que las componen cooperen entre si y formen una barrera protectora de exopolisacáridos. Además las bacterias dentro de una biopelícula se encuentran relativamente inactivas metabólicamente y tienen una mayor resistencia a los antibióticos en comparación con las bacterias libres, de esta forma se requieren dosis de antibióticos 500 veces mayores a las normales para poder afectar a estos microorganismos y la respuesta inmune del hospedero es insuficiente contra las infecciones causadas por biopelículas, permitiendo que el deterioro de las estructuras periodontales siga avanzando.(7)

En 1976, Page y Schroeder, basándose en una revisión bibliográfica y en sus propios experimentos, describieron el desarrollo histológico de la gingivitis y periodontitis.

Su publicación ahora clásica diferenció la gingivitis inicial, temprana y establecida, y las demarcó de la periodontitis. Con el conocimiento de hoy ya no se considera a la “gingivitis inicial” como una etapa temprana de la enfermedad, más bien se le conoce como la respuesta fisiológica de los tejidos y sistema inmune ante la placa bacteriana, incluso cuando ésta se presenta en cantidades mínimas.

ENCÍA PRISTINA (PERFECCIÓN HISTOLÓGICA)

En esta existe escasa migración neutrófila continua hacia la parte coronaria del epitelio de unión y el surco.

ENCIA SANA NORMAL (LESIÓN INICIAL DE PAGE Y SCHROEDER)

En esta existe muy poca acumulación de placa, principalmente aerobios Gram positivos. El epitelio de unión se encuentra normal y la profundidad del surco es mínima. El tiempo de evolución es de 24 hrs.

Existen unos pocos leucocitos polimorfonucleares (PMN) que transmigran el epitelio de unión en dirección al fondo del surco. El tejido conectivo y el hueso alveolar se encuentran normales.

GINGIVITIS TEMPRANA (LESIÓN TEMPRANA DE PAGE Y SCHROEDER – POCOS PLASMOCITOS-)

Existe una mayor acumulación de placa (aerobios Gram positivos). Aumento de migración de neutrófilos y proliferación del epitelio de unión. Existe un aumento en el infiltrado hacia el tejido conectivo, con la presencia de neutrófilos, linfocitos, monocitos y macrófagos. Hay vasos dilatados, proliferación vascular, mayor pérdida de colágeno y muy pocos plasmocitos. Su tiempo de evolución es de 5 a 7 días.

GINGIVITIS ESTABLECIDA (LESIÓN ESTABLECIDA DE PAGE Y SCHROEDER)

Acumulación mayor de placa con presencia de bacterias gram positivas y negativas. Existe una marcada proliferación del epitelio de unión, un infiltrado leucocitario muy incrementado. Sin pérdida ósea ni migración epitelial hacia apical, la densidad plasmocitaria está entre 10 y 30%. Su tiempo de evolución es de 8 a 21 días.

ESTA PUEDE PERSISTIR DURANTE MUCHOS AÑOS SIN QUE SE DESARROLLE LA PERIODONTITIS.

PERIODONTITIS (LESION ESTABLECIDA O AVANZADA)

La transición de gingivitis a periodontitis, es causada en parte por cambios en el potencial patogénico de la placa, y también por una respuesta inapropiada del hospedero ante una infección, así como la existencia de factores predisponentes.

En la periodontitis existen periodos de remisión y exacerbación. Existe pérdida ósea y migración epitelial apical desde el límite cemento adamantino, la densidad plasmocitaria es de más del 50%. (3,21)

La presencia de signos clínicos de gingivitis está relacionada con la presencia de las especies gram negativas.

Los estudios Daneses relacionan ciertos morfotipos bacterianos con los cambios en la situación clínica de diversos sitios que presentan gingivitis.

Las especies que pertenecen a los complejos ROJO y NARANJA tienen una mayor prevalencia y se encuentran en mayor cantidad en los sitios en donde se tiene gingivitis establecida. Estas mismas especies se encuentran en las zonas donde existen lesiones supurativas.

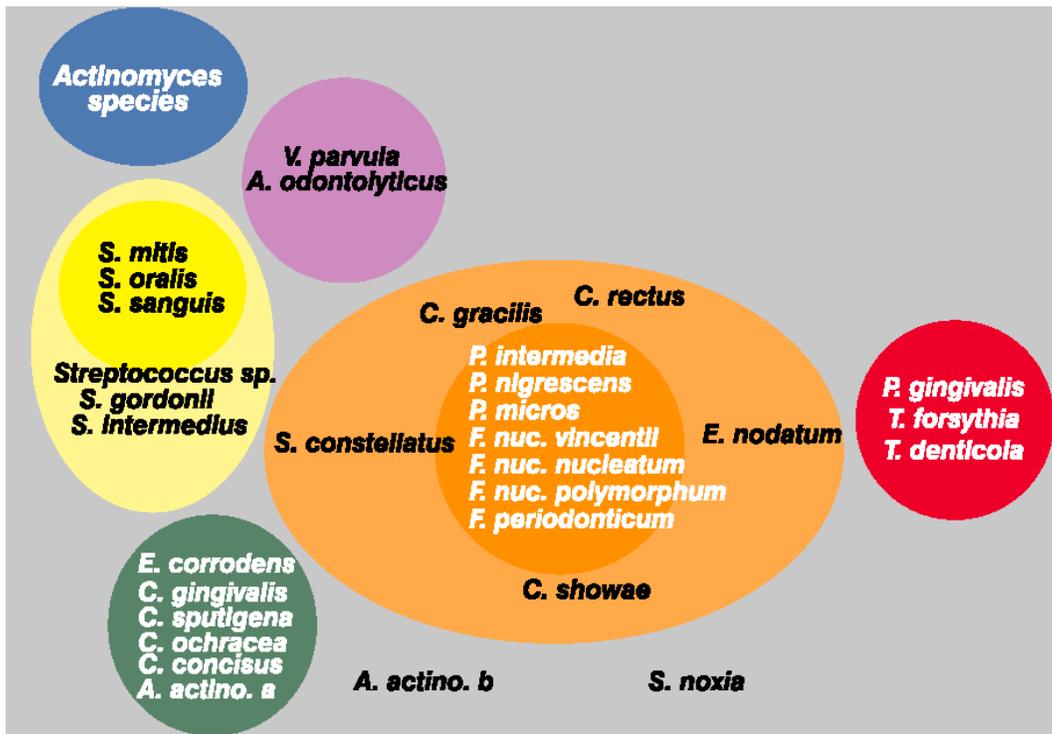


Fig. 1 Socransky, S., Haffajee, A. Periodontal microbial ecology. 2005. *Periodontology* 2000. 38:135-187.

Así, los cambios en la composición de la placa parecen afectar el hábitat, lo que da como resultado la aparición de los signos clínicos de la gingivitis.

Otros estudios indican que tanto el cambio en el hábitat como el desarrollo de la gingivitis afectan el desarrollo de la placa dental bacteriana.

La placa se acumula mucho más rápido después de la limpieza de los sitios que están afectados por la gingivitis que en aquellos sitios que se encuentran periodontalmente sanos.

De esta forma es posible postular un esquema de sucesión microbiológica seguido por una interacción recíproca bacteria-hospedero.

La colonización inicial parece involucrar a miembros de los grupos amarillo, verde y púrpura, en conjunto con especies de *Actinomyces*. Esto lleva a una sucesión autógena en la cual los miembros de los complejos rojo y naranja se vuelven más dominantes.

Se piensa que el incremento en los niveles de los dos últimos complejos lleva a un cambio en el hábitat dando como manifestación clínica la presencia de gingivitis. La gingivitis a su vez, favorece la proliferación de los miembros no solo de los complejos rojo y naranja, sino también de los colonizadores primarios.

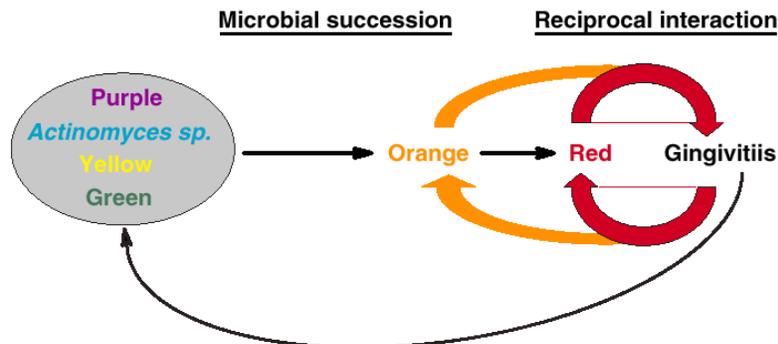


Fig.2 Socransky, S., Haffajee, A. Periodontal microbial ecology. 2005. *Periodontology* 2000. **38**:135-187.

