

Bacilos Gram Negativos No Fastidiosos en la Microbiota Subgingival y Lingual en un Grupo de Pacientes Chilenos con Periodontitis

Non Fastidious Gram Negative Rods in the Subgingival and Lingual Microbiota in a Group of Chilean Periodontitis Patients

Silva N¹, Gajardo M¹, Quintero A¹

RESUMEN

Antecedentes y objetivos: Las periodontitis son un grupo de patologías que afectan los tejidos de soporte del diente. Diferentes especies de la microbiota subgingival se han asociado con los tipos de periodontitis. El aislamiento de bacilos Gram negativos no fastidiosos en sacos periodontales es un tema importante ya que algunas de estas especies podrían contribuir como causa principal a fracasos de la terapia periodontal. También es un foco de interés ubicar reservorios de estas bacterias como fuente principal de infección del saco periodontal. Así, el objetivo de este trabajo fue determinar la presencia/ausencia de bacilos Gram negativos no fastidiosos en sacos periodontales y en el dorso lingual de un grupo de pacientes chilenos con periodontitis.

Material y Método: Se tomaron muestras subgingivales de 4 sitios periodontalmente afectados y de dorso de lengua, a 27 pacientes con periodontitis. Las muestras fueron depositadas en RTF a 4 °C para ser procesadas.

Resultados: Se obtuvo una coincidencia de un 77,7% ($p=0,0038$) entre la presencia/ ausencia de bacilos Gram negativos no fastidiosos en saco periodontal y dorso lingual. 38,4% de los pacientes presentó *Alcaligenes faecalis* y 30,8% de ellos, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Rev. Clin Periodoncia Implantol Rehabil. Oral Vol. 1 (1); 5-8, 2008.

Palabras claves: periodontitis, bacilos Gram negativos no fastidiosos, microbiota subgingival.

ABSTRACT

Background and aims: Periodontitis are a group of pathologies that affect support tissue of tooth. Different periodontopathic bacterial species of the subgingival microbiota has been associated with periodontitis but, at this time a great relevance has also been attributed to the presence of non-fastidious Gram negative rods in periodontal pockets, because these species could be a major cause of periodontal therapy failure, it was very interesting to localize the oral reservoir of it, in order to contribute to control the periodontal pocket infection. Thus, the aim of this work was to determine the presence and/or absence of non fastidious Gram negative rods in both, periodontal pockets and lingual dorsum of 27 Chilean periodontitis patients.

Patients and Method: 27 periodontal patients were recruited. Lingual dorsum and subgingival plaque samples were obtained and deposited in cold RTF (4°C) until processing.

Results: 77,7% ($p=0,0038$) of coincidence between presence and/or absence of non-fastidious Gram negative rods in both periodontal pocket and lingual dorsum was found. 38,4% of these patients harbored *Alcaligenes faecalis* and 30,8% of them, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Rev. Clin Periodoncia Implantol Rehabil. Oral Vol. 1 (1); 5-8, 2008.

Key words: lingual reservoir, periodontitis, Gram negative non-fastidious rods, subgingival microbiota.

INTRODUCCIÓN

La periodontitis es una enfermedad infecciosa del periodonto causada tanto por el sobrecrecimiento de patógenos periodontales en la microbiota subgingival de individuos susceptibles como por la respuesta inmuno-inflamatoria local estimulada por ellos. Hay dos formas clínicas de periodontitis, periodontitis agresiva y periodontitis crónica, caracterizadas por una destrucción progresiva de los tejidos periodontales: encía, cemento radicular, ligamento periodontal y hueso alveolar. Ambas se pueden presentar en forma localizada o generalizada y pueden eventualmente conducir a la pérdida de una o más piezas dentarias^(1,2). Las bacterias asociadas con periodontitis son en su mayoría bacilos Gram negativos anaeróbicos fastidiosos, entre los cuales se encuentra *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola* y *Prevotella intermedia/nigrescens*. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, microaerófilico, también se encuentra asociado a periodontitis⁽³⁻¹⁰⁾. Aunque el análisis microbiológico de la microbiota subgingival no siempre es necesario para diagnosticar y tratar a la mayoría de los pacientes con periodontitis, dicho estudio es de gran utilidad cuando se trata a

