

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Estomatología III (Medicina y Cirugía Bucofacial)



**DIAGNÓSTICO Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO NO-
QUIRÚRGICO EN PERIODINTITIS. INFLUENCIA DE LA
METODOLOGÍA MICROBIOLÓGICA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Agustín Casas Hernández

Bajo la dirección de los doctores

Mariano Sanz Alonso
David Herrera González

Madrid, 2004

ISBN: 84-669-2816-2



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO ESTOMATOLOGÍA III



**DIAGNÓSTICO Y RESPUESTA AL
TRATAMIENTO NO-QUIRÚRGICO EN
PERIODONTITIS**

**INFLUENCIA DE LA METODOLOGÍA
MICROBIOLÓGICA**

TESIS DOCTORAL

AGUSTÍN CASAS HERNÁNDEZ

DIRECTORES:

**PROF. DR. D. MARIANO SANZ ALONSO
DR. D. DAVID HERRERA GONZALEZ**

2005

AGRADECIMIENTOS

Quisiera comenzar agradeciendo a mis directores de tesis, el Prof. Dr. D. Mariano Sanz y al Dr. D. David Herrera su ayuda en la elaboración de este proyecto. Muchas gracias por enseñarme todo lo que hoy sé y lo que todavía me queda por aprender; y porque cada día sigo sorprendiéndome de la capacidad de trabajo y entrega del Dr. Sanz y de la inagotable generosidad del Dr. Herrera. Ha sido un placer compartir este trabajo con ellos.

En la ejecución de los estudios que componen esta tesis han sido muchas las personas que han participado en sus diferentes fases. Estaré siempre agradecido a Bibiana Mateos, Bettina Alonso y Cristina Serrano que hicieron una gran labor en la parte clínica y a Itziar González y Ana O'Connor por encargarse de la parte microbiológica. Obviamente sin su trabajo, entrega y colaboración, los estudios no se podrían haber llevado a cabo.

Gracias a los alumnos del Master de Periodoncia que nos ayudaron en el manejo de los pacientes y, por supuesto a los propios pacientes que con su inestimable cooperación y contribución nos ayudan a aprender más y mejor.

Llegado a este punto es merecido recordar a todos aquellos que han compartido conmigo mis años de formación en el Master de Periodoncia, compañeros que se han convertido en buenos amigos con los que he disfrutado cada instante. Gracias especialmente a Silvia, Cristina, José Antonio y Jorge, sin ellos no hubiera sido lo mismo porque he aprendido mucho con ellos y, sobre todo, de ellos.

No puedo dejar de acordarme de Sonia, Nuria, Silvia y Vanessa, con las que comparto el trabajo cotidiano, ellas han tenido que combatir y convivir con mi estrés durante la elaboración de la tesis. Gracias por apoyarme, ayudarme y comprenderme. Sin vosotras mi trabajo ya no es lo mismo.

Para finalizar, se merecen un reconocimiento sincero todos aquellos profesores que tanto me han enseñado a lo largo de mi formación. Han sido muchos y muy buenos pero quisiera acordarme especialmente de Mariano Sanz, Berta Legido, David Herrera y Mariano Herrero, por contagiarme su buen hacer y su interés por la Periodoncia y la Implantología.

*La duda puede convertirse en
una buena cualidad si la educa.
La duda ha de llegar a ser sabia,
ha de convertirse en crítica.*
R.M. Rilke

Las tortugas también vuelan...
B. Ghodabi

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	6
1. Periodontitis.....	7
1.1 Epidemiología.....	7
1.2 Etiopatogenia.....	8
1.2.1 Bacterias.....	8
1.2.2 Respuesta hospedador.....	15
1.2.3 Predisposición genética.....	18
1.2.4 Factores ambientales y adquiridos.....	19
1.3 Clasificación.....	20
1.4 Tratamiento.....	21
2. Diagnóstico microbiológico en periodontitis.....	23
2.1 Uso para pacientes individuales.....	23
2.2 Uso para grupo de pacientes.....	24
3. Tests microbiológicos.....	25
3.1. Técnicas visuales.....	26
3.1.1. Microscopía de campo oscuro y de contraste de fase.....	26
3.2. Cultivos bacterianos.....	28
3.3. Métodos inmunológicos.....	31
3.3.1. Microscopía de inmunofluorescencia.....	32
3.3.2. Test de aglutinación al látex.....	32
3.3.3. Citometría de flujo	32
3.3.4. ELISA.....	33
3.3.5. Inmunoensayo de partículas.....	33
3.3.6. Inmunoensayo de membranas.....	33
3.3.7. Marcadores en sangre periférica.....	34
3.4 Métodos enzimáticos.....	34
3.5 Métodos de biología molecular.....	36
3.5.1 Sondas de ácido nucleico.....	37
3.5.2 Análisis de endonucleasas de restricción.....	38
3.5.3 Hibridación ADN-ADN“tablero de ajedrez”.....	39
3.5.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	39
4. Toma de muestras microbiológicas.....	42
4.1 Procedimientos de toma de muestras.....	42
4.1.1.Comparación entre los diferentes procedimientos de toma de muestras.....	44
a) Acceso al fondo de la bolsa periodontal.....	44
b) Tamaño de la muestra.....	44

c) Composición de la muestra.....	46
i. Composición repitiendo el método.....	46
ii. Composición con diferente método.....	46
4.2 Selección de las localizaciones para la toma de muestras.....	47
A. Nicho donde se realiza la toma de la muestra.....	47
B. Selección y número de localizaciones.....	48
C. Variaciones de estrategia según las bacterias.....	48
D. Número de puntas de papel en cada localización.....	49
E. Tamaño de las puntas de papel y el tiempo de la toma.....	49
4.3 Influencia del laboratorio que realiza el análisis sobre los resultados.....	50
5. Utilidad diagnóstica de los distintos tests microbiológicos para el análisis de la microflora subgingival.....	51
6. Uso de los tests microbiológicos en periodontitis.....	56
7. Eficacia clínica y microbiológica del tratamiento periodontal no-quirúrgico.....	59
II. JUSTIFICACIÓN.....	76
III. HIPÓTESIS.....	79
IV. OBJETIVOS.....	81
V. PACIENTES Y MÉTODOS	
- Estudio 1: Evaluación en fase diagnóstica.....	84
- Estudio 2: Evaluación en respuesta al tratamiento periodontal no-quirúrgico.....	90
VI. RESULTADOS	
- Estudio 1: Evaluación en fase diagnóstica.....	98
- Estudio 2: Evaluación en respuesta al tratamiento periodontal no-quirúrgico.....	108
VII. DISCUSIÓN.....	117
VIII. CONCLUSIONES.....	143
IX. ANEXO I. Tablas: Introducción	145
X. ANEXO II. Figuras: Pacientes y métodos.....	158
XI. ANEXO III. Tablas y gráficos: Resultados.....	162
XII. BIBLIOGRAFÍA.....	186

I. INTRODUCCIÓN

1. PERIODONTITIS

Las enfermedades periodontales engloban a dos grupos de patologías bien diferenciadas, las gingivitis y las periodontitis. En estas patologías existe una estrecha relación topográfica entre depósitos bacterianos existentes sobre la superficie radicular y un infiltrado de células inflamatorias en los tejidos periodontales (1). La diferencia entre ambos grupos de patologías es que en las periodontitis se produce la destrucción de la inserción periodontal, y como consecuencia de esta destrucción tisular de las estructuras de soporte de los dientes, se puede llegar a producir su pérdida. De hecho, las periodontitis son la principal causa de pérdida dentaria en pacientes mayores de 35 años (2).

1.1 Epidemiología

En Estados Unidos, la prevalencia de periodontitis crónica (definida como tener uno o más dientes con pérdida de inserción y sondaje ≥ 3 mm), entre personas mayores de 30 años y con más de 6 dientes, es de aproximadamente un 35%, incluyendo un 3,1% que padece periodontitis avanzada, el 9,5% periodontitis moderada y un 21,8% periodontitis inicial (3).

La prevalencia de periodontitis avanzada en europeos es baja (4). La proporción de europeos entre 35-44 años con bolsas iniciales (3,5-5,5 mm) oscilaba entre 13-54%; en Europa del Este, la media era de 45% y para la Europa Occidental era del 36%. La proporción de adultos con bolsas profundas ($>5,5$ mm) es menor del 10% en la Europa Occidental y entre un 30-40% en algunos países de la Europa del Este (4).

De acuerdo con los datos de la última Encuesta de Salud Oral en España (año 2000), utilizando el Índice Periodontal Comunitario, el porcentaje de sujetos sin ningún signo de enfermedad es del 55% para la cohorte examinada menor de 15 años, el 19% para adultos jóvenes entre 35-44 años, y el 8,7% de los adultos entre 65-74 años (5). En los últimos años, comparándolo con los datos de encuestas anteriores, se ha producido una disminución en la necesidad de tratamiento periodontal. En 1993, tan sólo el 25% estaba libre de gingivitis y los resultados del 2000 revelan un porcentaje del 55%. Lo mismo ocurre con el porcentaje de sujetos que requieren tratamiento mecánico, que ha disminuido del 47,7% al 28,2%. Aún así, los datos señalan que en el grupo de pacientes

de 35-44 años, la prevalencia de bolsas periodontales (moderadas o profundas) alcanza el 25,6 %. La prevalencia de enfermedad avanzada es de un 4,2 % (5).

1.2 Etiopatogenia

Las periodontitis son una familia de patologías que difieren en su etiología, historia natural, progresión y respuesta al tratamiento, pero que tienen en común otros procesos, como las vías de destrucción tisular o las características histopatológicas o ultraestructurales (6;7). Un grupo de bacterias Gram-negativas, anaerobias o microaerófilas son el factor etiológico de las periodontitis, son las causantes del inicio y perpetuación de la infección. Pero otros factores del hospedador, la herencia genética, el tabaco y otros factores de riesgo pueden determinar si la enfermedad ocurre, o la severidad de la misma, por encima de las bacterias. De hecho, menos del 20% de la variabilidad en la expresión de las periodontitis puede ser explicado por los niveles de bacterias específicas (8;9). Por todo esto, se dice que las periodontitis son enfermedades multi-factoriales, ya que el inicio, la manifestación y progresión de la infección va a estar influenciada por diferentes factores (10).

La patogénesis de las periodontitis se inicia por un grupo de bacterias Gram-negativas que a través de sus antígenos, lipopolisacáridos y otros factores de virulencia provocan la respuesta inflamatoria inmediata e inmune, tanto innata como específica, del hospedador. Esta respuesta se traduce, por un lado, en la producción de anticuerpos y polimorfonucleares contra las bacterias y, por el otro, en la producción de citoquinas y prostaglandinas que, junto con las metaloproteinasas y la activación del complemento provocan la destrucción del tejido conectivo y óseo. Esta destrucción ocasiona cambios macroscópicos, que se traducen en cambios clínicos, como la pérdida de inserción o el aumento de la profundidad de sondaje que, a su vez, modifican el ambiente favoreciendo las condiciones ideales para la supervivencia y mantenimiento del biofilm subgingival. Tanto la respuesta inflamatoria, inmune y la destrucción tisular están influenciadas por factores de riesgo genéticos, medioambientales y adquiridos (6).

1.2.1 Bacterias subgingivales

Durante la década de 1970 y 1980, se hicieron grandes esfuerzos por clarificar la naturaleza infecciosa de las periodontitis determinando que el factor etiológico de las periodontitis es un grupo de bacterias, predominantemente Gram-negativas, anaeróbicas

o microaerófilas que colonizan el área subgingival; en la década de 1990, se ha concluido que, aunque las bacterias son esenciales, no son suficientes para que se pueda desarrollar la enfermedad (6). En 1996, en el Taller Mundial sobre Periodontitis (“World Workshop”), se concluyó que la mayoría de las periodontitis estaban asociadas a tres bacterias: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* (anteriormente denominado *Bacteroides forsythus*) y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (11). Recientemente, distintos virus como citomegalovirus, virus Epstein-Barr, papilomavirus y virus del herpes simple, se han estudiado por su posible asociación con el desarrollo de las periodontitis, y probablemente participen modificando la respuesta del hospedador a la microbiota subgingival (12-15).

En los primeros estudios en los años 1960, las muestras microbiológicas se tomaban con una cureta, de múltiples localizaciones, y se analizaban todas juntas. Las muestras se examinaban utilizando el microscopio y se observaba la presencia de microorganismos fusiformes, espiroquetas y, ocasionalmente, amebas. Debido a que no se observaban claras diferencias entre localizaciones enfermas y sanas, se consideró que las periodontitis eran “infecciones no específicas”. Esta teoría vino a reafirmarse con el estudio clásico de Løe, que demostraba como la acumulación de placa precedía e iniciaba la aparición de gingivitis (16-18). Pero esta teoría no-específica dejaba muchas preguntas sin responder, como la destrucción ósea de forma localizada en un paciente, o la no-correspondencia entre zonas con más cálculo y placa con zonas de mayor destrucción, o pacientes con muy poca placa y, en cambio, con una destrucción periodontal avanzada. La conclusión era que la composición de la placa podía variar entre individuos e incluso localizaciones.

Posteriormente, se ha evaluado la relación de 15-20 especies bacterianas con las periodontitis, pasando a una teoría de “infección específica”. Existen multitud de estudios que avalan esta teoría. Se ha demostrado como la composición microbiológica de las muestras tomadas de localizaciones enfermas difiere de las sanas en pacientes con periodontitis juvenil localizada (19-21); lo mismo ocurre en pacientes con periodontitis crónica entre localizaciones sanas y enfermas, y entre localizaciones enfermas al comparar periodontitis juvenil localizada y periodontitis crónica (22;23). La evolución en los métodos microbiológicos ha conseguido identificar más detalladamente ciertas bacterias y se ha conseguido asociar esas bacterias con ciertas formas de periodontitis.

Sin embargo, la evolución en los métodos de detección continúa y nuevas bacterias orales continuarán identificándose (24).

Aceptada esta teoría específica, las investigaciones se centraron en identificar los patógenos responsables de las periodontitis. Se encontró que algunas bacterias subgingivales, como *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, estaban raramente presentes en un periodonto sano. Se desarrolló la hipótesis de que estas bacterias podían ser organismos exógenos en zonas subgingivales y representar infecciones reales (exógenas). Pero existían otras bacterias subgingivales que sí se encontraban en pacientes sanos, por lo que se denominó infecciones periodontales endógenas, aquellas causadas por microorganismos indígenas (25). La descripción precisa del tipo de infección periodontal puede ser importante para la selección del tratamiento más eficaz, entre los cuáles se puede incluir un tratamiento antimicrobiano específico.

Los hallazgos que han cambiado el entendimiento de las periodontitis en los últimos años y que afectan a la microbiología son los siguientes:

- a) La naturaleza infecciosa de las periodontitis.
- b) La determinación de bacterias periodontopatógenas específicas.
- c) La evolución episódica de las periodontitis.
- d) La organización bacteriana en biofilms.

a) Naturaleza infecciosa de las periodontitis

Los datos que nos indican la naturaleza infecciosa de las periodontitis se pueden resumir en los siguientes (26):

a. 1) Infecciones periodontales agudas

La fase aguda de ciertas formas de enfermedad periodontal como la gingivitis ulceronecrotizante o periodontitis ulceronecrotizante se resuelven con antibióticos, con lo que se demuestra la naturaleza infecciosa de estos procesos (27-29).

a. 2) Relación de los niveles de placa con gingivitis y periodontitis

La presencia de placa bacteriana está relacionada con el desarrollo de la gingivitis y la instauración de los procedimientos de control de placa

pueden resolver la inflamación gingival (16;17). La instauración de un programa de mantenimiento tras el tratamiento de las periodontitis ha demostrado la preservación de la salud periodontal conseguida (30;31). Dado que la placa está compuesta por bacterias, se sugiere la naturaleza infecciosa de dichos procesos.

a. 3) Eficacia de los antibióticos en el tratamiento de la periodontitis

El uso de antibióticos en el tratamiento de las periodontitis provoca una mejora de los síntomas del cuadro. Se han usado multitud de agentes antimicrobianos para tratar las diferentes formas de periodontitis (32).

a. 4) Respuesta inmunológica del paciente

Toda infección provoca una respuesta inmunológica del hospedador. Existen estudios que demuestran esta respuesta traducida en un aumento de los anticuerpos séricos frente a bacterias subgingivales (33). Incluso esa respuesta puede influenciar las características de las periodontitis (33;34).

a. 5) Potencial patogénico de las bacterias de la placa dental

Se ha comprobado el potencial patogénico de la placa bacteriana al inocularla subcutáneamente en localizaciones extraorales (35). Además, se han encontrado numerosos factores de virulencia de las diferentes bacterias patógenas (36;37).

a. 6) Estudios en animales de experimentación:

-Roedores: En roedores se ha podido demostrar como el uso de antibióticos o antisépticos mejora su estado periodontal (38), y es posible que desarrollen la enfermedad si se les inoculan los patógenos de otros animales enfermos (39), o incluso del hombre (40).

-Perros y primates: En perros y monos es posible desarrollar periodontitis favoreciendo el acúmulo de placa (41;42), y de la misma forma, la instauración de procedimientos de control de placa puede prevenir las gingivitis y periodontitis (43).

-Inmunización: Si las bacterias son los agentes etiológicos de las periodontitis, la inmunización frente a estas bacterias podría evitar su acción patogénica. Diferentes estudios han indicado que la inmunización con organismos, o con sus factores de virulencia, puede disminuir la severidad de las periodontitis, particularmente en ratas infectadas con *P. gingivalis* (44) o en monos con periodontitis inducida por ligaduras (45). Otros estudios han observado una exacerbación de la enfermedad en monos con periodontitis inducida por ligaduras (46).

b) Determinación de los patógenos periodontales.

Una vez que se ha determinado la naturaleza infecciosa de las periodontitis, el problema surge en definir qué bacterias son las responsables de la enfermedad. Son más de 300 especies diferentes las que pueden ser cultivadas de la bolsa periodontal de diferentes individuos y 30-100 especies en una misma localización (47;48); a este número hay que sumarle todas las especies que no podemos cultivar o que son difíciles de identificar. La cifra de especies bacterianas en la cavidad oral puede ser alrededor de 500 (49). Con tanta diversidad de bacterias, puede que nos enfrentemos con infecciones mixtas o polimicrobianas, con lo que se complica dilucidar la función de las especies individuales en la etiología de la enfermedad.

Las características peculiares de la historia natural de la enfermedad complican también la asignación de responsabilidades a cada bacteria. Las localizaciones de un mismo paciente pueden no estar activas al mismo tiempo, incluso diferentes localizaciones pueden estar activas por patógenos diferentes o actuar un patógeno en un momento y otro diferente posteriormente en la misma localización. Además, la existencia de diferentes periodontitis son parámetros a tener en cuenta.

Para considerar una bacteria como un patógeno periodontal, es decir, involucrada en el inicio y progresión de las periodontitis, debe cumplir una serie de criterios. Los criterios de Koch se han utilizado para definir la relación causal entre un agente infeccioso y la enfermedad (50). Estos criterios no parecen válidos para definir los patógenos periodontales por lo que se modificaron (34).

Los criterios a cumplir por una bacteria para ser considerada como patógeno periodontal son (34;50):

- Criterio de asociación. La especie bacteriana debe encontrarse más frecuentemente y en mayor número en los casos de infección que en los individuos sin infección.
- Criterio de eliminación. La eliminación de la bacteria debe ir acompañada de la remisión de la enfermedad.
- Criterio de respuesta inmune. Si una bacteria es capaz de producir infección, el organismo debe producir anticuerpos o una respuesta celular inmune específica frente a dicho patógeno.
- Criterio de factores de virulencia. La existencia de factores de virulencia determina las características o propiedades de la bacteria durante el proceso de la infección.
- Criterio de estudios animales. La inoculación de la bacteria en animales debe provocar el desarrollo de la infección.
- Criterio de análisis de riesgo. Se evalúa la relación existente entre el valor de la presencia del agente etiológico, en este caso bacterias, y el riesgo de progresión de la enfermedad.

Los primeros estudios para asociar bacterias específicas a las periodontitis se centraron en *A. actinomycetemcomitans* y la periodontitis juvenil localizada (actualmente denominada periodontitis agresiva localizada) (51;52). El grupo de bacterias que cumplen los criterios para considerarlos patógenos periodontales son *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *T. forsythensis*. En 1996, en el Taller Mundial sobre Periodontitis (“World Workshop”) se concluyó que la mayoría de las periodontitis estaban causadas por estas tres bacterias (11).

Pero hay más bacterias que, con más o menos información disponible, cumplen los criterios para considerarlos agentes etiológicos de la periodontitis. Estas bacterias son *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Micromonas micros* (antes denominado *Peptostreptococcus micros*), *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Eikenella corrodens*, *Eubacterium* sp., *Selemonas* sp. y *espiroquetas* (34;53). En un futuro, estos conceptos pueden evolucionar con el conocimiento de la organización bacteriana en biofilms y sus peculiares características.

c) Detección de los periodos de progresión de la enfermedad (actividad)

Son muchos los estudios que han definido los periodos de cambio en los tejidos periodontales. Løe ya demostró utilizando un modelo experimental de gingivitis en humanos cómo se producían cambios en el estado gingival en dos o tres semanas (16-18). Incluso estudios radiográficos tomados anualmente demostraron la pérdida de hueso alveolar en periodontitis juvenil y en formas agresivas de periodontitis en adultos. Por esto, es importante encontrar métodos diagnósticos que puedan predecir los momentos de actividad, traducidos como momentos en los que se está produciendo pérdida de inserción (54).

d) Organización bacteriana en biofilms

El descubrimiento de la organización de las colonias bacterianas en biofilms es uno de los avances más importantes en la microbiología oral. Un biofilm es una matriz formada por una asociación de poblaciones bacterianas unidas entre sí y a superficies o interfases. Probablemente sea el método preferido de crecimiento para muchos o quizás para todas las especies bacterianas (55).

El comportamiento de las bacterias en los biofilms es totalmente diferente a su comportamiento en solitario, y tanto su patogenicidad como la expresión de sus factores de virulencia pueden estar aumentados o ser distintos. En los próximos años, los estudios se deberán centrar en el comportamiento de las diferentes bacterias en estas organizaciones.

Las características a resaltar de los biofilms son las siguientes (7):

- Las comunidades de bacterias están asociadas entre sí de modo que unas colaboran en el desarrollo de otras comunidades. Las diferentes comunidades exhiben una cooperación metabólica, por ejemplo, con el intercambio de nutrientes.
- Las comunidades que componen el biofilm poseen microambientes radicalmente diferentes, variaciones de pH, concentraciones de oxígeno y potenciales eléctricos, permitiendo nichos adecuados a todas las especies.

- Dentro del biofilm existe un sistema circulatorio primitivo formado por canales de agua, que permite intercambio metabólico y de señales.
- Los biofilms proporcionan seguridad a las comunidades que la componen ya que son capaces de resistir las defensas del hospedador y los antibióticos sistémicos, locales y antisépticos.
- Los procesos de intercomunicación entre las poblaciones bacterianas que componen el biofilm es quizás la característica más importante de su organización. Algunas de las funciones de los biofilms van a depender de la habilidad de las bacterias para comunicarse entre sí. La comunicación entre las poblaciones se puede producir por señales moleculares o intercambiando material genético. Entre estos procesos, destaca el *quorum sensing* se refiere a la regulación de la expresión de genes específicos por la acumulación de señales en el ambiente que median en la comunicación intercelular. Además, el intercambio genético puede darse por distintos mecanismos como la conjugación, transformación, transferencia de plásmidos y transferencia de transposones. Estas características dan a los biofilms sus distintas y peculiares propiedades (55).

Existe evidencia sobre el intercambio de información entre las bacterias que pueden hacer expresar un tipo u otro de patogenicidad. Sin embargo, no conocemos suficientemente el comportamiento de *P. gingivalis*, *T. forsythensis* y *A. actinomycetemcomitans* en los biofilms (7).

1.2.2 Respuesta del hospedador

La respuesta del hospedador frente a la agresión bacteriana se va a traducir en una respuesta inmune e inflamatoria. Aunque estas respuestas en los tejidos periodontales pueden parecer similares a las que ocurren en otros tejidos, existen diferencias significativas, sobre todo por la existencia del epitelio de unión con sus peculiares características, y el biofilm subgingival, con una gran cantidad de bacterias y de sus productos con potenciales inductores de respuestas diferentes. Por tanto, las respuestas pueden ser exageradas y producir destrucción celular y tisular, involucrando al tejido conectivo y óseo.

Ambas respuestas están interrelacionadas entre sí, con lo que los componentes de ambas respuestas interactúan dinámicamente durante el proceso de periodontitis.

Respuesta inflamatoria e inmune

Los eventos moleculares y celulares que ocurren inicialmente se deben a una respuesta “rutinaria” del hospedador frente al biofilm subgingival, pero los productos bacterianos específicos y las características individuales modifican el proceso. En un primer momento, las bacterias y los productos que componen el biofilm interactúan con el epitelio de unión y penetran dentro del tejido conectivo subyacente. El tejido conectivo responde con una vasodilatación y un incremento del número de leucocitos, sobre todo neutrófilos, que migran para entrar en el epitelio y en el surco. A la vez se destruyen el colágeno y otros componentes de la matriz extracelular perivascular, produciéndose cambios anatómicos hasta formar la bolsa periodontal. Posteriormente, hay un aumento del infiltrado leucocitario dominado por linfocitos, incluyendo las células B y T, con características de células T-helper 1 (Th1) y T-helper-2 (Th2). Al evolucionar, la lesión estará dominada por las células B, aunque también existirán células T, macrófagos y neutrófilos. Las células B se diferencian para la producción de células plasmáticas productoras de anticuerpos (6;7;56).

Se pueden distinguir 4 fases diferentes en la patogénesis de la periodontitis (56):

1. Fase de alteración bacteriana aguda: Los elementos vasculares y epiteliales responden a los cambios bacterianos.

Al exponerse el epitelio a los productos bacterianos como lipopolisacáridos (LPS), ácidos grasos, como el butírico y propiónico o péptidos y N-formil-metionil-leucilfenilalanina, provoca que respondan con una serie de mediadores pro-inflamatorios y citoquinas como interleuquina-8 (IL-8), prostaglandina E₂ (PGE₂), interleuquina-1 α (IL-1 α), metaloproteinasas y factor de necrosis tumoral α (TNF- α). Estos mediadores facilitan la llegada de los neutrófilos.

2. Fase de respuesta inflamatoria aguda: Los tejidos responden a las primeras señales.

A la fase anterior se incorporan el sistema de proteínas séricas y la activación de los macrófagos. El infiltrado vascular y la activación del complemento

amplifican la respuesta inflamatoria local y producen una mayor activación endotelial. Se reclutan más neutrófilos, se produce una mayor proliferación de células epiteliales, y la secreción localizada de enzimas inicia la destrucción de la matriz extracelular.

3. Fase de respuesta inmune: Activación de las células mononucleares para formar la respuesta inmune local y sistémica.

En esta fase se produce un aumento de la actividad celular inflamatoria de los tejidos y se producen cambios epiteliales asociados con la bolsa periodontal. Tan pronto como comienza la inflamación, el exudado de los vasos es, predominantemente, de células mononucleares. Los productos bacterianos y las citoquinas derivadas del epitelio activan a las células mononucleares tisulares que forman la respuesta inmune local. Posteriormente, la respuesta por los anticuerpos es activada para controlar la infección bacteriana. Todo ello estará dirigido por mediadores de la inflamación como los distintos tipos de interleuquinas tipo-1,2,3,4,5,6 y 8, TNF- α y β e interferón γ .

4. Fase de regulación y resolución: Determinantes de los componentes protectores en el surco y balance de colágeno en los tejidos.

Esta fase representa la pérdida inicial de inserción, además de un aumento de la actividad de las células mononucleares en los tejidos. Los fibroblastos comienzan a secretar diferentes sustancias y las células plasmáticas son las predominantes. Todo esto crea un ambiente en el que los diferentes productos aumentan la destrucción del tejido conectivo y la destrucción del tejido óseo.

Destrucción tisular

Las periodontitis van a provocar la destrucción del hueso y del tejido conectivo, incluyendo el colágeno, proteoglicanos y otros componentes de la matriz extracelular. Este proceso de destrucción está constantemente ajustado por las interacciones entre las bacterias y el hospedador.

La destrucción de la matriz extracelular está determinada por el balance existente entre las metaloproteinasas y sus inhibidores. Este balance está regulado localmente por la

exposición de la IL-1 α , IL-1 β , IL-10, factor de crecimiento transformador β (TGF- β) y LPS.

Igualmente, la destrucción ósea se debe al balance entre reabsorción y formación de hueso. Los factores involucrados en esta destrucción son la PGE₂, IL-1 β y con menos potencial el TNF- α . IL-6 podría estar también involucrada. Factores circulantes, incluyendo las hormonas esteroideas, la hormona paratiroidea, la calcitonina y la vitamina D₃, podrían regular el proceso de remodelado óseo.

1.2.3 Predisposición genética

Los factores genéticos que modifican la respuesta del individuo frente a las agresiones microbiológicas son los determinantes de la susceptibilidad a las periodontitis, afectan a la tasa de progresión y determinan la severidad de la enfermedad (57).

La evidencia sobre la susceptibilidad genética de las periodontitis proviene de las siguientes tres fuentes:

- La asociación de periodontitis con rasgos específicos transmitidos genéticamente. Existen enfermedades de transmisión genética, como la Neutropenia o el síndrome de Papillon-Lefèvre, con alteraciones en el número / función de los neutrófilos y con una mayor susceptibilidad a padecer periodontitis (58;59).
- Los estudios en gemelos con periodontitis han señalado una gran concordancia entre gemelos monocigóticos y bicigóticos. Se ha demostrado que esta herencia aumenta en un 50 % el riesgo de padecer periodontitis avanzada (60).
- Estudios en familias que padecen periodontitis de comienzo temprano (agresivas localizadas / generalizadas, según la clasificación de 1999 -**Tabla 1, pág. 146**) han demostrado que poseen uno o más genes autosómicos dominantes asociados con el aumento de la susceptibilidad a las periodontitis (7).

Los rasgos genéticos que pueden aumentar la susceptibilidad son los siguientes (61;62):

- Anormalidades en la función de los fagocitos. Se ha demostrado en el 75% de los individuos con periodontitis juvenil.
- Capacidad reducida para producir inmunoglobulina G₂ (IgG₂). Es el mayor anticuerpo sérico que se produce en respuesta a la infección periodontal. La

capacidad de producir esta inmunoglobulina viene determinada genéticamente, está regulada por el cromosoma 6 y varía mucho entre individuos.

- Polimorfismo en el receptor hFc- γ -RIIa. Es el único receptor que reconoce las bacterias unidas a IgG₂. Su afinidad para unirse al complejo antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) viene determinada genéticamente. Existe una forma de expresión en que el receptor tiene muy poca afinidad para unirse, con lo que provoca una mayor susceptibilidad para sufrir infecciones.
- Polimorfismos del TNF- α . El gen que lo expresa se halla en el cromosoma 6, y el polimorfismo se encuentra en la región que determina su producción, aumentándola de forma exagerada. Este polimorfismo se ha asociado con mayor susceptibilidad a infecciones.
- Función alterada de monocitos y macrófagos. La respuesta de estas células viene marcado genéticamente. La alteración, en los pacientes susceptibles, consiste en la liberación significativa de más TNF- α , IL-1 β , y PGE₂ que los individuos resistentes (63;64).
- Polimorfismo de IL-1 β . El gen de IL-1 que se encuentra en el cromosoma 2q13 es polimórfico. Los individuos con uno de los genotipos específicos producen 4 veces más IL-1 β que los genotipos negativos, y tienen 20 veces más probabilidad de padecer periodontitis a partir de los 40 años (65).
- Gen de la ciclooxigenasa 1. Esta enzima se encarga de producir PGE₂. Su expresión viene determinada por el cromosoma 9q32-33. La susceptibilidad viene determinada por una producción excesiva de PGE₂.

1.2.4 Factores ambientales o adquiridos

La respuesta inmune del individuo puede verse modificada por factores ambientales o adquiridos, como el hábito tabáquico o el estrés.

- Tabaco: Es el factor externo adquirido que más se ha asociado con periodontitis y, especialmente, con periodontitis avanzadas (66;67). Sus efectos son variados. Además de modificar las características clínicas, es capaz de reducir la tensión de oxígeno creando un ambiente favorable para la colonización y crecimiento de bacterias Gram-negativas. También tiene efectos importantes sobre el sistema inmune. El tabaco afecta la función

leucocitaria, altera la quimiotaxis y fagocitosis de los neutrófilos orales y periféricos (68;69) y reduce la producción de anticuerpos (70;71).

- Estrés: Factores psicoemocionales como el estrés pueden ocasionar una depresión de la respuesta inmune frente a la infección periodontal (72;73). La gingivitis ulceronecrotizante fue la primera patología relacionada con el estrés. Pero hoy en día, el significado etiológico del estrés no acaba de ser corroborado en las periodontitis crónicas (73;74).

1.3 Clasificación de las periodontitis

Las periodontitis no son una entidad única y homogénea, sino que son una familia de enfermedades estrechamente relacionadas en las que puede variar la etiología, la historia natural y la respuesta al tratamiento (6).

La clasificación de las enfermedades periodontales es necesaria para que todos los profesionales utilicen un lenguaje común. En muchos casos, sobre todo cuando se manejan enfermedades que poseen una etiología multifactorial, pueden inducir a confusión y discusión. De hecho, los conocimientos que se han ido descubriendo sobre la etiología han ido haciendo evolucionar las clasificaciones (75).

Los últimos años se ha estado utilizando la clasificación consensuada en el “World Workshop in Clinical Periodontics” en 1989 y el “Workshop Europeo en Periodoncia” (76;77). Pero se achacaban ciertos defectos a las clasificaciones, como la existencia de demasiadas categorías, ausencia de un componente gingival, énfasis inapropiado en la edad de inicio y tasa de progresión y, por último, en unos criterios de clasificación no demasiado claros (78).

Tras varios cambios, la actual clasificación data de 1999 (78) (**Tabla 1, pág. 146**). La idea fundamental de esta clasificación, diferenciándose de las anteriores, es que se elimina cualquier dato concerniente a la edad y a la progresión de la enfermedad. A todos los casos en los que no existe una destrucción agresiva de los tejidos periodontales, independientemente de la edad, se les agrupa simplemente como “Periodontitis crónica”, complementando el nombre con “generalizada” o “localizada” en función de la extensión de la afectación. Por otro lado, las formas de enfermedad periodontal claramente destructivas pasan a denominarse “Periodontitis agresivas”,

subclasificándose a su vez en “generalizada” o “localizada”. De esta manera, en este último apartado, se incluyen la mayoría de los casos de lo que antes se conocía como periodontitis prepuberal y juvenil, excepto aquellas agrupadas a periodontitis asociadas a enfermedades sistémicas. Existen algunos casos de la antigua periodontitis del adulto que, debido a su elevada tasa de destrucción, se incluyen también en este grupo (78).

Las clasificaciones irán evolucionando y cambiando a medida que conozcamos más sobre las infecciones periodontales. Por ejemplo, la designación de periodontitis crónica puede estar abarcando multitud de infecciones polimicrobianas y poligenéticas que se irán descifrando en los próximos años (75).

1.4 Tratamiento

Los avances en el tratamiento de las periodontitis han ido encaminados al control de la infección, la modulación de la respuesta del hospedador y el manejo de los factores de riesgo.

Si las periodontitis son infecciones provocadas por bacterias, el tratamiento periodontal debe ir dirigido a controlar esa infección en los tejidos periodontales. La base del tratamiento periodontal es la disgregación del biofilm subgingival por medio de procedimientos mecánicos (79;80). Estos procedimientos incluyen el control de la placa supragingival por parte del paciente, con el uso de una técnica y frecuencia de cepillado correcta junto con medidas de higiene interproximal, por medio de diferentes métodos como la seda dental o los cepillos interproximales (81;82). El control del biofilm subgingival se realizará por parte del profesional con las técnicas de raspado y alisado radicular, junto con la eliminación de todos los factores retentivos (83). En determinados casos, las cirugías periodontales serán necesarias para controlar la infección periodontal, esto es acceder a localizaciones donde no se ha podido disgregar el biofilm y conseguir un ambiente en que se impida la formación del biofilm (84).

La utilización de agentes químicos como los antisépticos pueden ayudar en el control de la infección (85-88). El producto de referencia (“gold standard”) de estos agentes contra la formación de la placa bacteriana es la clorhexidina, aunque se utilizan otras sustancias con diferentes efectos como las aminas cuaternarias, fenoles y aceites esenciales como el triclosan (89).

Se ha propuesto el uso de antibióticos para manejar las periodontitis, al responsabilizar a una serie de bacterias específicas del inicio y progresión de la enfermedad. Los medios de supresión de placa no específicos pueden no ser la única posibilidad para la prevención y tratamiento de estas infecciones. Una alternativa válida puede ser la eliminación o reducción específica de las bacterias patógenas de la placa dental. Es en esta hipótesis donde se apoya el uso de antibióticos para el tratamiento de las periodontitis (90-94).

2. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO EN PERIODONTITIS.

El aumento de los conocimientos sobre la etiopatogenia de las periodontitis trae consigo un cambio en los objetivos a cumplir por los tratamientos aplicados. Al determinarse que el factor que inicia las periodontitis son las bacterias, la instauración de un tratamiento anti-infeccioso adecuado es el objetivo para conseguir el éxito clínico.

Para seleccionar el tratamiento apropiado en infecciones como las periodontitis, deben considerarse un número importante de factores:

1. Tener identificados los organismos causantes de la patología. Si no se conocen, al menos se debe ser capaz de estimar la probabilidad estadística de que una bacteria o grupo de bacterias causen la infección (1).
2. Evaluar microbiológicamente los tratamientos anti-infecciosos. Debemos conocer cuál es el efecto de nuestros tratamientos sobre las diferentes bacterias. La elección estará basada en (1):
 - a. La susceptibilidad del organismo que infecta.
 - b. La naturaleza de la infección.
3. Deben considerarse una serie de factores del hospedador para elegir el tratamiento anti-infeccioso óptimo. El tratamiento debe tener en cuenta alergias u otras posibles reacciones adversas que pueden modificar la elección del mismo (1).

Mediante los tests microbiológicos se pueden identificar las bacterias, y evaluar microbiológicamente los tratamientos anti-infecciosos. La utilidad de los tests microbiológicos en periodontitis puede considerarse desde dos grandes categorías:

- Uso para el paciente individual.
- Uso para un grupo de sujetos o pacientes.

2.1 USO PARA EL PACIENTE INDIVIDUAL

Idealmente, un test microbiológico debería servir para (1):

- Determinar el agente causal. Las periodontitis son infecciones mixtas. La selección del tratamiento y pronóstico puede variar según los patógenos

presentes. Por tanto, en la fase diagnóstica, los patógenos específicos deben ser determinados.

- Determinar las localizaciones de destrucción tisular activa. Si somos capaces de detectarlas podremos instaurar el tratamiento adecuado y en el momento idóneo.
- Planificar el tratamiento para los pacientes no-tratados. El diseño del plan de tratamiento irá encaminado a la eliminación de los patógenos periodontales.
- Corregir el tratamiento de pacientes refractarios y recidivantes. Los pacientes que no responden al tratamiento, pueden ser pacientes a los que no se ha instaurado el tratamiento correcto.
- Controlar los efectos del tratamiento. Conocer si se ha conseguido la eliminación de los patógenos periodontales.
- Decidir los intervalos de las visitas de mantenimiento. Se puede determinar, en cada momento, los niveles residuales o de carga de patógenos periodontales para decidir el intervalo de mantenimiento. Hay muy poca evidencia que apoye este uso de los tests microbiológicos, sin embargo, puede ser razonable pensar que con ciertos niveles de patógenos periodontales sea necesario realizar los mantenimientos más frecuentemente.