Este ciclo puede romperse de varias maneras:

El primer camino puede ser eliminar la placa dental bacteriana, que es una estrategia que conduce a un éxito parcial y hoy en día es uno de los métodos más utilizados.

Una segunda alternativa podría ser eliminar a los miembros de los complejos rojo y naranja, lo que probablemente limitaría el desarrollo de la gingivitis y su efecto sobre el desarrollo de la placa dental bacteriana.

Como tercera opción, está el control de la gingivitis mediante una terapia en donde no existe la utilización de antimicrobianos, disminuyendo la acumulación de la placa y posiblemente a los complejos rojo y naranja. (1)

CONOCIMIENTO ACTUAL DE LA ETIOLOGÍA PERIODONTOPÁTICA

Las enfermedades periodontales son infecciones causadas por las bacterias residentes en las biopelículas (4).

En una INFECCIÓN CLÁSICA, la situación inicial presenta una colonización específica natural con microorganismos (Flora "residente"). El hospedero se encuentra saludable (balance ecológico). Cuando se presenta una infección, un número incrementado de microorganismos patogénicos exógenos (dosis infecciosa) penetra en el mecanismo de defensa del hospedero y comienzan a proliferar selectivamente.

En una INFECCIÓN OPORTUNISTA, la situación inicial presenta la misma flora no patogénica está presente. En el proceso infeccioso, la alteraciones en la micro ecología y la resistencia general de hospedero lleva a una desestabilización del balance ecológico.

Una o más especies reaccionan a esta nueva situación con proliferación selectiva y actividad alterada causando daño tisular (enfermedad).

Socransky y Haffajee (1992) propusieron las siguientes modificaciones de los postulados de Koch, para permitir la determinación de patógenos periodontales:

POSTULADOS DE HENLE Y KOCH

- El AGENTE CAUSAL siempre debe ser encontrado en la lesión clínica, no en sujetos saludables.
- El patógeno putativo debe ser CULTIVABLE en cultivo puro.
- Las características patogénicas del agente causal deben iniciar una enfermedad en MODELOS ANIMALES idénticas a la que inicia en humanos y el agente debe ser identificado en el animal.

ADEMAS: EN LOS POSTULADOS DE HENLE Y KOCH DEBE EXISTIR UNA CLARA EVIDENCIA DE “RELACIÓN INMUNOLÓGICA PATÓGENO-HUESPED”

POSTULADOS DE SOCRANSKY

ASOCIACIÓN: El agente causal debe ser encontrado en “focos” activos en mayor porcentaje que en focos no activos.

ELIMINACIÓN: La eliminación del agente causal tiene que detener la enfermedad.

RESPUESTA INMUNE: La respuesta inmune, celular o humoral, debe validar el papel específico del agente causal en la enfermedad.

LOS FACTORES DE VIRULENCIA: Los agentes causales deben poseer factores de virulencia que son pertinente para el inicio y progreso de la enfermedad.

MODELOS ANIMALES: La patogenicidad del agente causal es un modelo animal debe proveer evidencia concluyente de que puede causar periodontitis en humanos.

Con base en lo propuesto por Socransky, varias bacterias periodontopáticas han sido identificadas y examinadas con detalle. Sin embargo, todavía es necesario mostrar si las bacterias en la placa subgingival son periodontopatógenas o indicadores de la enfermedad periodontal. (21)

El conocimiento actual de la etiología patogénica de la placa supra y subgingival se puede observar en la siguiente figura:

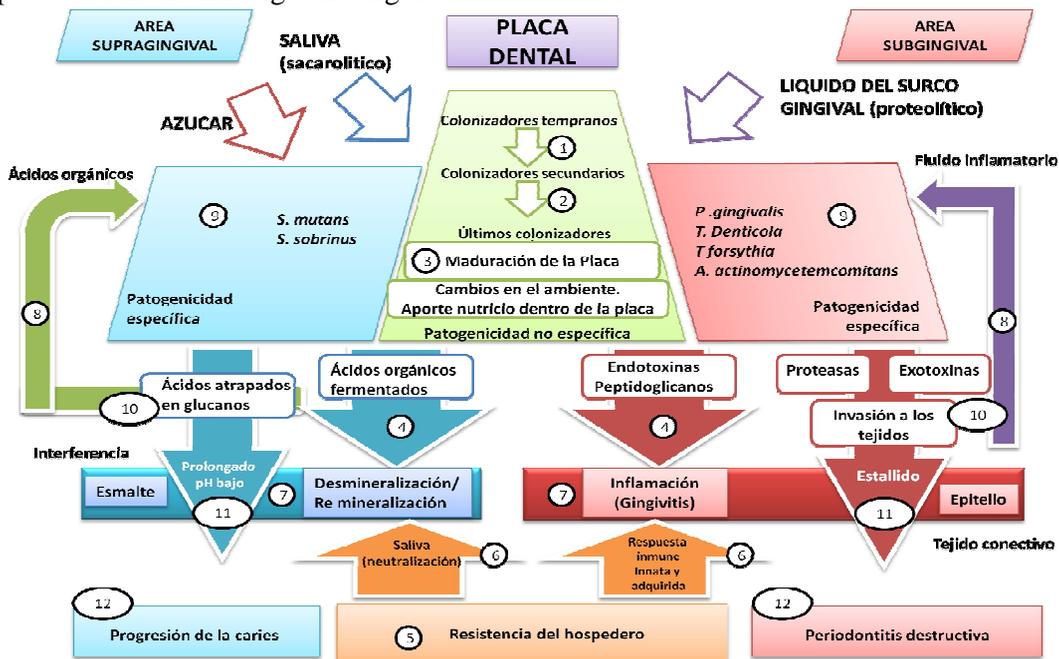


Fig. 3 Nishihara, T., & Koseki, T. 2004. Microbial etiology of periodontitis. *Periodontology* 2000. 36:14-20

Cuando la higiene supragingival no se mantiene, la placa dental inmediatamente desarrolla una dinámica interacción, que termina con el establecimiento de una comunidad de microorganismos. (6)

Como ya se ha establecido, las enfermedades periodontales están asociadas con los microorganismos presentes en la placa subgingival, y el uso de las bacterias periodontopáticas como indicadores de la estabilidad periodontal se ha evaluado en diversos estudios.

Para que estas bacterias periodontopáticas sean capaces de causar enfermedad periodontal, es esencial que puedan colonizar bolsas subgingivales y producir factores de virulencia que dañen directamente a los tejidos del huésped. (6)

Las bacterias (normalmente Gram negativas) que poseen factores de virulencia son normalmente encontradas en bolsas periodontales cuando la destrucción periodontal está en fase activa.

Algunos de estos factores de virulencia son: ENDOTOXINAS, EXOTOXINAS, ENZIMAS, SUSTANCIAS QUIMIOTACTICAS Y ANTIGENOS. (21)

El papel de las especies microbianas subgingivales en la etiología de la enfermedad periodontal se ha documentado extensamente y en la actualidad se sabe que los microorganismos específicos o grupos de especies más frecuentes en altos niveles y proporciones en los sitios con periodontitis son las siguientes: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*Aa*), *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Tannerella forsythensis* (*Tf*) y *Treponema denticola*. Mientras que los miembros del género *Actinomyces* se relacionan con la salud periodontal. (8)

Los principales factores de virulencia de las bacterias anteriormente mencionadas son:

- Toxinas: Leucotoxinas de varios clones *Aa*, y el lipopolisacárido especial de las *Pg*.
- Habilidad para invadir: *Pg* y *Aa* pueden penetrar las células del hospedero y así inhibir la respuesta inmune no específica, la primera línea de defensa.
- Enzimas y Proteasas: Ante el contacto de *Pg* con las células epiteliales, numerosas enzimas son liberadas (Ej. Proteasas extracelulares) así como proteinasas cisteínicas que reducen la respuesta inmune del hospedero.

Así como muchos microorganismos en la cavidad bucal se benefician de las actividades de *Aa* y *Pg*, estos dos organismos también son dependientes de otros.

La formación de placa comienza con los colonizadores iniciales (*Actinomyces naeslundii/viscosus*, *Streptococcus*, etc.). *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, y *Porphyromonas gingivalis* solo penetran la biopelícula después, porque estos últimos son capaces de colonizar el epitelio pero no los tejidos duros de la superficie dentaria. (21)

Con todos los conceptos anteriores en mente, el tratamiento periodontal no debe estar limitado a la eliminación de los patógenos periodontales específicos sino también debe

tener como objetivo destruir la biopelícula que protege a las bacterias residentes de la acción de los antibióticos y de la respuesta inmune.