pacientes que responden mal, que son refractarios a la terapia convencional o que presentan una rápida progresión de la enfermedad^(11,12). En un estudio de Colombo et al, (n=94) los pacientes refractarios constituyeron un grupo heterogéneo en cuanto a su microbiota periodontal predominante pero tenían en común una menor prevalencia de los periodontopatógenos "clásicos" y la presencia inusual de otros tipos bacterianos⁽¹³⁾. Al respecto, en los últimos años se ha asignado una gran importancia al aislamiento de bacilos Gram negativos (BGN) no fastidiosos potencialmente patógenos en otros sitios del cuerpo, desde sacos periodontales de pacientes que muestran baja respuesta al tratamiento periodontal convencional⁽¹³⁻¹⁹⁾. También se ha reportado que además de los tejidos periodontales, este tipo de bacterias podría colonizar y sobrecrecer en otros nichos ecológicos bucales como el dorso lingual a consecuencia por ejemplo del desbalance en la microbiota habitual, producido por tratamiento con antimicrobianos sistémicos^(20,21). Por otra parte, el dorso lingual es uno de los nichos ecológicos más complejos de la cavidad bucal, y del organismo en general, en cuanto a cantidad y variedad de su microbiota⁽²²⁾. Es así que a partir de muestras de esta microbiota se han aislado especies microbianas características de otros

nichos ecológicos tanto orales como del resto del organismo. Entre estas especies se incluyen patógenos periodontales clásicos, bacilos entéricos y hongos unicelulares. Es por ello que el dorso lingual se puede constituir en un reservorio potencial de microorganismos, tanto para la recolonización del periodonto después de la terapia periodontal convencional como para la colonización del saco periodontal por bacterias inusuales, propias de otros hábitat del cuerpo^(23,24). Esto podría explicar que especies de las familias *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonaceae* y otros bacilos Gram negativos no fermentadores se hayan aislado de sacos periodontales en pacientes de USA y Suecia^(25,26), Rumania⁽²⁷⁾, Santo Domingo⁽²⁸⁾, Sudán⁽²⁹⁾ y Chile⁽³⁰⁾. De acuerdo a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar la ocurrencia de bacilos Gram negativos no fastidiosos en muestras de saco periodontal y dorso lingual en un grupo de pacientes chilenos con periodontitis con el fin de establecer una posible asociación entre la presencia simultánea de estas bacterias en ambos sitios de la cavidad oral de los pacientes. Esta información permitirá al clínico reorientar tanto el protocolo de tratamiento como las indicaciones sobre la mantención periodontal, frente a pacientes con baja respuesta a la terapia periodontal convencional, periodontitis refractaria o periodontitis rápidamente progresiva.

PACIENTES Y MÉTODOS

Pacientes

Se seleccionó un total de 27 pacientes con periodontitis entre quienes acudieron a la Escuela de Graduados de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y al Centro de Diagnóstico y Tratamiento Eloisa Díaz, del Servicio de Salud Metropolitano Norte de la Región Metropolitana en Santiago, Chile. En este grupo había 20 mujeres y 7 varones, cuyas edades fluctuaron entre los 13 y 52 años. Se excluyó pacientes que hubiesen recibido algún tipo de tratamiento periodontal y antibioticoterapia sistémica o terapia antiinflamatoria no esteroidea en los últimos 6 meses. También se excluyó del estudio a embarazadas y a pacientes con enfermedades sistémicas. El protocolo de investigación fue explicado a todos los pacientes quienes firmaron un Consentimiento Informado, revisado y aprobado por la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. De acuerdo al protocolo, todos los pacientes iniciaron su tratamiento periodontal dos semanas después de detectada la enfermedad.

Parámetros clínicos

Los parámetros clínicos fueron evaluados en este estudio, siempre por el mismo investigador (AQ) especialmente calibrado para estos fines, fueron nivel de inserción clínica (CAL), profundidad al sondaje (PD), acumulación de placa supragingival (PI) y sangramiento al sondaje (BOP). CAL y PD fueron medidos con una sonda electrónica computarizada (Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, USA). Se examinaron seis sitios en todos los dientes de cada paciente, con exclusión de los terceros molares: mesiobucal, bucal, distobucal, distolingual, lingual y mesiolingual.