2.2 USO PARA UN GRUPO DE PACIENTES DETERMINADO

Otra indicación de los tests microbiológicos es el examen de grupos de población. Se han descrito tres usos importantes (1):

- Estudios epidemiológicos sobre prevalencia de patógenos en varias poblaciones. Pueden existir patógenos diferentes en poblaciones distintas.
- Estudios longitudinales para valorar la importancia de las bacterias en el inicio y progresión de las periodontitis.
- Identificar individuos de riesgo, que pueden padecer periodontitis o tener una forma recurrente.

3. TESTS MICROBIOLÓGICOS: Métodos de estudio del biofilm subgingival.

Las técnicas de detección de patógenos se han ampliado y sofisticado de acuerdo con el mayor conocimiento que posemos sobre la microbiología de las periodontitis y el avance propio de la tecnología. Podemos destacar los siguientes:

3.1. Técnicas visuales:

3.1.1. Microscopía de campo oscuro y de contraste de fase.

3.2. Cultivos bacterianos.

3.3. Métodos inmunológicos:

3.3.1. Microscopía de inmunofluorescencia.

3.3.2. Test de aglutinación al látex.

3.3.3. Citometría de flujo.

3.3.4. ELISA.

3.3.5. Inmunoensayo de partículas.

3.3.6. Inmunoensayo de membranas.

3.4. Métodos enzimáticos.

3.4.1. BANA-test.

3.5. Métodos de biología molecular.

3.5.1. Sondas de ácidos nucleicos.

3.5.2. Análisis de endonucleasas de restricción.

3.5.3. Hibridación ADN en “tablero de ajedrez” (“*Checkerboard DNA-DNA hybridization technology*”).

3.5.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El origen de todos los métodos para detectar los patógenos periodontales es triple. Desde métodos desarrollados para la detección de bacterias en otras ramas de la Medicina y modificados para la identificación de patógenos periodontales (sondas de ácidos nucleicos y la reacción en cadena de la polimerasa), pasando por pruebas utilizadas para demostrar la correlación entre las bacterias y cambios clínicos (cultivo, ELISA y la microscopía por inmunofluorescencia), y por último, métodos desarrollados

específicamente para patógenos periodontales basadas en propiedades específicas de estas bacterias, como es la hidrólisis del N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida (BANA-Test) (95).

3.1. TÉCNICAS VISUALES

3.1.1. Microscopia de campo oscuro y de contraste de fase

Han sido los métodos que se utilizaron en los primeros estudios para analizar microbiológicamente la placa bacteriana. Ésta se coloca sobre placas y se observa a través del microscopio de forma inmediata. Las bacterias se identifican por su forma y tamaño, pudiendo apreciarse su grado de movilidad dentro de la estructura de la placa. Con estas técnicas visuales únicamente se puede determinar la proporción relativa de morfotipos (96;97). Son pocas las bacterias que se pueden reconocer con claridad, siendo las espiroquetas una de ellas ya que son organismos fácilmente identificables por su forma y movilidad.

Gracias a estas primeras técnicas, se demostró como la microbiota bacteriana era diferente en individuos sanos y enfermos. En pacientes sanos, la placa se caracterizaba, principalmente, por un número pequeño de cocos no-móviles. Mientras que en individuos con periodontitis, la placa bacteriana se caracteriza por una alta proporción de espiroquetas de tamaño pequeño, medio y grande, junto con la presencia de bacilos curvos y móviles (98;99).

Al comparar diferentes muestras de placa en el tiempo, la microscopía podía detectar cambios en la morfología y movilidad de la microbiota en pacientes con periodontitis. La importancia de este hecho radica en que la habilidad para detectar estos cambios tenía relevancia clínica. Existe, por ejemplo, una correlación positiva entre la determinación mediante microscopio de los bacilos móviles y los niveles clínicos de inflamación gingival, como entre los recuentos de espiroquetas y la profundidad de sondaje (98-100).

Mucho más importantes fueron los descubrimientos realizados con el microscopio de campo oscuro que demostraba las diferencias existentes en la distribución de los morfotipos bacterianos desde coronal a apical en la placa subgingival (101).

La utilización del microscopio de campo oscuro y de contraste de fase tiene ventajas como:

- Monitorización de los pacientes durante el tratamiento. El éxito del tratamiento se determinaba por el cambio de una flora altamente patogénica a una más característica de un estado de salud (102-104) y se demostraba una buena reproducibilidad (105).
- Procedimiento ambulatorio. Podía realizarse en el gabinete dental ya que la identificación de las bacterias es sencilla, al sólo determinar la forma y movilidad de las mismas. Su beneficio clínico es limitado (106).
- Motivación y educación de los pacientes. No existen estudios que demuestren que esta afirmación sea cierta pero poder mostrar al paciente las bacterias que componen su placa bacteriana podría servir de refuerzo positivo para mejorar el cumplimiento de las técnicas de higiene dental (107).

Dentro de las desventajas que podemos señalar están:

- No identifica especies individuales. No se puede caracterizar individualmente a los microorganismos y sólo se pueden definir morfogrupos bacterianos. No es posible dar nombre a una bacteria únicamente por su morfología, aunque ésta tenga ciertas peculiaridades, como es el caso de las espiroquetas (95).
- Monitorización de pacientes tratados. Se ha demostrado que con estas técnicas no se puede predecir la progresión de las periodontitis en pacientes tratados y en fase de mantenimiento (104;108;109).
- No permite realizar un antibiograma para detectar la sensibilidad y resistencias a antibióticos.

Hoy en día existe un gran número de pruebas microbiológicas que superan con creces lo que la microscopía puede ofrecer, y su uso ha quedado como elemento accesorio.

3.2 CULTIVO

Las técnicas de cultivo bacteriano han sido y son la base sobre la que se apoya la microbiología como ciencia (106). Es el método de referencia (“gold standard”) de los análisis microbiológicos, esto quiere decir que todos los tests microbiológicos nuevos deben ser comparados y validados con él (107).

La base del cultivo es favorecer el crecimiento de las bacterias recogidas en una muestra sobre diferentes medios para su posterior caracterización, identificación y recuento.

El procedimiento en Periodoncia incluye diferentes pasos. La toma de la muestra ha de ser muy cuidadosa, ya que el objetivo es obtener la mayor cantidad de placa subgingival posible, de forma que sea representativa del nicho a estudiar. Las muestras, una vez transportadas hasta el laboratorio de forma eficaz, dependiendo del método de toma de muestras seleccionado, son dispersadas por sonificación o por un vórtex. Una vez dispersadas, se distribuyen en varios medios de agar y, por último, son cultivadas bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Las placas de cultivo son analizadas tras el periodo de incubación y las colonias de bacterias que se observan se pueden aislar individualmente (95). Estas cepas bacterianas son identificadas utilizando múltiples análisis incluyendo:

- Morfología de la colonia y celular.
- Tinción de Gram.
- Patrones de fermentación del azúcar.
- Análisis bioquímicos.
- Análisis cromatográficos de los productos metabolizados.

El laboratorio determina el tipo de especie bacteriana presente en la muestra del paciente y sus proporciones relativas y absolutas, con lo que se describe la flora general y las especies individuales dentro de la muestra.

El cultivo no es capaz de identificar todas las bacterias en una muestra, pero sí que es capaz de detectar el mayor espectro bacteriano de patógenos periodontales (95;110), incluso bacterias infrecuentes como las enterobacterias (111). Esta incapacidad para detectar todas las bacterias es debida a la posibilidad de que éstas puedan morir o

puedan ser inicialmente viables pero incapaces de sobrevivir al estrés acumulado durante la toma de muestra, o en la dispersión, o a la exposición al oxígeno o por carecer de nutrientes específicos en los medios de cultivo. Por lo tanto, los microorganismos son sensibles a la técnica de toma y análisis de la muestra. La incapacidad de poder cultivar todas las bacterias de las muestras puede favorecer la aparición de falsos-negativos.

Para cultivar las diferentes bacterias se utilizan medios de cultivo no selectivos y selectivos. Las muestras se suelen cultivar en placas de agar no selectivo, en una atmósfera anaerobia para estudiar patógenos anaerobios y facultativos. Se utilizan también medios selectivos, que favorecen el crecimiento de ciertas bacterias frente a otras, ya que se utilizan condiciones apropiadas de crecimiento y nutrientes específicos. Por ejemplo, para el crecimiento de *A. actinomycetemcomitans*, se utiliza un medio compuesto por agar tripsina-soja conteniendo suero de caballo, bacitracina y vancomicina (TSBV) (112) o bien otro denominado Dentaïd- 1 que suprime el suero y sangre haciéndose más restrictivo contra el crecimiento de bacterias con mayores requerimientos nutricionales (113), incubado a 37 grados centígrados en un ambiente al 5% de CO₂ (112). *T. forsythensis* es una bacteria difícil de cultivar con medios no selectivos, ya que su crecimiento es muy lento, por ese motivo se ha propuesto el uso de medios selectivos enriquecidos con ácido N-acetil-murámico para mejorar su detección (114). El problema de los medios selectivos es que suprimen otra flora y pueden eliminar otros posibles patógenos. Por eso, se recomienda utilizar la combinación de métodos tanto selectivos como no selectivos. Pero esta combinación de medios hace que el cultivo sea un método más costoso, laborioso y que precise mucho tiempo (95).

Además, el cultivo es el único método para determinar la susceptibilidad y resistencia a antibióticos de las especies bacterianas al trabajar con microorganismos vivos (115-117). Podemos seleccionar tres opciones a la hora de aplicar la asociación cultivo-antibiograma:

- Identificar mediante cultivo la mayoría de los gérmenes presentes y elegir un antibiótico que inhiba el mayor número de bacterias aisladas.

El objetivo es eliminar una gran parte de la flora con el antibiótico de primera elección. Implicaría el empleo de antibióticos de amplio espectro, con las

modificaciones evidentes en la flora local, y sobre todo sistémica, como la toxicidad inherente de estos fármacos, la posibilidad de creación de resistencias antibióticas, y el riesgo de recolonización bacteriana no deseada al eliminar bacterias protectoras (106).

- Identificar mediante cultivo la flora predominante y elegir un antibiótico que inhiba las bacterias aisladas y conocidas con mayor poder patogénico.

Se eligen los patógenos con una influencia contrastada en la patogenia de la enfermedad, enfrentándolos con antibióticos diferentes; el más específico para eliminar el grupo estudiado de bacterias se elige como de primera elección. De esta forma es más fácil elegir un antibiótico, siendo menos probable que la elección recaiga en alguno de amplio espectro (99;117).

- Identificar la flora en el biofilm subgingival y elegir el antibiótico apropiado.

El conocimiento de la estructura en biofilms de las bacterias subgingivales permite desarrollar nuevos modelos en la realización de antibiogramas y en el estudio de las resistencias bacterianas.

Se pueden señalar que las ventajas del cultivo frente a otros tests microbiológicos son:

- La posibilidad de obtener recuentos relativos y absolutos de las especies bacterianas cultivadas.
- Es el único método que permite estudiar bacterias no contempladas a priori como objetivo.
- Es posible realizar antibiogramas para determinar la susceptibilidad antibiótica de las diferentes especies bacterianas.

Y dentro de las desventajas se puede destacar:

- Sólo es posible cultivar bacterias viables, con lo que se depende mucho de los procedimientos de toma de muestras microbiológicas, su transporte y su manipulación.

- Existen bacterias difíciles o imposibles de cultivar por sus características, o porque se encuentran en pequeño número en la cavidad oral, al tener el cultivo un límite de detección alto.
- Es un método costoso, laborioso de realizar y que precisa mucho tiempo.

3.3 ANÁLISIS INMUNOLÓGICOS

Los métodos inmunológicos realizan una detección de las bacterias de forma indirecta. Estas pruebas se basan en el empleo de anticuerpos específicos contra los organismos a estudiar. Los anticuerpos (Ac) utilizados en los análisis inmunológicos se unen a los antígenos (Ag) bacterianos formando complejos Ag-Ac y de esta forma se detectan los microorganismos.

Entre las ventajas de estos métodos podemos destacar el que son métodos rápidos y relativamente poco costosos, al compararlos con el cultivo tradicional, además de poseer una gran sensibilidad (118;119).

La gran desventaja es que, al contrario que los cultivos, que detectan un gran espectro de patógenos bacterianos periodontales, los inmunológicos sólo van dirigidos a detectar ciertas especies bacterianas. Por ello no se puede realizar una valoración completa de la microbiota subgingival.

La otra gran desventaja es la existencia de reacciones cruzadas. Los anticuerpos que se emplean para detectar a las bacterias pueden reaccionar con otras bacterias relacionadas taxonómicamente con la buscada apareciendo falsos-positivos. Un claro ejemplo lo forman las bacterias del grupo *Haemophili* que se unen a los anticuerpos empleados al intentar detectar *A. actinomycetemcomitans* (120).

Con estos métodos no se puede realizar ningún tipo de antibiograma para evaluar la sensibilidad antibiótica de las bacterias.

Existen diferentes métodos inmunológicos empleados para el estudio de los patógenos periodontales. Podemos destacar los siguientes:

3.3.1 Microscopía de inmunofluorescencia

Se emplean anticuerpos marcados con elementos fluorescentes para unirse con el antígeno. Al producirse la reacción Ag-Ac pueden ser examinados bajo un microscopio inmunofluorescente. Para ello, las muestras de la placa subgingival se diluyen en cloruro sódico, se fijan en metanol y se incuban sucesivamente con anticuerpos monoclonales, suero anti-IgG, y fluoresceína. Mediante un microscopio y un fluorómetro se califican los tests como positivos o negativos para las bacterias estudiadas, de tal forma que se consigue un umbral de detección bacteriano de 10^4 (121;122).

Con estas técnicas se ha estudiado la asociación entre bacterias como *P. gingivalis* y *T. forsythensis* y la profundidad de bolsa (123); y se ha determinado la mayor proporción de *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *T. forsythensis* en la placa subyacente a los pónicos de prótesis fijas dentosoportadas (124).

3.3.2 Test de aglutinación al látex

Esta técnica se diseñó para su aplicación en la clínica, ya que no requiere instrumental y se puede realizar en el plazo de 30 minutos. Las muestras de placa subgingival se mezclan con partículas de látex recubiertas por anticuerpos específicos, lo cual provoca una reacción con los antígenos bacterianos, que es visible gracias a la aglutinación que se produce. Este método ha sido capaz de detectar antígenos de *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. intermedia* (125).

3.3.3 Citometría de flujo

Usa marcadores antisuero con elementos fluorescentes para reaccionar con complejos Ag-Ac que son separados en la citometría de flujo y, posteriormente valorados por un espectrofotómetro. Sin embargo, esta técnica requiere unos instrumentos muy caros y hay muy poca información sobre su capacidad para analizar la placa bacteriana (126).

3.3.4 ELISA

Son las siglas correspondientes al término en inglés *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ensayo inmunosorbente ligado a enzimas). Esta técnica se utiliza para identificar antígenos bacterianos mediante una reacción colorimétrica secundaria a su unión con anticuerpos y a otra posterior con enzimas. Las muestras obtenidas de la placa subgingival se suspenden en una solución tampón y se distribuyen en pocillos cubiertos con anticuerpos monoclonales. Posteriormente, los pocillos se lavan con un segundo anticuerpo monoclonal unido a una enzima, generalmente peroxidasa o fosfatasa alcalina. Finalmente, se añade un sustrato que reacciona con la enzima produciendo una reacción colorimétrica que se puede cuantificar (127;128).

3.3.5 Inmunoensayo a través de fluorescencia de concentración de partículas

Existen dos tipos de inmunoensayo; los que utilizan gránulos de poliestireno y los que utilizan células bacterianas. Los gránulos de poliestireno sirven de sustrato ya que están recubiertos de anticuerpos específicos de especie unidos a un marcador fluorescente y se enfrentan a la muestra de placa subgingival preparada. Con un fluorímetro se detecta la señal fluorescente y, en consecuencia, el número de bacterias presentes en la muestra. Existe otro método en que se sustituyen los gránulos de poliestireno por células bacterianas. Estas bacterias están unidas a diferentes anticuerpos monoclonales que reaccionan con los lipopolisacáridos de las bacterias a estudiar. Este método tiene un límite de detección de 10^4 (129;130).

3.3.6 Inmunoensayo de membranas

Existe un método inmunológico disponible de forma comercial, Evalusite ® (Eastman Kodak Company, Canadá), el cuál puede utilizarse en la clínica dental para detectar tres patógenos periodontales: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *P. intermedia*. Los anticuerpos frente a estas tres especies se enfrentan con la muestra del paciente. Los complejos Ag-Ac formados se detectan por la adición de un segundo anticuerpo marcado enzimáticamente, junto a un sustrato enzimático coloreado. Unos punteados indican la presencia de las tres especies diferentes, mientras que la intensidad del color de la reacción

indica el número relativo de bacterias (128). El test se puede realizar en 10 minutos y el límite de detección para las tres especies varía entre 10^4 y 10^5 (131).

3.3.7 Marcadores en sangre periférica de los patógenos periodontales

Este análisis se basa en detectar la respuesta que producen los patógenos periodontales en el organismo. Durante años se ha intentado encontrar una relación entre la actividad de las periodontitis y la respuesta a la agresión de determinados componentes en sangre periférica, fundamentalmente, anticuerpos circulantes y células de la serie blanca. Se ha detectado una respuesta elevada de anticuerpos en suero frente a *A. actinomycetemcomitans* (132;133) y *P. gingivalis* (134;135).

3.4 MÉTODOS ENZIMÁTICOS

No detectan bacterias de forma directa, sino que se determina su presencia al detectar las enzimas que producen. Las enzimas utilizadas incluyen colagenasas, peptidasas, enzimas análogas a la tripsina, proteinasas neutras y elastasas. Todas estas enzimas tienen un gran potencial destructivo de los tejidos periodontales. El gran problema de estos métodos es que estas enzimas, aunque son producidas por patógenos periodontales, no lo hacen de forma exclusiva ya que existen otras bacterias, o incluso, células humanas que también las producen. Por ejemplo, las colagenasas son producidas por una gran variedad de bacterias y de células humanas. Podrían diferenciarse entre sí mediante procedimientos como la electroforesis en gel, y separar las colagenasas bacterianas mediante reacciones colorimétricas (136). Actualmente, el uso de estos métodos enzimáticos para la determinación de patógenos periodontales tiene una utilidad clínica escasa (137).

Basándose en los análisis enzimáticos se ha desarrollado un test para su empleo específico en la consulta dental, “BANA-Test” (Perioscan®, Oral B, EEUU). Se basa en la detección de una enzima similar a la tripsina, con actividad proteolítica y capacidad para degradar un sustrato sintético conocido como BANA (N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida). Esta degradación se puede medir por un método colorimétrico mediante la reacción de la β -naftilamida con el negro de Evans. Los

diferentes tonos de azul indican la presencia bacteriana en la muestra (138-141). Esta prueba detectaría a las bacterias que son capaces de producir esta enzima y que están involucradas en la destrucción de los tejidos periodontales; las bacterias orales BANA-positivas conocidas son (142;143):

- *Treponema denticola* (y probablemente otras espiroquetas no cultivables)
- *P. gingivalis*
- *T. forsythensis*
- Ciertas cepas de *Capnocytophaga* sp. que no suelen ser patógenos periodontales

Un test positivo significaría que una combinación de estas especies que degradan BANA está presente en un nivel superior al umbral del test.

Otro test enzimático desarrollado para su uso en la clínica es el Periocheck® (Sunstar Inc Takatsuki, Japón). Se utiliza para detectar la presencia de peptidasas producidas por *T. denticola*, *P. gingivalis* y *T. forsythensis* (144), compartiendo un principio similar al test-BANA(145).

Este test enzimático colorimétrico está basado en un método denominado SK-013 (145) que medía de forma indirecta N-carbobenzosiglicil-glico-arginina-3,5-dibromo-4-hidroxianilina. Los cambios colorimétricos producidos en el Periocheck® son el resultado de dos pasos. El primero es una reacción en la que 3,5-dibromo-4-hidroxianilina (DBHA) es liberado de un sustrato sintético, N-carbobenzosiglicil-glico-arginina-DBHA, por medio de las peptidasas que se encuentra en las muestras subgingivales. En el siguiente paso, la liberación de DBHA produce una reacción química que promueve la oxidación de un cromógeno provocando una reacción colorimétrica de manera dosis dependiente. El color de la solución resultante se clasifica en positiva ($\geq 0,2$ unidades tripsina/ml) o negativa ($< 0,2$ unidades tripsina/ml) para *T. denticola*, *P. gingivalis* y *T. forsythensis*, es decir, un test positivo significaría que una combinación de estas especies está presente en un nivel superior al umbral de detección del test (146).

Se ha afirmando que el Periocheck® no era un buen método para diagnosticar las periodontitis ni para detectar y valorar los cambios sufridos tras el tratamiento (147). En cambio, se ha determinado que puede ser un método prometedor para evaluar la eficacia microbiológica del raspado y alisado radicular (148) y que puede ser un método diagnóstico útil en identificar localizaciones de riesgo de pérdida de inserción (149).

Entre las ventajas de estos tests enzimáticos figuran el ser simple de realizar y asequible económicamente. Sobre todo, por la posibilidad de realizarla en el consultorio dental con la obtención de los resultados de forma rápida.

Tiene el gran inconveniente de que no se puede hacer un diagnóstico microbiológico específico. Este tipo de prueba no es capaz de diferenciar entre las distintas especies BANA-positivas. Esto quiere decir que puede dar positivo en localizaciones sanas, si éstas albergan alguna de las especies BANA-positivas en número suficiente (138). Por otra parte, sólo detecta un número específico de patógenos periodontales y no da información acerca de la sensibilidad antibiótica de la flora residente.

Al ser las bacterias positivas al test de carácter anaerobio, se ha propuesto la administración de un antibiótico como el metronidazol, durante la fase básica del tratamiento mecánico en aquellos casos en que se asocie un diagnóstico de periodontitis y un resultado positivo para el test. Dado que existen localizaciones BANA-negativas que albergan un gran número de anaerobios, no parece razonable indicar el empleo de metronidazol ni ningún otro antibiótico basándose únicamente en los resultados de esta prueba (138;140). Tampoco se ha podido determinar longitudinalmente si el test-BANA puede identificar localizaciones con riesgo de deterioro periodontal, con lo que su capacidad para valorar la progresión de la enfermedad es muy limitado (147).

3.5 MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Con los últimos avances tecnológicos y el desarrollo de la biología molecular se ha podido aislar, analizar y utilizar el genoma de cada especie donde están registradas las características anatómicas y funcionales de las mismas. Los principios de las técnicas de biología molecular residen en el análisis del ADN, ARN o de la estructura y función

proteica. Existen diferentes técnicas que utilizan el genoma de las bacterias para poder determinar su presencia en una muestra e incluso cuantificarlas. Las técnicas que vamos a analizar son las siguientes:

3.5.1 Sondas de ácidos nucleicos

Su forma de actuación se basa en los mismos principios que los métodos inmunológicos pero, en este caso, en vez de anticuerpos, se utilizan fragmentos de ADN o ARN. Una sonda es una molécula específica y conocida de ADN o ARN de un microorganismo que ha sido sintetizada de manera artificial y marcada para su detección. Si se separa la doble hélice del ADN, y se coloca material genético marcado, dejando que se una a su complementario, se puede detectar si lo que se busca está presente o no en la muestra. El proceso sería el siguiente; la muestra de placa subgingival es sometida a la digestión enzimática del ADN bacteriano. Estos fragmentos desconocidos son expuestos a las sondas marcadas complementarias y, bajo condiciones determinadas de temperatura e ionización, se permite su hibridación en un substrato como la nitrocelulosa. El ADN puede ser detectado por radiomarcado o por una reacción colorimétrica. Los tests pueden reflejar tanto la presencia como el número aproximado de bacterias (150). Se puede utilizar una sonda formada por el genoma completo, una sonda clonada o una sonda sintética de oligonucleótidos que se unen (híbridos) con la secuencia complementaria del ácido nucleico del microorganismo que se quiere detectar (120;151). La mayoría de las sondas utilizadas son oligonucleótidos de entre 20-30 nucleótidos (152).

Las sondas son un elemento de investigación valioso, ya que son relativamente baratas y permiten detectar bacterias específicas de la placa subgingival en niveles de hasta 10^3 . Algunos laboratorios combinan sondas ADN con métodos clásicos de cultivo, y aunque existen estudios que muestran la superioridad de estas técnicas frente al cultivo clásico en cuanto a la detección de patógenos periodontales, su utilidad clínica real debe valorarse con más estudios longitudinales. Hoy en día, ambos métodos pueden ser complementarios, ya que las sondas de ADN pueden utilizarse en determinaciones amplias, pudiendo detectar especies que se encuentran en un número por debajo del límite de detección del cultivo (153).

Entre las desventajas que podemos señalar es que no existen sondas para todos los patógenos periodontales, y no se da información sobre la susceptibilidad de las bacterias frente a diferentes antibióticos, ya que, al igual que los métodos inmunológicos, se trabaja con bacterias no viables (153). Pero esta desventaja es también una ventaja, ya que el manejo de la toma de muestra y, posterior traslado a los laboratorios donde se realizan los análisis no es tan delicado (153).

Existen problemas de reacciones cruzadas, ya que secuencias homólogas de nucleótidos pueden estar presentes en microorganismos diferentes, con lo que pueden reaccionar con organismos distintos a los buscados (120).

3.5.2 Análisis de endonucleasas de restricción

Estas enzimas reconocen y rompen las cadenas de ADN en secuencias específicas de bases. Los fragmentos obtenidos se pueden separar mediante electroforesis, y posteriormente se pueden teñir y visualizar con luz ultravioleta (128). Debido a la especificidad de los fragmentos de ADN se puede determinar la distribución y transmisión de una cepa determinada, por lo que esta técnica es muy útil en investigación epidemiológica (154).

Una de sus aplicaciones es el estudio de los patrones de transmisión de patógenos entre miembros de una misma familia (155-157). Con este método se ha podido comprobar la enorme diversidad genética de ciertos patógenos periodontales. No todas las cepas bacterianas de la misma especie poseen la misma virulencia o potencial patogénico. De hecho, un número muy limitado de clones o tipos bacterianos de una especie pueden ser capaces de causar la enfermedad. Por tanto, para poder estudiar la transmisión bacteriana y evaluar los clones es necesario diferenciar las bacterias dentro de la misma especie. Para ello se han diferenciado utilizando los biotipos o serotipos, pero estos métodos pueden no ser capaces de proporcionar la suficiente discriminación. Zambon utilizó el análisis de endonucleasas de restricción, pero sólo pudo distinguir un pequeño grupo dentro de *A. actinomycetemcomitans* (158). También se ha utilizado este tipo de análisis para examinar otras bacterias orales como *Actinomyces* sp., *E. corrodens* y *Streptococcus mutans* (95). Todo esto se complica al entender la estructura y características del biofilm subgingival y el

intercambio de información existente entre las colonias bacterianas que lo componen.

3.5.3 Hibridación ADN en “tablero de ajedrez” (Checkerboard DNA-DNA hybridization technology)

Se ha desarrollado esta técnica para la detección de hasta 40 especies bacterianas, las más comúnmente encontradas en la cavidad oral. Se utiliza una sonda completa de ADN genómico marcada con digoxigenina. La unión de ambos ADN, el de la muestra y la sonda, se detecta mediante anticuerpos antidigoxigenina y se cuantifica por métodos de quimioluminiscencia, dando las muestras la apariencia de un tablero de ajedrez. Se consigue un límite de detección de 10^4 células de cada especie, pero puede ajustarse para detectar 10^3 células (152).

Entre sus ventajas está la posibilidad de realizar el procesamiento rápido de un gran número de muestras analizando 40 especies bacterianas en un solo paso, no son necesarias bacterias viables y es, particularmente aplicable para estudios epidemiológicos. Pero entre sus desventajas cabe destacar la sofisticación y coste del laboratorio para llevarlo a cabo, ya que es necesario un equipo altamente específico (152), y el hecho de ser semicuantitativo (159-161).

Al comparar esta técnica con el cultivo, se detectó una mayor prevalencia para *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* y *T. forsythensis* y un recuento bacteriano significativamente mayor en la mayoría de las especies. Además, se determinó que ambas técnicas poseen un razonable grado de concordancia (162).

3.5.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Kary Mullis desarrolló este método de detección basándose en los análisis con ácidos nucleicos (95). La PCR es una técnica de biología molecular en la que se consigue la replicación del ADN y se ha convertido en la técnica más poderosa para la amplificación de genes.

Se basa en la utilización de cebadores (“primers”) de ADN (normalmente oligonucleótidos sintéticos de 18-28 bases de longitud) para detectar segmentos de ADN. Los cebadores son seleccionados basándose en la región de ADN que se quiere amplificar. Los cebadores se añaden a la solución que contiene el ADN extraído de la muestra obtenida del paciente. Cuando la mezcla se calienta a 90-95 °C se produce la desnaturalización de la cadena de ADN, es decir, la doble hélice se separa en dos cadenas individuales. Al enfriarse a 40-60 °C, los cebadores se unen a las cadenas individuales de ADN y al irse calentando a 70-75 °C se forma la cadena complementaria de ADN. A llegar a los 90 °C se produce de nuevo la desnaturalización de ADN creado. Este proceso repetido varias veces forma numerosas copias de ADN, ya que en cada ciclo se produce un incremento exponencial de la cantidad de ADN. En 1988 se desarrolló la Taq-polimerasa, una polimerasa ADN termoestable. Esta Taq-polimerasa permite la automatización de la reacción usando los *termo-cicladores*. Gracias a la amplificación del ADN es posible detectar mucho mejor al microorganismo aunque exista en muy pequeño número (95), e incluso cuantificar la cantidad de bacterias en la muestra (163;164). En la PCR cualitativa, los segmentos de ADN amplificados con la reacción de la polimerasa se analizan mediante electroforesis en un gel de agarosa y bromuro de etidio y el patrón en bandas se compara entre diferentes cepas para detectar las bacterias.

Las ventajas de esta técnica son el ser una prueba rápida de realizar y de bajo coste. Gracias a este método de replicación, se podría detectar un único microorganismo con la mayor sensibilidad que cualquier otro método microbiológico. Igualmente el manejo de las muestras no es tan delicado como con el cultivo, ya que no se necesitan bacterias viables para poder detectarlas (165).

Entre las desventajas, está la incapacidad de realizar antibiogramas, y la de sólo poder detectar determinadas bacterias (según los cebadores seleccionados para ello), y no todas las bacterias que componen la muestra. Las dificultades aparecen cuando se pretende estudiar pequeñas cantidades de ADN, porque las cantidades de los elementos necesarios deben ser exactas. Otra limitación de la

PCR es la susceptibilidad del proceso a la contaminación sobre todo en estudios para detectar secuencias raras de ADN (152).

Para intentar solucionar las limitaciones se han desarrollado variantes de la PCR como “PCR Multiplex” que permite la amplificación de varias regiones a la vez, al incorporar los cebadores necesarios en un sólo paso (166;167). La PCR cuantitativa permite la cuantificación de todos los segmentos de ADN utilizando controles específicos de cantidad conocida (163;164;168). Esta variante tiene un potencial importante en el diagnóstico de los patógenos periodontales ya que permite el análisis de gran número de muestras de manera sencilla. La PCR cuantitativa se ha ido desarrollando cada vez más hasta la aparición de la “PCR cuantitativa en tiempo-real” que permite una mejora en su manipulación al permitir la valoración continua de la cantidad de productos que se consumen en los ciclos de PCR (152). La PCR cuantitativa ha demostrado su buena sensibilidad en la detección de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* (164).

Otra variante es la reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores arbitrariamente. Esta técnica utiliza segmentos arbitrarios de ADN en lugar de secuencias definidas. Este método se ha utilizado para marcar bacterias dentro de una misma especie con el fin de buscar el origen de una infección bacteriana (169).

La utilización de la PCR es cada vez mayor. Gracias a ella, se ha determinado que la cantidad de bacterias en la cavidad oral es de aproximadamente unas 500 especies (49). En Periodoncia se ha utilizado para detectar la infección y el patrón de transmisión de *A. actinomycetemcomitans* (165;170;171). Con este método se han estudiado los serotipos y genotipos de diferentes patógenos, por ejemplo, se ha estudiado la distribución de serotipos de *A. actinomycetemcomitans* (172-174) y la asociación de la distribución de los diferentes serotipos con la presencia de *P. gingivalis* (172); además del genotipo de *T. forsythensis* (175) y el de *P. gingivalis* (176). Su utilización se ha ampliado al estudio de virus y su relación con las periodontitis (177). Incluso se ha utilizado para detectar a *Mycobacterium tuberculosis* (178) y *Helicobacter pylori* (179) en la cavidad oral.

4. TOMA DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS

Los métodos de análisis microbiológico sólo pueden detectar las bacterias que están presentes en la muestra que tomamos del paciente. Por tanto, la información generada por el método de análisis microbiológico va a ser dependiente de la metodología de la toma de las muestras (107). La toma va a estar influenciada por los siguientes parámetros:

4.1 Procedimientos de toma de muestras

4.2 Selección de las localizaciones para la toma de muestras

4.3 Influencia del laboratorio que realiza el análisis de las muestras

4.1 PROCEDIMIENTOS DE TOMA DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS

El objetivo de la muestra es recoger la mayor cantidad de bacterias que componen la microbiota subgingival y, al mismo tiempo, y dependiendo del tipo de análisis que realicemos posteriormente, que esas bacterias sobrevivan durante todo el proceso.

Son varios los métodos que se han propuesto para tomar las muestras microbiológicas, se pueden destacar:

✓ Curetas

Fue una de las primeras técnicas utilizadas, y aún sigue vigente (180-183). La técnica es sencilla ya que con la cureta se recoge todo el contenido subgingival (placa bacteriana y cálculo) y se procesa para su análisis al microscopio de campo oscuro (184;185) y para realizar cultivos (186).

Se han descrito varias modificaciones en la técnica; por ejemplo, se ha propuesto la realización de un raspado progresivo de la bolsa, y sólo recoger el contenido más profundo de la misma para analizarla (187).

✓ Puntas de papel

Actualmente, es el método más utilizado. La colocación de puntas de papel estériles en el fondo de la bolsa periodontal tiene el potencial de recoger las

bacterias no adheridas y, no tanto las bacterias adheridas a la superficie radicular (188;189).

✓ *Diseños especiales.*

Los investigadores han creado diferentes métodos para mejorar la toma de las muestras microbiológicas. Por ejemplo, pasando las puntas de papel a través de jeringas para evitar que la muestra se contamine con la placa supragingival, y obtener sólo la porción más apical de la bolsa periodontal (190). Otro método desarrollado consistía en una cánula insertada a una jeringa con gas a través de la cual los microorganismos pasaban. Se diseñó para recoger la microbiota del fondo y de la mitad de la bolsa y proteger a las especies anaerobias de la muestra mediante un gas libre de oxígeno (19).

✓ *Técnicas de irrigación de la bolsa periodontal*

Este método se diseñó para poder estudiar, mediante el microscopio de campo oscuro, la microbiología de las localizaciones tratadas, utilizando agentes antibacterianos, como tetraciclinas o clorhexidina (191;192). Un volumen de líquido predeterminado se introduce en el surco y el líquido conteniendo los microorganismos es recogido para realizar el análisis morfológico (sólo con campo oscuro).

✓ *Procedimientos quirúrgicos*

Se pretende retraer o desplazar la pared blanda para poder acceder al fondo de la bolsa periodontal. Se ha propuesto la utilización de una sutura para desplazar la pared blanda y obtener la muestra de una localización precisa dentro de la bolsa periodontal (193). Otros autores realizaban colgajos semilunares para exponer la porción apical de las bolsas profundas antes de tomar la muestra (21;22), o incluso obtenían una muestra de tejido bajo la justificación que las bacterias que invaden el tejido pueden ser con más probabilidad los causantes de la pérdida de inserción (13).

4.1.1 COMPARACIÓN ENTRE LOS DIFERENTES PROCEDIMIENTOS DE TOMA DE MUESTRAS.

La comparación es complicada debido a que debe ser la única variable para validar la técnica. Desafortunadamente, hay muy pocos estudios publicados que cumplan este requisito (54). Por eso, la comparación entre los métodos utilizados esta basado en los siguientes puntos (54):

- a) ACCESO AL FONDO DE LA BOLSA PERIODONTAL
- b) EL TAMAÑO DE LA MUESTRA QUE SE OBTIENE
- c) LA COMPOSICIÓN DE LA MUESTRA
 - i. COMPOSICIÓN REPITIENDO EL MÉTODO
 - ii. COMPOSICIÓN CON DIFERENTE MÉTODO

a) ACCESO A UNA ZONA DETERMINADA DE LA BOLSA PERIODONTAL

La distribución de las bacterias en la bolsa periodontal no es homogénea. Las capas más externas de los biofilms y las zonas más apicales de la bolsa periodontal contienen la mayor proporción de bacterias patogénicas (194;195). Si lo que se quiere obtener son las especies en la parte apical de la bolsa, dichas bacterias deberán ser aisladas del resto de bacterias que se encuentran en otras localizaciones dentro de la misma bolsa. Las puntas de las curetas, las puntas de papel, y el pequeño diámetro de los capilares de los métodos de irrigación, parecen ser más grandes que la entrada de una bolsa periodontal. En una bolsa de 4 mm, la entrada mide unos 150 μm (196). En cambio, la punta de una cureta mide unos 800 μm y las puntas de papel unos 300 μm (54). Los métodos actuales son demasiado voluminosos y puede que ninguno llegue de forma precisa y selectiva a la zona más apical de la bolsa periodontal. Los únicos métodos que llegarían son los quirúrgicos en los que la pared blanda de la bolsa es retirada con una sutura para ganar acceso al fondo de la bolsa sin homogeneizar el contenido de la misma (193).

b) TAMAÑO DE LA MUESTRA OBTENIDA

El número de organismos que se encuentra en la bolsa puede variar dependiendo del estado de salud/enfermedad de la localización. En forma absoluta, el número de

unidades formadoras de colonia (UFC) varía desde 10^2 - 10^5 en localizaciones sanas a 10^4 - 10^9 en localizaciones con periodontitis (54).

Las curetas recogen una mayor cantidad de bacterias en la bolsa periodontal en comparación con otros métodos utilizados. Las muestras tomadas mediante curetas poseen entre 10-1000 veces más UFC que las muestras tomadas con puntas de papel. Las curetas recogían un 61-91% de la flora subgingival en comparación con el 7-41% obtenido mediante puntas de papel (109;197). En comparación con las diferentes técnicas de irrigación, las curetas recogen cerca de tres veces más bacterias (54).

La ventaja de las puntas de papel es que se consigue una mayor reproducibilidad en comparación con las curetas (198). Mediante las puntas de papel, se obtienen de 10^2 - 10^4 UFC y sólo se recoge un 7% de los microorganismos de la bolsa. En pacientes con periodontitis juvenil localizada, al analizar una sonda periodontal tras el sondaje de las localizaciones afectadas, se obtenía un 5,7% de *A. actinomycetemcomitans* (199).

La cantidad de UFC que se recoge puede influir de manera negativa en la interpretación de los datos microbiológicos obtenidos. Se crea un dilema debido a la particularidad de la no-uniformidad de las bacterias que pueblan la bolsa periodontal (194;195). Las especies patógenas pueden perderse si tomamos una muestra demasiado pequeña. Sin embargo, una muestra grande, por ejemplo todo el contenido de una bolsa de 8 mm, puede que diluya las especies patógenas a niveles bajos si éstas se encuentran en alto número sólo en una zona específica (por ejemplo, la porción apical de la bolsa).