Ciertos miembros clave en la comunidad de la placa dental bacteriana pueden ser relativamente más fáciles de remover, resultando en un colapso de esta comunidad la cual en consecuencia no podrá soportar a las especies patógenas. Remover la placa bacteriana madura, es un paso crítico para la terapia periodontal. (7)

El principal paradigma para el tratamiento periodontal es entonces remover las bacterias y sus productos de las bolsas periodontales ya sea con terapia quirúrgica o no quirúrgica. (6)

En la actualidad, las terapias periodontales diseñadas para afectar la composición de la microbiota subgingival pueden agruparse en tres amplias categorías:

- Las que eliminan físicamente microorganismos a menudo denominada desbridamiento mecánico.
- Las que intentan matar o afectar el metabolismo de los microorganismos usando sustancias como antisépticos y antibióticos.
- Las que afectan el medio ambiente de los microorganismos.

La estrategia contra una infección causada por la biopelícula consiste en alterar la comunidad de la placa dental bacteriana removiendo a los miembros que son claves y más fáciles de eliminar, de esta manera la comunidad de la biopelícula no puede darle soporte a las especies más patógenas.

Una gran cantidad de evidencia muestra que la eliminación mecánica no puede erradicar todas las bacterias periodontopáticas del ambiente subgingival, especialmente aquellas que habitan en áreas inaccesibles como las zona de furca, surcos, concavidades o bolsas periodontales profundas.

Sin embargo, la reducción en el número de bacterias y los cambios en la ecología de la biopelícula que se logran después de una limpieza mecánica, resultan en la resolución de los cambios inflamatorios y de esta forma el hospedero puede tener una mejor respuesta ante las bacterias remanentes. (7)

La forma más común de terapia periodontal es la eliminación de las placas supragingival y subgingival con procedimientos como la higiene bucal realizada por el propio paciente, el raspado y alisado radicular combinado a veces con cirugía periodontal. (3)

La terapia periodontal no quirúrgica está directamente dirigida a remover la biopelícula microbiana de las superficies radiculares en los dientes con enfermedad periodontal.

El objetivo de este tratamiento es eliminar de las superficies radiculares y el área subgingival, las bacterias vivas presentes en la biopelícula y los microorganismos calcificados (ej. Sarro), sin necesidad de algún procedimiento quirúrgico mediante el raspado y alisado radicular para remover la capa de cemento contaminada. (9,10,11)

Como consecuencia los tejidos periodontales del paciente pueden hacer frente a los microorganismos remanentes, reduciendo los cambios inflamatorios en los tejidos blandos y la profundidad de las bolsas subgingivales. El paciente además, debe ser

capaz de tener un mejor control sobre la recolonización microbiana del área dentogingival llevando a cabo medidas de higiene bucal.

El hecho de que el paciente comprenda la importancia de la eliminación de la placa subgingival y los procedimientos de higiene bucal, constituye un elemento esencial para el éxito del tratamiento periodontal. (10)

Cierto nivel de higiene bucal es esencial para una terapia periodontal exitosa. Las bacterias que inician la formación de la placa crean un ambiente necesario para el establecimiento de una micro flora más dañina, de esta forma, el desarrollo de una flora subgingival depende de la presencia de la placa supragingival.

Algunos estudios recientes han demostrado que existen cambios positivos en la placa subgingival después de remover los depósitos supra gingivales. (7)

Mc Nabb y cols. (1992), reportaron que el control de la placa supragingival que se logra mediante una limpieza profesional, induce cambios significativos en la composición de la micro flora subgingival, incluyendo una disminución en la *P.gingivalis* y espiroquetas. (7)

Dahlén y cols. (1992), examinaron el efecto del control personal de placa sobre la microbiota subgingival, después del raspado supragingival, durante un periodo de 2 años. El control de la placa supragingival provocó marcados cambios en la cantidad y composición de la microbiota subgingival, tanto en bolsas periodontales profundas y superficiales.

Estos hallazgos pueden implicar que la microbiota subgingival se ve influenciada no solo por factores locales de las bolsas periodontales sino también por el ambiente supragingival.

Un meticuloso control de la placa supragingival puede causar una contracción de la encía y disminuir la profundidad al sondeo en los sitios afectados periodontalmente y de esta manera provocar cambios en la micro flora subgingival. (7)

Ximenez-Fyvie y cols.(2000) mostraron que la remoción de la placa supragingival monitoreada semanalmente, disminuyo significativamente el conteo de las especies supra y subgingivales, creando un perfil microbiano comparable al que se observa cuando se tiene salud periodontal. Se sugiere que la limpieza profesional puede cambiar la actitud de los pacientes en relación al control personal de placa y causar una alteración en el ecosistema periodontal lo cual lleva a un efecto prolongado sobre la microbiota subgingival. (7)

Petersilka y cols.(2002) mencionan que tanto los procedimientos de control de placa realizados por el paciente así como los realizados por el profesional de la salud bucal remueven la placa supragingival, afectando la microbiota subgingival solo en los 3mm marginales de la bolsa periodontal. De esta forma, se puede observar que la profundidad de la bolsa periodontal puede determinar el efecto que tenga el control de la placa supragingival sobre las bacterias subgingivales. (7)

Haffajee y cols.(1997) examinaron los niveles de 40 especies bacterianas incluyendo *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Treponema Denticola*, antes y después del raspado y alisado radicular en 57 pacientes adultos.

Después del raspado y alisado radicular, existió un aumento en el nivel de inserción, disminución en el enrojecimiento de la encía, sangrado al sondeo y profundidad de bolsas periodontales. (7)

Darby y cols,(2001) investigaron los efectos del raspado y alisado radicular en la micro flora subgingival. Utilizando PCR para determinar la presencia de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia* y *T. denticola* en 28 pacientes, antes y después del raspado y alisado radicular. El tratamiento resultó en el mejoramiento clínico de las condiciones periodontales y en una reducción significativa de *P. intermedia*, *T. forsythia* y *T. denticola*.

Renvert y cols.(1990), también demostraron que el raspado radicular resulta en una disminución de la profundidad de las bolsas periodontales así como del sangrado al sondeo, en conjunto con una reducción en los niveles de las bacterias subgingivales. (7)

En muchos estudios clínicos sobre los efectos de la terapia periodontal no quirúrgica, el sangrado después del sondeo ha sido utilizado como principal indicador de la presencia de enfermedad periodontal. Después de la terapia no quirúrgica existe una reducción de la inflamación periodontal que es evidenciada por una reducción de la tendencia al sangrado.

La estabilidad a largo plazo de la situación periodontal mejora cuando el desbridamiento subgingival se combina con el control personal de placa por parte del paciente.

Durante las semanas subsecuentes al raspado y alisado radicular en combinación con las medidas de higiene bucal y el control de placa que lleva a cabo el paciente, se puede observar una reducción en la profundidad al sondeo de las bolsas periodontales.

Esta reducción, es benéfica ya que resulta en un ambiente menos favorable para el establecimiento de las bacterias periodontopáticas.

Además, facilita el acceso para las subsecuentes limpiezas durante la fase de mantenimiento de la terapia periodontal de soporte y para una adecuada remoción de placa por parte del paciente.

Por otro lado, el tejido inflamado que contiene un infiltrado de células inflamatorias y un aumento en el número de capilares, es gradualmente reemplazado por un tejido más rico en colágeno.

Estos cambios son acompañados por una constricción gradual de los tejidos en dirección apical y sobre la superficie radicular. La interfase entre la superficie radicular y el epitelio de la bolsa periodontal es parcialmente transformado en un epitelio de unión largo.

Tanto el epitelio de unión largo como la presencia de un mayor número de fibras colágenas, resulta en una ganancia en los niveles de inserción clínica.

La magnitud de estos cambios, está relacionada con el tamaño inicial del defecto, que se expresa con la profundidad inicial al sondeo, el tipo de diente y otros factores ambientales como son la calidad en la higiene bucal del paciente. Los cambios en la profundidad al sondeo y en la inserción clínica también son acompañados por cambios en la posición del margen gingival y cambios en el hueso alveolar. (10,11)

Por lo anterior, la terapia periodontal no quirúrgica que incluye el raspado y alisado radicular así como el control personal de placa y la instrucción al paciente en las medidas de higiene bucal, constituyen el primer paso para el control de las enfermedades periodontales. (12)

DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE LAS ESPECIES BACTERIANAS EN MUESTRAS DE BIOPELICULAS

Los avances en la investigación han permitido examinar la micro flora periodontal desde una perspectiva cuantitativa y cualitativa, con el objetivo de conocer la patogenicidad de la placa dental.

El estudio de las enfermedades infecciosas se ha enfocado tradicionalmente en un pequeño número de patógenos en una infección determinada. Incluso cuando las muestras son tomadas de áreas donde existe una compleja mezcla de especies, se ha dado énfasis en buscar un número limitado de patógenos para cada sitio. Los organismos remanentes a menudo son considerados como “flora normal”.