Muestras de placa subgingival

Las muestras de placa subgingival de cada paciente, fueron obtenidas a partir de 4 sitios periodontalmente afectados (uno por cuadrante), con una profundidad de saco mayor a 5 mm y una pérdida de inserción mayor a 3 mm. Después de aislar cada sitio, con torulas de algodón y secar con aire, los depósitos supragingivales fueron totalmente removidos con curetas (Hu Friedy, Gracey, USA). Las muestras subgingivales fueron obtenidas insertando dos conos estandarizados N° 30 estériles (Johnson & Johnson, USA), en las zonas más profundas del saco periodontal durante 20 s. Las cuatro muestras de cada paciente (8 conos) se depositaron en un vial conteniendo 2 ml de Medio de Transporte frío (RTF) sin EDTA. Los viales con las muestras, fueron mantenidos siempre a 4°C para ser transportados al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, y ser procesados inmediatamente dentro de las 3 horas siguientes a la toma de muestra.

Muestras de dorso Lingual

Las muestras provenientes desde el dorso lingual, fueron obtenidas arrastrando un rollo de algodón estéril, desde la zona posterior

de la lengua hasta la punta, a través de la línea media por 10 seg. (31) Luego, el algodón se depositó en un vial conteniendo 2 ml de RTF sin EDTA. Los viales con las muestras, fueron mantenidos siempre a 4°C y procesados, como en el caso anterior.

Procedimientos Microbiológicos

Las muestras de placa subgingival y de dorso lingual, fueron dispersadas, mediante agitación máxima (Thermolyne maxi mix II type 37600, IOWA USA) en vortex durante 45s y luego diluidas en forma seriada hasta 10⁴ y 10⁶ respectivamente en PBS. Alícuotas de 100 µl de las diluciones apropiadas, (10⁻³ y 10⁻⁴ para placa subgingival, 10⁻⁵ y 10⁻⁶ para dorso lingual) fueron sembradas en agar sangre menadiona-hemina para el recuento de la microbiota periodontal total cultivable⁽³²⁾ y agar Mc-Conkey para la detección de bacilos Gram negativos no fastidiosos. Las placas de agar sangre hemina-menadiona fueron incubadas a 35°C en jarra con generador de anaerobiosis, por 14 días, mientras que el agar Mc-Conkey se incubó en aerobiosis a 35°C por 24 a 48 hr. La cantidad de microbiota cultivable total se expresó como UFC/ml de medio de transporte y el recuento diferencial de especies se expresó como porcentaje de la microbiota total. La identificación de las especies aisladas, se realizó mediante el aspecto colonial y microscópico y el uso de galerías comerciales, API 20 E y API 20 NE (Biomerieux) para los bacilos Gram negativos no fastidiosos (siguiendo las indicaciones del fabricante).

Análisis Estadístico

Los parámetros clínicos CAL, PI, PD, BOP obtenidos para cada paciente, en los grupos PA y PC, fueron analizados comparativamente usando el test T, para datos no pareados. En este estudio se consideró al paciente como unidad de observación. Para los bacilos Gram negativos no fastidiosos se utilizó el X² para variables nominales. Los resultados se expresaron como promedios y desviaciones standard.

RESULTADOS

Se estudiaron 27 pacientes con periodontitis, 14 (51,9%) presentaban periodontitis agresiva (PA) y los 13 (48,1%) restantes periodontitis crónica (PC). Los criterios utilizados para clasificar a los pacientes, en una u otra entidad clínica se presentan en la tabla I. Los parámetros clínicos de los pacientes se presentan en la tabla II expresados como promedios y desviación estándar, pudiéndose observar valores similares en pacientes con PA y con PC, excepto para el índice de sangramiento al sondaje (BOP) que presentó una diferencia estadísticamente significativa (p=0,015). El porcentaje de ocurrencia (prevalencia) de BGN no fastidiosos en saco periodontal y dorso lingual en el total de pacientes estudiados se presenta en la tabla III. Se puede observar que el 48,1% de los pacientes presentó bacterias de este tipo tanto en saco periodontal como en dorso lingual; el 7,4% de ellos las presentó sólo en saco periodontal y el 14,8% sólo en dorso lingual. En el 29,6% de los pacientes no se aisló BGN no fastidiosos. Así, el porcentaje total de coincidencia aislamiento-no aislamiento en ambas muestras por paciente fue de 77,7%, estableciéndose una diferencia estadísticamente significativa con respecto al 22,3% de no coincidencia (p=0,0038). Al considerar en forma separada los grupos de pacientes con PA (n=14) y con PC (n=13) los porcentajes se distribuyeron de manera similar, no se observaron diferencias significativas entre la coincidencia aislamiento / no aislamiento entre ambas entidades clínicas (p=0,21). La tabla IV muestra el porcentaje de ocurrencia de las tres especies de BGN no fastidiosos aisladas en este estudio. *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* fueron aisladas en el 30,8% de los pacientes, tanto en saco periodontal como en dorso lingual. *Alcaligenes faecalis* también se aisló en ambos sitios, en el 38,4% de los pacientes. En el grupo estudiado, se obtuvo un 100% de correlación en el tipo de especie bacteriana aislada simultáneamente en saco periodontal y dorso lingual. El porcentaje de aislamiento de cada una de estas especies en saco periodontal con respecto a la microbiota total cultivada fue de 9,8% para *E.coli*, 16,8% para *P.aeruginosa* y 2,8% para *A.faecalis* (tabla V).