Aunque la cureta es el método que obtiene el mayor número de bacterias (más del 90% de la placa subgingival), su uso sólo estaría indicado si se quiere estimar el total del contenido de la bolsa o para tomar muestras de localizaciones con pocos microorganismos, como localizaciones sanas para obtener la suficiente cantidad. Sin embargo, las curetas pueden no ser útiles para toma de muestras post-tratamiento cuando existe una pequeña proporción de microorganismos, y el método diagnóstico se convierte en el tratamiento al raspar la bolsa (54).

c) COMPOSICIÓN DE LA MUESTRA

Para valorar la reproducibilidad de un método, o para comparar diferentes métodos se deben tomar varias muestras de las mismas localizaciones con los diferentes métodos y comparar los resultados que se obtienen. El problema surge cuando la primera muestra tomada puede alterar la composición de la microbiota y si la segunda toma es con otro método no se puede saber si las diferencias obtenidas son resultado del método usado o de la alteración del medio provocada. Por lo tanto, seleccionar una localización y examinarla longitudinalmente con los diferentes métodos puede tener muchas dificultades. La microbiota de la localización puede ser homogénea en la primera toma pero no desarrollarse de forma similar en las siguientes tomas (54).

La valoración de la reproducibilidad se ha de realizar para un mismo método de toma de muestra y comparar con diferentes métodos para determinar el más idóneo.

i. *COMPOSICIÓN DE LA MUESTRA USANDO EL MISMO MÉTODO.*

La reproducibilidad de las puntas de papel fue determinada por Christersson (199) quien no detectó diferencias en los recuentos de *A. actinomycetemcomitans* al comparar dos muestras tomadas con una diferencia de 30 minutos. Estas investigaciones sugieren que las muestras individuales de la bolsa periodontal son reproducibles. No pasaba lo mismo con otros métodos de toma de muestra que demostraron, como las curetas, que alteraban la flora de la bolsa, observado con microscopio de campo oscuro (200).

ii. *COMPOSICIÓN DE LA MUESTRA USANDO DIFERENTES MÉTODOS.*

Las estrategias de toma de muestras utilizan diferentes principios físicos. Por eso, es más fácil explicar las diferencias cualitativas en los microorganismos detectados por los diferentes métodos. En la toma de muestras, comparando puntas de papel y curetas, encontraron un mayor porcentaje de *Bacteroides* sp. en puntas de papel que en las muestras con curetas (197). Al contrario, Moore y col. no encontraron diferencias en las muestras tomadas con puntas de papel y curetas (186).

4.2 SELECCIÓN DE LA LOCALIZACIÓN PARA LA TOMA DE MUESTRAS.

Quizás el mayor problema al que deba enfrentarse el método de toma de muestra es su capacidad para obtener una muestra representativa de la flora subgingival. Nos centraremos en las puntas de papel que es el procedimiento más utilizado. Los parámetros que deberemos valorar son los siguientes:

- A. NICHOS DÓNDE SE REALIZA LA TOMA DE MUESTRA
- B. SELECCIÓN Y NÚMERO DE LOCALIZACIONES
- C. VARIACIONES DE ESTRATEGIA SEGÚN LAS BACTERIAS
- D. NÚMERO DE PUNTAS DE PAPEL EN CADA LOCALIZACIÓN
- E. TAMAÑO DE LAS PUNTAS DE PAPEL Y TIEMPO DE LA TOMA

A. NICHOS DONDE SE REALIZA LA TOMA DE MUESTRA

Para identificar la presencia de patógenos periodontales en la boca, lógicamente se realiza la toma de muestras de las bolsas periodontales. Actualmente, es el método más difundido para determinar la flora subgingival (96;134;181). Sin embargo, se ha comparado la capacidad de otros nichos orales para poder determinar la presencia de patógenos periodontales, ya que la presencia de los mismos ha sido suficientemente comprobada en dichos nichos (201-204). Se ha señalado que el análisis de muestras salivales mediante PCR puede ser superior a las muestras subgingivales para detectar determinadas bacterias como *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* y *T. denticola*. En cambio, aunque se obtenían resultados razonables para *A. actinomycetemcomitans* y *T. forsythensis*, éstos pueden necesitar la combinación de muestras salivales y subgingivales (205). Puede que si se quiere controlar la infección en la cavidad oral en conjunto, sea necesario realizar muestras de otros nichos orales, y no sólo del nicho subgingival, aunque Danser y col. comprobaron la preponderancia del nicho subgingival y su relación como nicho primario sobre el resto, concediéndole la mayor influencia (203).

B. SELECCIÓN Y NÚMERO DE LOCALIZACIONES

Clínicamente, la pérdida de inserción no se produce de manera homogénea en la boca de un mismo paciente. Esta característica puede ser explicada, entre otras razones, por un patrón determinado de distribución de los patógenos periodontales.

Se ha estudiado la distribución de *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *A. actinomycetemcomitans* en las localizaciones subgingivales, determinándose una estrategia concreta de toma de muestras según la probabilidad de detectarlas. Aquellas localizaciones con la mayor profundidad de sondaje y sangrado son en las que con más probabilidad encontraremos *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* (206-209). En localizaciones con sangrado, la probabilidad de encontrar *P. gingivalis* es 4,3 mayor que en localizaciones que no sangran (206;207). Estas diferencias en la composición de la microflora subgingival han sido atribuidas, en parte, a factores locales, como el potencial de oxidación-reducción (210), anaerobiosis (211) y la existencia de nutrientes provenientes de productos sanguíneos como los factores de crecimiento (212).

Una vez determinada la distribución, entendida como la mayor probabilidad de detectar ciertas bacterias, se procedió a diseñar un protocolo encaminado a determinar en qué localizaciones se tendrían que tomar las muestras microbiológicas con puntas de papel. El protocolo señalado es la selección de la localización con más profundidad de sondaje y sangrado al mismo (localización más enferma) en cada cuadrante y analizadas de forma agrupada (207;208). Este protocolo es el más aceptado actualmente, aunque únicamente se evaluó en la detección de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*.

C. VARIACIONES DE ESTRATEGIA SEGÚN LAS BACTERIAS

Se han realizado diferentes estudios que han sugerido que diferentes especies de patógenos periodontales pueden necesitar diferentes estrategias de toma de muestras. Para determinar con un 95% de confianza que un paciente no está infectado con *A. actinomycetemcomitans*, debemos tener más de 25 muestras subgingivales negativas. Para realizar lo mismo con *P. gingivalis* y *T.*

forsythensis, deben ser negativas 6 o más localizaciones al azar, o más de tres localizaciones con una profundidad de bolsa mayor de 5 mm. Para *P. intermedia*, se ha determinado en 4 o más localizaciones negativas, con un sondaje mayor de 5 mm. Estos valores están basados en unas prevalencias pre-establecidas que son del 11% para *A. actinomycetemcomitans*, 44% para *P. gingivalis*, 48% para *T. forsythensis* y un 54% para *P. intermedia* en una población adulta con periodontitis crónica. Pero no se ha determinado ni la prevalencia de estos patógenos, ni el número de muestras necesarias en otros pacientes afectados de otros tipos de periodontitis como las agresivas (213;214). La pregunta que se puede plantear es si la misma estrategia tiene la capacidad para detectar todos los patógenos periodontales de la misma forma.

D. NÚMERO DE PUNTAS DE PAPEL EN CADA LOCALIZACIÓN

El número de puntas de papel que se deben tomar por cada localización es una cuestión que no se ha determinado de forma tajante en la literatura. El protocolo más extendido es la utilización de dos puntas de papel, colocadas consecutivamente, y durante 10 segundos (206;215). Existen estudios donde se varía el número de puntas y la forma de tomarlas, se puede hacer introduciéndolas en la bolsa periodontal de forma consecutiva o a la vez (206;216-218). La probabilidad de detectar una bacteria aumenta cuando tomamos un tamaño muestral mayor, de ahí que se pretenda aumentar el número de puntas de papel. Estas afirmaciones se basan en la utilización de cultivos, pero para otras formas de análisis microbiológico más sensibles podría no ser necesario aumentar el número de ellas.

E. TAMAÑO DE LAS PUNTAS DE PAPEL Y EL TIEMPO DE LA TOMA

Se ha comprobado como los resultados microbiológicos pueden variar al utilizar diferentes diámetros en las puntas de papel. Las puntas de papel de tamaño 45 son las óptimas para realizar la muestra (188). Con respecto, al tiempo de la toma de la muestra, entre 10 y 60 segundos es el tiempo recomendado, no existiendo diferencias significativas al comparar diferentes tiempos entre este intervalo. Sí existían diferencias significativas en las muestras obtenidas dependiendo del fabricante de las puntas de papel (188). En muy pocos estudios

se comenta el fabricante de las puntas, el tamaño de las mismas y, a veces ni se menciona el tiempo de la toma de la muestra.

4.3 INFLUENCIA DEL LABORATORIO QUE REALIZA EL ANÁLISIS SOBRE LOS RESULTADOS

Los resultados del análisis son dependientes de la técnica de toma de muestras y su posterior manipulación. Por tanto, los laboratorios pueden influir en los resultados microbiológicos obtenidos.

Los resultados obtenidos de los estudios que analizan este hecho son bastante llamativos. Una muestra microbiológica, tomada en la misma localización con dos puntas de papel a la vez, y enviadas cada una a un laboratorio distinto puede dar resultados diferentes (217). Los resultados muestran que la coincidencia o no entre los laboratorios variaba según la bacteria cultivada, aunque en ningún caso los dos laboratorios coincidieron en identificar las mismas especies bacterianas. La bacteria con la mayor coincidencia de detección fue *P. gingivalis*. Ante estos resultados está claro que la metodología de análisis utilizada en los laboratorios puede tener diferente capacidad para detectar las bacterias. Los antibiogramas realizados con las muestras tomadas también variaban de forma llamativa (217).

También se ha comparado los hallazgos de dos muestras de la misma localización y analizadas por el mismo laboratorio, siguiendo un protocolo estándar; recogiendo dos pares de muestras en cada localización y colocándose en dos viales diferentes. Sólo en 2 de los 20 pacientes del estudio coincidió la presencia de las especies bacterianas en la pareja de muestras, en el resto los resultados eran diferentes a pesar de pertenecer a la misma localización. Sin embargo, estos casos en que coincidía la presencia de bacterias no lo hacían ni en los mismos niveles, ni tampoco en la sensibilidad antibiótica (216).

La dificultad del procedimiento de cultivo de las bacterias puede ser el responsable de las diferencias encontradas. Se hace imprescindible protocolos exhaustivos de cultivo en cada bacteria para conseguir resultados aceptables en la mayoría de los laboratorios. No existen datos con otros medios de análisis microbiológicos más sensibles y menos laboriosos en su ejecución.

5. UTILIDAD DIAGNÓSTICA DE LOS DISTINTOS TESTS MICROBIOLÓGICOS PARA EL ANÁLISIS DE LA MICROFLORA SUBGINGIVAL

El proceso diagnóstico no es un método perfecto que siempre relaciona el resultado de la prueba con la situación clínica real. La variedad que existe de métodos de detección de microorganismos nos obliga a comparar y evaluar cada uno para poder seleccionar el que aporte mayores beneficios.

Para su evaluación, los métodos diagnósticos han de ser comparados con un método de referencia (“gold standard”). Este método nos informa de la “verdad”, es decir, cuando la enfermedad está presente el test diagnóstico será positivo. En multitud de casos, el método de referencia más apropiado puede ser un procedimiento demasiado invasivo o demasiado costoso. Por eso, por consenso internacional, se puede utilizar un método de referencia imperfecto, siendo el mejor disponible. Esto sucede con los métodos de diagnóstico microbiológico, ya que el cultivo no es la técnica perfecta, pero al ser la más utilizada y durante más tiempo se ha convertido en el método de referencia (47;48;106;219).

El cultivo bacteriano posee varios problemas cuando es utilizado como referencia. El mayor problema es que existen bacterias en la bolsa periodontal que no pueden ser cultivadas (95) o que no sobreviven a la toma de la muestra o a su procesado. Esta incapacidad de poder cultivar todas las bacterias de las muestras puede favorecer la aparición de falsos-negativos (95). Además, la comparación de los métodos encargados de la detección de bacterias orales, tiene ciertas dificultades inherentes. Cada método mide variables totalmente diferentes: mientras el cultivo cuenta bacterias viables, otros métodos miden reacciones Ag-Ac, o incluso ADN. Este hecho conlleva imprecisiones en las comparaciones entre los diferentes métodos.

El principal requisito a cumplir por el test microbiológico ideal sería que fuera capaz de detectar todas las bacterias presentes en la muestra tomada, aún cuando se encuentren en un número pequeño, por lo tanto, deberá tener un límite de detección bajo. Este requisito conlleva implícitamente que debe acompañarse de una estrategia de toma muestra también ideal, es decir, capaz de recoger una muestra representativa de la microflora subgingival, aún cuando la especie bacteriana se encuentre en bajo número.

Además, debe ser capaz de cuantificar las bacterias presentes en la boca, estableciendo el recuento total de cada bacteria; este dato podría establecer diferentes niveles de patógenos que podrían determinar el padecimiento o no de algún tipo de periodontitis. Todo ello conllevará que debe ser un test con una sensibilidad y una especificidad cercana al 100%. Debe ser un test no invasivo, fácil de realizar y poco costoso. Si el test ideal necesitara bacterias viables para detectarlas conllevaría un gran coste económico, de medios y su eficacia dependería de las manipulaciones de la muestra. Probablemente lo más recomendable sería que pudiera detectar bacterias no viables para que las manipulaciones fueran lo más sencillas posible. Este requisito se podría cumplir utilizando las técnicas de biología molecular, pero para ello deberán ser caracterizadas todas las bacterias presentes en la cavidad oral y conocer su material genético.

La utilidad de las pruebas diagnósticas se valora en términos de su sensibilidad, especificidad y valor predictivo (110;220):

- La especificidad se refiere a la capacidad de una prueba u observación para diferenciar con claridad un padecimiento de otro. Se define como el porcentaje o la proporción de sujetos (localizaciones) con enfermedad realmente ausente que tienen una prueba negativa. Traducido al diagnóstico microbiológico, es el porcentaje de muestras negativas por el cultivo (método de referencia) que también lo son en el método de detección que se compara. El término falsos-positivos reflejará muestras negativas en cultivo pero positivas en el nuevo método.
- La sensibilidad denota la capacidad de una prueba u observación para identificar la enfermedad siempre que está presente. Se define como el porcentaje o la proporción de individuos (localizaciones) con enfermedad realmente presente que cuentan con una prueba positiva. Con terminología microbiológica nos describe el porcentaje de muestras positivas por el cultivo que son positivas también con el método de detección que se compara. El término falsos-negativos reflejará muestras positivas mediante el cultivo pero negativas con el método que se compara.

La sensibilidad y especificidad de una prueba deben ser tomadas en consideración cuando tenemos que elegir la prueba diagnóstica. Una vez realizada ésta, el clínico tiene que tomar una decisión de tratamiento. Para tal fin, el valor predictivo de una prueba posee interés especial. El valor predictivo se refiere a la probabilidad de que el resultado de una prueba (es decir, la proporción de resultados positivos verdaderos y resultados negativos verdaderos combinados) concuerden con el estado patológico. Hay dos tipos (110;220):

- El valor predictivo positivo determina la probabilidad de enfermedad de un sujeto o localización con resultados positivos en la prueba.
- El valor predictivo negativo determina la probabilidad de una situación clínica saludable en presencia de resultados negativos de la prueba diagnóstica. Es decir, la probabilidad de no padecer la enfermedad en sujetos con un resultado negativo en el test microbiológico.

El gran problema de los valores predictivos es su dependencia de la prevalencia de la enfermedad. Si la prevalencia de una enfermedad es muy baja, aún teniendo una alta sensibilidad el método diagnóstico, el valor predictivo positivo será pequeño, lo que significaría que aún teniendo el método diagnóstico positivo tendrá una probabilidad baja de padecer la enfermedad (110).

La representación y el cálculo matemático de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos se realiza mediante la confección de tablas de contingencia (**Tabla 2, pág. 149**).

Cada método diagnóstico de análisis microbiológico tiene que venir definido claramente por varios parámetros, entre ellos, el límite de detección, la sensibilidad y la especificidad.

Límite de detección

Se define como el nivel mínimo de bacterias necesario para detectar el microorganismo de interés. Cuanto más bajo sea el límite de detección de un método diagnóstico, más

probabilidad se tendrá de detectar la bacteria subgingival aún cuando se encuentre en un pequeño número. El límite de detección es diferente dependiendo del test que se considere, en cultivos varía dependiendo del tipo de medio que se utilice: en medios no selectivos el límite es 10^4 - 10^5 mientras que en los selectivos es de 10^3 (95). El menor límite de detección lo posee la PCR tiempo-real, pudiendo llegar a ser de 10 (164;168) (**Tabla 3, pág. 150**).

Sensibilidad y Especificidad (**Tabla 4, pág. 151**).

La sensibilidad varía para cada microorganismo en cada método de detección analizado. Los métodos inmunológicos poseen una sensibilidad para la detección de *A. actinomycetemcomitans* al compararlos con el cultivo que oscila entre un 20% obtenido con Evalusite® (131;221) a un 100% obtenido mediante la inmunofluorescencia indirecta y el inmunoanálisis fluorescente de concentrado bacteriano (121;129). Para *P. gingivalis*, la sensibilidad oscila entre un 52% (131;221) y un 100% (129). En cuanto a la especificidad, para *A. actinomycetemcomitans* oscilaba entre un 68% (129) a un 98% (131;221) y para *P. gingivalis* entre un 57% (129) a un 98% (131;221). Gracias al uso de anticuerpos monoclonales se consigue esta alta especificidad. No solo se han comparado los métodos inmunológicos con el cultivo, también se ha comparado la utilidad diagnóstica de la inmunofluorescencia indirecta con las sondas de ADN para la detección de *P. gingivalis* y *T. forsythensis*, mostrando una mayor sensibilidad que las sondas de ADN (222). Los métodos enzimáticos (BANA-test) se han comparado con cultivo, con inmunofluorescencia indirecta, ELISA y sondas de ADN mostrando resultados similares de sensibilidad (143).

Las sondas completas de ADN han mostrado diferentes resultados en los estudios realizados in vitro e in vivo. Se ha señalado, in vitro, que este tipo de sondas posee una sensibilidad y una especificidad de un 96% y un 86%, respectivamente, para *A. actinomycetemcomitans*, y un 60% y 82%, respectivamente, para *P. gingivalis* (223). Sin embargo, cuando se han analizado en pacientes, la sensibilidad y especificidad se han reducido de forma significativa, bajando la sensibilidad y la especificidad a un 21% y un 83% respectivamente, para *A. actinomycetemcomitans* y un 71% y 53% respectivamente para *P. gingivalis* (224). Este descenso puede ser debido a las reacciones cruzadas con otras especies desconocidas. Han obtenido mejores resultados

las sondas de ADN que utilizan oligonucleótidos con una sensibilidad del 100% para *A. actinomycetemcomitans* y *P. intermedia* y un 91% para *P. gingivalis* (153).

La PCR cualitativa comparada con el cultivo ha demostrado una mayor precisión en la identificación y la frecuencia de detección para *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* (225). La PCR cualitativa utiliza diferentes cebadores como el gen 16 ARNr, gen fimbrias y gen colagenasa prtC. Los datos obtenidos en cuanto a la sensibilidad y especificidad en diferentes poblaciones afectadas de periodontitis son heterogéneos. La sensibilidad y especificidad para *A. actinomycetemcomitans* varía de un 45-96% y un 73-89%, respectivamente, y para *P. gingivalis* en 94-100% y un 38-85%, respectivamente (171;225-227). El desarrollo de la PCR cuantitativa, con la aparición de la PCR a tiempo real ha demostrado un alto grado de sensibilidad, especificidad y es un método muy reproducible (228). La sensibilidad y especificidad con este método es para *A. actinomycetemcomitans* de 75 y 93% respectivamente, para *P. gingivalis* de un 71% y un 85% respectivamente, y para *T. forsythensis* de un 100% y un 12% respectivamente (114).

6. USO DE LOS TESTS MICROBIOLÓGICOS EN PERIODONTITIS

La naturaleza infecciosa de las periodontitis puede hacer útil el empleo del diagnóstico microbiológico tanto en la fase diagnóstica como en la evaluación de la respuesta a las diferentes modalidades de tratamiento periodontal para conocer su potencial anti-infeccioso.

APLICACIÓN DE TESTS MICROBIOLÓGICOS DURANTE EL DIAGNÓSTICO DE LAS PERIODONTITIS

Los tests microbiológicos no son necesarios para detectar o diagnosticar las periodontitis. Para ello contamos con datos clínicos, como la profundidad de sondaje, el nivel de inserción o el sangrado, y los datos radiográficos. Sin embargo, ninguno de los datos clínicos y radiográficos nos informan sobre la etiología de las periodontitis (229). Para que los tests microbiológicos tengan valor, han de aportar datos relevantes en el diagnóstico y/o en el diseño del plan de tratamiento, esto quiere decir que debe proporcionar una mejoría clínica superior y/o un claro beneficio al paciente.

El análisis del patrón microbiológico de un paciente con periodontitis en la fase diagnóstica se basa en la diversidad de patógenos periodontales que pueden estar causando la infección. No sólo se hace necesario determinar la cantidad de carga bacteriana sino también determinar qué bacterias son las causantes de la infección. Los primeros estudios que asociaron bacterias específicas a las periodontitis se centraron en *A. actinomycetemcomitans* (51;52). Más tarde, se añadieron *P. gingivalis* y *T. forsythensis* (11). Hoy en día hay más bacterias que, con más o menos justificación en base a estudios publicados, cumplen los criterios para considerarlos agentes etiológicos de la periodontitis como *F. nucleatum*, *C. rectus*, *M. micros*, *P. intermedia*, *E. corrodens*, *Eubacterium* sp., *Seimonas* sp. y *espiroquetas* (34;53).

La utilidad de los tests microbiológicos para el diagnóstico de las diferentes periodontitis es controvertida. Se han demostrado las limitaciones que existen para diferenciar periodontitis crónicas y agresivas en base a la presencia de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, gracias a una revisión sistemática de los

estudios publicados (230). Aunque el diagnóstico de las periodontitis agresivas pueda ser menos probable en pacientes en los que no se detecte *A. actinomycetemcomitans*, la sensibilidad y especificidad para un diagnóstico positivo de este tipo de periodontitis en presencia de esta bacteria es bajo y heterogéneo, y por tanto, la mera presencia o ausencia de este patógeno no es capaz de discriminar entre periodontitis agresivas y crónicas (152).

APLICACIÓN DE TESTS MICROBIOLÓGICOS EN EL DISEÑO DEL TRATAMIENTO PERIODONTAL

La utilidad de los tests microbiológicos en el diseño del plan de tratamiento periodontal se ha valorado en un número limitado de estudios, principalmente en pacientes con periodontitis agresivas o que no responden al tratamiento periodontal (231-235). Fundamentalmente, se utilizan como guía en la selección de antibióticos específicos frente a los patógenos detectados. Únicamente se ha realizado un estudio controlado, donde se comparan dos grupos de pacientes; a uno se les aplica el tratamiento mecánico junto con un antibiótico sistémico específico, según los resultados microbiológicos obtenidos, frente al grupo control donde sólo se realiza el tratamiento mecánico. Los resultados demuestran que el uso de los tests microbiológicos provoca un aumento en el uso de antibióticos sistémicos y se realizan menos cirugías periodontales (232). En el resto de estudios se desvirtúan los resultados que en algunos casos presentados son espectaculares (152), al carecer de controles.

APLICACIÓN DE TESTS MICROBIOLÓGICOS DURANTE LA FASE DE MANTENIMIENTO

Se ha sugerido la utilidad de los tests microbiológicos como indicadores de salud o progresión de las periodontitis en varios estudios longitudinales, donde la detección o no de los patógenos periodontales puede estar asociado de forma significativa con una respuesta clínica diferente (82;236-243). En la mayoría de los estudios, la ausencia de estos patógenos fue el mejor indicador de salud periodontal, y su presencia se asocia al riesgo de periodontitis (236;241).

Se ha señalado no sólo la presencia de los patógenos, sino también el nivel crítico como indicador de riesgo de recurrencia. Se ha observado un aumento significativo del riesgo de pérdida de inserción cuando *A. actinomycetemcomitans* está presente en niveles de 10^4 y *P. gingivalis* en niveles de 10^5 (238;239). También se ha demostrado que la presencia de *T. forsythensis* está asociado con progresión de periodontitis y con pérdida de hueso (243), y que los pacientes con persistencia de *T. forsythensis* tenían 5,3 veces más probabilidades de perder inserción (82). Aunque los datos de estos estudios son positivos, la ausencia de ensayos clínicos con controles adecuados pueden no mostrar el valor real de los tests microbiológicos.

APLICACIÓN DE TESTS MICROBIOLÓGICOS EN LA EVALUACIÓN DE LA EFICACIA MICROBIOLÓGICA DE LAS DIFERENTES MODALIDADES DE TRATAMIENTO PERIODONTAL

El tratamiento periodontal puede ser diferente para tratar las distintas formas de periodontitis causadas por los patógenos, aunque las características clínicas sean similares en todas las periodontitis (134). Conocer el agente etiológico conlleva la selección del tratamiento más adecuado para su erradicación. Por lo tanto, se ha de conocer el potencial anti-infeccioso de cada modalidad de tratamiento para los distintos patógenos periodontales y poder seleccionar, antes de comenzar, el tratamiento idóneo para cada caso (229;244;245). Existe un número de pacientes que no responden al tratamiento periodontal convencional. En estos casos se habla de periodontitis refractarias, y han sido relacionadas con patógenos periodontales concretos (246-248). El término periodontitis refractaria no se reconoce en la clasificación de 1999 (78) (**Tabla 1, pág. 146**); se consideran periodontitis no bien tratadas. El conocimiento de la eficacia microbiológica de las diferentes modalidades de tratamiento periodontal han de conocerse previamente, para poder ser aplicadas según el caso concreto.

7. EFICACIA CLÍNICA Y MICROBIOLÓGICA DEL TRATAMIENTO PERIODONTAL NO-QUIRÚRGICO

El éxito del tratamiento periodontal, traducido en una mejoría de los parámetros clínicos, va a depender de la consecución de los siguientes objetivos microbiológicos:

- Disgregar el biofilm subgingival.
- Eliminar / reducir las bacterias que componen el biofilm subgingival.
- Evitar la recolonización de patógenos periodontales y la formación de un nuevo biofilm subgingival.
- Permitir la colonización de bacterias compatibles con salud.

El concepto de la placa dental como un biofilm subgingival se ha revisado recientemente (194). Teniendo en cuenta estos conceptos, el tratamiento periodontal no sólo tiene que ir encaminado a la eliminación de patógenos periodontales específicos, sino que debe ampliarse a la disgregación del biofilm para tener acceso a dichos patógenos ya que el biofilm les sirve de protección contra las defensas del hospedador y los agentes antimicrobianos. Una vez que el biofilm se ha desestructurado podemos esperar eliminar los patógenos y favorecer la aparición de especies compatibles con salud.

Para cumplir estos objetivos contamos con diferentes modalidades de tratamiento periodontal, fundamentalmente tratamientos mecánicos asociados o no con antimicrobianos locales o sistémicos. Revisaremos el tratamiento mecánico no-quirúrgico, que incluye el control de placa y el raspado y alisado radicular siendo el primer paso recomendado y una fase indispensable del tratamiento periodontal (249).

CONTROL DE LA PLACA SUPRAGINGIVAL POR EL PACIENTE

El cepillado es el medio de higiene oral más utilizado. Independientemente del diseño del cepillo, la función del cepillado es sencilla ya que disgrega la placa por la acción mecánica de las cerdas y la elimina de la superficie (250). El desarrollo de la flora subgingival depende de la presencia de la placa supragingival. Pero una vez establecido el biofilm subgingival, varios estudios han mostrado que el control de la placa supragingival no afecta significativamente a la flora subgingival en bolsas profundas

(82;251;252). El efecto microbiológico del control de placa supragingival es la reducción en los recuentos totales de bacterias (89). El cepillado puede reducir los patógenos periodontales como *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythensis*, *P. gingivalis*, *E. corrodens* y *T. denticola* en la placa supragingival pero no lo hace en la subgingival (79).

El cepillado adquiere una función importante en evitar la recolonización de las bacterias subgingivales, ya que la placa supragingival es el responsable de la recolonización tras el tratamiento (253). Tras el tratamiento y sin medios de higiene oral las bacterias subgingivales tardan 42 días en volver a los valores pretratamiento (254). En un estudio similar, se determina que tras el tratamiento de raspado y alisado radicular en una sola sesión, a los siete días la composición de los sitios tratados era similar a los sitios periodontalmente sanos, pero a los 60 días no hay variaciones en la composición microbiana antes y después del tratamiento (255).

Con los datos expuestos parece claro que el control de placa supragingival, tras el tratamiento mecánico subgingival, es esencial para evitar la recolonización de los patógenos periodontales (253).

PROFILAXIS SUPRAGINGIVAL POR PARTE DEL PROFESIONAL

La mayoría de los estudios que han valorado los efectos de la profilaxis supragingival en bolsas mayores de 3mm no han encontrado ningún efecto sobre la microbiota subgingival (81;82;256). Sin embargo, existen estudios que concluyen que la profilaxis supragingival tiene efectos sobre la microbiota subgingival, ya que se produce un descenso del recuento total de bacterias, un aumento de bacilos y cocos Gram-positivos y un descenso de patógenos periodontales como *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythensis*, *P. gingivalis* y *T. denticola*.

RASPADO Y ALISADO RADICULAR

El biofilm subgingival puede evadir los mecanismos de defensa del hospedador además de disminuir el efecto de los agentes antimicrobianos; pudiendo ser necesario hasta una concentración de antibióticos 500 veces mayor para poder eliminar los patógenos que forman parte del biofilm (253). El biofilm subgingival no puede ser eliminado por los

métodos de higiene oral. Por este motivo es necesario el raspado y alisado radicular, que es el tratamiento mecánico que se emplea para la disgregación del biofilm subgingival en pacientes con periodontitis. Este tratamiento es utilizado no sólo para tratar las periodontitis, sino también para mantener el periodonto sano tras el tratamiento y evitar la recurrencia de la enfermedad.

Los efectos clínicos del raspado y alisado radicular están bien documentados con numerosos estudios (249;257-264); provocan la reducción de la profundidad de sondaje y ganancia de inserción clínica (265;266), que va a depender de la profundidad de sondaje inicial (249):

- Para bolsas iniciales de 1-3 mm, la reducción media en la profundidad de sondaje se ha calculado en 0,03 mm y una pérdida de inserción de 0,34 mm.
- En bolsas iniciales de 4-6 mm, la reducción en el sondaje es de 1,29 mm con una ganancia de inserción de 0,55 mm.
- Para bolsas iniciales de ≥ 7 mm, se reduce la profundidad de sondaje en 2,16 mm y ocurre una ganancia de inserción de 1,19 mm.

El raspado y alisado radicular disgrega el biofilm subgingival, pero los datos acerca de su capacidad para eliminar patógenos son contradictorios. A pesar de la gran variedad de diseños de investigaciones, la mayoría han concluido que el recuento total de bacterias se reduce aproximadamente un 99% tras el tratamiento mecánico (248;260-262;267-269). Los primeros estudios, realizados con microscopio de campo oscuro o contraste de fase señalaron que tras el tratamiento mecánico se producía un descenso en la proporción de espiroquetas y bacilos móviles, mientras aumentaban los cocos y los bacilos no-móviles (200;263). En general, la instrumentación radicular provoca una disminución de las bacterias Gram-negativas mientras favorece el establecimiento de una población de bacterias Gram-positivas que están asociadas con salud gingival (200;255;269;270). Con los métodos microbiológicos que utilizan la biología molecular, se ha demostrado el descenso significativo del recuento de *P. gingivalis*, *T. forsythensis* y *T. denticola* tras el tratamiento (260;261;271). Otros estudios utilizando cultivos, también han observado un descenso de las especies denominadas *Bacteroides* “negropigmentados” (259) y de especies específicas como *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* (267). Sin embargo, otros estudios con cultivos, no han

observado grandes cambios en la composición de la microbiota subgingival, particularmente para especies bacterianas como *A. actinomycetemcomitans* (209;272;273), *P. gingivalis*, *P. intermedia/nigrescens* (273;274), *C. rectus* y *F. nucleatum* (274). La incapacidad para erradicar con la instrumentación radicular ciertos patógenos se ha explicado por su capacidad para invadir los tejidos blandos (244;248;275;276), y duros como los túbulos dentinarios (277), por poseer niveles pretratamientos altos o profundidades de sondaje iniciales elevadas (208;209). La colonización de otros nichos orales como lengua, amígdalas y mucosas pueden servir de fuente de recolonización de las zonas tratadas (201-203).

Si nos centramos en los tres patógenos periodontales, podemos señalar que, con respecto a *A. actinomycetemcomitans* existe controversia en la literatura, por un lado existen estudios que demuestran su erradicación tras el tratamiento mecánico (231;267) mientras que otros estudios señalan su incapacidad para erradicarlo (244;248;268). La discrepancia entre los estudios puede depender de los niveles pretratamiento de las localizaciones infectadas (253). Se ha comprobado como el raspado y alisado radicular es capaz de afectar de forma significativa los recuentos de *P. gingivalis* (268;271;278). Se ha señalado un porcentaje de reducción que varía entre un 70% (268), 68% (278) y 66% (279), según los estudios. Existen menos datos sobre el efecto del raspado y alisado radicular sobre *T. forsythensis*. Todos los estudios demuestran la dificultad de eliminar este patógeno, aunque se constata reducciones tras el tratamiento de 43% a 27% (271), de un 77,9% a 35,6% (279) y de un 57,6% a un 36,6% (280). Nuevas modalidades de tratamiento periodontal, como la desinfección en boca completa ha obtenido resultados prometedores en cuanto a la erradicación de *P. gingivalis* y *T. forsythensis* (281-283).

Gracias al raspado y alisado radicular vamos a poder tratar con éxito la mayoría de las periodontitis, pero un pequeño número de pacientes no responden al tratamiento, ocasionando una pérdida de inserción continuada. De hecho, se ha observado que tras el raspado y alisado radicular, el 68% de los pacientes responde bien al tratamiento, mientras que el 32% de pacientes mostraban muy poco beneficio y la pérdida de inserción continuaba progresando (260;271); sabemos que cuando la profundidad de sondaje es superior a 5 mm la eficacia del tratamiento disminuye (249), pero puede que no estemos aplicando el tratamiento correcto. En la clasificación de 1989 de la

Academia Americana de Periodoncia se define la periodontitis refractaria como aquella periodontitis generalizada que continúa, a pesar del tratamiento adecuado. En la última clasificación de 1999, desaparece el término periodontitis refractaria, se considera que esta periodontitis es consecuencia del no-establecimiento del tratamiento adecuado frente a los patógenos causantes de la misma (78).

Tras la eliminación del biofilm subgingival, se produce una recolonización, predominantemente por bacterias no patógenas, que pueden inhibir el establecimiento de los patógenos periodontales. Para evitar la recolonización de los patógenos periodontales es esencial repetir la instrumentación para eliminar el biofilm que se va formando; en este hecho radica la importancia de la fase de mantenimiento.

INSTRUMENTACIÓN RADICULAR MEDIANTE APARATOS SÓNICOS Y ULTRASONICOS

Gracias a los avances tecnológicos, se ha producido un gran desarrollo de los aparatos de ultrasonidos encaminados a intentar superar las limitaciones de la instrumentación radicular manual con curetas.

Estudios comparando la instrumentación ultrasónica y el tratamiento realizado con curetas han demostrado la no-existencia de diferencias significativas en cuanto a los beneficios clínicos y microbiológicos obtenidos (257;258;284;285). El meta-análisis realizado llega a la misma conclusión (286).

Las localizaciones asociadas a furcas responden de una forma menos favorable al tratamiento periodontal no-quirúrgico que otras localizaciones con una profundidad de sondaje similar. Esta pobre respuesta se debe a razones anatómicas que pueden impedir una correcta instrumentación de la superficie radicular. Se ha sugerido que la instrumentación radicular mediante ultrasonidos puede acceder mejor a la superficie favoreciendo la disgregación del biofilm subgingival (287). Se ha señalado que la instrumentación de las furcas con ultrasonidos es capaz de reducir la cantidad de espiroquetas y bacilos móviles (288). En su capacidad para llegar al fondo de la bolsa periodontal, los resultados de estas nuevas puntas han sido contradictorios, por un lado se duda de la eficacia de su capacidad para conseguirlo (289), mientras que también se afirma todo lo contrario (290).

Sí parece ser significativo el menor tiempo empleado en el tratamiento mediante ultrasonidos que con curetas. De hecho se afirma, que ante procedimientos con semejantes resultados clínicos y microbiológicos, se debiera elegir el que se realiza en el menor tiempo (286)

La aparición de las nuevas puntas de ultrasonidos con diámetros cada vez más pequeño, semejantes a sondas periodontales, y diferentes curvaturas, han permitido una mejor accesibilidad a las irregularidades de la superficie radicular y a zonas como las furcas (291). Estudios comparando curetas con puntas de ultrasonidos estándar y con estas nuevas puntas más pequeñas, en cuanto a su capacidad para acceder al fondo de la bolsa periodontal, han señalado que con curetas se llegaba a 1,25 mm del fondo de la bolsa, con puntas de ultrasonidos estándar a 1,13 mm, mientras que con las nuevas puntas de ultrasonido a 0,78 mm (289).

La cavitación producida por los ultrasonidos puede tener un efecto antimicrobiano adicional (285). Este hecho podría significar que la instrumentación con ultrasonidos puede ser superior a la instrumentación manual en cuanto a su eficacia microbiológica. Los estudios indican que este fenómeno de cavitación afecta menos a las bacterias Gram-positivas, virus y esporas, que a las bacterias Gram-negativas como las espiroquetas (285). Sin embargo, no se han encontrado diferencias entre ambos procedimientos (266;286). Sólo se consigue reducir el nivel de detección de los patógenos periodontales (285).

La aparición y desarrollo de nuevas puntas de ultrasonidos tienen la capacidad de acceder a superficies radiculares de una forma más eficaz, consiguiendo disgregar el biofilm de estas localizaciones antes inaccesible. Este hecho puede que mejore la eficacia clínica y microbiológica de esta modalidad, comparada con el raspado y alisado radicular realizado mediante curetas. Se necesitan más estudios que valoren la eficacia de cada una de estas nuevas puntas.

INSTRUMENTACIÓN RADICULAR CON ULTRASONIDOS MÁS IRRIGACIÓN SUBGINGIVAL CON CLORHEXIDINA

La clorhexidina es un agente antimicrobiano que se une a la membrana celular bacteriana (de carga negativa) provocando su destrucción. Pero también evita la unión a

otras bacterias o a la superficie (292). Se ha determinado que se necesita 5 mg/ml de clorhexidina durante 10 minutos para destruir a las bacterias subgingivales (293), teniendo en cuenta que el aclaramiento de la clorhexidina en el surco es del 50% a los 12,5 minutos (294).

Los nuevos aparatos de ultrasonidos pueden incorporar depósitos que permiten incorporar agentes irrigadores, como antisépticos. La irrigación casi en la punta puede conseguir alcanzar las zonas más profundas de las bolsas periodontales. La posibilidad de llegar con antisépticos como la clorhexidina a zonas complicadas de acceder puede favorecer la disgregación del biofilm subgingival y, además, impedir la formación de un nuevo biofilm por su capacidad para evitar la unión entre bacterias o superficies. Por lo tanto, y teóricamente a la espera de estudios, podemos esperar obtener mejores resultados tanto clínicos como microbiológicos en nuestro tratamiento mecánico (295;296).