La mayoría de las veces estas especies pueden ser compatibles con el hospedero, residentes comunes en el sitio de la muestra; sin embargo, en otros casos, estas especies pueden contribuir a la patogénesis de la condición a evaluar. Además, la ausencia de algunas especies compatibles con el hospedero puede ser importante para el inicio y progresión de la enfermedad así como en la presencia de una o más especies patógenas.

La evaluación de una compleja muestra de microorganismos puede verse alterada por al menos dos factores. El primero, es la tradición de solo enfocarse en un pequeño número de especies que pueden ser patógenas. El segundo, es la ausencia de técnicas útiles y rápidas para la identificación y evaluación de un gran número de especies y muestras tomadas de áreas donde existe una compleja microbiota.

Para el diagnóstico microbiano de las bacterias periodontopáticas existen diversas alternativas como son: cultivos bacterianos, análisis inmunológicos, ensayos enzimáticos y pruebas de DNA.

Dentro de los ensayos enzimáticos, el más utilizado es la prueba de BANA. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythensis*, comparten un perfil enzimático, ya que todas producen una enzima parecida a la tripsina. Esta prueba mide la actividad de dicha enzima a través de la hidrólisis de una sustancia incolora denominada *N- α -benzoyl-DL-arginina-naftilamida (BANA)*, sustrato sintético que es hidrolizado por la peptidasa bacteriana mencionada anteriormente.

Las muestras de placa dental bacteriana que son BANA positivas invariablemente presentan una o más de estas especies. (22,24,24)

Desafortunadamente, el *Actinobacillus actinomycetemcomitans* no es identificado por la prueba BANA. Otra desventaja es que otras bacterias menos virulentas pertenecientes a la flora de la bolsa periodontal también pueden resultar BANA positivas.

A continuación se presenta un cuadro que resume los diferentes métodos para determinar la composición microbiana de muestras de placa de la cavidad bucal.(1)

METODO	VENTAJAS	DESVENTAJAS	APLICACIÓN
Cultivos	Pueden detectar especies no reconocidas; proveer cultivos para análisis futuros.	Consume mucho tiempo, es costoso y a menudo es difícil su aplicación.	Estudio de nuevos ecosistemas.
Medios Selectivos	Pequeño número de muestras para un pequeño número de especies.	Existen pocos medios selectivos disponibles, pueden ser muy selectivos o no lo suficiente, son costosos.	Estudios que involucran de 1 a 10 especies en un pequeño número de muestras.
Inmunofluorescencia	Especificidad; razonablemente rápida.	Uso limitado de antisueros útiles; se pueden analizar pequeños números de muestras.	Tal vez es más útil para el diagnóstico que para ecología o estudios de algún tratamiento.
PCR	Sensibilidad; especificidad.	No cuantitativo (presencia/ausencia); costoso; dependiente de la amplificación.	Detección de especies en un sujeto (prevalencia); detección de un bajo número de especies después del tratamiento.
PCR TIEMPO REAL	Sensibilidad; especificidad; cuantificación.	Comparativamente lento; muy costoso; limitado en número de muestras y especies.	Estudios para la cuantificación de un muy limitado número de especies en donde se requiere un número muy bajo de muestras.
DNA-DNA Hybridization	Sensibilidad; especificidad; cuantificación.	Destinada a especies cuyas sondas están disponibles; pequeño número de especies para un pequeño número de muestras.	Búsqueda de un grupo específico de especies en un pequeño número de muestras
Checkerboard DNA-DNA Hybridization	Sensibilidad; especificidad; cuantificación; puede usar una muestra entera; gran número de especies y muestras. No es costoso.	Destinado a especies en donde la sonda está disponible; posibilidad de reacciones cruzadas.	Estudios de un gran número de especies en un gran número de muestras, ej. Ecología y estudios de tratamiento.
Amplificación 16S rDNA	Detección de especies cultivables y no cultivables; posicionamiento filogenético.	Extremadamente costoso; número de muestras extremadamente pequeño.	Estudio del rango de las especies presentes en hábitats específicos.

HIPOTESIS

Si existe relación entre la cantidad y tipo de microorganismos patógenos periodontales y los signos clínicos de la periodontitis, entonces al concluir la Fase I en los pacientes que acuden tanto a la clínica de Periodoncia de la licenciatura de Cirujano Dentista como de la Especialización en Endoperiodontología, estos mostraran cambios en la cantidad y tipo de microorganismos lo que repercutirá en el mejoramiento de las condiciones periodontales (disminución en la profundidad al sondeo).

MATERIAL Y MÉTODOS

TECNICA E INSTRUMENTO PARA RECOLECTAR LA INFORMACIÓN

La muestra se constituyó de 30 pacientes que acudieron por primera vez para su atención durante el periodo lectivo 2010-2 y que fueron diagnosticados con Periodontitis (Profundidad de bolsa ≥ 4 mm y presencia de pérdida osea), además de un grupo control compuesto de 10 pacientes, tanto de la clínica de de Periodoncia de la licenciatura de Cirujano Dentista como de la especialización en Endoperiodontología.

A los 40 sujetos seleccionados se les explicó el procedimiento a seguir y los cuidados que deberían tener durante el estudio y se inició la toma de muestras. Sin embargo durante este tiempo algunos de los pacientes fueron abandonando el tratamiento o no cumplieron con sus citas por lo que fueron excluidos. Finalmente se obtuvieron muestras de PDB pre y post tratamiento de Fase I en 11 pacientes, más un grupo control integrado por 5 pacientes periodontalmente sanos que no recibieron ningún tratamiento.

En el mismo paciente se recolectaron dos muestras de PDB pre y post tratamiento, la primera para siembra en medios de cultivo y la segunda para su procesamiento mediante la prueba BANA.

El procedimiento para la recepción y atención de los pacientes fue el mismo que es empleado rutinariamente, es decir, elaboración de expediente clínico, fotografías intra orales, de frente y perfil, así como serie radiográfica.

En la primera cita, se midió la profundidad al sondeo de los dientes presentes en boca, mediante una sonda periodontal graduada (PCP 11.5 B B7), las mediciones se obtuvieron de 6 sitios en cada diente (mesial, medio y distal, de las caras vestibular y palatina o lingual) y se registraron en el formato utilizado habitualmente para este fin (ver anexo no. 1).

Las mediciones mayores de ≥ 4 mm fueron registradas en color rojo y las menores en color azul.

RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE PLACA DENTAL BACTERIANA:

CULTIVOS BACTERIANOS

Previo a la obtención de las muestras de PDB en los pacientes, se realizaron diversos ensayos para estandarizar la preparación del medio de cultivo tanto para el transporte como para la siembra de microorganismos, para este fin se seleccionó el medio TSB (Caldo de Soya Tripticasa) el cual según diversos estudios, permite el crecimiento de microorganismos periodonto patógenos. De igual forma, se estandarizó el procedimiento para la siembra de las muestras obtenidas.

Lo anterior fue posible gracias a la colaboración del equipo de trabajo del laboratorio de Ecología Microbiana de la Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos (UBIPRO) de la FES IZTACALA.

Una vez estandarizados dichos procedimientos, se prepararon 100 ml de medio de transporte TSB que se colocaron en tubos de ensaye con tapa rosca (1ml en cada tubo), 1000 ml de medio de cultivo TSB que fueron colocados en 40 cajas de Petri para realizar la siembra masiva de las muestras obtenidas de los pacientes diagnosticados con periodontitis y de los integrantes del grupo control.

Las muestras de placa subgingival de cada paciente se obtuvieron de 4 sitios periodontalmente afectados (uno por cuadrante), con una profundidad de bolsa ≥ 4 mm. El sitio de la toma de muestra se aisló con rollos de algodón y se secó suavemente con aire.

Las muestras subgingivales se obtuvieron introduciendo en las bolsas periodontales seleccionadas para cada cuadrante, dos puntas de papel estériles del número 30, durante 20 segundos.

La recolección de las muestras se realizó de manera rápida, flameando previamente la punta de las pinzas de curación estériles, antes de sujetar las puntas de papel.

La presencia del mechero nos permitió disminuir el riesgo de contaminación de la muestra obtenida.

Las cuatro muestras de cada paciente (8 puntas) se depositaron en los tubos que contenían 1ml de un medio de transporte (TSB) y se llevaron al laboratorio de microbiología de la UBIPRO para su procesamiento.

Los frascos que contenían el medio de transporte, fueron rotulados con el nombre y no. de expediente del paciente así como la fecha de obtención de la muestra.

En la bitácora, se registraron los siguientes datos:

- ☞ NOMBRE DEL PACIENTE
- ☞ NO. DE EXPEDIENTE
- ☞ DIAGNÓSTICO PERIODONTAL
- ☞ FECHA DE OBTENCION DE LA MUESTRA
- ☞ DIENTE DEL CUAL SE OBTUVO LA MUESTRA, ASI COMO LA PROFUNDIDAD AL SONDEO DEL MISMO

Una vez obtenida la muestra, se procedió a realizar la siembra masiva de los microorganismos en el medio de cultivo descrito con anterioridad.