TABLA I. Criterios clínicos de periodontitis.

Periodontitis agresiva localizada	La edad de inicio se estima en sujetos con <20 años edad, a través de examen clínico periodontal y entrevista personal. Existe pérdida de inserción clínica ≥ 4 mm en dos o más primeros molares y/o incisivos, y ausencia de pérdida de inserción en caninos, premolares o segundos molares.
Periodontitis agresiva generalizada	La edad de inicio se estima en sujetos mayores de 30 años, a través de un examen clínico y entrevista personal. Existe pérdida de inserción clínica ≥ 4 mm en dos o más primeros molares y/o incisivos, hay pérdida de inserción también en caninos, premolares o segundos molares.
Periodontitis crónica generalizada	La edad de inicio se estima en sujetos mayores de 35 años, a través de un examen clínico y entrevista. Pérdida de inserción clínica ≥ 4 mm se observa en al menos el 30% de los dientes presentes en la boca del paciente.

TABLA II. Valor promedio y desviación standard de los parámetros clínicos evaluados en este estudio.

Parámetros Clínicos	Valor promedio \pm SD Periodontitis agresiva (n = 14)	Valor promedio \pm SD Periodontitis crónica (n = 13)
Nivel de inserción Clínica (NIC)	3,36 \pm 0,60	3,37 \pm 0,87
Profundidad al sondaje (mm) (PD)	3,44 \pm 0,66	3,12 \pm 0,52
Índice de placa (PI)	47,49 \pm 10,1	58,26 \pm 19,2
Sangramiento al sondaje (BOP)	39,26 \pm 9,9	54,65 \pm 19,*

* p = 0,015

TABLA III. Ocurrencia subgingival y lingual de Bacilos Gram negativos no fastidiosos en el total de pacientes estudiados y porcentajes de coincidencia y de no coincidencia, aislamiento / no aislamiento entre saco periodontal y dorso lingual.

Pacientes	Saco periodontal	Dorso lingual	Porcentaje
13	+	+	48,1
8	-	-	29,6
2	+	-	7,4
4	-	+	14,8
Total coincidencia aislamiento/no aislamiento			77,7 *
Total no coincidencia			22,3

* p = 0,0038 con respecto al 22,3% de no coincidencia.

TABLA IV. Especies aisladas de Bacilos Gram negativos no fastidiosos en saco periodontal y dorso lingual en el mismo paciente.

Especie	Porcentaje de aislamiento	
	Saco periodontal	Dorso lingual
<i>Escherichia coli</i>	30,8	30,8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30,8	30,8
<i>Alcaligenes faecalis</i>	38,4	38,4

TABLA V. Porcentajes promedio de aislamiento de cada una de estas especies en relación a la microbiota total cultivable en el grupo de pacientes (n =27).