Existen pocos estudios que hayan estudiado la efectividad de estas nuevas puntas, donde la irrigación puede estar incorporada en su interior emergiendo casi del extremo activo. Los datos de los estudios existentes son limitados y contradictorios. Existen estudios que concluyen que la irrigación con clorhexidina aporta beneficios clínicos. Se ha señalado que en bolsas de 4-6 mm existe una reducción significativa en la profundidad de sondaje cuando se irriga con clorhexidina al compararla con agua (295). No ocurre lo mismo con las bolsas mayores de 7 mm, señalándose que los beneficios pueden ser sitio-dependientes. Por otro lado, otras investigaciones no encontraron diferencias significativas entre irrigar con agua o con clorhexidina (297-299). La diferencia entre las investigaciones puede deberse al sistema de irrigación de cada sistema de ultrasonidos; el antiséptico puede no llegar a la punta del extremo activo. Por tanto, cada sistema debe ser investigado y validado individualmente y determinar el método de irrigación con el mayor beneficio.

DESINFECCIÓN EN BOCA COMPLETA (DBC)

En los últimos años, se ha desarrollado un tratamiento periodontal basado en el manejo de la microbiota, la desinfección en boca completa (“*full-mouth disinfection*”).

a) *Justificación e hipótesis de la desinfección en boca completa*

Los patógenos periodontales no sólo colonizan la bolsa periodontal, ya que gracias a su capacidad de adhesión a tejidos duros y blandos los podemos encontrar en otros nichos intraorales como la lengua, las amígdalas, mucosas, e incluso, la saliva. En pacientes con periodontitis, se han encontrado *A. actinomycetencomitans*, *P. gingivalis* y *P. intermedia* en los nichos intraorales citados anteriormente (201-204). Se considera como nicho primario de los patógenos periodontales las bolsas periodontales, ya que se ha demostrado que la extracción de todos los dientes en la cavidad oral provoca una reducción significativa en la proporción de bacterias en el resto de los nichos (203).

Se ha sugerido la capacidad de los patógenos periodontales para trasladarse de un nicho a otro de la cavidad oral (300-302). Analizado la prevalencia de los patógenos, antes y después del tratamiento periodontal, en diferentes nichos intraorales y extraorales, se ha demostrado una relación directa y dinámica influenciada por el tratamiento (303). Por ejemplo, *A. actinomycetencomitans* se ha encontrado pretratamiento en el canal lagrimal y en el conducto nasal, pero tras el tratamiento no se detecta en estos nichos. En cambio, *T. denticola* es detectado en el conducto lagrimal post-tratamiento cuando no estaba presente en el pretratamiento; en el conducto auditivo externo se produce un descenso post-tratamiento (de un 14,3% a un 8,6%). El resto de patógenos no se han encontrado en otros nichos extraorales. Aunque el vehículo de transmisión intraoral no está claramente identificado, la saliva (donde las bacterias pueden sobrevivir) puede tener la mayor responsabilidad, ya que tras el tratamiento periodontal aumentan el porcentaje de patógenos en saliva (303); por ejemplo, tras el tratamiento se produce un aumento de *P. gingivalis* en saliva, de 14,3% pretratamiento a un 28,6% post-tratamiento (303). Pero para poder establecerse los patógenos periodontales, la saliva tendría que penetrar en el fondo de la bolsa y el continuo flujo crevicular lo haría casi imposible. Instrumentos dentales como sondas o de higiene como las cerdas del cepillo, que pueden penetrar hasta 3 mm, podrían contribuir a que los patógenos periodontales penetraran dentro de la bolsa (302;304). La transmisión tiene una importancia relativa, ya que los patógenos periodontales además deben establecerse y mantenerse en el tiempo en dicha localización.

Una bolsa periodontal tratada mediante raspado y alisado radicular podría ser recolonizada por patógenos desde bolsas periodontales todavía no tratadas o desde otros

nichos intraorales, antes de que un ecosistema nuevo y menos patogénico se pueda establecer. Para evitar este hecho se ha planteado un nuevo concepto de tratamiento encaminado a reducir la probabilidad de esta transmisión intra-oral. Si se evita la transmisión desde nichos no tratados a los tratados podríamos obtener mejores resultados clínicos y microbiológicos (305).

b) Tratamiento: Desinfección en boca completa (DBC)

La Desinfección en boca completa se comenzó a estudiar y aplicar en 1995 por la Universidad Católica de Lovaina en Bélgica (281;305-310) (**Tablas 5 y 6, pág. 152-153**). El tratamiento que propusieron consiste en:

1. Realización del tratamiento mecánico de raspado y alisado radicular en menos de 24 horas. Gracias a la rapidez de ejecución se podría tratar la totalidad del nicho subgingival impidiendo la transmisión intra-oral desde las bolsas no tratadas a las tratadas (203).
2. Uso de clorhexidina para tratar el resto de nichos. La pauta propuesta fue:
 - i. Cepillado del dorso de la lengua durante un minuto con gel de clorhexidina al 1 %. Se incorpora la lengua al tratamiento ya que es una zona muy poblada por bacterias, y su cepillado con clorhexidina es capaz de reducir el número de bacterias sobre su superficie (311-313).
 - ii. Dos enjuagues con clorhexidina al 0,2 % durante un minuto durante la ejecución del tratamiento. Se consigue reducir el número de bacterias en saliva, ya que la clorhexidina reduce hasta un 90 % dichas bacterias en 24 horas (314).
 - iii. Dos aplicaciones mediante spray de clorhexidina al 0,2 % de las amígdalas y faringe. Los enjuagues pueden no llegar bien a esta zona tan posterior, por eso se propone este método que tiene el mismo efecto antimicrobiano que el uso del enjuague (315).

- iv. Irrigación subgingival repetida (tres veces durante diez minutos) con gel de clorhexidina al 1 % de todas las bolsas periodontales. Se realiza por medio de una jeringa con la punta roma, insertándola en el fondo de la bolsa, hasta notar cierta resistencia (316). Se utilizaban dos jeringas y puntas diferentes para irrigar las bolsas superiores y las inferiores, y así reducir la posibilidad de recontaminación de las localizaciones tratadas. Se repetía la irrigación tres veces durante diez minutos para asegurar el contacto suficiente de la clorhexidina subgingivalmente y que tuviera efecto bactericida (99 % de reducción de placa subgingival en 30 minutos). Esta forma de actuación está basada en el hecho de que la concentración mínima bactericida de la clorhexidina para el *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans* es de 5 mg/mL en diez minutos (293;294;317).
- v. Enjuagues dos veces al día durante un minuto con clorhexidina al 0,12 % durante dos meses. Se propone el mantenimiento de este tratamiento durante dos meses pues se argumenta que impide la recolonización por patógenos periodontales (292).
- vi. Aplicación mediante spray de clorhexidina al 0,2 % en la zona de amígdalas y faringe durante dos meses. La justificación es la misma que en el punto anterior (315).

c) Resultados clínicos

En los estudios piloto, se obtuvieron resultados clínicos similares entre el tratamiento convencional (TC) y la DBC con respecto a la reducción de sondaje en las localizaciones con sondaje inicial de 5-6 mm, a los dos meses. Sin embargo, en las localizaciones con un sondaje inicial mayor de 7 mm, se producía un descenso mayor, y de manera significativa, en las localizaciones tratadas mediante DBC frente a TC (3,3 vs 2,5 mm, respectivamente) (**Tabla 7, pág. 154**). No se detectaron diferencias en la reducción del sangrado al sondaje entre ambas técnicas (305) (**Tabla 9, pág. 156**).

A los 8 meses, DBC continuaba consiguiendo las mayores reducciones del sondaje en las localizaciones con un sondaje inicial igual o mayor de 7 mm, tanto en dientes unirradiculares como multirradiculares. Los datos señalan una mayor reducción del sondaje en los dientes multirradiculares (1,2 mm) que en los unirradiculares (0,83 mm) (**Tabla 7, pág. 154**). De forma similar a los resultados a dos meses, no se encontraron diferencias en cuanto al sangrado al sondaje (310) (**Tabla 9, pág. 156**).

En estudios sucesivos, DBC continuaba consiguiendo los mejores resultados clínicos al compararlo con TC. Se conseguía reducir la profundidad de sondaje en dientes unirradiculares y multirradiculares tanto en las bolsas de más de 7 mm (2,3 mm y 1,4 mm, respectivamente) como en las de 5-6 mm (0,9 mm y 0,7 mm, respectivamente). Además, se conseguía reducir de forma significativa el porcentaje de sangrado, y se lograba un aumento significativo en la ganancia de inserción, mejor en las localizaciones con profundidad de sondaje inicial mayor de 7 mm que las localizaciones de 5-6 mm (309) (**Tablas 8 y 9, pág. 155-156**).

Los buenos resultados se mantenían tanto en pacientes con periodontitis crónica del adulto como en periodontitis de comienzo temprano (282;306).

Una crítica que se realizaba a estos estudios era que no se conocía si los beneficios obtenidos eran debido al uso de la clorhexidina o al hecho de raspar toda la boca en menos de 24 horas. Por eso, se evaluó el raspado y alisado radicular en 24 horas sin el uso coadyuvante de la clorhexidina (RAR 24h). Los resultados demostraron una reducción de sondaje significativa del RAR 24h al compararlo con TC y DBC (2,3 mm, 1,2 mm y 2,2 mm respectivamente). Los resultados eran mejores cuando se examinaban las localizaciones con profundidad de sondaje inicial mayor de 7 mm y en los dientes multirradiculares. En el resto de variables clínicas se mantenían las diferencias significativas a favor del RAR 24h (281) (**Tabla 7, pág. 154**).

d) *Resultados microbiológicos* (**Tabla 10, pág. 157**)

En el estudio piloto, el número de UFC detectadas tanto de bacterias aerobias como anaerobias eran similares en ambos grupos de tratamiento tras dos meses. A pesar de ello, se comprobó como la DBC eliminaba *P. gingivalis* en seis de diez pacientes, además de provocar un aumento significativo de la presencia de bacterias beneficiosas

en cultivo (305). Mediante el microscopio de campo oscuro no se encontraron diferencias en el número de espiroquetas y formas mótilas (305).

En estudios posteriores, DBC reducía de manera significativa las formas mótilas y espiroquetas, y esta reducción persistía hasta dos meses en dientes unirradiculares y hasta 8 meses en los multirradiculares. Hubo una menor cantidad de UFC de bacterias anaerobias tras DBC. Sin embargo, la reducción de los organismos patogénicos específicos vistos con DBC era de 1 mes, y no persistía durante todo el periodo de estudio (309).

En periodontitis avanzadas, se determinó que los pacientes tratados mediante DBC mantenían menos del 10% de formas mótilas y espiroquetas, mientras que los pacientes tratados de manera convencional el nivel de estas formas mótilas se mantenía en un 20%. Los cultivos indicaron que, tras dos meses, se reducía el número de UFC de anaerobios en dientes uni y multirradiculares pero al 4º mes esta diferencia se hacía menor alrededor de los dientes unirradiculares. DBC era capaz de reducir el número de muestras con *P. gingivalis* de 10 a 4, mientras que en TC no había diferencias. En general, el número de patógenos subgingivales específicos se redujo más con DBC. En otros nichos intraorales controlados, el número de UFC asociadas con cualquier tratamiento se redujo aproximadamente un 0,5 log sobre la lengua, en la saliva y sobre la mucosa bucal. Los beneficios microbiológicos en los nichos intraorales se consideraron controvertidos (308).

Comparando la eficacia microbiológica en pacientes con periodontitis crónica y de comienzo temprano se encontraba una reducción significativa de la cantidad de formas mótilas y espiroquetas mediante el microscopio de campo oscuro. Sin embargo, cuando se comparaban los tratamientos entre los pacientes con periodontitis crónica se obtenía mejores resultados con DBC en la reducción de espiroquetas y formas mótilas a lo largo de todo el estudio. En los pacientes con periodontitis de comienzo temprano, no se encontraron diferencias significativas tras dos meses. En cuanto a los resultados obtenidos con cultivo, en los pacientes con periodontitis crónica, se descendían los niveles de *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *C. rectus* y *M. micros* de 1 a 3 log, y *P. gingivalis* se erradicaba en 7 de 8 pacientes con DBC. Con TC, *P. gingivalis* se eliminó en 1 de los 6 pacientes y la reducción de otros patógenos fue despreciable (282).

DBC reducía de forma significativa las unidades formadoras de colonia de anaerobios de la flora total y de *Bacteroides* negro-pigmentados en los dientes uni y multirradiculares en los pacientes con periodontitis crónica. En otros nichos intraorales (saliva y lengua) los resultados fueron ambiguos. Las diferencias entre los grupos, con respecto a la reducción de UFC en los pacientes con periodontitis de comienzo temprano, fueron menores que aquellos observados en pacientes con periodontitis crónica y no persistió a lo largo de todo el estudio (282).

Realizando el análisis microbiológico mediante sondas de ADN, ambos tratamientos ocasionaron un cambio en las especies patogénicas a los 8 meses con relación al porcentaje y la frecuencia de detección. En este aspecto, DBC indujo una mejora adicional cuando lo comparábamos con TC (307).

Al comprobar la eficacia microbiológica, mediante el microscopio, del raspado y alisado radicular en 24 horas sin la pauta de clorhexidina, se reducía las formas móviles y la población de espiroquetas por debajo del 20%. Todos los tratamientos reducían el número de UFC para los anaerobios estrictos en cultivo. Sobre la lengua, los *Bacteroides* negro-pigmentados permanecían sin cambios con TC, mientras que con los tratamientos en 24 horas con y sin clorhexidina hubo un descenso. En la saliva, descendieron los bacteroides en los tres grupos de tratamiento pero más en los tratamientos en 24 horas, sin diferencias con el uso del antiséptico. Con respecto a las bacterias específicas, en los dientes multirradiculares el número de patógenos iniciales se redujo, pero los valores rebotaron a valores iniciales a los 8 meses para *P. gingivalis*, *M. micros*, *C. rectus* y *F. nucleatum* con TC. La reducción en las unidades formadoras de colonia permaneció en los grupos tratados en 24 horas.

e) Efectos inmunológicos

La DBC es un tratamiento bien tolerado por los pacientes. No se han detectado diferencias significativas en los parámetros de dolor y /o en el número de analgésicos utilizados al compararlo con TC (305).

Sí se ha detectado un aumento significativo en la temperatura corporal en la noche tras la segunda cita de raspado y alisado radicular en DBC. La posible explicación de este hecho es la bacteriemia producida durante la instrumentación subgingival (318).

Además, la irrigación con clorhexidina, antes y después del raspado provoca una bacteriemia adicional (318).

El tratamiento mecánico de las bolsas periodontales causa la inoculación, en el hospedador, de bacterias periodontales y /o endotoxinas. Los lipopolisacáridos (LPS) son el mayor componente de la pared celular de las bacterias Gram-negativas y pueden provocar una importante respuesta inmune del hospedador. La inoculación de LPS puede inducir actividad pirógena aunque la dosis mínima pirógena puede ser diferente para los LPS de diferentes bacterias. La instrumentación de más de un cuadrante puede ser capaz de producir la inoculación de una concentración de LPS mayor de la dosis mínima pirógena.

Sin embargo, el hecho de que aparezca fiebre tras el segundo día de tratamiento ha sugerido que puede producirse una segunda respuesta inmune mucho más potente. Es lo que se conoce como fenómeno de Shwartzman. En modelos animales, la inoculación repetida (tras 24 horas) de LPS puede provocar este fenómeno (319). Tras la inoculación de LPS, la fiebre puede deberse a la secreción de TNF por los fagocitos mononucleares o por la formación de complejos inmunes, a los que sigue la liberación de IL-1 que es altamente pirógeno.

f) *Otros enfoques basados en la DBC: raspado y alisado radicular el mismo día (“same-day full-mouth scaling and root planing”)*

A partir de la creación del protocolo de desinfección en boca completa, han surgido tratamientos periodontales no-quirúrgicos basados en él. Se ha propuesto la realización del raspado y alisado radicular realizado en el mismo día, ejecutando el tratamiento en menos de 12 horas, dejando una hora y media entre ambas sesiones (“The same-day full-mouth scaling and root planing”) (180;320;321) (**Tablas 5 y 6, pág. 152-153**).

Los resultados clínicos de este tratamiento son similares a los obtenidos con TC para todos los parámetros analizados. Solamente se obtenían mejores resultados con el tratamiento en 12 horas en localizaciones seleccionadas, una por cuadrante, mayores de 7 mm, donde se medía el nivel de inserción relativo con una férula (320), pero debido al número limitado de estas localizaciones el resultado se interpreta con cautela (**Tabla 7, pág. 154**).

En cuando a los resultados microbiológicos obtenidos mediante PCR, con ambos tratamientos se consigue reducir la presencia de los patógenos periodontales de forma significativa y mantenerlos durante 6 meses, no obteniéndose diferencias significativas entre los tratamientos (180).

También, se procedió a analizar la respuesta inmune de los pacientes sometidos al tratamiento mecánico en menos de 12 horas. En ambos tratamientos se producía una reducción en los niveles de anticuerpos y no se hallaron diferencias significativas en la dinámica de la respuesta inmune entre ambos (321).

g) Valoración de la DBC

El tratamiento en 24 horas con o sin clorhexidina ha demostrado mejores resultados que el tratamiento convencional. La desinfección en boca completa nos ofrece un tratamiento basado en un mejor entendimiento del proceso infeccioso. Pero quedan muchas cuestiones por contestar y en gran parte, esas respuestas las aportarán los diferentes métodos de análisis microbiológico.

1. Tras el tratamiento convencional se produce una repoblación de las localizaciones tratadas por las bacterias de las localizaciones todavía sin tratar. La DBC inhibe la recolonización por los supuestos patógenos periodontales desde otros nichos intraorales. Sin embargo, las localizaciones podrían ser reinfectadas por bacterias de otros individuos o de fuentes extraorales. Por tanto, para determinar el origen de la recolonización se debe estudiar el genotipo y ribotipo de las bacterias y determinar su procedencia.
2. Los patógenos pueden disminuir a cantidades muy pequeñas para ser detectadas, pero no ser eliminados. Por lo tanto, puede parecer que se han reinfectado las localizaciones tratadas, cuando en realidad se puede producir un aumento de las bacterias que estaban ya presentes, pero no detectadas. Este problema podría ser resuelto al realizar análisis microbiológicos más sensibles que puedan determinar si los patógenos se han erradicado realmente de las localizaciones tratadas.

3. Los datos varían según el análisis microbiológico utilizado. Mediante cultivo se señalaba la eliminación de patógenos como *P. gingivalis*, mientras que con sondas de ADN se comprobó que los resultados eran totalmente diferentes. Por tanto, al cambiar el método de análisis microbiológico se producen resultados distintos.
4. Los datos tanto clínicos como microbiológicos se tomaban de un único cuadrante, siempre el cuadrante superior derecho. Por lo tanto, se podía estar infravalorando la prevalencia de la enfermedad y sobrevalorar su extensión, pudiendo no reflejar los datos completos de la boca de los pacientes. Un cuadrante puede no reflejar la situación real de la boca del paciente tanto clínica como microbiológicamente. Se intenta solucionar parte de este problema seleccionando hasta cuatro localizaciones en dientes unirradiculares y multirradiculares, tomando cuatro puntas de papel (dos por vestibular y dos por lingual) en cada localización. Es decir, se toman en cada paciente 32 puntas de papel del primer cuadrante, para determinar lo más realmente posible la flora subgingival de los pacientes. Pero queda por determinar si el primer cuadrante refleja la flora subgingival de toda la boca.
5. Si la desinfección en boca completa se basa en impedir la recolonización de zonas no tratadas, se podría reducir más el tiempo de ejecución del tratamiento. Se ha propuesto reducirlo hasta realizarlo en menos de 12 horas, pero los resultados clínicos y microbiológicos no han mostrado diferencias significativas (solo en localizaciones seleccionadas ≥ 7 mm). El beneficio de la ejecución del raspado y alisado radicular en 24 horas puede deberse al fenómeno de Shwartzman y no a impedir la transmisión intraoral de los patógenos. Son necesarios más estudios clínicos que determinen si nos podemos beneficiar del manejo del sistema inmunológico de los pacientes con periodontitis.
6. Los estudios realizados para validar la desinfección en boca completa tienen problemas de diseño. El más importante es la carencia de aleatorización en los grupos de tratamiento (281) sobre todo en el grupo control, al utilizarse grupos de estudios anteriores (306).

7. Los datos clínicos obtenidos del grupo control son mucho peores comparados con otros estudios que han valorado el tratamiento convencional de raspado y alisado radicular por cuadrantes (**Tablas 7 y 8, pág. 154-155**).
8. De forma semejante a la profundidad de sondaje y nivel de inserción, los datos sobre el sangrado al sondaje son llamativamente peores en el grupo control que en el test (281;306;308) (**Tabla 9, pág. 156**).
9. Las variables clínicas son tomadas después de realizar el tratamiento de raspado y alisado radicular, esto puede causar una sobrevaloración de las variables en la visita inicial.

II. JUSTIFICACIÓN

Las periodontitis se caracterizan por provocar la destrucción de la inserción periodontal de los dientes; siendo la principal causa de pérdida dentaria en pacientes mayores de 35 años (2). Son patologías cuya prevalencia en países desarrollados alcanza el 35% (3;4).

La evaluación microbiológica de la flora subgingival en un paciente con periodontitis se enmarca dentro de los conocimientos que han mostrado claramente como las diferentes formas de periodontitis son infecciones bacterianas (16;17;26-28;30-35;38-42;44-46;322). El factor etiológico de las periodontitis es un grupo de bacterias, predominantemente Gram-negativas y anaerobias que colonizan el área subgingival. En consecuencia, los diferentes tipos de periodontitis son infecciones mixtas en las que el biofilm subgingival puede variar entre ellas y poseer patrones de composición diferentes según las bacterias presentes (134;246).

La descripción precisa del tipo de infección periodontal puede ser importante tanto para caracterizar la periodontitis que padece el paciente como para influir en la selección del tratamiento más eficaz. Los tests microbiológicos se han valorado en el diseño del plan de tratamiento periodontal utilizándose como guía en la selección de antibióticos específicos frente a los patógenos detectados (231-235). Su utilización provoca un aumento en el uso de antibióticos sistémicos y una menor realización de cirugías periodontales (232).

INFLUENCIA DE LA TOMA DE MUESTRAS

El objetivo fundamental para realizar una correcta evaluación microbiológica es la obtención de una muestra representativa de los patógenos periodontales presentes en la boca del paciente. La selección de las localizaciones y el número de muestras microbiológicas a tomar son los dos parámetros que pueden influir en la obtención de dicha muestra. La calidad y cantidad del patrón microbiológico de un paciente pueden ser diferentes antes y después del tratamiento, por eso, la estrategia de toma de muestras puede variar según el momento de la toma. Si no se determina correctamente la estrategia más adecuada se puede afirmar la erradicación de un patógeno cuando en realidad sigue formando parte del patrón microbiológico del paciente. De ahí la importancia de valorar la eficacia de las diferentes estrategias de toma de muestras y su influencia en los resultados tanto en la fase diagnóstica como en la evaluación de la respuesta microbiológica a los tratamientos periodontales.

INFLUENCIA DE LAS MODALIDADES DE TRATAMIENTO PERIODONTAL NO QUIRÚRGICO

La eficacia de las distintas modalidades de tratamiento periodontal está directamente relacionado con la capacidad de disgregar el biofilm subgingival, junto con la capacidad para reducir o eliminar los patógenos periodontales. El tratamiento mecánico convencional es capaz de cumplir estos objetivos, pero se están investigando otras modalidades de tratamiento periodontal básico para mejorar su impacto y eficacia clínica y microbiológica. Los avances tecnológicos, como el desarrollo de nuevas puntas de ultrasonidos, permiten un mejor acceso a las irregularidades radiculares, en muchos casos incluso se puede irrigar esas zonas con antisépticos como la clorhexidina. Además, la mejor comprensión de los procesos etiopatogénicos de las periodontitis permiten desarrollar nuevas modalidades de tratamiento basados en ellos; como la desinfección en boca completa o el raspado y alisado radicular en 24 horas que impiden la transmisión de patógenos de localizaciones no-tratadas a las tratadas (281;305-310). La eficacia clínica y microbiológica de estas nuevas modalidades pueden ser superiores al tratamiento convencional ya que pueden tener una mayor capacidad de disgregar el biofilm subgingival y eliminar los patógenos periodontales. Toda nueva modalidad de tratamiento periodontal debe ser evaluada, tanto clínica como microbiológicamente, para demostrar su superioridad frente al tratamiento convencional.

Por lo tanto, se pretende determinar como distintas estrategias de toma de muestras microbiológicas, variando la localización y número, pueden influir en los resultados obtenidos tanto en la fase diagnóstica como en la evaluación de la respuesta al tratamiento periodontal.

III. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS 1.

La frecuencia de detección y el porcentaje de la flora que representan los patógenos periodontales deben ser altos en pacientes con periodontitis en la fase de diagnóstico.

HIPÓTESIS 2.

La estrategia de toma de muestra (variando el número y las características de las localizaciones seleccionadas) puede influir en los resultados del diagnóstico periodontal. Una estrategia que seleccione las 4 localizaciones más enfermas en cada cuadrante, debe detectar mejor la presencia de patógenos que una estrategia con sólo la localización más enferma de toda la boca, o dos localizaciones en un mismo cuadrante.

HIPÓTESIS 3.

La respuesta clínica y microbiológica al tratamiento básico periodontal podría mejorarse con sistemas que permitan un mejor acceso a la superficie radicular, que se combine con la irrigación subgingival con antisépticos o que adopte un enfoque anti-infeccioso más racional.

HIPÓTESIS 4.

La estrategia de toma de muestras, en cuanto el número y las características de las localizaciones seleccionadas, puede influir en los resultados microbiológicos en la evaluación de la respuesta al tratamiento básico periodontal. Una estrategia que seleccione las 4 localizaciones más enfermas en cada cuadrante, debe detectar mejor la presencia de patógenos que una estrategia con sólo dos localizaciones en un mismo cuadrante.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinación de la estrategia más adecuada en la toma de muestras de la flora subgingival para el estudio mediante cultivo de los patógenos periodontales, tanto durante el diagnóstico como en la evaluación de la respuesta al tratamiento periodontal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudio 1:

- 1) Determinar la frecuencia de detección de los patógenos periodontales y el porcentaje que representan de la flora total en pacientes con periodontitis mediante diferentes estrategias de toma de muestras.
- 2) Determinar la influencia de la estrategia de toma de muestras microbiológicas, en cuanto al número de localizaciones, en los resultados obtenidos en el diagnóstico microbiológico en periodontitis.

- Estudio 2:

- 3) Evaluar la respuesta clínica y microbiológica de pacientes con periodontitis frente a cuatro procedimientos de tratamiento periodontal no-quirúrgico.
- 4) Determinar la influencia de la estrategia de toma de muestras microbiológicas, dependiendo del número de localizaciones, en los resultados obtenidos durante la evaluación microbiológica de cuatro procedimientos de tratamiento periodontal no-quirúrgico.

V. PACIENTES Y MÉTODOS

Los objetivos de este trabajo de investigación se valoraron en dos estudios diferenciados:

- Estudio 1: Evaluación en fase diagnóstica.
- Estudio 2: Evaluación en respuesta al tratamiento periodontal no-quirúrgico.

ESTUDIO 1: EVALUACIÓN EN FASE DIAGNÓSTICA

Pacientes

Se incluyeron dos grupos de estudio para valorar las estrategias de toma de muestras:

- Grupo 1 versus 4 (1vs4): Formado por 33 pacientes consecutivos que acudieron solicitando atención al Master de Periodoncia de la Universidad Complutense de Madrid (UCM).
- Grupo 2 versus 4 (2vs4): Compuesto por 20 pacientes consecutivos que acudieron al Master de Periodoncia de la UCM solicitando atención y que fueron incluidos en un ensayo clínico para evaluar diferentes enfoques del tratamiento periodontal no-quirúrgico.

Los pacientes de ambos grupos cumplían los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de Inclusión

- No haber recibido tratamientos periodontales previos.
- Padecer periodontitis crónica, con presencia de más de cinco bolsas con profundidad de sondaje mayor o igual a 6 mm.
- Poseer al menos 16 dientes, como mínimo tres dientes en cada cuadrante.
- Buena salud general.
- No tomar ninguna medicación relevante.

Criterios de Exclusión

- Padecer patologías agudas como abscesos periodontales o enfermedades periodontales ulceronecrotizantes.
- Enfermedades sistémicas relevantes.
- Embarazo.
- Toma de antibióticos en el mes previo.
- Uso de medicación sistémica crónica que puedan afectar a los resultados.

Diseño del estudio

Visita de selección de los pacientes

A los pacientes que cumplían los criterios de inclusión y exclusión y daban su autorización para participar en el estudio (se les informaba y daban su autorización por medio de un consentimiento informado), se les citó para la visita inicial del estudio.

Visita inicial del estudio

Se procedió a la selección de las localizaciones donde se iban a tomar las muestras, el registro de los datos clínicos de dichas localizaciones y la toma de las muestras microbiológicas.

Estrategias de toma de muestras

Grupo 1vs4:

Se realizaron dos estrategias de toma de muestras microbiológicas:

A) Muestra-única (M1): se seleccionó la localización más enferma de la boca, es decir, con la mayor profundidad de sondaje y sangrado. Se excluyeron de esta selección los cordales y los dientes con posibles lesiones endoperiodontales.

B) Muestra-agrupada (M4): se seleccionaron 4 localizaciones, una por cuadrante. La localización en cada cuadrante debía ser la más enferma,

esto es, con la mayor profundidad de sondaje y sangrado, excluyendo la tomada en M1. Se procesaron agrupadas en un mismo vial.

Grupo 2vs4:

Se realizaron dos estrategias de toma de muestras microbiológicas:

A) Muestra-doble (M2): se seleccionaron las dos localizaciones más enfermas, con mayor profundidad de sondaje y sangrado, de un mismo cuadrante. Se excluyeron de esta selección los cordales y los dientes con lesiones endoperiodontales. Se procesaron en el mismo vial.

B) Muestra-agrupada (M4): se seleccionaron 4 localizaciones, una por cuadrante. La localización en cada cuadrante debía ser la más enferma, esto es con la mayor profundidad de sondaje y sangrado, excluyendo las tomadas en M2. Se procesaron agrupadas en el mismo vial.

Variables clínicas

De cada localización, se registraban, mediante sonda manual, las siguientes variables clínicas:

1. Índice de placa, valorando presencia y ausencia (IP, sí/no)
2. Sangrado al sondaje, valorando presencia y ausencia (SS, sí/no)
3. Profundidad de sondaje (PS, milímetros)
4. Recesión (RE, milímetros)
5. Presencia de supuración (SU, sí/no)

Procedimiento de toma de muestras

Cada localización se aislaba convenientemente mediante rollos de algodón, se eliminaba la placa o cálculo presente supragingivalmente, y se secaba con chorro de aire. La toma de la muestra se realizó con dos puntas de papel (Fine, West Palm Beach, EEUU), tamaño 30, colocadas consecutivamente durante 10 segundos lo más subgingival posible.

Las muestras fueron transportadas al laboratorio, en viales con 1,5 mm de Fluido de Transporte Reducido (RTF) (323) y procesadas dentro de las 24 horas siguientes a la toma.

Procesado de las muestras

Se comenzaba vibrando las muestras durante 30 segundos con un aparato Vórtex a su máxima potencia, para posteriormente, realizar diluciones a la décima parte en una solución salina tampón de fosfato. Se inoculaban 0,1 milímetros de las diluciones apropiadas sobre las placas con los medios de cultivo. Los medios empleados incluyen:

- a) Placas de agar no selectivo (Oxoid 2, Oxoid Ltd., Basingstoke, Gran Bretaña) con sangre de carnero al 5% suplementado con hemina (5 mg/L) y menadiona (1mg/L). Se incubaron a 37 °C, durante 14 días, en una atmósfera anaerobia con 80% de N₂, 10% H₂ y 10% de CO₂.
- b) Placas con Dentaid-1 (113) para aislamiento selectivo de *A. actinomycetemcomitans*, siendo incubadas a 37 °C durante 3-5 días en aire con 5% de CO₂.

Identificación de las bacterias

El número total de unidades formadoras de colonia (UFC) fue determinado en el medio general, sirviendo como referencia para calcular el porcentaje de cada una de las especies estudiadas.

En el medio general se identificaron las siguientes especies bacterianas: *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Micromonas micros*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythensis*. Cada colonia identificada de manera tentativa morfológicamente, era recontada en la placa de dilución apropiada y aislada en medio general. La identificación definitiva se basó en diversas pruebas: Tinción de Gram, aerotolerancia, morfología, actividad tripsínica con degradación de benzil-DL-arginina-2-naftilamida (Sigma. St Louis, EEUU), producción de nitrito desde nitrato, producción de indol desde triptófano, fermentación de la catalasa, producción de α -glucosidasa. En caso de duda, se recurrió a los perfiles de

reacción para identificación de anaerobios, con el sistema API 32 A (Biomerieux, Le Balme Les Grottes, Francia).

En el medio selectivo Dentaid-1 se identificaron colonias de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* morfológicamente por su estructura con forma de estrella interior, así como reacción positiva ante la catalasa (3% de H₂O₂).

VARIABLES MICROBIOLÓGICAS

Tras el recuento, se calcularon las siguientes variables:

- Unidades formadoras de colonia (UFC) totales.
- Frecuencia de detección de cada patógeno.
- Porcentaje de flora de cada patógeno (en las localizaciones positivas).
- UFC por cada patógeno (*P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *T. forsythensis*, *P. intermedia*, *C. rectus*, *M. micros* y *A. actinomycetemcomitans*).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se calcularon las medias de las variables clínicas en cada grupo. Como el paciente es considerado la unidad de análisis, en las muestras agrupadas o dobles, se obtenía previamente la media de cada paciente. Los resultados se compararon entre los grupos mediante t-test pareado.

Las variables microbiológicas se analizaron de diferentes maneras:

- Las UFC fueron transformadas en logaritmo para obtener una distribución normal y, posteriormente, se compararon mediante t-test pareado si se ajustaban a la normalidad, y mediante el test de los rangos señalados si no lo hacían. Si el valor de UFC era cero, se asignaba un valor de una unidad menos que el umbral de detección (10² para *A. actinomycetemcomitans* y 10³ para los demás patógenos) para hacer los cálculos.

- La frecuencia de detección de los patógenos era comparada mediante el test de la chi-cuadrado.
- El porcentaje de flora en localizaciones positivas se analizó mediante el test de los rangos señalados.

Para comparar las dos estrategias de toma de muestras, se confeccionaron tablas de contingencia 2x2 para determinar, entre otros parámetros, la sensibilidad y la especificidad, y analizar la relación de los dos grupos de valores mediante el test de la chi-cuadrado y mediante el test de correlación de Pearson.

ESTUDIO 2: EVALUACIÓN EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO PERIODONTAL NO-QUIRÚRGICO.

Pacientes

Se seleccionaron consecutivamente 20 pacientes con periodontitis crónica generalizada moderada que acudieron al Master de Periodoncia de la UCM solicitando tratamiento. Los pacientes que participaban en el estudio debían de cumplir los siguientes criterios de inclusión y exclusión.

Criterios de Inclusión

- Pacientes con periodontitis crónica generalizada moderada definida con una pérdida ósea entre 30-50%, y presencia de bolsas periodontales de 4-6 mm en al menos el 20% de las localizaciones.
- Edad comprendida entre 18 y 65 años.
- Con al menos 16 dientes. Como mínimo tres en cada cuadrante.
- Ausencia de enfermedades sistémicas relevantes.
- Bajo ningún tratamiento médico sistémico relevante.

Criterios de exclusión

- Pacientes con periodontitis agresivas o crónicas avanzadas, o con patologías periodontales agudas.
- Enfermedades sistémicas relevantes.
- Embarazo.
- Toma de antibióticos sistémicos el mes previo al estudio.
- Uso de medicación sistémica crónica que puedan afectar a los resultados.

Diseño del estudio (Figura 1, pág. 159)

Visita de selección

Los pacientes eran diagnosticados de periodontitis crónica generalizada moderada por los alumnos que cursan el Master de Periodoncia de la UCM. Se comprobaba el

cumplimiento de los criterios de inclusión y exclusión por parte de los investigadores y se les informaba de su posible participación en el estudio. Los pacientes autorizaban su participación por medio de un consentimiento informado.

A los pacientes que cumplían los requisitos se les realizaba la historia médica y dental y se tomaban impresiones con alginato para la confección de unos modelos de estudio, sobre los cuales se preparara una férula del primer cuadrante a tratar y se les citaba para la visita inicial del estudio.

Visita inicial del estudio

Un mismo investigador se encargaba de la recogida de las variables clínicas y microbiológicas en cada paciente, tanto en la visita inicial como en las evaluaciones posteriores.

Una vez realizada la recogida de variables clínicas y microbiológicas pre-tratamiento, a los pacientes se les asignaba aleatoriamente (por medio de una lista generada por ordenador con sobres cerrados proporcionados por un agente externo) un grupo de tratamiento, concertando las correspondientes citas según cada grupo. El investigador que realizaba las evaluaciones clínicas y microbiológicas no conocía los tratamientos que recibían los pacientes.

Tratamientos

En todos los grupos de tratamiento, en la primera cita, se enseñaron instrucciones en higiene oral, utilizando la técnica de Bass y la limpieza interproximal, según las necesidades individuales de cada paciente. Estas instrucciones fueron reforzadas a lo largo del estudio.

Dos investigadores realizaron los diferentes tratamientos evaluados. Estos investigadores no participaban en las evaluaciones clínicas ni microbiológicas. Los cuatro grupos de tratamiento, constituidos por cinco pacientes cada uno, que se valoraron fueron:

- Grupo TC: Se realiza el tratamiento convencional consistente en raspado y alisado radicular por cuadrante con un intervalo de una semana, con lo que el tratamiento se prolonga durante un mes. El raspado y alisado radicular se realizaba con anestesia local y mediante curetas específicas (sistema Gracey, Hu-friedy, Chicago, EEUU). El tiempo asignado a cada cuadrante era de una hora.
- Grupo DB-c: Se realiza el tratamiento siguiendo los conceptos de la desinfección en boca completa. Se realiza el tratamiento mecánico de raspado y alisado radicular en 24 horas. El tratamiento se realizaba con anestesia local y con curetas específicas (sistema Gracey, Hu-friedy, Chicago, EEUU). En la primera visita se realizaba el tratamiento de dos cuadrantes (aproximadamente dos horas), y al día siguiente se realizaba el raspado y alisado radicular en los otros dos.
- Grupo DB-us: Se realiza el tratamiento periodontal no-quirúrgico de toda la boca en 24 horas. El tratamiento se realiza con anestesia local, usando el sistema de ultrasonidos (Cavitron ® SPS, Dentsplay DeTrey, York, EEUU) con puntas de diseño específico (FSI Slimline, Dentsplay DeTrey, York, EEUU) y con irrigación de agua. El tratamiento se realizó en dos sesiones de dos horas en un periodo máximo de 24 horas.
- Grupo DB-chx: Se realiza el tratamiento de la misma forma que el grupo DB-us, utilizando el mismo sistema de ultrasonidos con las mismas puntas de diseño específico, pero la diferencia es que se utilizaba para la irrigación clorhexidina al 0,12% (Perio-aid tratamiento, Dentaïd, Barcelona, España). Para ello, se añade al aparato de ultrasonidos un dispensador de agentes irrigadores de un volumen de 1000 ml (DualSelect™, Dentsplay DeTrey, York, EEUU).