Para ello la superficie donde se realizó el procedimiento se limpió y desinfectó.

Las cajas de Petri fueron rotuladas con una clave indicando el paciente a quien correspondía la muestra, así como el medio de cultivo y la fecha.

La siembra se realizó en presencia de un mechero, tomando con ayuda de una micro pipeta, 100µl del medio de transporte y distribuyendolos en la superficie del medio de cultivo con ayuda de un asa de vidrio. Posteriormente, las cajas fueron cerradas y selladas con cinta parafilm y colocadas en un frasco de vidrio con tapa metálica, en cuyo fondo previamente se depositó una toalla de papel húmeda y una caja de Petri vacía sobre la cual, se colocaron las cajas en donde fueron sembrados los microorganismos. Finalmente, sobre estas cajas, se colocó una vela encendida y se procedió a tapar el frasco. Al cerrar el frasco y apagarse la vela se obtuvo una condición de anaerobiosis.

Una vez transcurridos 7 días, tiempo necesario para el crecimiento bacteriano, se identificaron los distintos tipos de colonias, registrando: color, forma, superficie, transparencia, elevación, bordes.

El recuento de la microbiota se expresó en unidades formadoras de colonias por ml de muestra (UFC/ml)

PRUEBA BANA

Dado que los microorganismos anaerobios asociados con la enfermedad periodontal se encuentran en la placa subgingival, las muestras se obtuvieron de 4 sitios periodontalmente afectados (uno por cuadrante), con una profundidad de bolsa ≥ 4 mm. El sitio de la toma de muestra se aisló con rollos de algodón y se secó suavemente con aire.

La tira reactiva se extrajo del frasco justamente antes de la toma de muestra para evitar su contaminación.

Utilizando una cureta (Gracey 11/12 o 13/14) se obtuvo una muestra de PDB de cada diente afectado, y se colocó sobre la tira reactiva en la zona correspondiente. Entre cada toma de muestra, se limpió la cureta con una gasa estéril.

Después de muestrear todos los sitios, la parte superior de la tira reactiva se humedeció con agua bidestilada.

La tira reactiva se dobló de manera que existiera coincidencia entre la zona donde se colocan las muestras y la zona que fue humedecida, para posteriormente llevarla a la incubadora previamente encendida.

La incubación de la tira requirió de un tiempo de 5 min a 55°C, transcurrido este tiempo la incubadora emitió un timbre que indica que el proceso ha concluido.

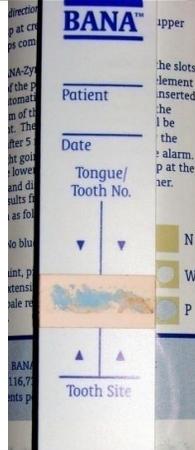
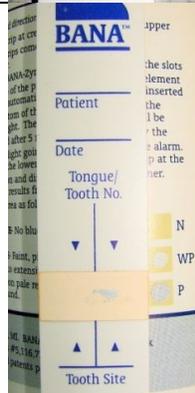
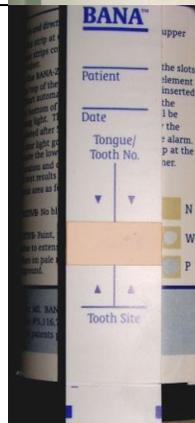
Se retiró la tira de la incubadora y con cuidado se separaron la zona de la muestra de la zona que fue humedecida.

En la zona de la tira reactiva donde se coloca la muestra, ocurre la reacción enzimática que indica la presencia de bacterias periodontopatógenas.

Esta reacción produce un cambio de coloración que puede ser azul grisáceo/claro o bien azul intenso dependiendo de la cantidad de microorganismos presentes en la muestra.

Cada frasco contenedor de las tiras reactivas, presenta en el exterior una escala de color para interpretar el resultado que puede ser NEGATIVO, DEBIL POSITIVO y POSITIVO.

Las tiras reactivas correspondientes a cada paciente, se compararon con la escala de color y los resultados se registraron en la bitácora.

INTERPRETACIÓN DEL RESULTADO BANA	
<p>Reacción positiva: Se presenta cuando existe un color azul oscuro sobre un área pequeña o completa de la tira reactiva que estuvo en contacto con la muestra de PDB. Una reacción positiva indica la presencia de > 10,000 UFC de BANA-anaerobios presentes en la muestra.</p>	
<p>Reacción débil positiva: Se presenta cuando existe un cambio de coloración azul claro en un área pequeña sobre la tira reactiva que estuvo en contacto con la muestra de PDB. Este color indica la presencia de una o más especies BANA positivas en bajos niveles.</p>	
<p>Reacción negativa: El hecho de que no exista un cambio de coloración en la tira reactiva, indica que los microorganismos BANA anaerobios no fueron detectados en la muestra de PDB, es decir existen <10000 de UFC.</p>	

FASE I DEL TRATAMIENTO ENDOPERIODONTAL:

La fase I del tratamiento periodontal fue realizada por los estudiantes tanto de licenciatura como de especialización y consistió en los siguientes procedimientos:

Raspado y alisado radicular. Pulido coronal

Se realizó el raspado y alisado radicular, así como el pulido coronal de los dientes de los pacientes seleccionados para este estudio.

Para eliminar el sarro supra y subgingival se utilizaron curetas (Serie Gracey o Universales [McCall o Columbia]) y hoces (Limpiadores de Jaquete) o la instrumentación ultrasónica (Cavitrón).

Después de la eliminación del sarro, las coronas clínicas deberán ser pulidas con pasta abrasiva y cepillo de profilaxis así como copas de hule.

Control personal de Placa

El paciente recibió información detallada sobre su estado dentario y la relación entre la presencia de placa dental y sarro en la boca, así como la ubicación de los sitios con enfermedad gingival o periodontal. Además se le explicaron las consecuencias de no seguir las medidas correctas de control personal de placa.

- Técnica de cepillado:

Se explicó al paciente el método de cepillado de Bass, el cual consiste en colocar un cepillo blando de múltiples cerdas con la cabeza en un ángulo de 45° con respecto del eje longitudinal del diente presionando en sentido apical contra el margen gingival. Esta técnica permite eliminar los depósitos blandos ubicados inmediatamente por debajo y por encima del margen gingival.

- Uso de hilo dental y auxiliares de limpieza:

Se explicó al paciente la técnica correcta para el uso de hilo dental y dependiendo de las necesidades de cada paciente, se recomendó el uso de otro tipo de auxiliares de limpieza como son: sustancias reveladoras, cepillos interproximales, enjuagues bucales, etc.

Una vez que se han completado los procedimientos anteriores, se evaluó semanalmente el progreso en la aplicación de las medidas de control personal de placa.

Transcurrido un mes desde el raspado y alisado radicular y pulido coronal, así como de la instauración de las medidas de control personal de placa, se realizó una revaloración de la profundidad al sondeo y de nueva cuenta se tomaron las muestras bacterianas siguiendo la misma metodología explicada con anterioridad.

RESULTADOS

CULTIVOS BACTERIANOS

Se observaron 12 diferentes morfologías de colonias presentes tanto en las muestras del grupo observacional como en las del grupo control en los cultivos pre y post fase I del tratamiento periodontal, estos se pueden observar en la figura no. 1