Especie	%
<i>E.coli</i>	9,8%
<i>P.aeruginosa</i>	16,8%
<i>A. faecalis</i>	2,8%

DISCUSIÓN

Nuevas especies de bacterias con un potencial poder patogénico se han aislado de los sacos periodontales de pacientes con periodontitis. Esto, junto con el aislamiento de virus y de hongos unicelulares, hace aún más complejo el cuadro de la etiopatogénesis de esta enfermedad y por ende se complica también el diagnóstico, tratamiento y prevención de esta patología. La periodontitis en su forma agresiva y crónica afecta a más del 95% de la población a nivel mundial y a más del 98% en Chile⁽³³⁾. Siendo una de las patologías infecciosas más prevalentes en el ser humano junto con la caries dental y sabiendo que su etiología radica en el establecimiento de una compleja microbiota organizada como biopelícula a nivel subgingival, es de gran relevancia poder discernir si patógenos periodontales clásicos, microorganismos inusuales o una combinación de ambos son los responsables de su manifestación clínica, de su recurrencia o fracaso del tratamiento. Este conocimiento permitiría al odontólogo, en base a un diagnóstico más certero, enfocar mejor la terapia periodontal y disminuir los casos de no respuesta y de recurrencia de la enfermedad. En este estudio, a diferencia del 13,5% de portación de bacilos entéricos y pseudomonáceos en pacientes con periodontitis avanzada del adulto reportado por investigadores en USA, se encontró que el 55,5% de los pacientes (15 de 27) albergaban BGN no fastidiosos en la microbiota subgingival de saco periodontal y el 62,9% (17 de 27) en el dorso lingual. Tomados en conjunto, el 70,3% de los pacientes presentó BGN no fastidiosos en saco periodontal, en dorso lingual o en ambos. Sólo en el 29,6% de los pacientes no se aisló este tipo de bacterias, sugiriendo una mayor prevalencia de patógenos inusuales en nuestro país acompañando a los periodontopatógenos clásicos en el saco periodontal.

El porcentaje de coincidencia (presencia/ausencia) de estas bacterias en saco periodontal y dorso lingual fue 77,7% en contraste con el 22,3% de no coincidencia. La diferencia estadísticamente significativa entre estos valores apoya la hipótesis de una asociación entre la presencia/ausencia de BGN no fastidiosos en saco periodontal y dorso lingual. Y de este último como probable sitio reservorio de patógenos oportunistas en cavidad bucal. Todo esto es consistente también con el postulado de translocación intraoral de patógenos periodontales para explicar la recolonización de los sitios subgingivales después del tratamiento periodontal⁽³⁴⁻³⁸⁾.

Las especies de BGN no fastidiosos aisladas en este estudio, fueron *P.aeruginosa*, *E.coli* y *A.faecalis*, en coincidencia con algunas de las especies aisladas por otros autores en diversas regiones del mundo^(19,20,26,28,38). Estas especies, principalmente *P.aeruginosa*, poseen muchos factores de virulencia que podrían causar daño a nivel periodontal⁽¹⁹⁾ y podrían explicar la no respuesta al tratamiento convencional. En este contexto es de gran importancia el hallazgo reportado en la literatura, que un 86,5 a 95% de los bacilos entéricos aislados de cavidad bucal mostraban resistencia a los niveles terapéuticos de Tetraciclina, Penicilina G y Eritromicina⁽¹⁹⁾ y que, posterior al tratamiento con antibióticos

de este tipo, ocurría un sobrecrecimiento de estas bacterias en la microbiota subgingival⁽²¹⁾. También se demostró que amoxicilina más ácido clavulánico y doxiciclina eran poco efectivos para eliminar *P.aeruginosa* y otras especies de enterobacterias, permitiendo la sobrevivencia selectiva de estos oportunistas⁽²⁰⁾.

Así, tomados en conjunto, estos resultados muestran que en nuestro país la presencia de patógenos inusuales, en sacos periodontales y dorso lingual en un grupo de pacientes con periodontitis tales como los BGN no fastidiosos podría influir en la baja o nula respuesta al tratamiento convencional como también en los casos de recurrencia de la enfermedad. Dado lo anterior, es interesante considerar la probable presencia de BGN no fastidiosos en los casos mencionados por lo que sugiere el análisis de la microbiota presente en saco periodontal y estudios de susceptibilidad

en el caso de aislamiento de estos patógenos. Asimismo, como nuestros datos indican, es de gran relevancia considerar el dorso lingual como reservorio posible de patógenos periodontales tanto clásicos como inusuales al momento de definir el tratamiento, hecho que justifica la desinfección de boca completa sugerida por otros autores^(31,40,41).