Visita uno y tres meses post-tratamiento

Se realizaba la valoración clínica y microbiológica por el mismo investigador que en la visita inicial. Se reforzaban las instrucciones de higiene oral según las necesidades individuales de cada paciente.

Visita seis meses post-tratamiento

Se realizaba la valoración clínica y microbiológica por el mismo investigador que en la visita inicial. La higiene oral fue evaluada y reforzada en los casos necesarios. Se realizaba una profilaxis profesional y se valoraba si era necesario que el paciente recibiera algún tipo de tratamiento adicional o pasaba a la fase de mantenimiento.

VARIABLES CLÍNICAS

Boca completa

Se registraron los siguientes parámetros en seis localizaciones de cada diente mediante una sonda electrónica de presión controlada, la sonda Florida ® (Florida Probe Corporation, Gainesville, Florida, EEUU) (**Figura 2 y 3, pág. 160**) :

- a) Índice de placa, valorando presencia y ausencia (IP, sí/no)
- b) Sangrado al sondaje, valorando presencia y ausencia (SS, sí/no)
- c) Profundidad de bolsa (PS, milímetros)
- d) Recesión (RE, milímetros)
- e) Nivel de inserción (NI, calculado como la profundidad de bolsa más la recesión, en milímetros)
- f) Movilidad dentaria (0-3)
- g) Afectación furcal (0-3, según Hamp y col (324))

Cuadrante experimental

Del primer cuadrante tratado se seleccionaron las dos localizaciones más enfermas, es decir, las localizaciones con la mayor profundidad de sondaje y sangrado. Estas localizaciones tenían que ser una en un diente molar y otra en uno no-molar. En estas localizaciones se procedía a medir el nivel de inserción relativo (NIR).

Para medir NIR se confeccionaba una férula, y sobre el paciente se le superponían topes de resina autopolimerizable. Con esta técnica se aseguraba que siempre se sondara en la misma localización y con la misma angulación. La

medición se realizaba con la sonda específica (“stent probe”) del sistema de la sonda Florida ® (**Figuras 4, 5, 6 y 7, pág. 160-161**).

Cada localización se medía dos veces para valorar la variabilidad en la lectura de los sondajes. Si había una discrepancia mayor de un milímetro entre las dos lecturas, se realizaba un nuevo sondaje, utilizándose la media de las dos mediciones que tuvieran menos de un milímetro de discrepancia (325)

Variables microbiológicas

Se realizaron dos estrategias de toma de muestras microbiológicas:

- Muestras de las dos localizaciones seleccionadas en el primer cuadrante tratado para valorar NIR (M2). En cada una de las localizaciones se tomaron dos puntas de papel consecutivas durante diez segundos y se procesaron de forma conjunta.
- Muestras de cuatro localizaciones de la boca del paciente (M4). Se seleccionaban la localización más enferma (con el mayor sondaje y sangrado al mismo) de cada uno de los cuadrantes. En cada localización se tomaban dos puntas de papel consecutivas durante diez segundos y se procesaban juntas.

Las localizaciones de las tomas de las muestras procedían de las mismas localizaciones durante todo el estudio.

Procedimiento de toma de muestras

Se realizaron de la misma forma expuesta en el estudio 1. En cada localización se tomaron dos puntas de papel consecutivas, dejando las puntas en la bolsa un mínimo de 10 segundos. Las muestras fueron transportadas al laboratorio, en viales de 1,5 mm de RTF (323) y procesadas en las dos horas siguientes.

Procesado de las muestras

Las muestras se procesaron de la misma forma que en el estudio 1. Se cultivaron en dos medios de cultivo, selectivo y no selectivo:

- c) Placas de agar no selectivo (Oxoid 2, Oxoid Ltd., Basingstoke, Gran Bretaña) con sangre de carnero al 5% suplementado con hemina (5 mg/L) y menadiona (1 mg/L). Se incubaron a 37 °C, durante 14 días, en una atmósfera anaerobia con 80% de N₂, 10% H₂ y 10% de CO₂. Se identifican *F. nucleatum*, *C. rectus*, *M. micros*, *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *T. forsythensis*.
- d) Placas con Dentaaid-1 (113) para aislamiento selectivo de *A. actinomycetemcomitans*, siendo incubadas a 37 °C durante 3-5 días en aire con 5% de CO₂.

Identificación de las muestras

Cada colonia identificada de manera tentativa morfológicamente, era recontada en la placa de dilución apropiada y aislada en medio general. La identificación definitiva se basó en diversas pruebas: Tinción de Gram, aerotolerancia, morfología, actividad tripsínica con degradación de benzil-DL-arginina-2-naftilamida (Sigma. St Louis, EEUU), producción de nitrito desde nitrato, producción de indol desde triptófano, fermentación de la catalasa, producción de α -glucosidasa. Se recurrió a los perfiles de reacción para identificación de anaerobios, con el sistema API 32 A (Biomérieux, Le Balme Les Grottes, Francia) en caso de duda.

Las colonias de *A. actinomycetemcomitans* se identifican morfológicamente por su estructura con forma de estrella interior y por la reacción positiva ante la catalasa (3% de H₂O₂).

Variables microbiológicas

Se calcularon las siguientes variables:

- Unidades formadoras de colonia (UFC) total.
- Frecuencia de detección de cada patógeno.
- Porcentaje de flora de cada patógeno (en las localizaciones positivas).
- UFC de cada patógeno.

Análisis estadístico

El paciente fue considerado la unidad de análisis. Se calcularon medias por cada paciente y grupo de tratamiento. Las variables clínicas eran valoradas mediante Kruskal-Wallis. Además, para la valoración intra-grupo, las comparaciones entre las visitas se realizaban el test de los rangos señalados para muestras pareadas.

Las localizaciones fueron agrupadas según su profundidad de sondaje inicial en tres categorías, debido a las mediciones que se obtiene en la sonda Florida ® (326;327):

- Iniciales: menos de 3,5 mm
- Moderadas: entre 3,5 y 5,4 mm
- Profundas: más de 5,5 mm

Las variables microbiológicas eran procesadas de formas diferentes:

- Las UFC eran transformadas en logaritmos, para posteriormente, ser comparadas como las variables clínicas. Cuando la variable consideraba era la estrategia de toma de muestras y se consideraban los 20 pacientes se utilizaba el test-t para muestras pareadas.
- La frecuencia de detección de patógenos era comparada mediante el test de la chi-cuadrado.
- El porcentaje de flora de cada patógeno era comparado mediante el test de los rangos señalados.

Para la comparación de las estrategias de toma de muestras, se confeccionaron tablas de contingencia 2x2 para determinar, entre otros parámetros, la sensibilidad y especificidad y los valores de los tests de chi-cuadrado y de correlación de Pearson.

VI. RESULTADOS

Los resultados se presentan en cada modelo de evaluación.

ESTUDIO 1: EVALUACIÓN EN FASE DIAGNÓSTICA

Características de las poblaciones (Tabla 11, pág. 163)

Participaron 53 pacientes en el estudio, 33 formando parte del Grupo 1vs4 y 20 en el Grupo 2vs4.

Grupo 1vs4

La media de edad de los integrantes de este grupo fue de 46 años con rangos entre los 29 y 73 años. 14 pacientes eran mujeres y 19 eran hombres. Más de la mitad eran no-fumadores, un 54,5%. La gran mayoría (96,9%) reconocían cierto nivel de estrés en su vida. El 51,5% de los pacientes padecía una periodontitis crónica generalizada avanzada y un 45,4% generalizada moderada.

Grupo 2vs4

El rango de edades de los integrantes de este grupo oscilaba entre los 37 y 71 años, con un promedio de 48,3 años. 13 pacientes eran mujeres y 7 hombres. El 60% de los pacientes eran no-fumadores y el 90% reconocían cierto nivel de estrés en su vida. El 85% de los pacientes padecía una periodontitis crónica generalizada moderada y un 15% avanzada.

Características clínicas de las localizaciones

Las características clínicas de las localizaciones en que se tomaron muestras se encuentran en la **Tabla 12 (pág. 164)**.

Grupo 1vs4

La media de profundidad de sondaje fue de 7,5 mm en M1 y 6,1 mm en M4. La recesión media fue de 1 mm en M1 y 1,2 mm en M4. El porcentaje de sangrado al sondaje era mayor del 90 %, siendo los porcentajes mayores en M1 (96,9 %) en comparación con M4 (92,4 %). La presencia media de placa era del 96,9 % tanto en M1 como en M4. El porcentaje medio de supuración fue mayor en M1 (21,2 %) en comparación con M4 (15,9 %).

Grupo 1vs2

La profundidad de sondaje media de las localizaciones donde se tomaron las muestras fue de 6,4 mm en M2 y 5,7 mm en M4. La recesión media fue mayor en M2 (2,3 mm) que en M4 (1 mm). El porcentaje de sangrado al sondaje era mayor en M2 (97,4 %) que en M4 (91,8 %), igualmente pasó con el porcentaje medio de placa, que fue de un 95,6 % en M2 y un 94,4 % en M4. El porcentaje medio de supuración fue de un 20,4 % en M4 y un 15,4 % en M2.

Resultados microbiológicos

Unidades formadoras de colonia (UFC)

Grupo 1vs4

Los recuentos totales obtenidos en la muestra M4 eran significativamente mayores ($p < 0,001$) que los de M1 (**Tabla 13A, pág. 165**).

Los recuentos bacterianos para cada patógeno pueden verse en la **Tabla 13A (pág. 165)**. Los recuentos bacterianos eran mayores en M4 comparado con M1 para todos los patógenos. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos tipos de muestras para *P. gingivalis* ($p < 0,001$), *P. intermedia* ($p < 0,001$), *M. micros* ($p = 0,01$) y *F. nucleatum* ($p < 0,001$).

Grupo 2vs4

De forma similar a lo visto con los resultados obtenidos en el grupo 1vs4, se observaba una mayor cantidad de UFC total en M4 frente a M2, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,025$) (**Tabla 13B, pág. 165**).

Respecto a los recuentos de los diferentes patógenos, también eran mayores para M4, excepto para *C. rectus*, y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos tipos de muestras para *P. intermedia* y *F. nucleatum* ($p < 0,05$) (**Tabla 13B, pág. 165**).

Frecuencia de detección de cada patógeno

Grupo 1 vs 4

Todos los patógenos demostraron una mayor frecuencia de detección en M4, excepto *C. rectus* que tuvo una mayor frecuencia en M1 aunque las diferencias no alcanzaban el nivel de significación. Las muestras M1 dejaban de detectar cada patógeno en 2-5 pacientes. La mayor discordancia se producía con *M. micros*, ya que en 5 pacientes no se detectaba en M1 pero sí con M4 (**Tabla 14A, pág. 166**).

Grupo 2 vs 4

La frecuencia de detección de los patógenos fue similar con ambas estrategias, aunque *P. intermedia* presentaba una mayor prevalencia en M4 con un 80% versus un 65% en M2 (**Tabla 14B, pág. 166**). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas estrategias de toma de muestras.

Porcentaje de flora de cada patógeno en las localizaciones positivas

Grupo 1 vs 4

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de flora de cada patógeno detectado por cada una de las estrategias de toma de muestras. Las diferencias en el porcentaje de flora entre M1 y M4 oscilan entre 0,038% para *A. actinomycetemcomitans* y 2,1% de *P. intermedia*. El porcentaje de flora fue mayor en M1, comparándola con M4, para *T. forsythensis*, *M. micros*, *C. rectus* y *F. nucleatum* (**Tabla 15A, pág. 167**).

Grupo 2 vs 4

De la misma forma que en el grupo anterior, no existían diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de flora de cada patógeno detectado por cada una de las estrategias de toma de muestras. Las diferencias en el porcentaje de flora entre M2 y M4 oscilan entre 0,1% para *A. actinomycetemcomitans* y *C. rectus*, y 4,5% de *P. intermedia*. El porcentaje fue

mayor en M2 comparándolo con M4 para *P. gingivalis* y *T. forsythensis* (**Tabla 15B, pág. 167**).

Sensibilidad y especificidad de M1 y M2 respecto a M4

La representación y el cálculo matemático de la sensibilidad y especificidad se realizaron mediante la confección de tablas de contingencia 2x2, de la misma forma en que está representada en la **Tabla 2 (pág. 149)**. La sensibilidad y especificidad serán diferentes para cada patógeno estudiado y la estrategia de toma de muestras.

A. actinomycetemcomitans

M4 se considera el método de referencia (207;209;326) sobre el cual se comparan las otras estrategias de toma de muestras, M1 y M2. Los datos para *A. actinomycetemcomitans* se encuentran en las siguientes tablas de contingencia:

<i>A. actinomycetemcomitans</i>		M4		Total
		Test +	Test -	
M1	Test +	2	0	2
	Test -	2	29	31
Total		4	29	<i>n</i> =33
		S =0,500	E =1	
		M4		Total
		Test +	Test -	
M2	Test +	2	0	2
	Test -	0	18	18
Total		2	18	<i>n</i> =20
		S =1	E =1	
		S = Sensibilidad E = Especificidad		

Existe una concordancia absoluta en la detección de *A. actinomycetemcomitans* en M2 al compararlo con M4, ya que ambas estrategias de toma de muestras detectan los 18 pacientes negativos a dicho patógeno y los 2 pacientes positivos a *A. actinomycetemcomitans*. Este es el motivo de la obtención de una sensibilidad y especificidad del 100%.

De igual manera, al comparar M1 con M4 se observa una concordancia en la detección de los pacientes negativos a *A. actinomycetemcomitans*. Ambas estrategias de toma de muestras detectaron a los 29 pacientes negativos. Este es el motivo por el que la especificidad sea del 100%. Por el contrario, M1 no es capaz de detectar a todos los pacientes positivos para *A. actinomycetemcomitans* apareciendo dos falsos-negativos. De todos los pacientes positivos para *A. actinomycetemcomitans* sólo es capaz de detectar la mitad, por eso la sensibilidad de M1 es de un 50%.

En definitiva, se observa como M1 pierde dos pacientes positivos para M4. A pesar de esta diferencia, al realizar el análisis estadístico de los datos de sensibilidad y especificidad de M1 y M2, comparado con M4, se observa que son significativos para el test de la chi-cuadrado, lo que descarta significativamente que sean independientes, y para el test de Pearson, con lo que se observa una correlación significativa entre ambas estrategias (Tabla 16A y 16B, pág. 168).

P. gingivalis

Los datos de sensibilidad y especificidad, para *P. gingivalis* se calcularon según las siguientes tablas de contingencia:

<i>P. gingivalis</i>		M4		Total
		Test +	Test -	
M1	Test +	24	2	26
	Test -	3	4	7
Total		27	6	<i>n</i> =33
		S = 0,889	E = 0,667	
		M4		Total
		Test +	Test -	
M2	Test +	12	3	15
	Test -	1	4	5
Total		13	7	<i>n</i> =20
		S = 0,923	E = 0,571	
		S = Sensibilidad E = Especificidad		

Para un patógeno como *P. gingivalis*, con una prevalencia alta, se observan sensibilidades altas y especificidades bajas. De los 27 pacientes del grupo 1vs4 positivos para *P. gingivalis*, la estrategia de toma de muestras M1 sólo detecta a 24 pacientes, apareciendo 3 falsos-negativos. Sucede algo similar en el grupo 2vs4, de los

13 pacientes positivos para *P. gingivalis*, M2 sólo detecta a 12 apareciendo un falso-negativo. Estos datos ocasionan que la sensibilidad no alcance el 100%, siendo para M1 del 88,9% y para M2 del 92,3%. Se detectaron 6 pacientes en el grupo 1vs4 y 7 pacientes en el grupo 2vs4 negativos a *P. gingivalis*, pero tanto M1 como M2 solo detectaron 4 pacientes, con lo que aparecieron falsos-positivos. Este hecho hizo que la especificidad fuera de un 66,7% para M1 y un 57,1% para M2.

Al analizar los falsos-positivos y falsos-negativos, se observa como los resultados son similares entre los dos grupos. En el grupo 1vs4, se observa como M1 pierde tres pacientes positivos para M4, en cambio detecta dos pacientes positivos al patógeno pero que eran negativos para M4. De forma similar, en el grupo 2vs4 se observan tres falsos-positivos y un falso-negativo. Esta similitud de resultados puede deberse a la gran cantidad de patógenos en la fase diagnóstica. Al realizar el análisis estadístico de los datos de sensibilidad y especificidad de M1 comparado con M4 se observa que son significativos para el test de la chi-cuadrado, y para el test de Pearson. En cambio, al comparar M2 con M4 solamente se observa significación en el test de Pearson, correlacionando positivamente ambas estrategia de tomas (**Tabla 16A y 16B, pág. 168**). Por tanto, no se encuentran diferencias entre ambas estrategias de toma de muestras.

P. intermedia

Los datos sobre *P. intermedia* se pueden estudiar en las siguientes tablas de contingencia 2x2:

<i>P. intermedia</i>		M4		Total
		Test +	Test -	
M1	Test +	27	1	28
	Test -	3	2	5
Total		30	3	<i>n</i> =33
		S = 0,900	E = 0,667	
<i>P. intermedia</i>		M4		Total
		Test +	Test -	
M2	Test +	12	1	13
	Test -	4	3	7
Total		16	4	<i>n</i> =20
		S = 0,75	E = 0,75	
		S = Sensibilidad E = Especificidad		

La sensibilidad de M1 para *P. intermedia* es de un 90%; de los 30 pacientes positivos para este patógeno, M1 sólo pudo detectar a 27. La sensibilidad en M2 era de un 75%; de los 16 pacientes positivos para *P. intermedia*, solo hubo coincidencia entre ambas estrategias de toma de muestras en 12 pacientes. *P. intermedia* poseía una alta prevalencia en los grupos de estudio, solo 3 pacientes en el grupo 1vs4 y 4 pacientes en el grupo 2vs4 eran negativos para este patógeno. La especificidad era de un 66,7% en M1 y de 75% en M2.

Al analizar los falsos-positivos y falsos-negativos, se observa como en ambos grupos es mejor M4 en la detección del patógeno. M1 no detecta a tres pacientes positivos (3 falsos-negativos) y en M2 a cuatro pacientes. En cambio, se detecta un falso-positivo en M1 y en M2. Al realizar el análisis estadístico de los datos de sensibilidad y especificidad de M1 y M2 comparado con M4 observamos que son significativos para el test de Pearson, con lo que se observa una correlación significativa entre las estrategias de toma de muestras. En cambio, no se detectan significación estadística en el test de la chi-cuadrado (**Tabla 16A y 16B, pág. 168**).

T. forsythensis

Los datos de sensibilidad y especificidad para *T. forsythensis* se calcularon según las siguientes tablas de contingencia:

<i>T. forsythensis</i>		M4		Total
		Test +	Test -	
M1	Test +	8	1	9
	Test -	2	22	24
Total		10	23	<i>n</i> =33
		S = 0,800	E = 0,957	
		M4		Total
		Test +	Test -	
M2	Test +	1	0	1
	Test -	1	18	19
Total		2	18	<i>n</i> =20
		S = 0,5	E = 1	
		S = Sensibilidad E = Especificidad		

En el grupo 1vs4, se detecta *T. forsythensis* en 10 pacientes y no se detecta en 23. La aparición de falsos-positivos y negativos hace que la sensibilidad sea de un 80% y la especificidad de un 95,7%.

En el grupo 2vs4, se detecta *T. forsythensis* en 2 pacientes y no se detecta en 18. Existe una concordancia entre ambas estrategias de muestras en la detección de los pacientes negativos para este patógeno, este hecho provoca que la especificidad sea del 100%. En cambio, de los dos pacientes positivos para *T. forsythensis* en M4, sólo detectó 1 paciente M2; por tanto, la sensibilidad es de un 50%.

Ante el análisis de falsos-positivos y negativos, se observa que es ligeramente mejor M4 que el resto de estrategias. M1 no detecta a dos pacientes que M4 sí, aunque también aparece un falso-positivo, e igualmente M2 no detecta a 1 pacientes positivo en M4. A pesar de estas diferencias, al realizar el análisis estadístico de los datos de sensibilidad y especificidad de M1 con M4 son significativos para el test de la chi-cuadrado y para el test de Pearson. En cambio al comparar M2 y M4 solo es significativo el test de Pearson (**Tabla 16A y 16B, pág. 168**). No se puede determinar estadísticamente una capacidad mayor de M4 frente a las estrategias que se comparan.

M. micros

Los datos sobre *M. micros* se pueden estudiar en las siguientes tablas de contingencia 2x2:

<i>M. micros</i>		M4		Total
		Test +	Test -	
M1	Test +	17	3	20
	Test -	5	8	13
Total		22	11	<i>n</i> =33
		S = 0,773	E = 0,727	
		M4		Total
		Test +	Test -	
M2	Test +	7	2	9
	Test -	3	8	11
Total		10	10	<i>n</i> =20
		S = 0,7	E = 0,8	
		S = Sensibilidad E = Especificidad		

La sensibilidad de M1 para *M. micros* es de un 77,3% y la especificidad de un 72,7%. De los 22 pacientes positivos para *M. micros* hubo 5 falsos-negativos, y de los 11 pacientes negativos para *M. micros* hubo 3 falsos-positivos. El test de la chi-cuadrado y Pearson eran significativos (**Tabla 16A, pág. 168**). M4 obtenía los mejores resultados pero sin significación estadística.

La sensibilidad de M2 para *M. micros* fue de un 70% y la especificidad de un 80%. De los 10 pacientes positivos para *M. micros* hubo 3 falsos-negativos, y de los 10 pacientes negativos para dicho patógeno hubo 2 falsos-positivos. El test de Pearson señalaba una correlación significativa entre ambas muestras, aunque no se descartó significativamente que fueran independientes por el test de la chi-cuadrado (**Tabla 16B, pág. 168**).

C. rectus

Los datos de sensibilidad y especificidad para *C. rectus* se calcularon según las siguientes tablas de contingencia:

<i>C. rectus</i>		M4		Total
		Test +	Test -	
M1	Test +	0	5	5
	Test -	3	25	28
Total		3	30	<i>n</i> =33
		S = 0	E = 0,833	
		M4		Total
		Test +	Test -	
M2	Test +	1	2	3
	Test -	2	15	17
Total		3	17	<i>n</i> =20
		S = 0,333	E = 0,882	
		S = Sensibilidad E = Especificidad		

La sensibilidad de M1 para *C. rectus* es del 0%; este dato se debe a que la estrategia de toma de muestras M4 detecta 3 pacientes positivos a *C. rectus* pero M1 no detecta ninguno. La especificidad es de un 83,3%, en 25 pacientes hay una concordancia entre los resultados obtenidos con ambas estrategias de toma de muestras, pero hubo 5 falsos-positivos; 5 pacientes son positivos en M1 mientras que negativos en M4. Al comparar

ambas estrategias de toma de muestras, M1 es mejor que M4 aunque el test de la chi-cuadrado y de Pearson no observan relaciones significativas entre ambas estrategias (Tabla 16A, pág. 168).

Al comparar M2 con M4, la sensibilidad es baja (33,3%) ya que de los 3 pacientes positivos a *C. rectus*, M2 solo es capaz de detectar a 1, apareciendo 2 falsos-negativos. La especificidad es de un 88,2%, de los 17 pacientes negativos a este patógeno, solo aparecen 2 falsos-positivos. No existen relaciones significativas entre ambas estrategias de toma de muestras según el test de la chi-cuadrado y de Pearson (Tabla 16B, pág. 168), ya que aparecen el mismo número de falsos-negativos y falsos-positivos.

F. nucleatum

Los datos referentes a *F. nucleatum* se calcularon con las siguientes tablas de contingencia 2x2:

<i>F. nucleatum</i>		M4		Total
		Test +	Test -	
M1	Test +	30	0	30
	Test -	3	0	3
Total		33	0	<i>N</i> =33
		S = 0,909	E = -	
		M4		Total
		Test +	Test -	
M2	Test +	19	0	19
	Test -	1	0	1
Total		20	0	<i>N</i> =20
		S = 0,950	E = -	
		S = Sensibilidad E = Especificidad		

Todos los pacientes en ambos grupos de estudio, grupos 1vs4 y 2vs4, eran positivos para este patógeno. Este es el motivo por el que no se pudo calcular la especificidad en ambas estrategias de toma de muestras. En cuanto a la sensibilidad fue del 90,9% en M1 y de 95% en M2. Se observa como M1 no detecta a tres pacientes positivos y M2 a un paciente. M4 parece ser la estrategia más idónea pero debido a los resultados no se pudo realizar la comparación estadística utilizando el test de la chi-cuadrado y Pearson (Tabla 16A y B, pág. 168).

ESTUDIO 2: EVALUACIÓN EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO PERIODONTAL NO-QUIRÚRGICO

Características de los pacientes (Tabla 17, pág. 169)

Participaron 20 pacientes en el estudio. Cada grupo de tratamiento estuvo compuesto por cinco pacientes.

La edad media de los pacientes fue de 48,3 años; el rango de edades oscilaba entre 41,8 (DB-c) y 52,8 (DB-us). Los grupos de tratamiento fueron homogéneos no encontrándose diferencias significativas entre ellos.

La mayoría de los pacientes eran no fumadores (60 %) o fumadores de menos de 10 cigarrillos al día (30 %).

13 pacientes eran mujeres y 7 hombres, con una distribución semejante en los grupos de tratamiento.

La mayoría de los pacientes (90 %) reconocían algo de estrés en sus vidas.

Resultados clínicos

Profundidad de sondaje

La profundidad de sondaje media se reducía en todos los grupos de tratamiento tras el primer mes post-tratamiento (**Tabla 18, pág. 170**) aunque no se alcanzaba la significación estadística ($p=0,06$). Durante este periodo, las diferencias entre los grupos de tratamiento no fueron significativas mediante el test Kruskal-Wallis. A los tres meses, las reducciones en PS se mantenían en todos los grupos, pero los grupos que realizaban el tratamiento en 24 horas mostraban una reducción media mayor en PS (0,6-0,8 mm), al compararlo con el grupo TC (0,5 mm) aunque no se alcanzaban la significación estadística ($p=0,06$). A los seis meses, se observaba una tendencia similar; se producía una mayor reducción en la profundidad de sondaje de los grupos en que se había efectuado el raspado en 24 horas (DB-c, DB-us y DB-chx), con rangos que oscilaban entre 0,7-0,8 mm, mientras que en el grupo TC se conseguía una reducción de 0,5 mm. Las diferencias entre la visita inicial y 6 meses no alcanzaron la significación estadística en los grupos de tratamiento ($p=0,06$). Al comparar entre sí los grupos de

tratamiento en los periodos comprendidos entre la visita inicial y los tres meses y la visita inicial y los 6 meses, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas intergrupales en los cambios ocurridos.

Analizando los datos según la profundidad de bolsa inicial (**Tabla 18, pág. 170**), a los 6 meses los cambios promedios en la profundidad de sondaje para las bolsas poco profundas en la visita inicial (0-3,4 mm) variaban entre 0,2-0,4 mm. Únicamente existió cierta tendencia a la significación estadística en las reducciones del grupo DB-chx ($p=0,06$). Las diferencias entre los grupos no fueron estadísticamente significativas. Para bolsas iniciales moderadas (3,5-5,4 mm), la disminución en la profundidad de sondaje variaba entre 1,3-1,8 mm a los 6 meses. En los grupos en que el tratamiento se realizaba en 24 horas, los cambios en PS oscilaban entre 1,5-1,8 mm y fueron mayores que los cambios en el grupo TC, cuya reducción era de 1,3 mm. Sin embargo, ninguna de las diferencias entre los grupos fue estadísticamente significativa. En bolsas iniciales profundas ($>5,4$ mm), la disminución en la profundidad de sondaje variaba entre 2,4-2,6 mm tras 6 meses; estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Las diferencias entre los grupos no fueron estadísticamente significativas.

Si consideramos el porcentaje de localizaciones en cada una de las tres categorías de profundidad de sondaje en cada visita (**Tabla 19, pág. 171**), se encontró que el porcentaje de bolsas profundas se reducía en todos los grupos tras seis meses (1,5-5,2%), no consiguiendo alcanzar la significación estadística. Además, el porcentaje de bolsas moderadas se redujo entre un 15,4-20,6% a los seis meses, las diferencias presentaban cierta tendencia a la significación estadística ($p=0,06$). Por el contrario, la proporción de bolsas iniciales aumentó en todos los grupos ($p=0,06$), con rangos entre un 15,5-25,8%. Los mayores cambios en todos los intervalos corresponden al grupo DB-chx. Cuando se realizó la comparación entre los grupos, no se observó diferencias significativas.

Nivel de inserción clínica (**Tabla 20, pág. 172**)

La ganancia de inserción, observada al mes tras el tratamiento, variaba entre 0,1-0,7 mm, las diferencias no alcanzaban la significación estadística ($p=0,06$). Tras tres meses, la ganancia de inserción oscilaba entre 0,5-0,6 mm, con diferencias con tendencia a la significación para los grupos TC, DB-us y DB-chx ($p=0,06$). La ganancia media de

inserción a los seis meses variaba, según el grupo de tratamiento, entre 0,5-0,8 mm, obteniéndose diferencias con tendencia a la significación cuando se compara con la visita inicial en todos los grupos ($p=0,06$). Cuando se realizaron las comparaciones entre los grupos de tratamiento, el promedio de nivel de inserción entre la visita inicial y al mes fue significativamente mayor ($p=0,01$) para los grupos DB-c y DB-chx, que para DB-us.

Al realizarse el análisis según la profundidad de sondaje inicial, se observó en las bolsas profundas una media de la ganancia de inserción entre 2,0-2,6 mm, existiendo cierta tendencia a la significación en el grupo DB-us ($p=0,06$). Las diferencias entre los grupos no fueron estadísticamente significativas. En bolsas moderadas, la ganancia de inserción fue de 1,0-1,9 mm a los seis meses, existiendo cierta tendencia a la significación estadística para los cambios en todos los grupos de tratamiento ($p=0,06$). Los mejores resultados se observaron en DB-us y DB-chx con 1,6 y 1,9 mm, respectivamente y las menores ganancias fueron de 1,0 y 1,1 mm para TC y DB-c, respectivamente. Se detectaron diferencias entre los grupos, en el periodo comprendido entre la visita inicial y seis meses, el grupo DB-chx obtenía mayor ganancia de inserción al compararlo con TC y DB-us ($p<0,05$). En bolsas iniciales, se observaban cambios limitados en el nivel de inserción; las ganancias oscilaban entre 0,1-0,3 mm, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Valorando las diferencias entre los grupos al mes, la ganancia de inserción en los grupos TC, DB-c y DB-chx fue estadísticamente mayor ($p<0,05$) que en el grupo DB-us (que mostró pérdida de inserción).

Nivel de inserción relativo (Tabla 21, pág. 173)

En cuanto al NIR en las localizaciones seleccionadas, se observó al mes una ganancia media significativa ($p<0,05$) en DB-c y DB-chx, pero no en el grupo TC y DB-us. El NIR variaba de 0,38 mm obtenido en el grupo TC a 1,36 mm en el grupo DB-chx. Las diferencias entre los grupos no alcanzaban la significación estadística.

A los tres meses, la ganancia promedio de NIR fue estadísticamente significativa ($p\leq 0,05$) al compararla con la visita inicial en todos los grupos, y mayor en los grupos donde el tratamiento se realizaba en 24 horas (0,82-1,10 mm), en comparación con el grupo TC (0,68 mm).

A los seis meses, la ganancia promedio de NIR iba desde 1,40 mm obtenido en el grupo DB-chx, a 0,80 mm del grupo TC. Estas ganancias del NIR eran estadísticamente significativas para todos los grupos de tratamiento ($p \leq 0,05$).

Índice de Placa (Tabla 22, pág. 174)

Las medias del índice de placa medio fueron altos en todos los grupos de tratamiento, y el rango variaba entre un 80-97%. Los niveles se reducían en todos los grupos tras un mes y se mantenían estables a lo largo del estudio, con excepción del grupo DB-us en que se observaba una mayor reducción a los tres meses. La reducción se mantenía a los tres y seis meses. Estas reducciones en cada grupo de tratamiento no alcanzaban la significación estadística ($p=0,06$). Los cambios en el índice de placa entre los grupos de tratamiento no fueron estadísticamente significativos).

Sangrado al sondaje (Tabla 23, pág. 175)

El sangrado al sondaje inicial variaba entre un 50-71% en los cuatro grupos de tratamiento. No se observaban diferencias significativas entre los grupos en la evaluación inicial. La reducción en el sangrado al sondaje fue similar en todos los grupos de tratamiento tras uno (20-27%), y tres meses (26-36%). Sin embargo, a los 6 meses, mientras los grupos DB-c, DB-chx y TC mantenían la tendencia de reducción (30-47%), consiguiendo valores de SS entre 26-32%, el grupo DB-us presentaba un importante incremento, obteniendo el valor final mayor (37%). Las diferencias en los valores SS entre las distintas visitas no alcanzaban la significación estadística ($p=0,06$). Las diferencias en el sangrado al sondaje entre los grupos a los 6 meses no fueron significativas para ninguno de los grupos de tratamiento.

Resultados microbiológicos

Se procesaron dos muestras distintas: M2 que es la muestra de dos localizaciones del primer cuadrante tratado; y M4 que es la muestra de cuatro localizaciones de la boca del paciente.

Recuentos totales (Tabla 24, pág. 176)

Los recuentos totales se reducían a los seis meses tras el tratamiento. Estas reducciones fueron estadísticamente significativas en M4 ($p=0,05$), pero no en M2, aunque se observaba una tendencia a la significación ($p=0,06$). Las reducciones a uno y tres meses fueron también evidentes, pero no significativas.

Considerando todos los pacientes, los recuentos totales de bacterias fueron significativamente mayores ($p \leq 0,05$) en M4, al compararlas con M2, en todas las visitas. Lo mismo era cierto en cada uno de los grupos de tratamiento, pero sin alcanzar la significación estadística.

En todos los grupos de tratamiento se observó un descenso continuo en el recuento total de bacterias en cada visita. Se encontraron tres excepciones: el grupo DB-c presentaba un pequeño incremento desde la visita inicial a un mes en M4, y desde un mes a tres meses en M2, lo mismo sucedía en el grupo DB-us. El grupo DB-chx presentaba un incremento en el periodo comprendido entre los tres y los seis meses en M4, siendo el único grupo donde el valor final del recuento total de bacterias no era menor que en la visita inicial.

Actinobacillus actinomycetemcomitans

Solo dos muestras fueron positivas para este patógeno en la visita inicial, considerando ambas estrategias de toma de muestras (M4 y M2). Ninguna muestra fue positiva tras el tratamiento.

Se detectó una total concordancia en los resultados entre las dos estrategias de toma de muestras a lo largo de todo el estudio.

Porphyromonas gingivalis (Tabla 25, pág. 177)

Considerando todos los pacientes, la frecuencia detección para M4 fue bastante estable, los rangos iban del 50% al 65%. Por el contrario, M2 mostraba un descenso significativo al mes ($p=0,003$) (de un 74 % a un 40 %), pasando a un 50 % y un 55 % a los tres y seis meses respectivamente.

Si consideramos cada uno de los grupos de tratamiento, en el grupo TC la frecuencia de detección se redujo, y esta reducción fue confirmada por ambas estrategias de toma de muestras. En el grupo DB-c, no se observaba casi ningún efecto, y la mayoría de los pacientes permanecieron positivos a lo largo del desarrollo del estudio, este hallazgo fue confirmado por ambas estrategias de toma de muestras. En el grupo DB-us, casi no se detectaba ningún efecto mediante M4, mientras que para M2 se observaba un importante descenso a un mes, a los tres meses se producía un rebote, y a los 6 meses un nuevo descenso. En el grupo DB-chx se detectaron pequeños cambios, a pesar que con M4 se detectó un importante descenso a los tres meses, y con M2 al mes.

La proporción de flora total en las localizaciones positivas se reducía de manera importante tras el tratamiento, aunque a los tres y seis meses se producía un nuevo aumento. En cambio, mediante M2 se observaba un descenso en el periodo de tiempo comprendido entre los tres y los seis meses. Este patrón era válido para todos los grupos de tratamiento y para la muestra completa.

Cuando se comparaban ambas estrategias de toma de muestras por su capacidad en la detección de bacterias (**Tabla 33, pág. 185**), el rango de sensibilidad variaba entre 0,462 en la visita a 1 mes tras el tratamiento a 0,923 en la visita inicial (en la visita a 3 y 6 meses la sensibilidad fue de 0,8 y 0,667 respectivamente) y la especificidad fue semejante con rangos que oscilaban entre 0,571-0,875. Las discordancias se basaron, principalmente en los positivos encontrados en M4 a uno y seis meses que no se detectaban en M2 (7 falsos-negativos en la visita a 1 mes y 4 falsos-negativos a los 6 meses), y a los positivos en M2 que eran negativos en M4 (4 falsos-positivos a los 3 meses) (**Tabla 29, pág. 181**). El análisis estadístico con el test de Pearson demuestra una correlación significativa entre ambas estrategias de muestras en la visita inicial, a los tres y seis meses. En cambio, al mes tras el tratamiento no se detecta una correlación significativa entre M2 y M4 (**Tabla 33, pág. 185**). Tras el tratamiento, se produce un descenso en la cantidad de patógenos, ésta puede ser la razón por la que las diferencias entre ambas estrategias de toma de muestras aumentan.

P. intermedia / nigrescens (**Tabla 26, pág. 178**)

La frecuencia de detección era estable en las diferentes visitas: 79-90 % con M4, y un 63-70 % para M2. No se detectaba ningún efecto causado por el tratamiento. Al realizar

el análisis por grupo de tratamiento, la mayoría de los grupos mostraba el mismo patrón sin cambios con M4, con una excepción, el grupo DB-c, que se caracterizaba por una frecuencia inicial baja, que aumentaba con el tratamiento, manteniendo valores similares a lo largo del resto del estudio. Los resultados de M2 eran más variables, especialmente para los grupos TC y DB-c.

La proporción de flora total permanecía sin cambios a lo largo del estudio: los rangos variaban entre 10,6-12,5% para M4, a los 7,4-8,6% (existe una excepción, a un mes se detectaba un 3,6%) para M2. El único efecto del tratamiento se detectaba al mes cuando se producía una clara reducción en M2, seguido de un rebote hacia niveles iniciales a los tres y seis meses. Cuando consideramos los grupos de tratamiento y las muestras M4, el grupo TC mantenía sus valores estables, mientras que los otros grupos presentan un claro descenso al mes, a continuación se mantenían estables (como el grupo DB-c) o se producía un claro rebote de los valores (grupos DB-us y DB-chx). Con M2 se observaron unos patrones menos claros.

Al comparar las dos estrategias de toma de muestras (**Tabla 33, pág. 185**), la sensibilidad fue alta (0,750-0,647), mientras que la especificidad fue muy variable según la visita (0,000-1,000), probablemente debido a la alta frecuencia de detección. La mayoría de las discordancias se producían por el gran número de falsos-negativos en M2 (6 en la visita al mes tras el tratamiento, 5 a los tres meses y 4 a los seis meses), en cambio aparecieron pocos falsos-positivos (1 en la visita inicial y al mes, 2 a los tres meses) (**Tabla 30, pág. 182**). M4 parece ser la estrategia idónea en todas las evaluaciones aunque de manera similar a lo que ocurría con *P. gingivalis*, el test de Pearson detecta una correlación significativa entre ambas estrategias de toma de muestras en la visita inicial y a los seis meses. En cambio, al mes y a los tres meses no se detectó esta correlación (**Tabla 33, pág. 185**).

Tannerella forsythensis

Muy pocas muestras fueron positivas para este patógeno (uno o dos pacientes por visita). Las muestras positivas siempre se producían con la estrategia de cuatro localizaciones (M4), o con ambas muestras. Nunca se dio en M2 únicamente.