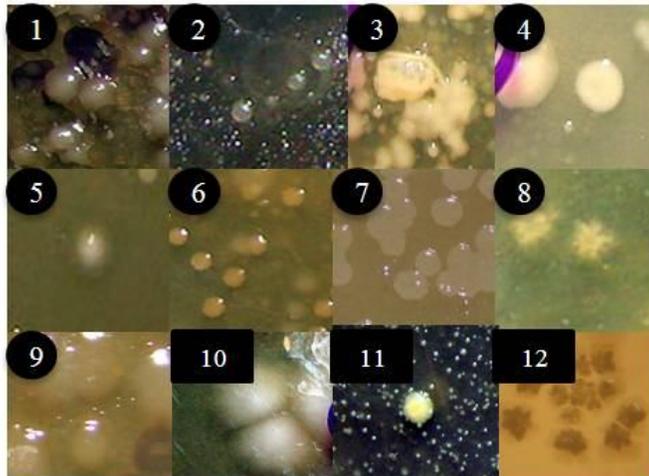
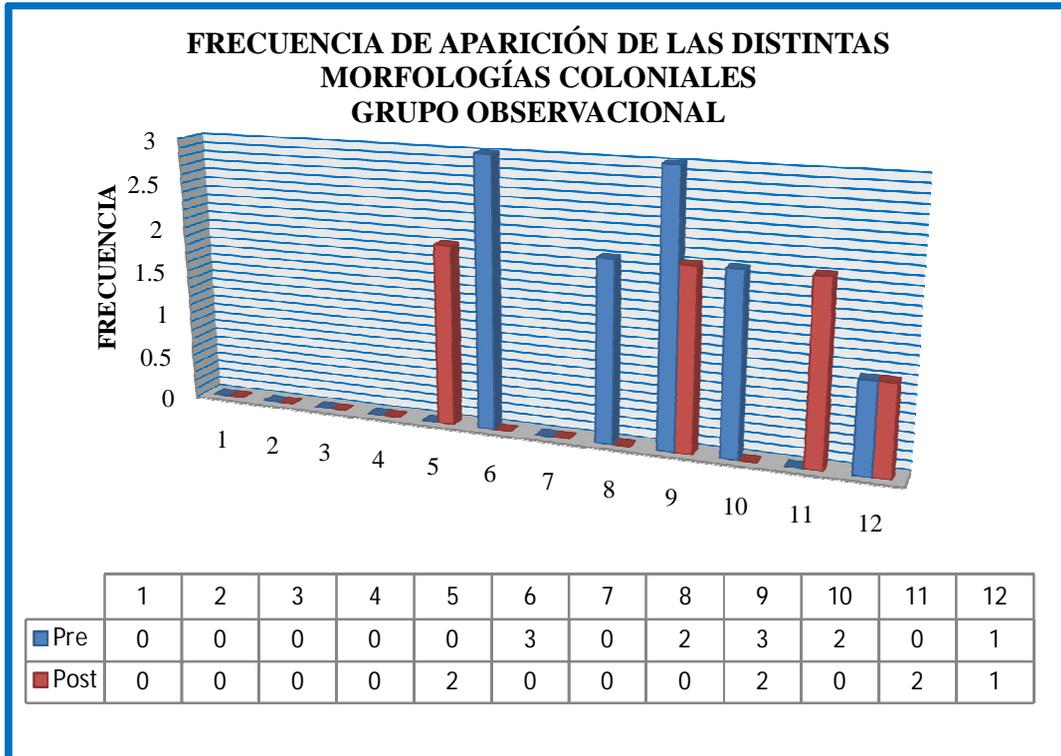
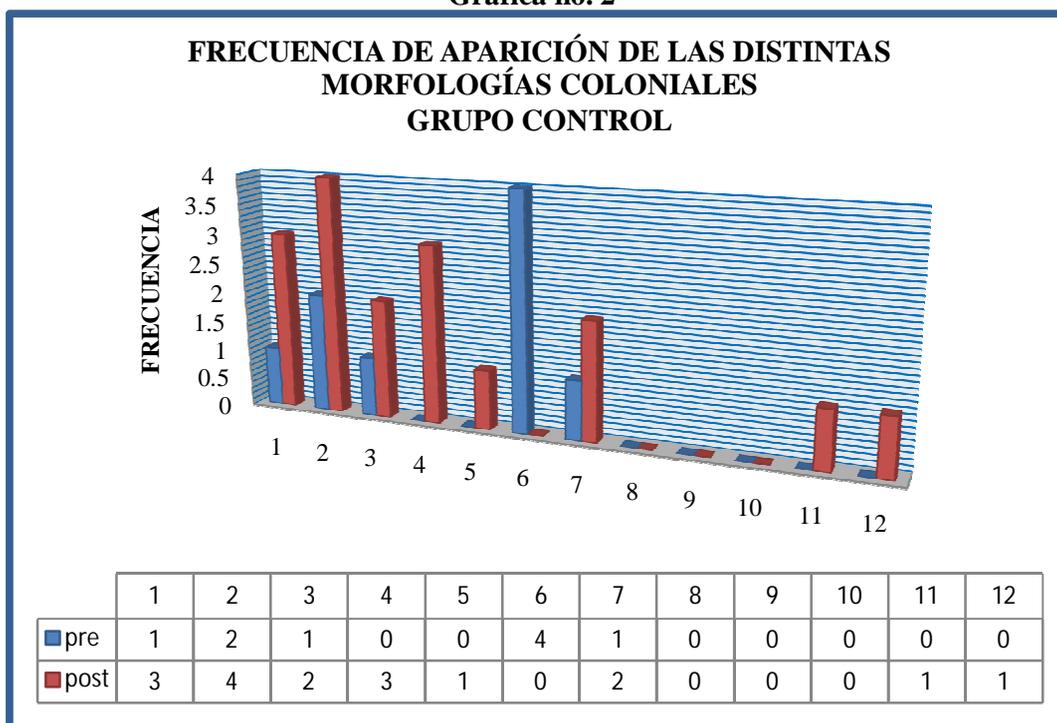


Fig. 1 Distintas morfologías coloniales observadas tanto en los cultivos del grupo observacional como del grupo control.

Grafica no. 1



Grafica no. 2



Las gráficas 1 y 2, muestran una variación en la presencia de las distintas morfologías coloniales antes y después de la fase I del tratamiento periodontal. Lo anterior sugiere que si existe un cambio en la microflora subgingival de los pacientes después de la implementación del tratamiento. También es importante mencionar, que algunas de las morfologías que están presentes en los pacientes del grupo control no se observan en el grupo observacional. Esto puede deberse a que en el grupo control no recibió tratamiento y algunos de estos microorganismos pueden ser parte de la microflora normal en salud.

Tabla no. 1
UFC GRUPO OBSERVACIONAL PRE TRATAMIENTO FASE I

PACIENTE/ MORFOLOGÍA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1								200				
2									200			
3								200				10
4										26		
5									100			
6									200			
7										200		
8							200					
9							200					
10							200					
11												

Tabla no. 2
UFC GRUPO OBSERVACIONAL POST TRATAMIENTO FASE I

PACIENTE/ MORFOLOGÍA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1												
2									1			
3												
4												
5											13	
6												
7												
8									83			
9											5	10
10					200							
11					200							

En las Tablas 1 y 2, se puede observar el recuento de las UFC/ml en los pacientes del grupo observacional pre y post tratamiento. Es importante notar que existen cambios tanto en la frecuencia de aparición como en las UFC de ciertas morfologías antes y después de la Fase I del tratamiento periodontal, lo que indica que después de implementarse el tratamiento la microflora sufre modificaciones.

Tabla no. 3
UFC GRUPO CONTROL PRE TRATAMIENTO FASE I

PACIENTE/ MORFOLOGÍA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	200	200	2									
2						200						
3						200	1					
4		5				4						
5						200						

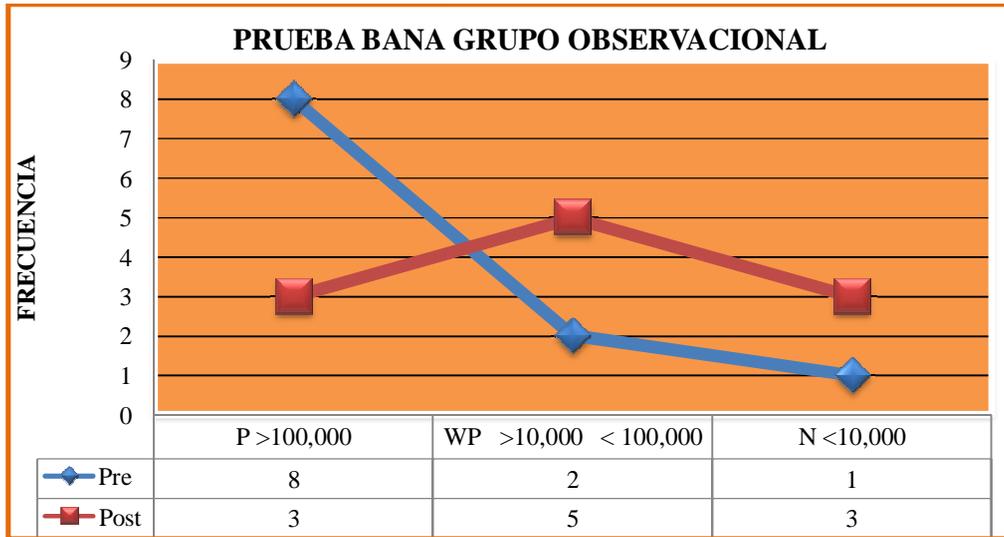
Tabla no. 4
UFC GRUPO CONTROL POST TRATAMIENTO FASE I

PACIENTE/ MORFOLOGÍA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	31	53		3	111							
2		200									18	2
3												
4	9	200		200								
5	2	200	1	2			114					

En las Tablas 3 y 4, se puede observar el recuento de las UFC/ml en los pacientes del grupo control. La presencia de diferentes morfologías en relación con las del grupo observacional, sugiere que en los pacientes con periodontitis existen ciertas condiciones que propician el crecimiento de diferentes microorganismos. En el caso del grupo control, se observan cambios en el recuento de UFC que pueden estar relacionados con los hábitos de higiene del paciente.