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestros agradecimientos a la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y la empresa Dentaid S.A. por el constante apoyo e implementación de este laboratorio, ya que sin su ayuda este trabajo no se habría realizado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Korman KS, Page RC, Tonette MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the player. Review. *Periodontology* 2000, 1997, 14, 33-53.
2. Slots J, Genco RJ. Black pigmented bacteroides species, capnocytophaga species, and Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *Journal of Dental Research*. 1984 63, 412-421.
3. Slots J. Subgingival microflora and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1979; 6: 351-382.
4. Dahlen G, Manji F, Baelum V, Fejerskov O. Putative periodontopathogens in "diseased" and "non diseased" persons exhibiting poor oral hygiene. *J. Clin. Periodontol*; 1992; 19: 35-42.
5. Hafajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal disease. *Periodontol* 2000; 1994;5: 78-111.
6. Socransky SS, Hafajee AD, Cugeni MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin Periodontol* 1998; 25:134-144.
7. Tanner AC, Haffer C, Brathall GT, Visconti RA, Socransky SS. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J. Clin Periodontol* 1979; 6:278-307.
8. Dzink JL, Socransky SS, Hafajee AD. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J. Clin Periodontol* 1988; 15: 316- 323.
9. Moore WEC, Moore LVH. Periodontal microbiota in different clinical conditions. *Periodontology* 2000,1994 ; 5: 66-77.
10. Moore WEC. Microbiology of periodontal disease. *Journal of Periodontal Research* 1987; 22: 335-341.
11. Adams DF. Diagnosis and treatment of refractory periodontitis. *Curr Opin Dent*. 1992; 2:33-38.
12. Fine DH. Microbial identification and antibiotic sensitivity testing, an aid for patients refractory to periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1994; 21: 98-106.
13. Colombo AP, Hafajee AD, Dewhirst FE, Paster BJ, Smith SM, Cugini MA, Socransky SS. Clinical and microbiological features of refractory periodontitis subjects. *J Clin Periodontol* 1998;25: 169-180.
14. Pihlstrom B. Periodontal risk assesment, diagnosis and treatment planning. *Periodontology* 2000. 2001; 25: 37-58.
15. Dahlén G, Pipattanagovit P, Rosling B, Moller AJR. A comparison of 2 transport media for saliva and subgingival samples. *Oral Microbiology and Immunology*. 1993;8: 375-382.
16. Aucken HM, Pitt TI. Antibiotic resistance and putative virulence factors of serratia marcescens with respect to O and K serotypes. *J. Med Microbiol*. 1998 47: 1105- 1113.
17. Bodey GP, Bolivar R, Fainstain V, Jadela L. Infections caused by Pseudomonas aeruginosa. *Rev. Infect. Disease*. 1983 5: 279-313.
18. Livrelli V, De Champs C, Di Martino P, Darfeuille- Michaud A, Forestier C. Adhesive properties and antibiotic resistance of Klebsiella, enterobacter and Serratia. Clinical isolates involved in nosocomial infections. *J. Clin Microbiol*. 1996 34: 1963-1969.
19. Slots J, Rams TE, Lisgarten MA. Yeast, enteric rods and pseudomonads in the subgingival flora of severe adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 1988; 3: 47 – 52.
20. Barbosa FCB, Mayer MPA, Saba- Chujfi E, Cai S. Subgingival occurrence and antimicrobial susceptibility of enteric rods and pseudomonads from Brazilian periodontitis patients. 2001; *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16: 306-310.
21. Rams TE, Babalola O, Slots J. Subgingival occurrence of enteric rods, yeasts and staphylococci after sistemyc doxycycline therapy. *Oral Microbiol Immunol*. 1990; 5: 166-168.
22. Roldan S, Herrera D, Sanz M. Biofilms and the tongue: Therapeutical approaches for the control of halitosis. *Clin Oral Invest* . 2003;7: 189-197.
23. Roldán S, Winkel EG, Herrera D, Sanz M, Van Winkelhoff AJ. The effects of a new mouthrinse containing Chlorhexidine , Cetylpyridinium Chloride and zinc lactate on the microflora of oral halitosis patients. A dual- centre, double-blind, placebo-controlled study. *J. Clin Periodontol*. 2003; 30: 427-434.