Micromonas micros (Tabla 27, pág. 179)

Cuando consideramos M4, la frecuencia de detección de esta especie bacteriana permanecía estable, sin cambios durante los tres primeros meses (47-55%), mientras que se detectaba un descenso claro a los 6 meses (32%). Por el contrario, con M2, la prevalencia era bastante estable (39-47%), excepto a los tres meses (25%). Cuando analizamos los resultados teniendo en cuenta cada uno de los grupos de tratamiento, no se distinguía ningún patrón en ninguna de las estrategias de toma de muestras.

Con M4, se observaba en la proporción de flora total un descenso tras el tratamiento y un rebote a los 6 meses, mientras que con M2 se observaba un descenso continuo durante todo el desarrollo del estudio. No se pudo distinguir ningún patrón que se pudiera evaluar en cada grupo de tratamiento.

Cuando comparamos las estrategias de toma de muestras (Tabla 33, pág. 185), la sensibilidad oscilaba entre 0,500-1,000 según la visita y la especificidad entre 0,800-1,000 según la visita, los valores menores se dieron al mes tras el tratamiento. Las diferencias estaban basadas en las muestras M4 positivas y no correspondidas en M2, hubo gran número de falsos-negativos, especialmente claros en las visitas a uno y tres meses (Tabla 31, pág. 183). El análisis estadístico demuestra la correlación significativa entre M2 y M4 en la visita inicial, a los tres y seis meses; en cambio, al mes no se detectó esta correlación significativa. A los seis meses, el test de la chi-cuadrado descarta de forma significativa que ambas estrategias sean independientes.

Fusobacterium nucleatum (Tabla 28, pág. 180)

Casi todas las muestras fueron positivas para esta especie bacteriana tanto en cada visita como con ambas estrategias de toma de muestras. No se detectó ningún tipo de efecto del tratamiento. La frecuencia de detección se mantuvo en valores muy altos 80-100% en todos los grupos de tratamiento durante todo el estudio

La proporción de flora total permanecía estable en M4 (10,6-12,5%), en cambio, se observaba un descenso en la proporción mediante M2, pero únicamente a los 6 meses (con un rango de valores que variaba desde 11,6%-13,8% a un 6,9%). Cuando se comparan los grupos de estudio, se observaban patrones muy similares tanto M4 como para M2. El primer patrón (se da en los grupos TC, DB-c y DB-us) mostraba un

incremento al mes, un descenso en el periodo comprendido entre la visita al mes y a los tres meses, y cierta variabilidad entre los tres y seis meses, pero con un valor final similar a lo obtenido en la visita inicial. En el segundo patrón, que se daba en el grupo DB-chx, se producía un importante descenso tras el tratamiento, con un rebote a los tres meses y, posteriormente, se producía un descenso adicional, con valores finales mucho más bajos que los valores iniciales.

Cuando comparamos las estrategias de toma de muestras (**Tabla 33, pág. 185**), la sensibilidad fue casi perfecta (0,950), mientras que la especificidad no fue posible calcularla en el resto de visitas. Estos resultados estaban basados en una frecuencia de detección de casi el 100% (95%-100%), limitando, por tanto la validez de la comparación entre ambas estrategias. En todas las visitas apareció un falso-negativo en M2 (**Tabla 32, pág. 184**).

VII. DISCUSIÓN

Los datos del presente trabajo demuestran, en dos estudios diferentes, la influencia de la metodología microbiológica sobre los resultados logrados, más concretamente, la influencia de la estrategia de toma de muestras microbiológicas.

La elección de los dos modelos de evaluación se basó en la importancia que alcanza el análisis microbiológico en ambos, tanto en la fase diagnóstica como en la evaluación de la respuesta a distintas modalidades de tratamiento periodontal no-quirúrgico. Al determinarse que las bacterias son las encargadas del inicio y progresión de las enfermedades periodontales (6;11;34;256), todos los esfuerzos se han centrado en el control de la infección para curar la enfermedad. Para establecer el control de la infección como el objetivo fundamental es necesario conocer el agente etiológico en la fase diagnóstica, y la forma de conseguirlo es obteniendo una muestra representativa de la microbiota subgingival de la boca del paciente. Cumplir este objetivo es donde radica la importancia de una estrategia de toma de muestras adecuada. En el estudio 1, se estudia la influencia de distintas estrategias de toma de muestras en los resultados obtenidos.

Además, conocer el agente etiológico de la infección nos debe llevar a diseñar un plan de tratamiento encaminado a la eliminación de dicho agente causal. Existen diferentes tratamientos periodontales que pueden poseer distinta eficacia anti-infecciosa. En el estudio 2 estudiamos la eficacia clínica y microbiológica de cuatro modalidades de tratamiento periodontal no-quirúrgico, y determinamos la influencia de la estrategia de toma de muestras en los resultados microbiológicos obtenidos. El problema surge porque una buena capacidad anti-infecciosa de una modalidad de tratamiento puede deberse a una “verdadera” eficacia microbiológica del propio tratamiento, o a una incapacidad para tomar una muestra representativa de la cavidad oral, lo que ocasiona que no detectemos ciertos patógenos periodontales dando por hecho que los hemos erradicado cuando en realidad continúan en la cavidad oral del paciente. Por tanto, establecer una correcta estrategia de toma de muestras microbiológicas tras el tratamiento periodontal es fundamental para conocer la capacidad anti-infecciosa de cada modalidad terapéutica.

ESTUDIO 1: EVALUACIÓN EN FASE DIAGNÓSTICA

En la fase diagnóstica, se debe establecer el patrón microbiológico causante de la enfermedad. Esta afirmación cobra mayor importancia cuando los distintos tipos de periodontitis, aunque sus características clínicas sean similares, pueden poseer diferentes patrones de composición del biofilm subgingival (134;246). Este hecho puede tener implicaciones en el diseño del plan de tratamiento, que puede ser diferente según la composición del biofilm subgingival, por ejemplo, con el uso de antibioterapia sistémica específica según el caso (32;328) y en el control posterior en la fase de mantenimiento, donde la ausencia de estos patógenos es el mejor indicador de salud periodontal, y su presencia supone riesgo de periodontitis (236;241).

Prevalencia de patógenos en las poblaciones de estudio

Se analizó la prevalencia de los patógenos en los dos grupos (grupo 1vs4 y grupo 2vs4), evaluados en la fase diagnóstica utilizando los datos obtenidos con las distintas estrategias de toma de muestras (M1, M2 y M4).

Cuando se evalúa la presencia de *A. actinomycetemcomitans* mediante cultivo en pacientes con periodontitis, la prevalencia que se ha determinado es baja (20-40%) en diferentes estudios alrededor del mundo. En España, se han demostrado prevalencias mucho más bajas del 6,3% (114) y del 3,2% (329) en pacientes periodontales. Estos datos corresponden a dos estudios distintos en que se utilizaron medios de cultivos selectivos para *A. actinomycetemcomitans* diferentes. Los datos obtenidos en el presente estudio mostraron una prevalencia baja en los dos grupos evaluados. En el grupo 1vs4, la prevalencia utilizando la estrategia de muestras M1 fue de 6% mientras que utilizando M4 fue del 12%. En cambio, en el grupo 1vs2 fue del 10% con ambas estrategias de toma de muestras, M2 y M4. Estos datos son ligeramente superiores a los datos obtenidos en estudios anteriores en España (114;329). Con otros tests microbiológicos como la PCR, los datos son muy heterogéneos aunque las prevalencias son mayores. En España se ha determinado una prevalencia del 18,8% (114), mientras que en otras partes del mundo las prevalencias eran muy superiores, por encima del 60% (114). La explicación de estas diferencias puede deberse a factores como variaciones en la selección de pacientes, metodología del estudio, diferentes serotipos bacterianos o incluso diferencias geográficas verdaderas. En cultivos, la metodología microbiológica puede influir en los resultados, ya que la selección del medio puede

tener diferente capacidad para favorecer el crecimiento de la bacteria, por ejemplo, para el cultivo de *A. actinomycetemcomitans* se han utilizado TSBV (112) y Dentaid-1 (113). También la estrategia de toma de muestras puede influir, y los datos del estudio muestran como la prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* en una misma población utilizando M4 es el doble que utilizando M1. Si sólo utilizásemos M1 en el análisis microbiológico no detectaríamos un 6% de pacientes con *A. actinomycetemcomitans* formando parte del biofilm subgingival.

La prevalencia de *P. gingivalis* en el grupo 1vs4 fue del 79% con la estrategia de toma de muestras M1 y de un 82% con M4. En el grupo 2vs4, los datos de prevalencia fueron inferiores, de un 75% en M2 y de un 65% en M4. Los datos del presente estudio están en concordancia con otros realizados en España donde la prevalencia fue del 84,4% (114). Sin embargo, estos resultados son mayores que los señalados por otros estudios que han utilizado el cultivo como test microbiológico, con rangos oscilando entre 27-51% (329). Existen diferencias geográficas en la prevalencia de este patógeno, ya que se ha demostrado la mayor prevalencia de este patógeno en España frente a otros países como los Países Bajos (267). Utilizando otros métodos microbiológicos como la PCR, la prevalencia es muy heterogénea según el estudio, pero siempre superior al 50% (114).

La prevalencia de *T. forsythensis* en el grupo 1vs4 fue del 27% con M1 y del 30% con M4; en cambio, las prevalencias fueron menores en el grupo 2vs4, un 5% con M2 y 10% con M4. Estos datos son similares a los obtenidos en otros estudios, en los que se ha obtenido una prevalencia del 25% en pacientes con periodontitis (114). Pero estos porcentajes son mucho menores que los obtenidos en España, con una prevalencia del 64,5% (329). Estos datos no son corroborados con el presente estudio. Utilizando métodos de biología molecular como la PCR, los datos han demostrado prevalencias muy altas, llegando hasta el 100% en pacientes con periodontitis y un 73,3% en pacientes sanos (114). Las diferencias tan llamativas entre ambos tests microbiológicos pueden deberse a que *T. forsythensis* es un anaerobio estricto que crece muy lentamente en un medio no selectivo. El agar sangre puede no ser el mejor medio ya que se requerirá otras bacterias como *P. gingivalis* o *F. nucleatum* que aporten al medio ácido N-acetil-murámico, esencial para su crecimiento. Basados en estos estudios puede ser recomendable utilizar un medio selectivo enriquecido con N-acetil-murámico para favorecer el crecimiento de *T. forsythensis*.

Las prevalencias de *F. nucleatum* y *P. intermedia* fueron muy altas. *F. nucleatum* se detectó en el 100% de los pacientes con M4 en los dos grupos evaluados; con M1 la prevalencia fue de 91% en el grupo 1vs4 y de un 95% con M2 en el grupo 2vs4. La prevalencia de *P. intermedia* fue mayor en el grupo 1vs4 que en el grupo 2vs4, fue de 85% y 91% en M1 y M4 respectivamente, y de un 65% y 80% en M2 y M4 respectivamente. *M. micros* presentaba prevalencias mayores en el grupo 1vs4 que en el grupo 2vs4. En el grupo 1vs4, la prevalencia fue de 61% en M1 y un 67% en M4 mientras que en el grupo 2vs4, la prevalencia fue de 45% en M2 y un 50% en M4. La prevalencia de *C. rectus* es similar en ambos grupos de pacientes, un 9-15% en el grupo 1vs4 y de un 15% en el grupo 2vs4.

Estrategias de toma de muestras

La metodología microbiológica utilizada para la evaluación del biofilm subgingival es muy variada. Existen diferentes procedimientos de toma de muestras, diferentes estrategias y diferentes tests para analizar las muestras. Ante esta variedad de procedimientos, cada uno de ellos debe justificarse y validarse mediante estudios clínicos bien diseñados. La información generada por el método de análisis microbiológico va a ser dependiente de la técnica y estrategia en la toma de las muestras. El objetivo, y por tanto, el mayor problema al que debe enfrentarse el método de toma de muestras, es su capacidad para obtener una muestra representativa del biofilm subgingival.

Los datos del estudio muestran que la selección, y el número de las localizaciones dónde se realiza la toma de la muestra subgingival, influyen en la identificación y enumeración de los patógenos detectados en la fase diagnóstica.

La muestra de cuatro localizaciones (M4) ha sido ampliamente utilizada en muchos estudios clínicos y ha demostrado su eficacia en la obtención de una muestra representativa de la microbiota subgingival en la fase diagnóstica (206;208;326). Esta técnica implica la selección de la localización más enferma en cada cuadrante y su procesamiento de forma agrupada. Mombelli y col. han demostrado la superioridad de M4 para detectar *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* en comparación con otros protocolos como la selección de la localización más enferma de la boca, de las dos localizaciones más enfermas, de las localizaciones mesiales de los primeros molares de

la arcada superior y de las localizaciones mesiales de todos los primeros molares (206;208). De igual forma, Haffajee y col. valoraron seis protocolos diferentes de estrategia de toma de muestras, comparando los resultados con las muestras subgingivales tomadas de mesial de cada diente (28 muestras por paciente) en 62 pacientes con periodontitis. Los resultados desvelaron que, de todos los pacientes positivos para determinadas especies bacterianas, si sólo se tomaban las muestras del primer molar superior derecho, no se detectaban el 68% de los pacientes positivos a las mismas; si se tomaban los dos primeros molares superiores no se detectaban el 55% de los pacientes; el 36% si se utilizaban los cuatro primeros molares; el 28% si se elegían los 6 dientes propuestos por Ramfjord; el 60% si se tomaba una muestra de la bolsa más profunda; y un 25% si se seleccionaban las cuatro bolsas más profundas (181). El porcentaje de error era mayor cuanto más infrecuentes eran las especies bacterianas a detectar, como *A. actinomycetemcomitans*. Estos datos vienen a concluir que cuantas más muestras tomemos de la boca del paciente menos falsos-negativos obtendremos (181). Idealmente tendríamos que tomar muestras de todas las localizaciones para evitar los falsos-negativos, este hecho sería muy costoso y por eso hemos de llegar a un equilibrio donde seleccionemos una estrategia en la cual tomemos un número mínimo de muestras que a su vez obtenga un mínimo número de falsos-negativos.

Se han propuesto otras estrategias diferentes en la toma de muestras. En la valoración microbiológica del enfoque en desinfección en boca completa (“*full-mouth disinfection*”) (281;305-310) se realizaba la evaluación de un único cuadrante en toda la boca y se asumía que lo que ocurría en ese cuadrante era extrapolable al resto de los cuadrantes. En los últimos años, el desarrollo de los nuevos métodos de análisis microbiológico, mucho más sensibles, permite proponer otros enfoques, como tomar una única muestra de la localización más enferma de la boca (M1) para determinar el patrón de la microbiota subgingival. El problema a resolver es conocer si el patrón microbiológico detectado en la muestra de un cuadrante, o de una única localización, puede ser representativo de la boca completa del paciente.

La comparación de las diferentes estrategias de toma de muestras es complicada, ya que debe ser la única variable de análisis para poder validarlas. Este es el motivo por el que se seleccionaron dos grupos de pacientes, comparando dos estrategias distintas en cada uno de ellos. Con este diseño se evitaba que el biofilm subgingival se viera alterado por

la toma de muestras repetidas, ya que no podría saberse si las diferencias encontradas eran debidas a la estrategia seleccionada o a la alteración del medio ambiente subgingival. Se tomó esta decisión en el diseño a pesar de que las puntas de papel poseen una buena reproducibilidad (198;199).

Teniendo en cuenta que se ha utilizado el método de referencia, el cultivo, para analizar las muestras, los resultados de la investigación demuestran que existen diferencias significativas entre los recuentos totales de anaerobios obtenidos con una única localización (M1), o con dos localizaciones de un mismo cuadrante (M2), frente a la muestra agrupada (M4). Esto es lógico, pero la menor cantidad de bacterias puede generar la presencia de falsos-negativos en la detección de determinados patógenos periodontales. Esto se debe al alto umbral relativo de detección del cultivo, situado para los patógenos periodontales en torno a 10^3 - 10^4 . Además, las muestras han de manejarse cuidadosamente para que las bacterias recogidas sean viables. No todas las bacterias pueden ser cultivadas, y durante el proceso de toma y cultivo de la muestra muchas de ellas pueden ser incapaces de sobrevivir al estrés acumulado en el proceso. Por tanto, cuanto mayor sea el recuento total obtenido, mayor probabilidad se tendrá de que podamos detectar los patógenos en la muestra. Esta afirmación podría variar si en vez del cultivo se seleccionara otro método de análisis bacteriano mucho más sensible como la PCR (225-227), donde no es necesaria la viabilidad de las bacterias al detectar su ADN.

Valorando los recuentos totales de cada patógeno individualmente, las diferencias entre M1 y M4 eran significativas para *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *M. micros* y *F. nucleatum* y existía cierta tendencia a la significación para *A. actinomycetemcomitans*. Estos datos corroboran los resultados obtenidos por Mombelli y col. para *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* (206-209). Por el contrario, no se detectaron diferencias significativas para la prevalencia de patógenos ni en el porcentaje de cada patógeno en las localizaciones positivas.

Seleccionar dos localizaciones de un mismo cuadrante (M2) aumenta el recuento total que se detecta de cada patógeno con lo que se aumenta la probabilidad de detectar los patógenos periodontales al compararse con M1. Sólo se observaron diferencias estadísticamente significativa entre *P. intermedia* y *F. nucleatum* al comparar M2 con

M4. No existieron diferencias ni en la prevalencia del patógeno ni en el porcentaje de cada patógeno en las localizaciones positivas.

Ante un análisis microbiológico deseamos determinar qué patógenos están presentes en la muestra que tomamos, pero no es el único parámetro ya que puede ser interesante conocer la cantidad de estos patógenos en la boca del paciente. Se ha sugerido que el recuento de *P. gingivalis* asociado con signos clínicos iniciales de enfermedad puede ser aproximadamente de $2,6 \times 10^4$ UFC (264), aunque Haffajee y col. determinaron este rango en 6×10^5 UFC (34). Los resultados del estudio demuestran como M4 es superior a M1 y M2 en la obtención de un mayor recuento de patógenos. En cambio, no existían diferencias significativas al comparar M2 y M1 con M4 ni en la prevalencia ni en el porcentaje de flora detectada. Los datos obtenidos en el estudio no determinan la superioridad de alguna de las estrategias de toma de muestras sobre las demás para procesarlas mediante cultivo, a excepción que nos interese una estrategia en que se obtenga el mayor recuento posible de patógenos periodontales donde M4 es superior. M4 puede ser una estrategia de muestras útil en los procedimientos de análisis microbiológico que cuantifiquen los patógenos como cultivo y PCR cuantitativa, pero no para métodos de análisis que no cuantifican como PCR cualitativa donde M2 o M1 pueden ser útiles. Se necesitan más estudios clínicos que determinen si estas estrategias son válidas para tests microbiológicos más sensibles.

La sensibilidad y especificidad de las diferentes estrategias de toma de muestras son diferentes para cada uno de los patógenos examinados. *A. actinomycetemcomitans* es el patógeno con la menor frecuencia de detección y porcentaje en cada localización, y este hecho ocasiona que la especificidad sea muy alta, del 100%, tanto en M1 como en M2, al haber una coincidencia total entre ambas muestras para detectar a los pacientes negativos que son los más numerosos. Por tanto, este porcentaje tan alto de especificidad se debió a una frecuencia de detección muy baja en todas las estrategias de toma de muestras estudiadas. En cambio, la sensibilidad varió entre las dos modalidades de toma de muestra. En M1, la sensibilidad de detección de *A. actinomycetemcomitans* era del 50%, de los cuatro pacientes positivos detectados con M4, M1 sólo detecta la mitad. En cambio, la sensibilidad en M2 era del 100%. El análisis estadístico muestra una correlación significativa entre M1 y M4, y entre M2 y M4, descartando que sean independientes entre sí.

La sensibilidad y especificidad de M1 con relación a M4 muestra una correlación estadísticamente significativa para *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, *M. micros* y *P. intermedia* ($p < 0,05$). De igual modo, el test de la chi-cuadrado descarta significativamente que sea independiente M1 con relación a M4 para *P. gingivalis*, *T. forsythensis* y *M. micros*. Las diferencias entre estas dos estrategias de toma de muestras se debieron fundamentalmente a la aparición de falsos-negativos por parte de M1. En todos los patógenos periodontales se obtenían más falsos-negativos que falsos-positivos a excepción de *C. rectus*, en el que M1 detectaba más veces su presencia que M4.

La sensibilidad y especificidad de M2 con relación a M4 muestra una correlación significativa para *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, *M. micros* y *P. intermedia* ($p < 0,05$), pero el test de la chi-cuadrado sólo descarta significativamente la independencia de las estrategias para *A. actinomycetemcomitans* ($p = 0,01$). Las diferencias entre las estrategias de muestras se debieron a la aparición de falsos-negativos. Únicamente en *P. gingivalis* aparecieron más falsos-positivos, al detectar M2 más pacientes con *P. gingivalis* que M4.

Ante los datos obtenidos durante la fase diagnóstica, no se observa la superioridad de ninguna estrategia de toma de muestras frente a las demás al no encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre ellas, a excepción del recuento total de patógenos donde M4 muestra su superioridad. Sin embargo, aunque las diferencias no son significativas si son importantes los falsos-negativos que obtienen M1 y M2 al compararlo con M4. Siempre que las muestras sean procesadas para cultivo durante la fase diagnóstica y nos interese recoger la mayor cantidad de patógenos posible, M4 puede ser la estrategia de elección. M1 y M2 pueden ser estrategias válidas para su utilización en otros tests microbiológicos más sensibles y que no realicen cuantificaciones, como la PCR cualitativa, pero se necesitan más estudios clínicos que prueben y validen cada estrategia.

ESTUDIO 2: EVALUACIÓN DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO PERIODONTAL NO-QUIRÚRGICO. INFLUENCIA DE LA METODOLOGÍA DE TOMA DE MUESTRAS

Una vez determinados los patógenos causantes de las periodontitis se debe instaurar el tratamiento adecuado para controlar la infección. Para poder conseguirlo, los diferentes tratamientos anti-infecciosos deben ser evaluados microbiológicamente. Se debe conocer cuál es el efecto de cada modalidad de tratamiento sobre los diferentes patógenos, teniendo en cuenta dos factores: la naturaleza de la infección y la susceptibilidad del organismo que infecta (1). Conociendo el efecto de las distintas modalidades de tratamiento, podremos seleccionar la más idónea para cada tipo de periodontitis.

La instrumentación radicular ha ido evolucionando en los últimos años gracias a los conocimientos que se han ido adquiriendo y a los avances tecnológicos. Han aparecido cada vez instrumentos más precisos, como aparatos ultrasónicos con puntas cada vez más finas que permiten un mejor acceso a la superficie radicular, y modalidades de tratamiento novedosas, basadas en el manejo de los factores etiológicos como es el caso de la “desinfección en boca completa” que pretende impedir la transmisión de bacterias de zonas no tratadas a zonas tratadas. Por tanto, actualmente los profesionales pueden seleccionar entre un amplio abanico de modalidades de tratamiento periodontal no-quirúrgico. Todas estas nuevas modalidades de tratamiento han de justificarse y validarse adecuadamente, y además se debe determinar el beneficio que pueda tener cada una de ellas sobre el resto y estudiar la posibilidad de que cada tipo de periodontitis deba ser tratado con modalidades de tratamiento diferentes según los beneficios que ocasionen.

En el estudio 2, se decidió comparar algunas de estas novedosas modalidades de tratamiento periodontal no-quirúrgico tanto clínica como microbiológicamente a 6 meses, y observar como influía la metodología microbiológica en los resultados obtenidos. Las modalidades de tratamiento variaban unas de otras por la existencia de diferencias en el tiempo de ejecución (24 horas versus 4 semanas), en base al concepto de desinfección en boca completa; por el procedimiento empleado (curetas versus nuevos sistemas de ultrasonidos con puntas específicas); y diferente irrigación como

coadyuvante de la instrumentación con ultrasonidos (agua versus clorhexidina al 0,12%).

Variables clínicas

Los resultados obtenidos demostraron que todas las modalidades de tratamiento periodontal no-quirúrgico eran efectivas en la mejora de las variables clínicas a los 6 meses. Los datos obtenidos no mostraron diferencias significativas entre los procedimientos empleados.

La evaluación de las variables clínicas ha mostrado que todos los grupos de tratamiento provocaron claras reducciones en la profundidad de sondaje, aunque la magnitud de esta reducción fue siempre mejor en los grupos de 24 horas, con un beneficio adicional entre 0,2-0,4 mm (dependiendo del sondaje inicial). La reducción en la profundidad de sondaje está relacionada con la profundidad de sondaje inicial (249), y se ha determinado que la reducción media para bolsas iniciales de 1-3 mm debe ser de alrededor de 0,03 mm (265). En el estudio 2, los rangos de reducción oscilaban entre 0,5-0,8 mm, siendo el tratamiento convencional en 4 semanas el que obtuvo las menores reducciones; en bolsas iniciales de 4-6 mm la reducción media propuesta en la literatura es de 1,29 mm (265), y en el estudio 2 las reducciones oscilaban entre 1,3-1,8 mm, siendo el tratamiento convencional en 4 semanas el que obtuvo las menores reducciones en la profundidad de sondaje. De la misma forma, en las bolsas mayores de 7 mm, se ha estimado que la reducción media que se puede esperar tras el tratamiento mecánico es de 2,16 mm (265), y los datos en el estudio muestran reducciones entre 2,4-2,6 mm. En general, los datos obtenidos en la reducción en la profundidad de bolsa en las cuatro modalidades de tratamiento periodontal no-quirúrgico están por encima de las medias consideradas, y los rangos más altos correspondieron a los grupos de tratamiento en 24 horas.

De forma semejante, todos los tratamientos consiguieron ganancias de inserción, con rangos entre 0,5-0,8 mm, obteniendo las mejores ganancias los procedimientos en 24 horas frente a las 4 semanas. De manera similar a lo que ocurre con la reducción en la profundidad de sondaje, los datos obtenidos en el estudio sobre la ganancia de inserción son superiores a las medias que ha determinado Cobb según la profundidad de sondaje inicial (265). Para bolsas iniciales de 1-3 mm, se ha determinado que ocurre una pérdida

de inserción de 0,34 mm, en cambio en el presente estudio ocurrió una ganancia entre 0,1-0,3 mm; la ganancia media que se espera en bolsas iniciales entre 4-6 mm es de 0,55 mm, y en el estudio 2 los datos señalaron ganancias de inserción entre 1-1,8 mm. En bolsas iniciales mayores de 7 mm es esperable una ganancia de inserción de 1,19 mm, y los datos obtenidos varían entre 2-2,6 mm.

Todas las modalidades de tratamiento periodontal no-quirúrgico eran capaces de reducir el sangrado al sondaje, sin diferencias significativas entre los distintos grupos. Existe cierta controversia sobre la relación entre la placa bacteriana y la rugosidad que se ocasiona en la superficie radicular por la instrumentación mecánica. Varios estudios han concluido que la rugosidad provocada sobre la superficie radicular por curetas o puntas de ultrasonidos no tienen efectos significativos sobre la retención de placa o la inflamación gingival (330). En cambio, otros autores han señalado que la rugosidad radicular subgingival favorece la acumulación de la placa bacteriana (331;332). Incluso se ha señalado que la gingivitis y periodontitis se asocian más frecuentemente con los dientes que exhiben una superficie rugosa. Los datos del estudio no demuestran diferencias significativas en el índice de placa, ni se puede achacar un mayor índice a una mayor rugosidad en la superficie radicular, ni supragingival ni subgingival, provocada por las diferentes modalidades de tratamiento evaluadas.

La ausencia de diferencias significativas en las variables clínicas en este estudio puede ser debida a diferentes razones. Quizás el hecho más importante es el pequeño número de pacientes que compuso la muestra en cada grupo de tratamiento dado que se trataba de un estudio piloto. Sin embargo, aunque no se detectaron diferencias significativas en el estudio piloto, si se realizara un diseño con dos grupos de tratamiento (TC y DB-chx) y 20 pacientes por grupo sí se observarían un significativo efecto del tratamiento en 24 horas.

Modalidades de tratamiento periodontal no-quirúrgico

La comparación entre las distintas modalidades de tratamiento periodontal no-quirúrgico utilizadas puede ser analizada dependiendo del tiempo de ejecución (24 horas versus 4 semanas); según el procedimiento empleado (curetas versus nuevos sistemas de ultrasonidos con puntas específicas); y por la utilización adicional de

diferente irrigación como coadyuvante de la instrumentación con ultrasonidos (agua versus clorhexidina al 0,12%).

1. Tiempo de ejecución del tratamiento periodontal no-quirúrgico

Las avances más novedosos en el tratamiento periodontal no-quirúrgico han propuesto el manejo de los factores etiológicos, como es el caso de los patógenos periodontales, para conseguir mejores resultados clínicos. Han surgido conceptos como la desinfección en boca completa (“*full-mouth disinfection*”) y el raspado y alisado radicular en el mismo día (“*same-day full-mouth scaling and root planing*”).

El concepto de desinfección en boca completa (DBC) propuesto por Quirynen (281;282;305-309) está diseñado para evitar la transmisión de bacterias de nichos no tratados a zonas tratadas. Se podría conseguir reduciendo el periodo entre las sesiones de tratamiento, esto es, completando el raspado y alisado radicular en 24 horas. La DBC incluye no sólo el tratamiento mecánico en 24 horas, sino también la utilización conjunta de clorhexidina (en forma de enjuagues, spray para las amígdalas, cepillado de la lengua e irrigación subgingival) para reducir las bacterias de los otros posibles nichos orales (lengua, amígdalas, mucosas y saliva).

Cuando esta nueva modalidad se ha evaluado en los estudios clínicos, los resultados clínicos obtenidos son mejores que los se podría esperar tras el tratamiento periodontal convencional (265). La DBC ha producido mejoras significativas en las variables clínicas, demostrando una reducción adicional media de 1,2 mm en la profundidad de bolsa, y una ganancia adicional media de 1 mm en el nivel de inserción, al compararlo con el protocolo tradicional de tratamiento (306). Los datos de nuestro estudio encontraron diferencias limitadas entre el protocolo tradicional y los procedimientos realizados en 24 horas. Estos procedimientos consiguieron una mayor reducción en la profundidad de sondaje, variando entre 0,2-0,4 mm, pero quedan lejos de los resultados obtenidos por el grupo belga. Lo mismo sucede con la ganancia de inserción, en nuestro estudio, los procedimientos en 24 horas obtienen una mayor ganancia de inserción que el tratamiento convencional, variando de 0,1-0,3 mm, no alcanzando la ganancia adicional de inserción de 1 mm observada por el grupo de investigación de la universidad de Lovaina.

En los pacientes tratados en 24 horas con el protocolo DBC, se ha observado la existencia de fiebre y de lesiones relacionadas con el virus del herpes (281;305;306). La explicación de estos hallazgos llevó al desarrollo de una nueva hipótesis sobre las consecuencias del raspado y alisado radicular en 24 horas. Los resultados favorables obtenidos podrían ser debidos a que en la primera sesión de raspado y alisado radicular (2 cuadrantes) se producía una bacteriemia significativa (318), y en la segunda sesión dentro de las 24 horas se podría inducir una reacción de hipersensibilidad provocando una gran respuesta inmune, que se conoce con el nombre de fenómeno de Shwartzman (282). Por tanto, se ha propuesto que realizar el tratamiento en 24 horas no sólo maneja los factores etiológicos como las bacterias sino que es capaz de manejar el sistema inmune, que sería el responsable de los resultados tan favorables. En nuestro estudio, ninguno de los pacientes tratados refirieron lesiones provocadas por el virus del herpes ni aumento de fiebre. La explicación para esta discrepancia no es clara.

Desde Glasgow, Apatzidou y Kinane han propuesto una nueva modalidad de tratamiento basado en la desinfección en boca completa, que han denominado como raspado y alisado radicular en el mismo día (“*same-day full-mouth scaling and root planing*”) (180;320;321). Se considera que si lo que se quiere evitar es la transmisión de zonas no tratadas a zonas tratadas, el tiempo de ejecución del raspado y alisado radicular se podría reducir aún más, y en vez de realizar el tratamiento en 24 horas, se reduce a 12 horas. Por tanto, el tratamiento se realiza raspando dos cuadrantes por la mañana y los otros dos cuadrantes por la tarde, dejando entre las dos sesiones de tratamiento 1,5 horas como mínimo.

Al comparar esta nueva modalidad de tratamiento periodontal no-quirúrgico con el tratamiento convencional, no encontraron diferencias significativas. A los seis meses, la mayor reducción en la profundidad de sondaje se daba en el tratamiento convencional (TC) frente al RAR en 12 horas ($1,8 \pm 0,7$ mm versus $1,7 \pm 0,5$ mm, respectivamente). En la ganancia de inserción a los 6 meses no había diferencias entre los dos tratamientos ($1,1 \pm 0,6$ mm en TC versus $1,1 \pm 0,4$ mm en RAR en 12 horas). Aunque no se hizo una distribución de frecuencias según la profundidad de sondaje inicial de toda la boca, sí se seleccionó una localización por cuadrante, siempre mayor de 5 mm, y se valoró independientemente. En este análisis, se encontró que las mayores reducciones de sondaje a los 6 meses se daban en TC frente al RAR en las bolsas iniciales de 5-7 mm

($2,5 \pm 1,0$ mm versus $2,3 \pm 1,0$ mm); pero, por el contrario, para las bolsas iniciales >7 mm, RAR en 12 horas obtenía los mejores resultados ($4,4 \pm 1,3$ mm versus $4,3 \pm 1,2$ mm). En estas localizaciones seleccionadas se realizó una férula individualizada y se midió el nivel de inserción relativo. No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la ganancia de inserción en las bolsas entre 5-7 mm, pero sí en las > 7 mm entre TC y RAR en 12 horas ($1,4 \pm 0,8$ mm versus $2,2 \pm 0,8$ mm, respectivamente) (320).

La discordancia entre los resultados de estas dos novedosas modalidades de tratamiento periodontal no-quirúrgico y los resultados de nuestro estudio puede deberse a varios motivos. Existen diferencias sustanciales en el diseño de ambos estudios, fundamentalmente provocadas por la dificultad de comparar un tratamiento que se efectúa en un periodo de hasta 6 semanas y por cuadrantes, de otro que se realiza en tan sólo 12 ó 24 horas. A los estudios de la universidad de Lovaina se les criticaba que sólo se utilizase un cuadrante para realizar la valoración, pero es la única forma de que el periodo comprendido desde el tratamiento hasta la reevaluación sea igual en la comparación de ambos tratamientos. En los estudios de Glasgow, que valoraban el raspado y alisado radicular en 12 horas, se intenta evaluar la boca completa del paciente, para ello la primera evaluación se realiza al mes del último cuadrante raspado. Esta decisión lleva un problema inherente, y es que sólo pasa un mes en el último cuadrante, porque en el resto de cuadrantes ha pasado más tiempo, el primer cuadrante raspado, en realidad, se evalúa cuando han pasado dos meses. Este hecho produce que las comparaciones no puedan ser del todo equiparables entre ambos tratamientos, ya que se conoce la influencia del tiempo en la cicatrización, y se ha determinado que los mayores cambios en las variables clínicas se producen entre 1-3 meses tras el tratamiento mecánico, aunque la maduración del periodonto puede llegar hasta 9-12 meses (257;261).

Además de este problema de diseño inherente a la comparación entre tratamientos, existen otros problemas en el diseño de los estudios que se realizaron para validar la DBC y que pueden influir en los resultados. El más llamativo es la carencia de aleatorización en los grupos de tratamiento (281) sobre todo en el grupo control, al utilizarse grupos de estudios anteriores (306). Pero a este hecho hay que sumarle que los datos clínicos obtenidos del grupo control son peores (**Tabla 7 y 8, pág. 154-155**),

comparados con otros estudios que han valorado el tratamiento convencional de raspado y alisado radicular por cuadrantes. Las diferencias son llamativas porque en bolsas ≥ 7 mm los resultados de la profundidad de sondaje son casi 1 mm peores (la media de reducción de sondaje para bolsas ≥ 7 mm es de 2,16 mm (265) y en los estudios sobre DBC son de 1 mm (308), 1,9 mm (306) y 1,9 mm (281) en dientes unirradiculares. Lo mismo ocurre con el nivel de inserción, para bolsas con profundidad de sondaje inicial ≥ 7 mm, la ganancia fue de 1,19 mm, y en los estudios sobre DBC eran de 0,4 mm (308), 0,6 mm (306) y 0,6 mm (281) en dientes unirradiculares. De forma semejante a la profundidad de sondaje y nivel de inserción, los datos sobre el sangrado al sondaje son llamativamente peores en el grupo control que en el test, e igualmente, la higiene oral de los pacientes sometidos al tratamiento convencional es peor que en el grupo test, lo que ocasiona un mayor sangrado al sondaje, siendo esta diferencia significativa (281;306;308) (**Tabla 9, pág. 156**). Otra característica criticable del diseño de los estudios de DBC es que las variables clínicas sean tomadas después de realizar el tratamiento de raspado y alisado radicular, ésto puede causar una sobrevaloración de las variables en la visita inicial (333;334). Esta sobrevaloración puede conllevar que al realizar las comparaciones con las siguientes visitas se produzcan mejorías más llamativas, no siendo reales.

Otra explicación para la discrepancia de resultados entre estudios puede deberse a que no se produzca el fenómeno de Shwartzman. Apatzidou y Kinane estudian el efecto del raspado y alisado radicular en 12 horas en la respuesta humoral del sistema inmune para comprobar si se produce dicho fenómeno. En el estudio se demuestra que el tratamiento realizado en 12 horas o en 6 semanas provocaba la reducción de anticuerpos contra la mayoría de los patógenos estudiados, con lo que no se encuentran evidencias que sostengan una respuesta inmunológica aumentada por la inoculación provocada por el tratamiento. Concluyen que no confirman los efectos beneficiosos del tratamiento en 12 horas debido a una reacción inmunológica aguda causada por la inoculación de las bacterias en los tejidos del hospedador (321). Este hecho puede deberse al tiempo limitado entre las dos sesiones de tratamiento, que no permiten que se produzca la reacción de hipersensibilidad provocando la respuesta inmune, o bien a que la bacteriemia que se produce no sea suficiente para provocar la inmunización y la posterior reacción de hipersensibilidad. Quizás esta última razón sea la explicación de por qué los pacientes de nuestro estudio no presentaron fiebre ni se detectó una reacción

inmunológica aguda tras el tratamiento: en pacientes con periodontitis moderada la cantidad de bacteriemia puede ser limitada e incapaz de desencadenar el fenómeno de Shwartzman, con lo que la respuesta al tratamiento puede ser menor (321). Esto se confirma con los datos del raspado y alisado radicular en 12 horas, que también utilizó pacientes con periodontitis crónica moderada, mientras que los pacientes utilizados en los estudios de Lovaina son periodontitis avanzadas que pueden tener un mayor potencial para ocasionar una bacteriemia y desencadenar la reacción inmunológica (321). Se ha sugerido que el “efecto vacuna” que se produce (la instrumentación mecánica causa la inoculación de las bacterias al torrente sanguíneo y estimula al hospedador para producir anticuerpos adicionales) puede ser el responsable del 50% de los beneficios clínicos observados (281). Son necesarios más estudios clínicos que determinen si nos podemos beneficiar del manejo del sistema inmunológico de los pacientes con periodontitis.