PRUEBA BANA

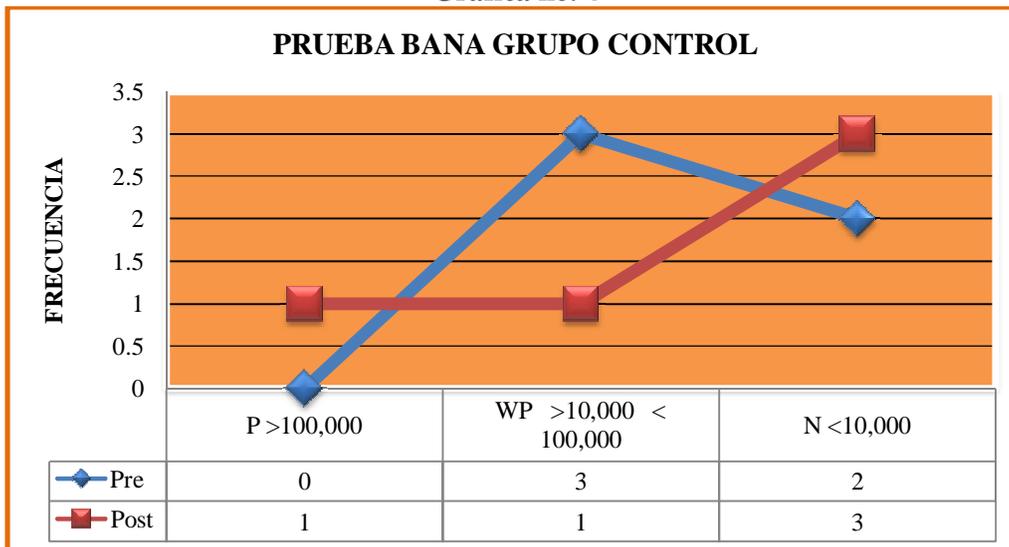
Grafica no.3



En esta gráfica se puede observar que antes de realizar la fase I del tratamiento periodontal, 8 de los 11 pacientes diagnosticados con periodontitis resultaron BANA positivos (P >100,000 UFC en la muestra de PDB).

Después de la fase I, 5 de los pacientes presentaron resultados BANA débil positivos (WP >10,000 < 100,000 de UFC en la muestra de PDB) y 3 pacientes resultaron negativos (N < 10,000 UFC en la muestra de PDB). Solo tres permanecieron BANA positivos. Lo anterior indica que después de la fase I existe una disminución en los microorganismos periodontopatógenos en la mayoría de los pacientes.

Grafica no. 4



En esta gráfica se puede observar que en los pacientes del grupo control quienes se encontraban periodontalmente sanos, 3 pacientes se presentaron resultados BANA débil positivo (WP >10,000 < 100,000 de UFC en la muestra de PDB) y 2 pacientes resultaron BANA negativos (N < 10,000 UFC en la muestra de PDB) en la primera toma de

muestra. Para la segunda toma de muestra, un paciente presento resultado BANA positivo ($P > 100,000$ UFC en la muestra de PDB), mientras que 3 pacientes resultaron BANA negativos y solo uno BANA débil positivo. Lo anterior indica que en aquellos pacientes que no recibieron tratamiento de fase I pueden existir variaciones en la cantidad de UFC de los microorganismos BANA positivos por diversos factores, como puede ser el cambio u omisión ocasional de los procedimientos de higiene bucal, sin embargo estas variaciones no afectan el estado de salud periodontal del paciente.

PROFUNDIDAD AL SONDEO

Para las profundidades al sondeo de los pacientes del grupo observacional se obtuvieron los siguientes valores:

Tabla no. 5

MEDIA Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LA PROFUNDIDAD AL SONDEO POR CUADRANTES EN LOS PACIENTES DEL GRUPO OBSERVACIONAL PRE TRATAMIENTO DE FASE I

CUADRANTE	Profundidad al sondeo en mm	
	Media	Desviación Estandar
Cuadrante Superior Derecho	5	2.37
Cuadrante Superior Izquierdo	4	2.18
Cuadrante Inferior Derecho	4	1.99
Cuadrante Inferior Izquierdo	4	2.10

Tabla no. 6

MEDIA Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LA PROFUNDIDAD AL SONDEO POR CUADRANTES EN LOS PACIENTES DEL GRUPO OBSERVACIONAL POST TRATAMIENTO DE FASE I

CUADRANTE	Profundidad al sondeo en mm	
	Media	Desviación Estandar
Cuadrante Superior Derecho	4	2.52
Cuadrante Superior Izquierdo	4	2.13
Cuadrante Inferior Derecho	4	1.80
Cuadrante Inferior Izquierdo	3	1.73

Para conocer si existe diferencia significativa entre las profundidades al sondeo antes y después de la fase I del tratamiento periodontal, se realizo la prueba T de Student, con el siguiente resultado:

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas		
	Variable 1	Variable 2
Media	4	3.272727273
Varianza	2	1.064935065
Observaciones	22	22
Coefficiente de correlación de Pearson	0.848354742	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	21	
Estadístico t	4.445751442	
P(T<=t) una cola	0.000111907	
Valor crítico de t (una cola)	1.720742871	
P(T<=t) dos colas	0.000223815	
Valor crítico de t (dos colas)	2.079613837	

Como se puede observar, el valor obtenido de t es mayor al valor crítico de tablas, por lo tanto, si existe diferencia significativa entre las profundidades al sondeo antes y después de la fase I de tratamiento periodontal, en los pacientes del grupo observacional.

Para el grupo control se obtuvieron los siguientes resultados de media y desviación estándar. Es importante señalar que tanto la primera como la segunda medición de la profundidad al sondeo, se obtuvieron al inicio y al término de la fase I de tratamiento que en los pacientes del grupo observacional, aunque al grupo control no se le realizó ningún tratamiento ya que estos pacientes se encontraban en estado de salud periodontal.

Tabla no. 7

MEDIA Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LA PROFUNDIDAD AL SONDEO POR CUADRANTES EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CONTROL (Primera Medición)

	Profundidad al sondeo en mm	
	Media	Desviación Estandar
CUADRANTE		
Cuadrante Superior Derecho	1	0.43
Cuadrante Superior Izquierdo	1	0.68
Cuadrante Inferior Derecho	1	0.82
Cuadrante Inferior Izquierdo	1	0.58

Tabla no. 8
MEDIA Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LA PROFUNDIDAD AL SONDEO
POR CUADRANTES EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CONTROL
(Segunda Medición)

	Profundidad al sondeo en mm	
	Media	Desviación Estandar
CUADRANTE		
Cuadrante Superior Derecho	1	0.35
Cuadrante Superior Izquierdo	1	0.45
Cuadrante Inferior Derecho	1	0.41
Cuadrante Inferior Izquierdo	1	0.38

Para el grupo control no se realizó la prueba de t de Student ya que como se puede observar no existe una diferencia en los valores de la media y desviación estándar entre la primera y segunda medición.

DISCUSIÓN

Tal y como lo mencionan Hafaajee, Teles y Socransky (2006), la terapia periodontal lleva a un cambio tanto en los parámetros clínicos como en los niveles de especies subgingivales. Se sabe que remover los depósitos de placa dental bacteriana que se acumulan sobre los dientes, tiene un efecto benéfico sobre los tejidos periodontales adyacentes. Lo anterior aunado al raspado y alisado radicular así como a los procedimientos de higiene bucal, se ha convertido en la piedra angular de la terapia periodontal. Sin embargo, el efecto de este tratamiento sobre la microbiota subgingival no se tiene completamente claro.

Dos importantes fenómenos tienen lugar como resultado de la remoción mecánica de los microorganismos supra y subgingivales.

El primero, es un cambio en las proporciones de las especies durante el periodo de recolonización. El segundo, es la modificación del hábitat. Estos son factores claves en los tratamientos que involucran desbridamiento mecánico.

La escrupulosa y repetida remoción de la placa supra gingival realizada por el paciente o por el Cirujano Dentista, puede afectar la colonización subgingival de las bolsas periodontales de pequeñas a moderadas. Lo anterior puede deberse a la ralentización de la recolonización de patógenos en la placa supra gingival antes de que se extienda a las áreas subgingivales, a la reducción de la inflamación gingival y a la disminución de los niveles de especies de la biopelícula supra gingival que pudieran contribuir al crecimiento subgingival de otras. (4)

Los resultados de este trabajo muestran que existen cambios en la microflora periodontal después de la fase I del tratamiento de los pacientes incluidos en este

estudio y que fueron diagnosticados con periodontitis. La fase I comprende tanto la implementación de medidas de higiene bucal como la remoción de los depósitos de PDB y cálculo supra y sub gingivales mediante desbridamiento mecánico. Estos cambios pueden observarse tanto en el conteo de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) como en la presencia de ciertas morfologías coloniales. En el caso de la prueba enzimática de BANA, existe una disminución en los resultados positivos lo que implica variaciones en la cantidad de alguna o varias de las especies del complejo bacteriano que detecta dicha prueba, como pueden ser: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythensis*. Según lo observado clínicamente, estas modificaciones en la microflora pueden relacionarse con la disminución en la profundidad al sondeo y con el mejoramiento de las condiciones periodontales del paciente después de la implementación de esta fase terapéutica, ya que existió una diferencia significativa entre las mediciones antes y después de de la misma.