24. Van Winkelhoff AJ, Van der Velden U, Winkel EG, De Graaf J. Black pigmenting bacteroides and motile organisms on oral mucosal surfaces in individuals with and without periodontal breakdown. *J.Periodontal Res* . 1986.21: 434-439.
25. Slots J, Feik D, Rams TE. Age and sex relationships of superinfecting microorganisms in periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* ; 1990; 5: 305-308.
26. Dahlén G, Wikstrom M. Occurrence of enteric rods, Staphylococci and Candida in subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol* 1995; 10: 42-46.
27. Ali RW, Velsescu C, Jivanescu MC, Lofthus B, Skaug N. Prevalence of six putative periodontal pathogens in subgingival plaque samples from Romanian adult periodontitis patients. *J. Clin Periodontol*. 1996;23: 133-139.
28. Slots J, Rams TE, Feik D, Tareras HD, Gillespie M. Subgingival microflora of advanced periodontitis in the Dominican Republic. *Journal of Periodontology* 1991;62: 543-547.
29. Ali RW, Babben V, Nelsen R, Skaug N. Comparative detection frequency of six putative periodontal pathogens in Sudanese and Norwegian adult periodontitis patients. *Journal of Periodontology* 1994;65: 1046-1052.
30. Silva N, Gamonal J, Gajardo M. Ocurrencia de bacilos Gram negativos no fastidiosos y levaduras en la microbiota subgingival de pacientes chilenos con periodontitis. *Rev. Odont.Mex*. 2006;10(3) 119-125.
31. Quirynen M, Mongardini C, Pauwels M, Bollen C, Van Eldere J, Van Steenberghe D. One stage Full – Versus partial mouth disinfection in the treatment of chronic adult or generalized Early- Onset Periodontitis. II Long- Term impact on microbial load. *J. Periodontol* 1999 ; 70: 646-656.
32. Slots J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation" *Oral Microbiol Immunol* 1986; 1 (1) 48- 57.
33. Gamonal J, López N, Aranda W. Periodontal condition and treatment need by CPITN, in the 30-44 and 65- 74 years old population in Santiago- Chile .*Int Dent J*. 1998;48: 96-103.
34. Quirynen M, Litsgarten MA. The distribution of bacterial morphotypes around natural teeth and titanium implants ad modum Branemark. *Clin Oral Implant Res*. 1990; 1: 8-12.
35. Quirynen M, Papaioannou W, Van Steenberghe D. Intraoral transmission and the colonization of oral hard susfaces . *J. Periodontol*. 1996; 67: 986-993.
36. Mongardini C, Van Steenberghe D, Dekeyes C, Quirynen M. One stage full – Versus partial mouth disinfection in the treatment of chronic adult or generalized Early- Onset periodontitis. I long term clinical observations. *J. Periodontol* 1999; 70: 632-645.
37. Slots J, Rams TE. Antibiotics in periodontal therapy: Advantages and disadvantages. *J. Clin Periodontol* . 1990 ; 17: 475-493.
38. Pancic MJ, Van Winkelhoff AJ, Douqué NH, Steures RWR, de Graaff J. Microbiological and clinical effects of metronidazole and amoxicillin in actinobacillus actinomycetemcomitans associated periodontitis. A 2- year evaluation. *J. Clin Periodontol* 1994; 21: 107-112.
39. Helovuo H, Hakkarainen K, Paunio K. Changes in the prevalence of subgingival enteric rods, staphylococci and yeasts after treatment with penicillin and erythromycin. *Oral Microbiol Immunol* 1993;8: 75-79.
40. Danser MM, Timmerman MF, Van Winkelhoff AJ, Van der Velden U. The effect of periodontal treatment on periodontal bacteria on the oral mucous membranes. *J. Periodontol*. 1996; 67: 478-485.
41. Von Troil- Linden B, Saarela M, Matto J, Alaluusua M, Jousimies- Somer H, Asikainen S. Source of suspected periodontal pathogens re- emerging after periodontal treatment. *J. Clin Periodontol*. 1996; 23: 601-607.

CORRESPONDENCIA AUTOR

Nora del Carmen Silva Steffens
Facultad de Odontología, Universidad de Chile
Olivos 943. Independencia. Santiago. Chile.
norasilvasteffens@hotmail.com

Trabajo recibido el 04/07/2007.

Aprobado para su publicación el 18/12/2007.