2. Utilización de procedimientos manuales versus ultrasónicos

Se han comparado, en multitud de estudios, diferentes modalidades de instrumentación radicular, principalmente instrumentos manuales (curetas) y procedimientos sónicos y ultrasónicos (257;335;336). Estos estudios han concluido que, en bolsas iniciales entre 4-7 mm, la eficacia clínica de los tratamientos es similar. Estos resultados están en concordancia con los resultados obtenidos en el estudio 2, donde no se observaron diferencias significativas cuando el tratamiento es realizado con curetas o con aparatos de ultrasonidos (grupos DB-c versus DB-us). Sin embargo, cuando los resultados son analizados mediante la distribución de frecuencias según la profundidad de sondaje inicial, los mejores resultados en cuanto a la reducción en la profundidad de sondaje se consiguen en las tres categorías (0-3,4 mm, 3,5-5,4 mm y >5,4 mm) en los grupos en que se utilizaba el aparato de ultrasonidos frente al tratamiento convencional.

El desarrollo de puntas ultrasónicas cada vez más estrechas y con diferentes curvaturas, permite un mejor acceso a las zonas difíciles de tratar en la superficie radicular, por lo tanto, se incrementa la eficacia en la eliminación del biofilm subgingival. Una de las grandes ventajas que se señalan en los estudios es que el uso de los aparatos ultrasónicos puede ahorrar de un 20-50% de tiempo en el tratamiento periodontal (289;337;338). En el diseño de nuestro estudio se decidió mantener el mismo tiempo de ejecución del tratamiento en cada cuadrante independientemente del procedimiento,

manual o ultrasónico. Se quería que los resultados no se vieran influenciados por la variación en el tiempo de ejecución en cada modalidad de tratamiento.

Todos los avances tecnológicos que se vayan aplicando a los procedimientos de instrumentación radicular deberán ser probados en estudios clínicos bien diseñados para validar y justificar su uso por las mejoras clínicas que se obtengan. Favorecer la disgregación del biofilm subgingival de la superficie radicular debe ser el objetivo fundamental de estos avances.

3. Irrigación adicional con agua versus clorhexidina

El uso de clorhexidina al 0,12% en forma de irrigación subgingival durante la instrumentación tiene como propósito reducir el biofilm subgingival, y por tanto, mejorar los resultados clínicos. La suma de la utilización del antiséptico junto con la instrumentación radicular mediante ultrasonidos, podría mejorar los resultados tanto clínica como microbiológicamente al compararlo con el tratamiento convencional con curetas (309), ya que se podría acceder mejor a disgregar el biofilm subgingival y sumarse el efecto bactericida de la clorhexidina.

Para evaluar la actividad antimicrobiana de la clorhexidina en las bolsas periodontales es necesario tener en cuenta dos parámetros: el tiempo de actividad de la clorhexidina en la bolsa; su concentración mínima inhibitoria (CMI) y su concentración mínima bacteriana (CMB) contra los diferentes patógenos periodontales. La CMB para *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans* es de 5 mg/mL, con un tiempo de actividad de al menos 10 minutos. Si el tiempo que se emplea en instrumentar una bolsa es igual al tiempo de la irrigación subgingival con clorhexidina, entonces podríamos esperar un efecto bactericida de la clorhexidina (293;294). Sin embargo, en el presente estudio, cuando se comparaban los resultados obtenidos en los grupos con la irrigación con clorhexidina y con agua, no se observaron diferencias significativas, con lo que no se detectaban efectos adicionales de la clorhexidina. Únicamente en bolsas moderadas, los resultados sobre el nivel de inserción a los 6 meses demostraron una mejoría adicional de 0,8 mm en el grupo que utilizaba la clorhexidina. Sin embargo, no se detectaron diferencias microbiológicas entre los grupos.

Son necesarios más estudios para determinar con exactitud la eficacia de la irrigación subgingival con clorhexidina al mismo tiempo que se instrumenta una bolsa periodontal con aparatos de ultrasonidos tanto en localizaciones accesibles como aquellas en donde estas puntas de ultrasonidos pueden ser superiores como furcas o concavidades radiculares. En estas localizaciones el acceso de la punta y la clorhexidina puede favorecer la disgregación del biofilm subgingival, la eliminación de los patógenos periodontales y la creación de un ambiente en que se impida la formación de un nuevo biofilm con patógenos periodontales.

Factores que afectan a los resultados obtenidos

La ausencia de diferencias significativas en las variables clínicas en este estudio puede ser debida a diferentes razones. Quizás el hecho más importante es el pequeño número de pacientes que compuso la muestra en cada grupo de tratamiento dado que se trataba de un estudio piloto. De hecho, Si se considera como la principal variable de mejora el cambio en el nivel de inserción relativo, la comparación de los cambios entre la visita inicial y los 6 meses da un resultado para el grupo TC (tratamiento convencional) de $0,80 \pm 0,37$ y para DB-chx (instrumentación radicular con ultrasonidos e irrigación de clorhexidina en 24 horas) de $1,40 \pm 1,19$. Con los datos del estudio para poder detectar una diferencia $>1\text{mm}$ (1,08 mm), el poder del test fue del 40%. En un futuro experimento, considerando una desviación estándar de 1,19 mm, y un poder del 80% para poder detectar una diferencia de 1,08 mm entre grupos, el tamaño muestral necesario para detectar diferencias estadísticamente significativas (a dos colas, $p < 0,05$) es de 20 pacientes por grupo. Esto sugiere que, aunque no se detectaron diferencias significativas en el estudio piloto, si se realizara un diseño con dos grupos de tratamiento (TC y DB-chx) y 20 pacientes por grupo sí se observarían un mejor efecto del tratamiento en 24 horas.

Otras características no relacionadas con el tamaño muestral que han podido influir en los resultados pueden ser los criterios de selección de los pacientes, y la valoración de las variables, por los siguientes motivos:

1. Se seleccionaron pacientes con periodontitis crónica moderada, deliberadamente se excluyeron los pacientes con bolsas profundas generalizadas, donde las diferencias significativas son más sencillas de detectar. La justificación para tomar esta decisión sobre el diseño del estudio se basaba en

que estos pacientes son los que pueden obtener un mayor beneficio clínico de los tratamientos periodontales no-quirúrgicos. Los pacientes con periodontitis avanzadas son candidatos claros para realizar cirugías periodontales, aunque los procedimientos en 24 horas aumenten la eficacia del raspado. Sin embargo, los pacientes moderados podrían evitar la fase quirúrgica, si el procedimiento mejora claramente los resultados.

2. La valoración en los cambios de inserción en el estudio se han obtenido de dos formas diferentes. La valoración del nivel de inserción en boca completa se realizó tomando el límite amelocementario como el punto fijo de referencia. Sin embargo, se seleccionaron dos localizaciones del primer cuadrante tratado y en éstas, se medía el nivel de inserción relativo (NIR), utilizando la sonda Florida ® y una férula de acrílico confeccionada para este fin como punto de referencia fijo.

Todos los grupos de tratamiento obtuvieron ganancias significativas en NIR, siendo los procedimientos ejecutados en 24 horas los que obtuvieron los mejores resultados. De hecho, la mayor ganancia de inserción relativa correspondió al grupo DB-chx (1,40 mm). Otros estudios clínicos que han validado la DBC han seleccionado la estrategia de evaluar sólo el primer cuadrante tratado (281;282;305;306;308-310). Parece que reducir el número de localizaciones evaluadas pueden no reflejar correctamente el estatus global de la boca (206;207;209), y si las localizaciones seleccionadas se corresponden con las bolsas de mayor profundidad de sondaje, los resultados siempre serán mejores (258). Es necesario diseñar nuevos estudios clínicos para determinar la eficacia clínica de los procedimientos en 24 horas, evaluando los resultados en la boca completa, con la dificultad que ésto conlleva al compararse dos procedimientos con tiempos de ejecución tan dispares como 24 horas y un mes.

Efecto microbiológico del tratamiento periodontal no quirúrgico

El impacto microbiológico del raspado y alisado radicular es controvertido. Muchos autores han intentado evaluar los cambios en la flora subgingival tras la instrumentación radicular y la posterior recolonización del nicho (260-262;267;268). Estudios utilizando el microscopio han observado que el recuento total de bacterias se reduce aproximadamente un 99% inmediatamente tras la instrumentación radicular

(200;250;263). Recientes estudios basados en cultivos, han señalado reducciones en *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* (135;259;267). Por el contrario, existen otros estudios que no han encontrado ningún impacto sobre ciertos patógenos, especialmente sobre *A. actinomycetemcomitans* (130;131;143;208;262;268;272).

Los resultados del presente estudio han demostrado que todos los tratamientos conseguían reducir los recuentos totales de bacterias anaerobias. Sin embargo, se observó un impacto limitado al evaluar los patógenos periodontales.

A. actinomycetemcomitans y *T. forsythensis* se detectaron raramente en las muestras tomadas. *A. actinomycetemcomitans* se detectó únicamente en dos pacientes en la visita inicial, no volviéndose a detectar tras el tratamiento periodontal. Éste fue el motivo por el que no se pudo realizar una evaluación apropiada de cada uno de ellos.

P. gingivalis fue detectado en el 65% de los pacientes en la visita inicial. Estos resultados están en concordancia con estudios previos sobre periodontitis crónica (329;339). No se ha detectado ningún efecto de las diferentes modalidades de tratamiento periodontal no-quirúrgico sobre este patógeno. Su frecuencia de detección fue estable en todas las visitas, pero su proporción en las localizaciones positivas sí mostró una clara reducción tras el tratamiento. La instrumentación radicular puede causar un descenso temporal en los niveles de *P. gingivalis* pero no es capaz de erradicarlo de las localizaciones subgingivales (339) (**Tabla 25, pág. 177**).

En aproximadamente el 80% de los pacientes se detectó *P. intermedia / nigrescens* en la visita inicial. De la misma manera que con *P. gingivalis*, se ha observado un impacto similar en *P. intermedia / nigrescens* tanto en los recuentos bacterianos como en la frecuencia de detección, y prácticamente no se producen cambios en las diferentes visitas ni en las diferentes modalidades de tratamiento evaluadas (**Tabla 26, pág. 178**).

F. nucleatum es la especie bacteriana que se detecta más frecuentemente, ya que fue cultivada en todas las muestras en la visita inicial y en todos los grupos de tratamiento. Esta especie es la más comúnmente encontrada en los estudios del biofilm subgingival en cultivos, representando aproximadamente el 7-10% del total de patógenos aislados en diferentes condiciones clínicas (219). En cambio, en el presente estudio la cantidad fue superior, ya que a los seis meses el porcentaje medio en las localizaciones positivas fue

del 15% (38%-11%, según el grupo de tratamiento). Ninguna modalidad de tratamiento periodontal no-quirúrgico tuvo efectos sobre este patógeno.

Se ha observado una reducción en la frecuencia de detección de *M. micros* a los 6 meses tras el tratamiento, mientras la proporción de flora total descendió al mes pero existió un rebote a los 6 meses. La instrumentación mecánica posee un efecto mínimo sobre la población subgingival de *M. micros* (340). Presumiblemente, la dificultad de eliminar *M. micros* por medio del tratamiento mecánico está relacionado con la alta afinidad de esta bacteria por unirse al epitelio crevicular (341).

Estos resultados corroboran otros que han mostrado que los diferentes procedimientos de instrumentación radicular no son predecibles en cuanto a la eliminación de los patógenos de las bolsas periodontales en pacientes con periodontitis crónica. Aunque estas cuatro modalidades de tratamiento mecánico son capaces de reducir el recuento total de bacterias anaerobias, tienen un impacto pequeño en la eliminación de la mayoría de las especies patogénicas que pueden residir en los tejidos blandos y pueden no estar influenciadas por la instrumentación radicular (260;261;276), o mantenerse en las irregularidades de la superficie radicular o en los túbulos dentinarios (277).

Valoración de la metodología de toma de muestras

La evaluación microbiológica en todo el desarrollo del estudio se realizó utilizando dos estrategias de toma de muestras. Se decidió realizar la evaluación microbiológica de distintas modalidades de tratamiento periodontal no quirúrgico comparando M4 (muestra conjunta de la localización más enferma de cada cuadrante) y M2 (muestra conjunta de dos localizaciones del primer cuadrante tratado), siguiendo el protocolo de la desinfección en boca completa (281) y eliminando la estrategia M1 (muestra de la bolsa más enferma de la boca) debido a las diferencias significativas encontradas en el recuento de patógenos en la fase diagnóstica.

El protocolo tradicional de toma de muestras, M4, es el que se considera como método de referencia en cultivo y con el que se compara M2. Al analizar el recuento total de bacterias, existieron diferencias significativas entre las dos estrategias. Lógicamente, con M4 se obtiene una muestra significativamente mayor que con M2 en todas las visitas. Este hecho puede ocasionar que sea más probable detectar los patógenos periodontales en M4 frente a M2, sobre todo tras el tratamiento, al reducirse el recuento

total de patógenos. Esta puede ser la explicación de por qué al mes no se encontraron correlaciones significativas entre ambas estrategias y no se descartó que fueran independientes (Test de Pearson y chi-cuadrado). En la visita al mes, tras el tratamiento periodontal se observó como M2 en los patógenos analizados, *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *M. micros*, obtuvo muchos falsos-negativos (**Tablas 29, 30, 31 págs. 181-183**). Esta aparición de falsos-negativos provoca que la estrategia de muestras M2 no detecte pacientes positivos para los diferentes patógenos periodontales. Esta afirmación está en concordancia con el estudio de Haffajee y col. (181) donde concluyen que se necesitan muestras múltiples para reducir la proporción de falsos-negativos. A los tres y seis meses, cuando el biofilm subgingival vuelve a restablecerse y a aumentar la cantidad de bacterias, los resultados entre las estrategias se igualan de manera similar a la visita inicial.

En cuanto a la frecuencia de detección y en la proporción de flora total en las localizaciones positivas, en general no se observó ningún cambio provocado por las diferentes modalidades de tratamiento periodontal no-quirúrgico cuando se tomaron muestras con la estrategia M4. En cambio, cuando analizamos los datos obtenidos con M2 se observó una importante reducción al mes en algunas bacterias, siendo esta reducción significativa para *P. gingivalis*. Si sólo se contara con los resultados de M2, concluiríamos que al mes las modalidades de tratamiento periodontal no-quirúrgico analizadas provocaban una reducción significativa en la frecuencia de detección y en la proporción flora en localizaciones positivas para este patógeno, siendo una afirmación no exacta, ya que hemos comprobado como con M4 no se observó ningún cambio.

Como se ha discutido anteriormente con los resultados clínicos, la selección de localizaciones en el primer cuadrante puede sobreestimar la bondad de los resultados, y esta estrategia puede no reflejar correctamente el estatus microbiológico global de la boca del paciente, como demuestran los resultados presentados. La evaluación microbiológica de la DBC, en los estudios de Lovaina, se ha realizado únicamente en el primer cuadrante tratado, y aunque pueda ser la manera más lógica de comparar dos tratamientos con tiempos de ejecución tan dispares, lo cierto es que los resultados pueden no ser reales, y no reflejar el efecto “verdadero” de los tratamientos en 24 horas. Por tanto, es necesario diseñar nuevos estudios, con las dificultades inherentes que eso conlleva, para determinar la eficacia microbiológica de la DBC, evaluando los resultados tomando la boca como un todo, tanto clínica como microbiológicamente.

METODOLOGÍA DE TOMA DE MUESTRAS

Los datos del presente estudio ponen de manifiesto la importancia de la metodología microbiológica en los resultados obtenidos. Más concretamente, la estrategia seleccionada de toma de muestras puede influir en la identificación y enumeración de los patógenos periodontales (200). Existen muchas variables que deben controlarse durante el proceso de toma de muestras para no obtener unos resultados incompletos e inexactos. La variable que se ha querido analizar con la presente tesis, ha sido la selección y número de localizaciones de dónde se han de tomar las muestras, y su influencia en los resultados microbiológicos en dos modelos de evaluación diferentes, en la fase diagnóstica y en la evaluación de la respuesta al tratamiento periodontal no-quirúrgico.

Durante la fase diagnóstica se evaluaron tres estrategias diferentes de toma de muestras: M1 (muestra de la localización más enferma de la boca), M2 (muestra de las dos localizaciones más enfermas de un mismo cuadrante) y M4 (muestra de la localización más enferma de cada cuadrante). La única diferencia significativa que se encontró fue en los recuentos totales, donde M4 obtenía los mayores recuentos al compararlos con M1 y M2. No se detectaron diferencias ni en la frecuencia de detección ni en el porcentaje de patógenos para cada una de las estrategias. Sin embargo, aunque las diferencias no son significativas sí son importantes los falsos-negativos que obtienen M1 y M2 al compararlo con M4. En la fase diagnóstica, la cavidad oral del paciente posee una gran cantidad de bacterias constituyendo el biofilm subgingival, por tanto, es más probable detectarlas independientemente del número de localizaciones en las que tomemos muestra porque obtendremos pocos falsos-negativos con cualquier estrategia. En consecuencia, en la fase diagnóstica la estrategia de toma de muestras puede no influir de manera significativa en la obtención de una muestra representativa de la cavidad oral del paciente. En cambio, esta afirmación no se cumple en la evaluación de la respuesta al tratamiento periodontal demostrado en el estudio 2. Al mes tras el tratamiento, M2 detectó un descenso significativo ($p=0,03$) en la frecuencia de detección de *P. gingivalis* que no era confirmado por M4. Tras el tratamiento periodontal se produce un descenso en el recuento de patógenos presentes en la cavidad oral, y éste pudo ser el motivo por el que M2 no fue capaz de detectarlo. Por lo tanto, aumentar el número de muestras provoca el aumento de la probabilidad de detectar los patógenos, ya que se produce una reducción en la cantidad de falsos-negativos que

aparecen, sobre todo con tests microbiológicos con una sensibilidad baja (181). Si sólo se hubieran tomado muestras M2 la conclusión del estudio hubiese sido que se reduce de manera significativa la frecuencia de detección de *P. gingivalis* tras el tratamiento periodontal no-quirúrgico, una afirmación que M4 determina como falsa.

M4 puede ser la estrategia de toma de muestras más adecuada ante los resultados obtenidos, sobre todo en la evaluación de la respuesta al tratamiento periodontal siendo las muestras procesadas para cultivo. Esta afirmación es corroborada por otros estudios (181;206-209). Sin embargo, la elección de la estrategia puede estar directamente relacionada con el método de análisis microbiológico que procese las muestras. Los métodos de análisis con una sensibilidad más alta, como la PCR, pueden necesitar otro tipo de estrategias donde se tomen menos muestras, como M1 y M2, ya que estos métodos con su alta sensibilidad favorecen la no-aparición de falsos-negativos. Se deben realizar más estudios clínicos que validen la estrategia de toma de muestras más adecuada para cada método de análisis microbiológico.

A la vista de los resultados obtenidos y de cómo pueden desvirtuarse por culpa de la influencia de la toma de la muestra, se debe prestar más atención a la descripción de la metodología microbiológica en los estudios clínicos. Actualmente, esta metodología es muy heterogénea; no sólo varían los tests microbiológicos utilizados sino también las estrategias en la toma de las muestras. Se debe exigir una descripción precisa de dicha metodología por las connotaciones que puedan tener en los resultados. Tras los datos obtenidos en los estudios de la presente tesis, parece imprescindible que la comunidad científica establezca un método de referencia en la estrategia de toma de muestras controlando las distintas variables que pueden influir en los resultados.

Son muchas las variables que deben ser analizadas para poder establecer como método de referencia una estrategia de toma de muestras concreta. Las puntas de papel son uno de los procedimientos más utilizados en la toma de muestras (281;282;305;329) y aún siendo uno de los más reproducibles se han encontrado diferencias significativas al comparar tanto el diámetro como el fabricante de las puntas de papel en la obtención de las muestras (188). Es necesario ampliar los estudios clínicos que determinen las características idóneas para que una punta de papel pueda servir para obtener una muestra representativa del biofilm subgingival. Pero existen más variables a tener en

cuenta como las localizaciones en donde se toman las muestras. Si nuestro objetivo es el control de la infección se deben realizar varios análisis microbiológicos para evaluar la respuesta al tratamiento. Tradicionalmente, en la fase diagnóstica se seleccionan las localizaciones más enfermas de la boca (una por cuadrante) y en estas mismas localizaciones se toman las muestras tras el tratamiento para determinar su efecto. Probablemente, la mayoría de las veces esas localizaciones serán las que mejor responden al tratamiento, pero pueden existir otras localizaciones que han respondido peor y sangran o poseen una mayor profundidad de sondaje residual. Si la probabilidad de detectar *P. gingivalis* es 4,3 veces mayor en localizaciones que sangran que cuando no sangran y de *A. actinomycetemcomitans* en bolsas residuales mayores de 5 mm, sería conveniente seleccionar localizaciones concretas con determinadas características aunque no sean las mismas localizaciones que en la visita inicial.

Con los conocimientos actuales sobre la función de las bacterias en el inicio y progresión de las periodontitis, es posible establecer como un objetivo en nuestro tratamiento controlar la infección. Pero para conseguir valorar adecuadamente este objetivo, debemos de mejorar la metodología microbiológica estableciendo protocolos con la suficiente validez científica para que nos permitan confiar en los resultados microbiológicos obtenidos.

VIII. CONCLUSIONES

1. Los patógenos periodontales con una mayor frecuencia de detección en el biofilm subgingival fueron *F. nucleatum* (100%), *P. intermedia* (80-91%) y *P. gingivalis* (65-82%). Los mayores porcentajes de flora correspondieron a *P. gingivalis* (11,6-26,2%), *P. intermedia* (6,2-10,1%) y *F. nucleatum* (3,9-10,7%).
2. En la fase diagnóstica, la selección de diferentes estrategias de toma de muestras no influye de manera significativa en los resultados microbiológicos obtenidos, a excepción de M4 que obtiene significativamente mayores recuentos totales. Sin embargo, la presencia de falsos-negativos en la detección de patógenos con M1 y M2 pueden hacer de M4 la técnica más conveniente.
3. Las cuatro modalidades de tratamiento periodontal no-quirúrgico evaluadas eran efectivas en la mejora de las variables clínicas a los 6 meses. Los resultados clínicos no demostraron diferencias significativas entre las cuatro modalidades de tratamiento, aunque se detectaron mejores resultados a favor de los procedimientos en 24 horas. Las modalidades de tratamiento evaluadas provocaban un efecto microbiológico limitado, y no se detectaron diferencias significativas en la respuesta de las variables microbiológicas entre los distintos procedimientos.
4. En la evaluación del efecto anti-infeccioso de diferentes modalidades de tratamiento periodontal no-quirúrgico M4 es la estrategia de toma de muestras más adecuada frente a M2.
5. La estrategia en la toma de muestras microbiológicas en Periodoncia es capaz de influir en los resultados obtenidos, sobre todo en la evaluación de la respuesta al tratamiento. La selección y número de localizaciones para realizar la toma de la muestra del biofilm subgingival puede influir en la identificación y enumeración de los patógenos en cultivo.

IX. ANEXO I
TABLAS INTRODUCCIÓN

TABLA 1.
CLASIFICACIÓN DE LAS ENFERMEDADES
PERIODONTALES 1999
(78)

1. ENFERMEDADES GINGIVALES

Inducidas por placa bacteriana	Gingivitis asociada con placa	Con factores locales				
		Sin factores locales				
	Enfermedades gingivales modificadas por factores sistémicos	Asociadas con el sistema endocrino	Gingivitis asociada con pubertad			
			Gingivitis asociada con ciclo menstrual			
		Embarazo	Gingivitis			
			Granuloma piogénico			
	Gingivitis asociada con diabetes-mellitus.					
	Asociadas con discrasias sanguíneas	Gingivitis asociada con leucemia				
		Otros				
	Enfermedades gingivales modificadas por medicamentos	Enfermedades gingivales influenciadas por medicamentos	Agrandamientos gingivales por toma de medicamentos			
Gingivitis por toma de medicamentos			Anticonceptivos orales			
		Otros				
Enfermedades gingivales modificadas por malnutrición		Gingivitis por deficiencia de ácido ascórbico				
	Otros					
No inducidas por placa bacteriana	Enfermedades gingivales de origen bacteriano específico	Lesiones asociadas con <i>Neisseria gonorrhoea</i>				
		Lesiones asociadas con <i>Treponema pallidum</i>				
		Lesiones asociadas con <i>streptococos</i>				
		Otros				
	Enfermedades gingivales de origen vírico	Infección por herpesvirus	Gingivostomatitis herpética primaria.			
			Herpes oral recurrente			
			Infecciones varicela-zoster			
	Otros					
	Enfermedades gingivales de origen fúngico	Infecciones por <i>Candida</i>		Candidiasis gingival generalizada		
		Eritema gingival lineal				
		Histoplasmosis				
		Otros				
	Lesiones gingivales de origen genético	Fibromatosis gingival hereditaria				
		Otros				
	Manifestaciones gingivales de condiciones sistémicas	Alteraciones mucocutáneas	Liquen plano			
			Penfigoide			
			Pénfigo vulgar			
			Eritema multiforme			
			Lupus eritematoso			
Inducido por drogas						
Otros						
Reacciones alérgicas		Materiales dentales restauradores	Mercurio			
			Níquel			
			Acrílico			
		Otros				
		Reacciones atribuibles a:	Pasta de dientes			
	Enjuagues					
Aditivos a goma de mascar						
Alimentos y aditivos						
Otros						
Lesiones traumáticas	Lesiones químicas					
	Lesiones físicas					
Lesiones térmicas						
Reacción a cuerpo extraño						
Otras no especificadas						

2. PERIODONTITIS CRÓNICAS	Localizada Generalizada	
3. PERIODONTITIS AGRESIVAS	Localizada Generalizada	
4. PERIODONTITIS COMO MANIFESTACIÓN DE ENFERMEDADES SISTÉMICAS		
Asociado con enfermedades hematológicas	Neutropenia adquirida	
	Leucemias	
	Otros	
Asociado con desordenes genéticos	Neutropenia cíclica y familiar.	
	Síndrome de Down	
	Síndromes de deficiencias en la adhesión leucocitaria	
	Síndrome de Papillon-Lefèvre.	
	Síndrome de Chediak-Higashi	
	Síndrome de histiocitosis	
	Enfermedad de almacenamiento de glicógeno	
	Agranulocitosis genética infantil	
	Síndrome de Cohen	
	Síndrome de Ehlers-Danlos (tipos IV Y VIII).	
	Hipofosfatasa	
Otros		
Otros no especificados		
5. ENFERMEDADES PERIODONTALES NECROTIZANTES	Gingivitis ulceronecrotizantes Periodontitis ulceronecrotizantes	
6. ABSCESOS DEL PERIODONTO	Absceso gingival Absceso periodontal Absceso pericoronario	
7. PERIODONTITIS ASOCIADAS CON LESIONES ENDODÓNTICAS		
8. DEFORMIDADES O CONDICIONES ADQUIRIDAS O DESARROLLADAS		
Factores locales dentarios que modifican o predisponen a las enfermedades gingivales asociadas a placa / periodontitis	Factores anatómicos dentarios	
	Restauraciones dentarias	
	Fracturas radiculares	
	Reabsorciones radiculares cervicales y perlas del esmalte	
Deformidades o condiciones mucogingivales alrededor de los dientes	Recesiones gingivales / tejido blando (superficies linguales o faciales)	
	Interproximal (papilas)	
	Ausencia de encía queratinizada	
	Ausencia de profundidad de vestíbulo	
	Posición aberrante del frenillo / músculo	
	Exceso gingival	Pseudobolsas
		Margen gingival inconsistente
		Excesivo margen gingival
Agrandamiento gingival		
Alteración del color		
Deformidades o condiciones mucogingivales en tramos desdentados	Defectos verticales / horizontales de la cresta ósea	
	Ausencia de tejido gingival queratinizado	
	Agrandamiento gingival / tejido blando	
	Posición aberrante del frenillo / músculo	
	Ausencia de profundidad de vestíbulo	
Alteración del color		
Trauma oclusal	Trauma oclusal primario	
	Trauma oclusal secundario	

TABLA 2. TABLA DE CONTINGENCIA 2X2 PARA EL CÁLCULO DE LA SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, VALOR PREDICTIVO POSITIVO Y NEGATIVO DE LOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS.

		ENFERMEDAD		Total	
		+	-		
MÉTODO DIAGNÓSTICO	Test +	a	b	a+b	VP+ = a/a+b
	Test -	c	d	c+d	VP- = d/c+d
	Total	a+c	b+d	$n=a+b+c+d$	
		S = a/a+c	E = d/b+d		

S=Sensibilidad
 E= Especificidad
 VP+ =Valor predictivo positivo
 VP- =Valor predictivo negativo
 n= Número de pacientes

TABLA 3. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS EN PERIODONTITIS (95).

Método de detección	Límite de detección	Detecta especies no viables	Tiempo
Cultivo bacteriano No selectivo Selectivo	10^4 - 10^5 10^3	NO	1-3 semanas
Métodos inmunológicos Inmunoanálisis fluorescencia	10^4 10^3	SÍ	Minutos a horas
Sondas ADN	10^2	SÍ	1-48 horas
Análisis Enzimáticos BANA	10^4	NO	15 minutos
PCR	10	SÍ	2-4 horas

TABLA 4. PORCENTAJES DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD PARA CADA MÉTODO DIAGNÓSTICO COMPARADO CON EL MÉTODO DE REFERENCIA (CULTIVO).

TEST MICROBIOLÓGICO	BACTERIA	DIANA MOLECULAR	LÍMITE DE DETECCIÓN	S	E
INMUNOANÁLISIS					
Inmunofluorescencia indirecta (121)	<i>A. actinomycetencomitans</i>	Anticuerpos monoclonales o policlonales	500 células/ml)	82-100%	88-92%
Inmunofluorescencia (342)	<i>A. actinomycetencomitans</i>	Anticuerpos policlonales	--	77%	81%
	<i>P. gingivalis</i>			91%	80%
EvaluSite® (131;221)	<i>A. actinomycetencomitans</i>	Anticuerpos policlonales	10 ⁵	20%	98%
	<i>P. gingivalis</i>		10 ⁶	52%	98%
Inmunoanálisis fluorescente de concentrado bacteriano (129)	<i>A. actinomycetencomitans</i>	Anticuerpos monoclonales para antígenos celulares	10 ⁴	100%	68%
	<i>P. gingivalis</i>			100%	57%
SONDAS DE ADN					
DMDx (224)	<i>A. actinomycetencomitans</i>	Región ADN específico desconocida su función ADN genómico	--	21%	83%
	<i>P. gingivalis</i>			71%	53%
PCR					
PCR Cualitativa (226)	<i>A. actinomycetencomitans</i>	Gen 16S ARN	25-100 céls	45%	79%
	<i>P. gingivalis</i>			100%	38%
PCR Cualitativa (227)	<i>P. gingivalis</i>	Gen colagenasa prtC	100 cels	90%	70%
PCR Cualitativa (225)	<i>A. actinomycetencomitans</i>	Gen leucotoxina	--	96%	89%
	<i>P. gingivalis</i>	Gen fimbriae		94%	85%
PCR Multiplex (171)	<i>A. actinomycetencomitans</i>	Gen 16S ARN	1-5 cels	89%	73%
	<i>P. gingivalis</i>		5-50 céls	100%	71%
PCR Cuantitativa a tiempo-real (114)	<i>A. actinomycetencomitans</i>	Gen LktC leucotoxina	10 céls	75%	93%
	<i>P. gingivalis</i>	Gen Arg-gingipain		71%	85%
	<i>T. forsythensis</i>	Gen antígeno BspA		100%	12%

S= Sensibilidad
E= Especificidad

TABLA 5. ESTUDIOS REALIZADOS SOBRE LA DESINFECCIÓN EN BOCA COMPLETA Y PROTOCOLOS RELACIONADOS.

ESTUDIO	AÑO	DBC	TC	Same day full mouth	RAR 24h	CLIN	MIC	MESES
Quirynen (305)	1995	5	5	-	-	sí	sí	2
Vanderkerckhove (310)	1996	5	5	-	-	sí	-	8
Bollen (309)	1996	5	5	-	-	-	sí	8
Bollen (308)	1998	8	8	-	-	sí	sí	4
Mongardini (306)	1999	20	20	-	-	sí	-	8
Quirynen (282)	1999	20	20	-	-	-	sí	8
De Soete (307)	2001	31	-	-	-	-	sí	8
Quirynen (281)	2000	20	20	-	12	Sí	sí	8
Apatzidou (180;320;321)	2004	-	-	20	20	Sí	sí	6
Nagata (343)	2001	29	-	-	-	-	-	6

DBC = Desinfección en boca completa (raspado y alisado radicular en 24 horas + tratamiento en otros nichos orales con clorhexidina).

TC = Grupo del tratamiento convencional (raspado y alisado radicular en 1 mes).

Same-day full-mouth = Raspado y alisado radicular en menos de 12 horas.

RAR 24 h = Raspado y alisado radicular en 24 horas (sin clorhexidina coadyuvante).

CLIN = Variables clínicas.

MIC = Variables microbiológicas.

TABLA 6. CARACTERÍSTICAS DE LOS ESTUDIOS SOBRE LA DESINFECCIÓN EN BOCA COMPLETA.

ESTUDIO	AÑO	PACIENTES	DBC	TC	RAR 12 h	RAR 24 h
Quiryren Vanderker. Bollen (305;309;310)	1995 1996 1996	Periodontitis crónica avanzada	RAR 24 h y enjuagues clorhexidina dos semanas	RAR cada dos semanas	-	-
Bollen (308)	1998	Periodontitis crónica / agresiva avanzada	RAR 24 h y clorhexidina en lengua, irrigación subgingival, enjuagues y amígdalas dos meses	RAR cada dos semanas	-	-
Mongardini Quiryren De Soete (282;306;307)	1999 1999 2001	Periodontitis crónica / agresiva avanzada	RAR 24 h y clorhexidina en lengua, irrigación subgingival, enjuagues y amígdalas dos meses	RAR cada dos semanas	-	-
Quiryren (281)	2000	Periodontitis avanzada	RAR 24 h y clorhexidina en lengua, irrigación subgingival, enjuagues y amígdalas dos meses	RAR cada dos semanas	-	RAR 24 h sin clorhexidina
Apatzidou (180;320;321)	2004	Periodontitis crónicas moderada / avanzada	-	RAR cada dos semanas	RAR 12 h sin clorhexidina	-
Nagata (343)	2001	Periodontitis crónica	RAR 24 horas, amígdalas, irrigación subgingival, enjuague 6 semanas	RAR cada semana	-	-

DBC = Desinfección en boca completa (raspado y alisado radicular en 24 horas + tratamiento en otros nichos orales con clorhexidina).

TC = Grupo del tratamiento convencional (raspado y alisado radicular en 1 mes).

RAR 12 h = Raspado y alisado radicular en menos de 12 horas.

RAR 24 h = Raspado y alisado radicular en 24 horas (sin clorhexidina coadyuvante).

TABLA 7. CAMBIOS MEDIOS EN LA PROFUNDIDAD DE SONDAJE EN LOS DIFERENTES ESTUDIOS Y MODALIDADES DE TRATAMIENTO PERIODONTAL-NO QUIRÚRGICO EN DIENTES UNIRRADICULARES Y MULTIRRADICULARES.

ESTUDIO	Prof. Sondaje	Unirradiculares			Multirradiculares			Meses
		RAR 24 h	DBC	TC	RAR 24 h	DBC	TC	
Quiryren (305)	5-6	-	2,2	2,0	-	-	-	2
	>7	-	3,3	2,5	-	-	-	
Vanderkerckove (310)	5-6	-	2,6	1,9	-	2,2	1,8	8
	>7	-	4,1	3,3	-	3,9	2,7	
Bollen (308)	5-6	-	2,0	1,1	-	1,6	0,9	4
	>7	-	3,3	1,0	-	2,4	1,0	
Mongardini (306)	4,5-6,5	-	1,9	1,2	-	1,6	0,7	8
	>7	-	3,7	1,9	-	3,0	1,6	
Quiryren (281)	4,5-6,5	2,1	1,9	1,2	1,4	1,6	0,7	8
	>7	3,3	3,7	1,9	2,9	3,0	1,6	

ESTUDIO	Prof. Sondaje	RAR 12 h	TC	Meses
Apatzidou (180;320;321)	Todas	1,7	1,8	6
ESTUDIO	Prof. Sondaje	DBC	TC	Meses
Nagata (343)	Todas	Diferencias no significativas, datos no disponibles (no publicados)		6

Prof. Sondaje = Profundidad de sondaje.

RAR 24 h = Raspado y alisado radicular en 24 h (sin uso de clorhexidina coadyuvante).

DBC = Desinfección en boca completa (raspado y alisado radicular en 24 h + clorhexidina).

TC= Grupo del tratamiento convencional (raspado y alisado radicular en 1 mes).

RAR 12 h = Raspado y alisado radicular en 12 h.

TABLA 8. CAMBIOS MEDIOS EN EL NIVEL DE INSERCIÓN EN LOS DIFERENTES ESTUDIOS Y MODALIDADES DE TRATAMIENTO PERIODONTAL NO-QUIRÚRGICO EN DIENTES UNIRRADICULARES Y MULTIRRADICULARES.

ESTUDIO	Prof. Sondaje	Unirradiculares			Multirradiculares		
		RAR 24 h	DBC	TC	RAR 24 h	DBC	TC
Quiryren (305)	5-6	-	1,78	1,47	-	-	-
	>7	-	3,47	1,88	-	-	-
Bollen (308)	5-6	-	0,9	0,0	-	0,6	-0,1
	>7	-	1,7	0,4	-	1	0,1
Mongardini (306)	4,5-6,5	-	1,1	0,3	-	0,9	0,0
	>7	-	2,3	0,6	-	2,0	0,5
Quiryren (281)	4,5-6,5	1,6	1,1	0,3	1,3	0,9	0,0
	>7	2,6	2,3	0,6	2,3	2,0	0,5

Prof. Sondaje = Profundidad de sondaje.

RAR 24 h = Raspado y alisado radicular en 24 horas (sin clorhexidina coadyuvante).

DBC = Desinfección en boca completa (raspado y alisado radicular en 24 horas + tratamiento en otros nichos orales con clorhexidina).

TC = Grupo del tratamiento convencional (raspado y alisado radicular en 1 mes).

TABLA 9. ÍNDICE DE SANGRADO AL SONDAJE ENTRE LOS DIFERENTES ESTUDIOS Y MODALIDADES DE TRATAMIENTO PERIODONTAL NO-QUIRÚRGICO.

ESTUDIO	DIENTE	RAR 24 h	DBC	TC	DIF	SIG	N	MES
Quirynen (305)	Uni	-	60	60	0	NS	10	2
	Multi	-	70	80	10	S	10	2
Vanderkerckhove (310)	Todos	-	30	30	0	NS	10	8
Bollen (308)	Todos	-	20	47	27	S	16	4
Mongardini (306)	Todos	-	25	45	20	S	24	8
Quirynen (281)	Todos	19	25	45	20/2	S	36	8

RAR 24 h = Raspado y alisado radicular en 24 horas (sin clorhexidina coadyuvante).

DBC = Desinfección en boca completa (raspado y alisado radicular en 24 horas + tratamiento en otros nichos orales con clorhexidina).

TC = Grupo del tratamiento convencional (raspado y alisado radicular en 1 mes).

DIF = Diferencias entre las modalidades de tratamiento comparadas.

SIG = Existencia de significación estadística.

SS = Significación estadística.

NS = No significación estadística.

N = Número de pacientes.

MES = Duración del estudio.

TABLA 10. DATOS MICROBIOLÓGICOS COMPARANDO LOS TRATAMIENTOS EN 24 HORAS CON EL TRATAMIENTO CONVENCIONAL.