En lo particular, los resultados obtenidos mediante la prueba enzimática BANA, coinciden con los obtenidos por Haffajee (1997), quien reportó los efectos clínicos y microbiológicos del raspado y alisado radicular en 57 pacientes con periodontitis del “adulto” monitoreándolos a los 3 y 6 meses después del tratamiento.

Los resultados obtenidos demostraron una disminución en la prevalencia y niveles de *T. forsythia*, *P. gingivalis* y *T. denticola*.(25)

Según Socransky, Haffajee (1992) y Doungudomdacha (2000), la sola presencia de patógenos putativos no implica que la enfermedad periodontal esté presente o pueda desarrollarse, ya que la mayoría de los sitios que inicialmente resultan positivos para estos microorganismos, pueden resultar positivos después de algún tratamiento aunque el número de células de cada especie generalmente es menor. Es esencial para el desarrollo de la periodontitis que las especies patógenas se encuentren presentes, pero aún así la enfermedad pudiera no presentarse mientras los patógenos no excedan el umbral de tolerancia del hospedero. (26) Esto lo podemos observar en los resultados obtenidos en el grupo control, donde aunque existen diversas modificaciones en la microflora periodontal y en ocasiones resultados positivos para la prueba enzimática de BANA, clínicamente las condiciones de los pacientes permanecieron estables ya que no existieron variaciones patológicas en la profundidad al sondeo.

CONCLUSIONES

Uno de los cambios de paradigma más importantes de la última década en el campo de la Periodoncia, ha sido el reconocimiento y aceptación de la placa dental bacteriana como biopelícula. La importancia clínica del intrincado ecosistema de la biopelícula dental es el hecho de que se trata de comunidades microbianas que tienen la habilidad de cambiar como resultado de una intervención terapéutica o de una modificación del hospedero.

En ocasiones, tanto en la clínica de Periodoncia de licenciatura como en la clínica de especialización en Endoperiodontología, se subestima la importancia de fomentar en el paciente los hábitos de higiene bucal y de realizar una correcta fase I de tratamiento. Lo anterior deriva en el fracaso de los tratamientos ya que los tejidos periodontales no responden de una forma adecuada debido a la constante inflamación causada por la presencia de bacterias periodontopatógenas.

Esta desestimación de la fase I, se debe principalmente a que el Cirujano Dentista no percibe de manera objetiva los cambios que se producen en la biopelícula dental cuando se realiza el desbridamiento mecánico.

En ese sentido, las pruebas microbiológicas realizadas en este trabajo (Cultivos bacterianos y prueba BANA) permiten mostrar de manera clara como es que se presentan modificaciones en la micro flora subgingival y como estas modificaciones tienen efectos positivos sobre la salud de los tejidos periodontales.

Aunque existe una amplia relación entre la Periodoncia y el área microbiológica, se conocen muy pocas investigaciones que establezcan puentes entre los resultados experimentales y su implementación clínica.

Es por ello que en un futuro próximo, será necesario fomentar un trabajo cooperativo entre estas dos áreas para de esta manera permitir que los hallazgos de laboratorio fundamenten y respalden la aplicación de la terapéutica periodontal.

Tal vez en algún momento, se pueda lograr establecer un tratamiento específico dependiendo del perfil de especies colonizadoras que posea cada individuo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Socransky, S., Haffajee, A. Periodontal microbial ecology. 2005. *Periodontology 2000*. **38**:135-187.
2. Nikolaev, YA., Plakunov V.K. Biofilm—“City of Microbes” or an Analogue of Multicellular Organisms?. 2007. *Microbiology*. **76**:125-138.
3. Lindhe J, et al. 2005. *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*. Editorial Médica Panamericana; Buenos Aires, Argentina. pp.110-111.
4. Haffajee, A., Teles, R., Socransky, S. 2006. The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota. *Periodontology 2000*. **42**:219–258
5. Löe, H., Theilade, E., Jensen, B. 1965. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* **36**:117-187.
6. Nishihara, T., Koseki, T. 2004. Microbial etiology of periodontitis. *Periodontology 2000*. **36**:14-20
7. Umeda, M., Takeuchi, Y., Noguchi, K., Huang, Y., Koshy, G., & Ishikawa, I. Effects of nonsurgical periodontal therapy on the microbiota. *Periodontology 2000*. **36**: 98-120.
8. Ximenez-Fyvie, L., Almaguer-Flores, A., Jacobo-Soto, V., Lara-Cordoba, M., Sanchez-Vargas, L., Alcantara-Maruri, E. Description of the subgingival microbiota of Periodontally Untreated Mexican Subjects: Chronic Periodontitis and Periodontal Health. 2006. *J Periodontol*. **77**:460-471.
9. Takamatsu, N., Yano, K., He, T., Umeda, M., & Ishikawa, I. Effect of Initial Periodontal Therapy on the Frequency of Detecting *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. 1999. *J Periodontol*. **70**:574-580.
10. Adriaens, P., Adriaens L. Effects of nonsurgical periodontal therapy on hard and soft tissues. 2004. *Periodontology 2000*. **36**:121-145.
11. Claffey, N., Polyzois, I., Ziaka, P. An overview of nonsurgical and surgical therapy. 2004. *Periodontology 2000*. **36**:35-44.
12. Ishikawa I., Baehni, P. Nonsurgical periodontal therapy- where do we stand now? 2004. *Periodontology 2000*. **36**:9-13
13. Hurts, J., et al. 2007. *Manual of Environmental Microbiology*. Editorial ASM PRESS, EUA; pp 69-75,101-111.
14. Krieg, N.R. 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 1. Editorial Baltimore: Williams & Wilkins.
15. Mitsuo, S., Suzuki, M., Umeda, M., Ishikawa I., & Benno, Y. Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner et al. 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig. gen.nov., comb.nov. 2002. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **52**:841-849.
16. Ingar O., Shah, HN., Gharbia, SE. Taxonomy and biochemical characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. 1999. *Periodontology 2000*. **20**:14-52.
17. Lau, L., Sanz, M., Herrera, D., Morillo, J., Martín, C., Silva, A. Quantitative real time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. 2004. *Journal of Clin Periodontol* **31**:1062-1069.

18. Alsina, M., Olle, E., Frias J. Improved, Low Cost Selective Culture Medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. 2001. *Journal of Clinical Microbiology* **39**:509-513.
19. Steffens, N., Gamoral, J., Gajardo, M. Ocurrencia de bacilos Gram negativos no fastidiosos y levaduras en la microbiota subgingival de pacientes chilenos con periodontitis. 2006. *Revista Odontológica Mexicana*. **10**:119-125
20. Atlas, R., Bartha, R. 2000. Ecología microbiana y Microbiología ambiental. Editorial Pearson. España. pp. 173- 215.
21. Wolf, H., Hassell T. Atlas a Color de Periodontología. 2008. Trad. Dr. Guillermo A. Park- Doreste. Editorial Amolca. Colombia. Pp.24-38,56-66.
22. Loesche WJ, Syed AS, Stoll J. Trypsin-Like Activity in Subgingival Plaque -- A Diagnostic Marker for Spirochetes and Periodontal Disease?" 1987. *J. Periodontol.* **58**: 266-273.
23. Loesche WJ, Bretz WA, Kerschensteiner D, Stoll J, Socransky SS, Hojoel PP, Lopatin DE. "Development of a diagnostic test for anaerobic periodontal infections based on plaque hydrolysis of BANA". 1990. *J. Clin Microbiol.* **28**: 1551-1559
24. Bretz W., Loesche W. "Characteristics of trypsin-like activity in subgingival plaque samples". 1987. *J. Dent Res.* **66**: 1668- 1672.
25. Teles R., Haffajee A., Socransky S. Microbiological goals of periodontal therapy. 2006. *Periodontology 2000.* **42**: 180-218.
26. D'Ercole S. Catamo G. Piccolomini R. Diagnosis in Periodontology: A further Aid Through Microbiological Test. *Clinical Reviews in Microbiology.* 2008. **34**:33-41.
27. Suvan J. Effectiveness of mechanical nonsurgical pocket therapy. 2005. *Periodontology 2000.* **37**:48-71.