ESTUDIO	M. Contraste de fase	UFC	CULTIVOS		
			<i>Bacteroides</i> negro-pigmentados	Patógenos específicos	Sondas ADN
Quirynen (305)	NS	NS	-	S	-
Bollen (309)	NS, unirradicular	S	-	NS	-
	S, multiradicular	S	-	NS	-
Bollen (308)	S	S	-	-	-
Quirynen (282)	P.crónica S	NS	S	S	-
	P.agresiva NS		NS	NS	-
Quirynen (281)	S	S	S	S	-
De Soete (307)	-	-	-	-	NS

UFC = Unidades formadoras de colonia.

S = Significación estadística.

NS = No significación estadística.

- = Datos no disponibles.

X. ANEXO II
FIGURAS PACIENTES
Y MÉTODOS

FIGURA 1. ESQUEMA DEL DISEÑO DEL ESTUDIO 2.

RAR= Raspado y alisado radicular. Grupo TC= Grupo tratamiento convencional. Grupo DB-c= RAR radicular 24 horas con curetas. Grupo DB-us= RAR con ultrasonidos e irrigación agua en 24 horas. Grupo DB-chx= RAR con ultrasonidos e irrigación clorhexidina en 24 horas.

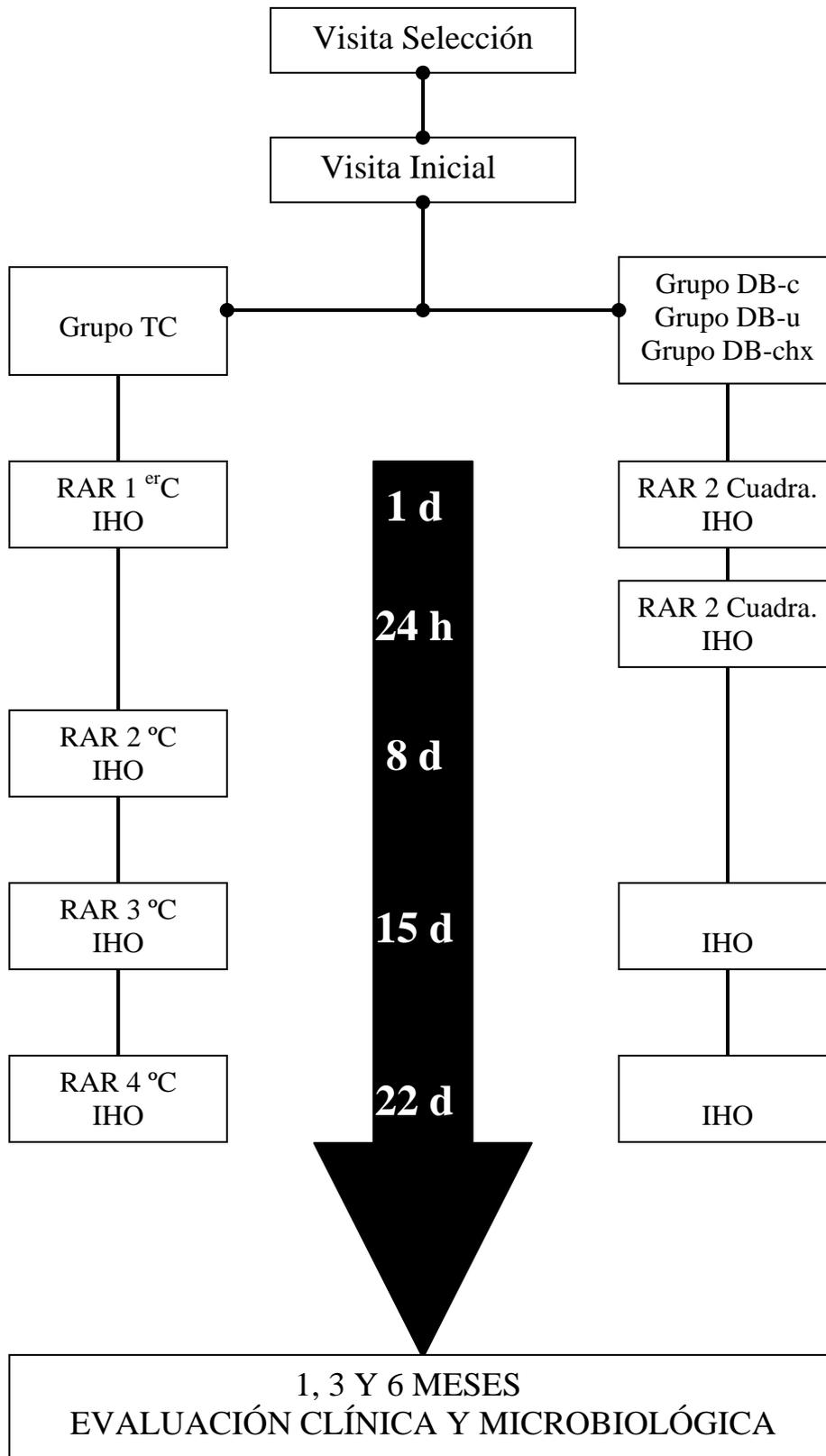


FIGURA 2. SONDA FLORIDA®

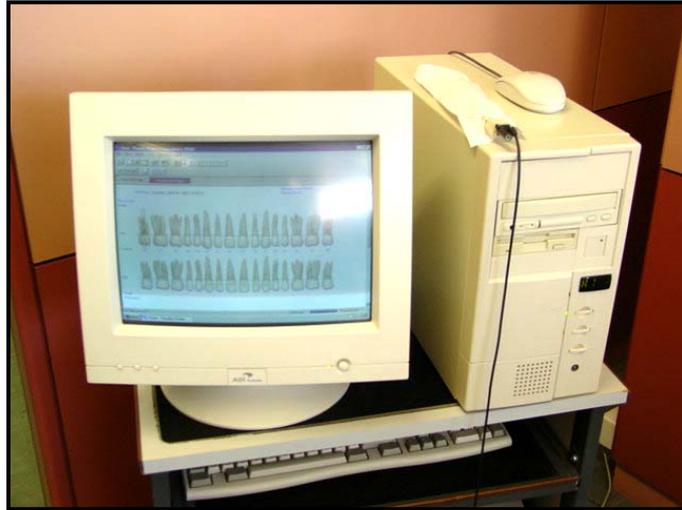


FIGURA 3. PIEZA DE MANO DE SONDA FLORIDA®

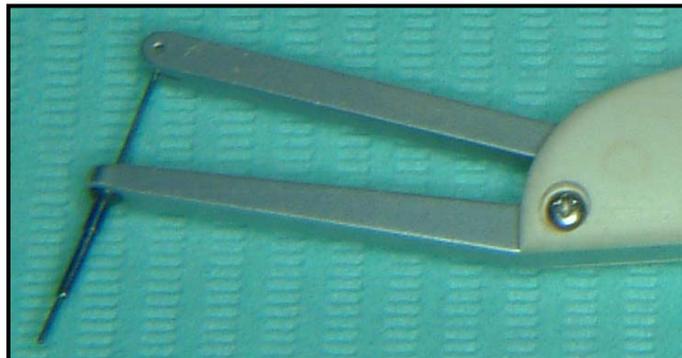


FIGURA 4. PIEZA DE MANO DE LA SONDA FLORIDA® PARA LA MEDICIÓN NIVEL DE INSERCIÓN RELATIVO (“STENT PROBE”)

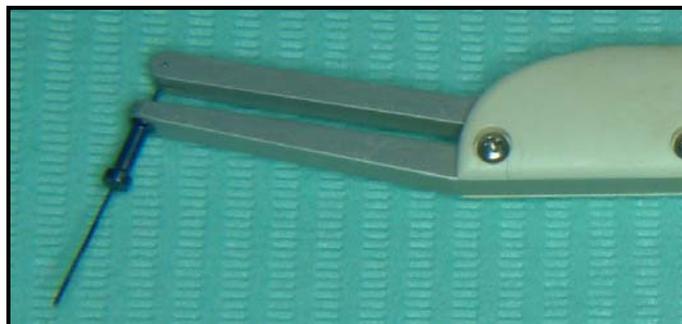


FIGURA 5. MODELO DE TRABAJO EN ESCAYOLA PARA LA CONFECCIÓN FÉRULA.

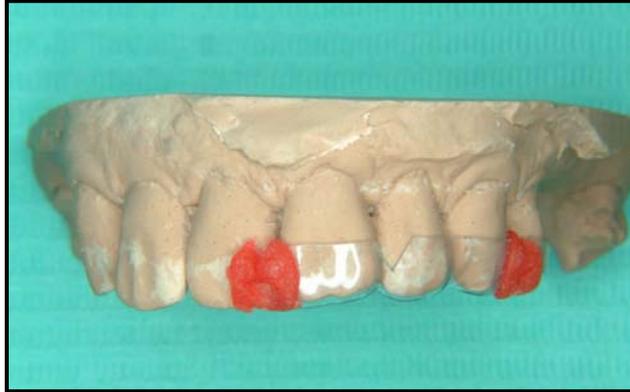


FIGURA 6. TOPE DE ACRÍLICO EN FÉRULA.

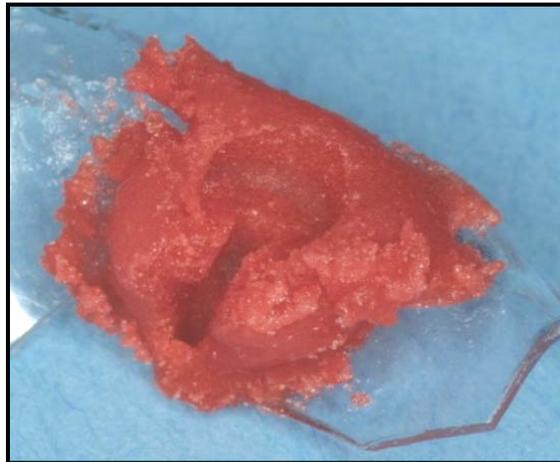
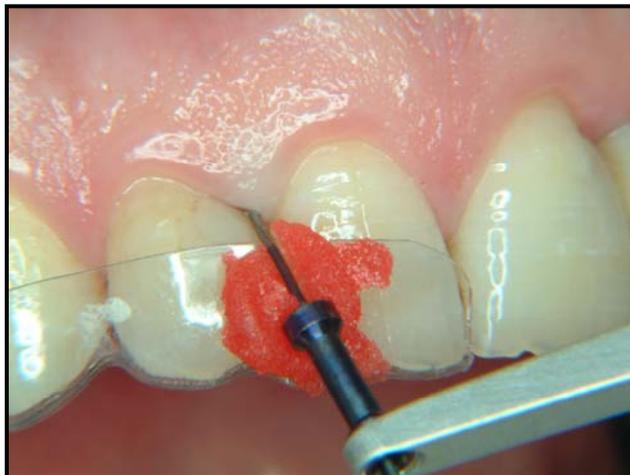


FIGURA 7. MEDICIÓN DEL NIVEL DE INSERCIÓN RELATIVO



XI. ANEXO III
TABLAS Y GRÁFICOS
RESULTADOS

**ESTUDIO 1: EVALUACIÓN ESTRATEGIA DE MUESTRAS EN LA FASE
DIAGNÓSTICA.**

TABLA 11. CARACTERÍSTICAS DE LAS POBLACIONES					
		Grupo 1vs4		Grupo 2vs4	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Tabaco	No	18	54,5	12	60
	<10 cig/día	5	15,1	6	30
	>10 cig/día	10	30,3	2	10
	TOTAL	33		20	
Estrés	No	1	3,0	2	10
	Poco	14	42,4	7	35
	Mucho	18	54,5	11	55
	TOTAL	33		20	
Edad	Media	46		48,3	
	ds	9,8		9,9	
	Rango	29-73		37-71	
Sexo	Mujeres	14	42,4	13	65
	Hombres	19	57,6	7	35
	TOTAL	33		20	
Periodontitis	Agresiva Moderada	1	3,0	-	-
	Crónica Moderada	15	45,4	17	85
	Crónica Avanzada	17	51,5	3	15
	TOTAL	33		20	

ds = Desviación estándar.

cig = Cigarrillos.

n= Número de pacientes.

TABLA 12. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LAS LOCALIZACIONES SELECCIONADAS.

GRUPOS DE ESTUDIO	ESTRATEGIA	Profundidad de sondaje		Recesión	
		<i>media</i>	<i>ds</i>	<i>media</i>	<i>ds</i>
Grupo 1vs4	M1	7,5	1,1	1,0	1,3
	M4	6,1	0,7	1,2	1,2
Grupo 2vs4	M2	6,4	0,9	2,3	1,7
	M4	5,7	0,9	1,0	1,1

GRUPOS DE ESTUDIO	ESTRATEGIA	% Medio sangrado sondaje	% Medio presencia placa	% Medio supuración
Grupo 1vs4	M1	96,9	96,9	21,2
	M4	92,4	96,9	15,9
Grupo 2vs4	M2	97,4	95,6	15,4
	M4	91,8	94,4	20,4

ds = Desviación estándar.

M1 = Muestra de la localización más enferma de la boca.

M2 = Muestra de dos localizaciones del primer cuadrante tratado.

M4 = Muestra de cuatro localizaciones, la más enferma de cada cuadrante.

TABLA 13A. LOGARITMO UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA (Media y desviación estándar) POR MUESTRA EN GRUPO 1VS4.

Log UFC	M1		M4		Estadística
	media	ds	media	ds	p
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	2,017	0,089	2,244	0,710	0,999 [^]
<i>P. gingivalis</i>	4,980	1,258	5,710	1,520	<u>p<0,001</u> [^]
<i>T. forsythensis</i>	3,557	0,955	3,769	1,223	0,999 [^]
<i>P. intermedia</i>	4,249	0,949	5,202	1,116	<u>p<0,001</u> *
<i>M. micros</i>	4,057	0,961	4,521	1,220	<u>0,0136</u> *
<i>C. rectus</i>	3,176	0,454	3,179	0,581	0,999 [^]
<i>F. nucleatum</i>	4,429	0,762	5,364	0,520	<u>p<0,001</u> *
Total	6,129	0,560	6,961	0,563	<u>p<0,001</u> *

TABLA 13 B. LOGARITMO UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA (Media y desviación estándar) POR MUESTRA EN GRUPO 2VS4.

Log UFC	M2		M4		Estadística
	media	ds	media	ds	p
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	2,102	0,375	2,228	0,732	0,999 [^]
<i>P. gingivalis</i>	4,572	1,312	4,757	1,501	0,589*
<i>T. forsythensis</i>	3,038	0,173	3,210	0,651	0,999 [^]
<i>P. intermedia</i>	4,258	1,117	4,913	1,232	<u>0,025</u> *
<i>M. micros</i>	3,671	0,815	4,022	1,120	0,115*
<i>C. rectus</i>	3,256	0,689	3,254	0,750	0,999 [^]
<i>F. nucleatum</i>	5,012	0,944	5,418	0,897	<u>0,025</u> *
Total	6,171	0,847	6,566	0,655	<u>0,025</u> *

* = Test-t pareado.

[^] = Test rangos señalados.

p < 0,05 = Significación estadística.

ds = Desviación estándar.

M1 = Muestra de la localización más enferma de la boca.

M2 = Muestra de dos localizaciones del primer cuadrante tratado.

M4 = Muestra de cuatro localizaciones, la más enferma de cada cuadrante.

TABLA 14A. PREVALENCIA DE CADA PATÓGENO EN GRUPO 1VS4 SEGÚN ESTRATEGIA DE TOMA DE MUESTRA.

%	M1	M4	Test chi-cuadrado
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	6	12	0,391
<i>P. gingivalis</i>	79	82	0,756
<i>T. forsythensis</i>	27	30	0,785
<i>P. intermedia</i>	85	91	0,450
<i>M. micros</i>	61	67	0,608
<i>C. rectus</i>	15	9	0,450
<i>F. nucleatum</i>	91	100	0,076

TABLA 14B. PREVALENCIA DE CADA PATÓGENO EN GRUPO 2VS4 SEGÚN ESTRATEGIA DE TOMA DE MUESTRAS.

%	M2	M4	Test chi-cuadrado
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	10	10	1,000
<i>P. gingivalis</i>	75	65	0,490
<i>T. forsythensis</i>	5	10	0,548
<i>P. intermedia</i>	65	80	0,288
<i>M. micros</i>	45	50	0,751
<i>C. rectus</i>	15	15	1,000
<i>F. nucleatum</i>	95	100	0,311

M1 = Muestra de la localización más enferma de la boca.

M2 = Muestra de dos localizaciones del primer cuadrante tratado.

M4 = Muestra de cuatro localizaciones, la más enferma de cada cuadrante.

TABLA 15A. PORCENTAJE DE FLORA EN LOCALIZACIONES POSITIVAS EN GRUPO 1VS4 POR CADA PATÓGENO PERIODONTAL (media y desviación estándar).

%	M1		M4		Dif M4-M1	TRS p
	media	ds	media	ds		
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0,002	0,01	0,04	0,1	0,03	0,99
<i>P. gingivalis</i>	25,9	23,4	26,2	23,8	0,3	0,85
<i>T. forsythensis</i>	2,2	6,0	2,0	4,3	-0,2	0,99
<i>P. intermedia</i>	4,1	6,3	6,2	9,9	2,1	0,15
<i>M. micros</i>	3,1	4,6	2,3	3,4	-0,8	0,84
<i>C. rectus</i>	0,4	1,2	0,2	1,2	-0,2	0,99
<i>F. nucleatum</i>	4,1	4,3	3,9	3,0	-0,2	0,99
<i>E. corrodens</i>	0,1	0,2	0,2	0,4	0,1	1,00
<i>Eubacterium sp</i>	1,3	4,2	0,6	2,1	-0,7	0,99
<i>Campylobacter sp</i>	0,1	0,4	0,3	0,8	0,2	1,00

TABLA 15B. PORCENTAJE DE FLORA EN LOCALIZACIONES POSITIVAS EN GRUPO 2VS4 POR CADA PATÓGENO PERIODONTAL (media y desviación estándar).

%	M2		M4		Dif M4-M2	TRS p
	media	ds	media	ds		
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0,03	0,1	0,2	1,1	0,17	0,99
<i>P. gingivalis</i>	11,9	13,6	11,6	17,3	-0,3	0,61
<i>T. forsythensis</i>	0,1	0,3	0,3	0,9	0,2	0,99
<i>P. intermedia</i>	5,6	9,7	10,1	12,9	4,5	0,22
<i>M. micros</i>	1,0	2,3	2,4	4,8	1,4	0,43
<i>C. rectus</i>	0,2	0,7	0,3	1,1	0,1	0,99
<i>F. nucleatum</i>	11,3	12,6	10,7	9,8	-0,6	0,89

M1 = Muestra de la localización más enferma de la boca.

M2 = Muestra de dos localizaciones del primer cuadrante tratado.

M4 = Muestra de cuatro localizaciones, la más enferma de cada cuadrante.

Dif M4-M1 o Dif M4-M2= Diferencia entre ambas estrategias.

TRS = Test de los rangos señalados.

ds = Desviación estándar

TABLA 16A. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE MUESTRA-ÚNICA (M1) POR CADA PATÓGENO EN RELACIÓN CON M4.

%	Sensibilidad	Especificidad	Test chi cuadrado p	Test Pearson p
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	50	100	<u>0,004</u>	<u>0</u>
<i>P. gingivalis</i>	88,9	66,7	<u>0,013</u>	<u>0,0009</u>
<i>T. forsythensis</i>	80	95,7	<u>0</u>	<u>0</u>
<i>P. intermedia</i>	90	66,7	0,077	<u>0,004</u>
<i>M. micros</i>	77,3	72,7	<u>0,016</u>	<u>0,009</u>
<i>C. rectus</i>	0	83,3	1,000	0,229
<i>F. nucleatum</i>	90,9	---	---	---

TABLA 16B. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE MUESTRA-DOBLE (M2) POR CADA PATÓGENO EN RELACIÓN CON M4.

%	Sensibilidad	Especificidad	Test chi Cuadrado p	Test Pearson p
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	100	100	<u>0,001</u>	<u>0,000</u>
<i>P. gingivalis</i>	92,3	57,1	0,058	<u>0,006</u>
<i>T. forsythensis</i>	50	100	0,171	<u>0,0004</u>
<i>P. intermedia</i>	75	75	0,197	<u>0,032</u>
<i>M. micros</i>	70	80	0,072	<u>0,012</u>
<i>C. rectus</i>	33,3	88,2	0,930	0,180
<i>F. nucleatum</i>	95	----	---	---

Test Pearson $p < 0,05$ = Correlacionados significativamente.

Test chi-cuadrado $p < 0,05$ = Se descarta significativamente que sean independientes.

ESTUDIO 2: EVALUACIÓN ESTRATEGIA DE MUESTRAS EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO PERIODONTAL NO-QUIRÚRGICO.

TABLA 17. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES, GENERAL Y POR GRUPOS DE TRATAMIENTO

		General	TC	DB-c	DB-us	DB-chx
Tabaco	No	12	4	2	3	3
	<10 cig/día	6	1	2	2	1
	>10 cig/día	2	0	1	0	1
TOTAL		20	5	5	5	5
Estrés	No	2	0	1	0	1
	Bajo	7	3	1	1	2
	Alto	11	2	3	4	2
TOTAL		20	5	5	5	5
Edad	Media	48,3	50,8	41,8	52,8	47,8
	ds	9,9	13,0	4,1	8,6	11,1
	Rango	37-71	38-71	37-47	44-67	39-67
Sexo	Mujeres	13	3	3	3	4
	Hombres	7	2	2	2	1
TOTAL		20	5	5	5	5

ds = Desviación estándar.

TC = Raspado y alisado radicular en 1 mes.

DB-C = Raspado y alisado radicular 24 horas con curetas.

DB-us = Instrumentación con ultrasonidos e irrigación agua en 24 horas.

DB-chx = Instrumentación con ultrasonidos e irrigación clorhexidina en 24 horas.

TABLA 18. PROFUNDIDAD DE SONDAJE POR VISITA Y POR GRUPO DE TRATAMIENTO, TANTO GENERAL COMO SEGÚN LA PROFUNDIDAD DE SONDAJE INICIAL (media y desviación estándar)

General	Visita inicial		1 mes		3 meses		6 meses	
	media	ds	media	ds	media	ds	media	ds
TC	2,6	0,36	2,2	0,40	2,1	0,28	2,1	0,29
DB-c	2,7	0,23	2,0	0,20	1,9	0,36	1,9	0,25
DB-us	2,8	0,26	2,3	0,18	2,1	0,30	2,1	0,35
DB-chx	2,9	0,56	2,2	0,48	2,3	0,52	2,1	0,32

0-3,4 mm	Visita inicial		1 mes		3 meses		6 meses	
	media	ds	media	ds	media	ds	media	Ds
TC	2,2	0,20	2,0	0,29	1,9	0,20	2,0	0,26
DB-c	2,1	0,20	1,8	0,33	1,7	0,36	1,7	0,31
DB-us	2,1	0,17	2,0	0,10	1,9	0,16	1,8	0,25
DB-chx	2,1	0,08	1,8	0,20	2,0	0,21	1,8	0,19

3,5-5,4mm	Visita inicial		1 mes		3 meses		6 meses	
	media	ds	media	ds	media	ds	media	ds
TC	4,2	0,20	3,0	0,40	3,0	0,36	2,9	0,37
DB-c	4,3	0,28	2,7	0,42	2,6	0,51	2,8	0,83
DB-us	4,4	0,14	3,0	0,44	2,7	0,61	2,6	0,51
DB-chx	4,4	0,11	2,8	0,56	2,8	0,63	2,6	0,44

>5,4mm	Visita inicial		1 mes		3 meses		6 meses	
	media	ds	media	ds	media	ds	media	ds
TC	6,0	0,17	3,9	1,13	3,9	1,13	3,5	1,00
DB-c	6,5	0,77	3,5	1,64	3,5	1,92	3,9	2,07
DB-us	6,1	0,39	4,0	0,39	3,9	0,74	3,5	0,48
DB-chx	6,1	0,20	3,5	1,56	3,9	1,38	3,7	1,40

ds = Desviación estándar.

TC = Raspado y alisado radicular en 1 mes.

DB-C = Raspado y alisado radicular 24 horas con curetas.

DB-us = Instrumentación con ultrasonidos e irrigación agua en 24 horas.

DB-chx = Instrumentación con ultrasonidos e irrigación clorhexidina en 24 horas.

TABLA 19. DISTRIBUCIÓN DE BOLSAS PERIODONTALES SEGÚN SU PROFUNDIDAD DE SONDAJE, POR GRUPO Y VISITA (porcentaje medio y desviación estándar).

0-3,4 mm	Visita inicial		1 mes		3 meses		6 meses	
	media	ds	media	ds	media	ds	media	ds
TC	77,6	7,84	92,6	8,03	92,7	5,05	93,2	4,93
DB-c	75,4	5,11	92,8	5,86	93,0	6,68	93,6	3,23
DB-us	73,1	6,78	90,6	5,65	91,2	7,31	92,1	7,55
DB-chx	65,8	15,82	87,3	12,08	88,6	11,21	91,5	7,72

3,5-5,4mm	Visita inicial		1 mes		3 meses		6 meses	
	media	ds	media	ds	media	ds	media	ds
TC	21,9	6,47	7,2	7,51	7,0	4,61	6,6	4,63
DB-c	21,6	6,02	6,4	5,17	6,1	5,49	5,9	2,96
DB-us	23,8	5,34	8,5	5,55	7,9	6,66	7,3	6,76
DB-chx	28,0	10,47	11,4	11,32	10,2	10,55	7,4	6,49

>5,4mm	Visita inicial		1 mes		3 meses		6 meses	
	media	ds	media	ds	media	ds	media	ds
TC	1,8	1,18	0,2	0,55	0,4	0,54	0,3	0,36
DB-c	3,1	3,42	0,8	1,14	0,9	1,50	0,6	0,59
DB-us	3,1	2,21	0,9	0,72	0,9	0,87	0,6	0,82
DB-chx	6,3	6,66	1,3	1,77	1,2	1,31	1,1	1,28

ds = Desviación estándar.

TC = Raspado y alisado radicular en 1 mes.

DB-C = Raspado y alisado radicular 24 horas con curetas.

DB-us = Instrumentación con ultrasonidos e irrigación agua en 24 horas.

DB-chx = Instrumentación con ultrasonidos e irrigación clorhexidina en 24 horas.

TABLA 20. NIVEL DE INSERCIÓN POR VISITA Y GRUPO DE TRATAMIENTO, TANTO GENERAL COMO SEGÚN LA PROFUNDIDAD DE SONDAJE INICIAL (media y desviación estándar).

General	Visita inicial		1 mes		3 meses		6 meses	
	media	ds	media	ds	media	ds	media	ds
TC	3,6	0,55	3,1	0,66	3,1	0,73	3,1	0,77
DB-c	2,9	0,36	2,4	0,30	2,3	0,52	2,3	0,33
DB-us	3,5	0,67	3,4	0,64	3,0	0,79	3,0	0,94
DB-chx	3,6	0,52	2,9	0,53	3,1	0,57	2,8	0,40

0-3,4 mm	Visita inicial		1 mes		3 meses		6 meses	
	media	ds	media	ds	media	ds	media	ds
TC	3,1	0,39	2,8	0,50	2,8	0,64	2,8	0,68
DB-c	2,3	0,35	2,1	0,18	2,0	0,35	2,0	0,17
DB-us	2,9	0,59	3,1	0,57	2,7	0,75	2,8	0,94
DB-chx	2,8	0,51	2,6	0,75	2,7	0,61	2,5	0,65

3,5-5,4mm	Visita inicial		1 mes		3 meses		6 meses	
	media	ds	media	ds	media	ds	media	ds
TC	5,1	0,97	4,2	1,15	4,1	1,16	4,1	1,19
DB-c	4,4	0,49	3,2	0,63	3,1	0,85	3,3	0,70
DB-us	5,0	0,45	4,0	0,62	3,5	0,72	3,4	0,78
DB-chx	4,8	0,42	3,3	0,45	3,4	0,63	3,0	0,27

>5,4mm	Visita inicial		1 mes		3 meses		6 meses	
	media	ds	media	ds	media	ds	media	ds
TC	7,2	1,22	5,4	1,68	5,0	1,88	4,6	1,79
DB-c	6,6	0,88	4,1	1,93	4,3	2,32	4,6	2,36
DB-us	6,7	0,39	5,1	0,87	4,9	1,14	4,4	0,95
DB-chx	6,6	0,30	4,3	0,94	4,9	1,15	4,4	1,13

ds = Desviación estándar.

TC = Raspado y alisado radicular en 1 mes.

DB-c = Raspado y alisado radicular 24 horas con curetas.

DB-us = Instrumentación con ultrasonidos e irrigación agua en 24 horas.

DB-chx = Instrumentación con ultrasonidos e irrigación clorhexidina en 24 horas.

TABLA 21. NIVEL DE INSERCIÓN RELATIVO POR GRUPO DE TRATAMIENTO (media y desviación estándar).

Grupos de tratamiento	Visita inicial-1 mes		Visita inicial-3 meses		Visita inicial-6 meses	
	media	ds	media	ds	media	ds
TC	0,38	0,48	0,68	0,36	0,80	0,37
DB-c	0,82	0,60	0,82	0,78	1,02	0,77
DB-us	0,82	0,49	1,10	0,38	1,06	0,59
DB-chx	1,36	0,90	1,08	0,65	1,40	1,19

ds = Desviación estándar.

TC = Raspado y alisado radicular en 1 mes.

DB-C = Raspado y alisado radicular 24 horas con curetas.

DB-us = Instrumentación con ultrasonidos e irrigación agua en 24 horas.

DB-chx = Instrumentación con ultrasonidos e irrigación clorhexidina en 24 horas.

TABLA 22. ÍNDICE DE PLACA, POR GRUPO DE TRATAMIENTO Y VISITA (media y desviación estándar).

Grupos de tratamiento	Visita inicial		1 mes		3 meses		6 meses	
	media	ds	media	ds	media	ds	media	ds
TC	0,97	0,03	0,53	0,25	0,59	0,22	0,56	0,12
DB-c	0,88	0,15	0,29	0,17	0,34	0,26	0,35	0,20
DB-us	0,80	0,12	0,41	0,23	0,21	0,17	0,39	0,11
DB-chx	0,86	0,27	0,54	0,21	0,54	0,35	0,55	0,33

ds = Desviación estándar.

TC = Raspado y alisado radicular en 1 mes.

DB-C = Raspado y alisado radicular 24 horas con curetas.

DB-us = Instrumentación con ultrasonidos e irrigación agua en 24 horas.

DB-chx = Instrumentación con ultrasonidos e irrigación clorhexidina en 24 horas.

TABLA 23. EVOLUCIÓN DEL ÍNDICE DE SANGRADO AL SONDAJE, POR GRUPO DE TRATAMIENTO Y VISITA (media y desviación estándar).

Grupos de tratamiento	Visita inicial-1 mes		Visita inicial-3 meses		Visita inicial-6 meses	
	media	ds	media	ds	media	ds
TC	0,25	0,24	0,26	0,24	0,47	0,21
DB-c	0,20	0,18	0,33	0,23	0,30	0,10
DB-us	0,24	0,12	0,36	0,19	0,21	0,23
DB-chx	0,27	0,16	0,30	0,13	0,36	0,10

ds = Desviación estándar.

TC = Raspado y alisado radicular en 1 mes.

DB-C = Raspado y alisado radicular 24 horas con curetas.

DB-us = Instrumentación con ultrasonidos e irrigación agua en 24 horas.

DB-chx = Instrumentación con ultrasonidos e irrigación clorhexidina en 24 horas.

TABLA 24. LOGARITMO UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA SEGÚN LA ESTRATEGIA DE TOMA DE MUESTRAS, POR GRUPO DE TRATAMIENTO Y VISITA (media y desviación estándar).

M4								
	Visita inicial		1 mes		3 meses		6 meses	
	media	ds	media	ds	media	ds	media	ds
General	6,576	0,672	6,484	0,539	6,336	0,457	6,091	0,616
TC	6,595	0,432	6,488	0,768	6,401	0,522	6,198	1,069
DB-c	6,468	1,258	6,617	0,703	6,366	0,212	5,857	0,334
DB-us	6,770	0,220	6,457	0,482	6,447	0,241	5,863	0,458
DB-chx	6,450	0,727	6,376	0,168	6,130	0,736	6,467	0,457

M2								
	Visita inicial		1 mes		3 meses		6 meses	
	media	ds	media	ds	media	ds	media	ds
General	6,237	0,817	5,841	0,638	5,895	0,768	5,470	0,923
TC	6,186	0,481	5,801	0,494	5,644	1,329	5,109	1,861
DB-c	5,827	0,868	5,429	0,735	5,857	0,747	5,333	0,475
DB-us	6,720	0,560	6,093	0,506	6,310	0,279	5,794	0,618
DB-chx	6,132	1,190	6,042	0,742	5,769	0,293	5,596	0,386

ds = Desviación estándar.

TC = Raspado y alisado radicular en 1 mes.

DB-C = Raspado y alisado radicular 24 horas con curetas.

DB-us = Instrumentación con ultrasonidos e irrigación agua en 24 horas.

DB-chx = Instrumentación con ultrasonidos e irrigación clorhexidina en 24 h.

M2 = Muestra de dos localizaciones del primer cuadrante tratado.

M4 = Muestra de cuatro localizaciones, la más enferma de cada cuadrante.

TABLA 25. FRECUENCIA DE DETECCIÓN Y PROPORCIÓN DE FLORA EN LOCALIZACIONES POSITIVAS PARA *P. gingivalis*, SEGÚN LA ESTRATEGIA DE TOMA DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS.

M4								
	Visita inicial		1 mes		3 meses		6 meses	
	frec.	%flora	frec.	%flora	frec.	%flora	frec.	%flora
General	65%	17%	65%	7%	50%	13%	58%	15%
TC	80%	9%	60%	5%	60%	12%	25%	38%
DB-c	75%	31%	100%	9%	60%	11%	80%	11%
DB-us	60%	16%	40%	5%	60%	9%	60%	17%
DB-chx	40%	15%	60%	9%	20%	37%	60%	11%

M2								
	Visita inicial		1 mes		3 meses		6 meses	
	frec.	%flora	frec.	%flora	frec.	%flora	frec.	%flora
General	75%	16%	40%	3%	55%	19%	50%	3%
TC	60%	16%	20%	4%	20%	10%	50%	4%
DB-c	100%	19%	100%	3%	60%	22%	60%	2%
DB-us	100%	18%	20%	5%	80%	25%	40%	4%
DB-chx	40%	8%	20%	2%	60%	12%	50%	4%

frec. = Frecuencia de detección.

%flora = Porcentaje flora en localizaciones positivas.

M2 = Muestra de dos localizaciones del primer cuadrante tratado.

M4 = Muestra de cuatro localizaciones, la más enferma de cada cuadrante.

TC = Raspado y alisado radicular en 1 mes.

DB-C = Raspado y alisado radicular 24 horas con curetas.

DB-us = Instrumentación con ultrasonidos e irrigación agua en 24 horas.

DB-chx = Instrumentación con ultrasonidos e irrigación clorhexidina en 24 horas.

TABLA 26. FRECUENCIA DE DETECCIÓN Y PROPORCIÓN DE FLORA EN LOCALIZACIONES POSITIVAS PARA *P. intermedia*, SEGÚN LA ESTRATEGIA DE TOMA DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS.

	M4							
	Visita inicial		1 mes		3 meses		6 meses	
	frec.	%flora	frec.	%flora	frec.	%flora	frec.	%flora
General	79%	11%	90%	11%	85%	13%	89%	12%
TC	80%	6%	80%	8%	80%	8%	100%	6%
DB-c	25%	37%	100%	24%	80%	12%	100%	13%
DB-us	100%	12%	80%	7%	100%	13%	60%	17%
DB-chx	100%	7%	100%	4%	80%	17%	100%	13%

	M2							
	Visita inicial		1 mes		3 meses		6 meses	
	frec.	%flora	frec.	%flora	frec.	%flora	frec.	%flora
General	63%	9%	65%	4%	70%	8%	67%	7%
TC	60%	7%	40%	1%	80%	16%	50%	1%
DB-c	50%	13%	60%	1%	40%	5%	80%	6%
DB-us	80%	3%	80%	4%	60%	4%	60%	17%
DB-chx	60%	15%	80%	6%	100%	4%	75%	4%

frec. = Frecuencia de detección.

%flora = Porcentaje flora en localizaciones positivas.

M2 = Muestra de dos localizaciones del primer cuadrante tratado.

M4 = Muestra de cuatro localizaciones, la más enferma de cada cuadrante.

TC = Raspado y alisado radicular en 1 mes.

DB-C = Raspado y alisado radicular 24 horas con curetas.

DB-us = Instrumentación con ultrasonidos e irrigación agua en 24 horas.

DB-chx = Instrumentación con ultrasonidos e irrigación clorhexidina en 24 horas.

TABLA 27. FRECUENCIA DE DETECCIÓN Y PROPORCIÓN MEDIA FLORA EN LAS LOCALIZACIONES POSITIVAS PARA *M. micros*, SEGÚN LA ESTRATEGIA DE TOMA DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS.

	M4							
	Visita inicial		1 mes		3 meses		6 meses	
	frec.	%flora	frec.	%flora	frec.	%flora	frec.	%flora
General	47%	5%	55%	4%	55%	3%	32%	4%
TC	60%	4%	0%	---	60%	1%	0%	---
DB-c	50%	10%	80%	4%	60%	2%	40%	4%
DB-us	40%	3%	40%	11%	60%	6%	20%	3%
DB-chx	40%	3%	100%	1%	40%	2%	60%	4%

	M2							
	Visita inicial		1 mes		3 meses		6 meses	
	frec.	%flora	frec.	%flora	frec.	%flora	frec.	%flora
General	47%	2%	40%	3%	25%	6%	39%	9%
TC	40%	6%	20%	4%	20%	5%	0%	---
DB-c	50%	3%	40%	1%	20%	2%	40%	1%
DB-us	80%	1%	60%	3%	20%	5%	40%	21%
DB-chx	20%	0,2%	40%	4%	40%	10%	75%	6%

frec. = Frecuencia de detección.

%flora = Porcentaje flora en localizaciones positivas.

M2 = Muestra de dos localizaciones del primer cuadrante tratado.

M4 = Muestra de cuatro localizaciones, la más enferma de cada cuadrante.

TC = Raspado y alisado radicular en 1 mes.

DB-C = Raspado y alisado radicular 24 horas con curetas.

DB-us = Instrumentación con ultrasonidos e irrigación agua en 24 horas.

DB-chx = Instrumentación con ultrasonidos e irrigación clorhexidina en 24 horas.

TABLA 28. FRECUENCIA DE DETECCIÓN Y PROPORCIÓN MEDIA DE FLORA EN LAS LOCALIZACIONES POSITIVAS PARA *F. nucleatum*, SEGÚN LA ESTRATEGIA DE TOMA DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS.

	M4							
	Visita inicial		1 mes		3 meses		6 meses	
	frec.	%flora	frec.	%flora	frec.	%flora	frec.	%flora
General	100%	10%	95%	13%	95%	11%	95%	11%
TC	100%	10%	100%	15%	100%	7%	100%	11%
DB-c	100%	6%	100%	8%	100%	7%	100%	16%
DB-us	100%	6%	80%	21%	100%	17%	100%	8%
DB-chx	100%	17%	100%	8%	80%	12%	80%	6%

	M2							
	Visita inicial		1 mes		3 meses		6 meses	
	frec.	%flora	frec.	%flora	frec.	%flora	frec.	%flora
General	95%	12%	100%	14%	95%	13%	100%	9%
TC	100%	10%	100%	13%	100%	10%	100%	9%
DB-c	100%	9%	100%	10%	100%	6%	100%	10%
DB-us	100%	6%	100%	16%	100%	11%	100%	8%
DB-chx	80%	23%	100%	15%	80%	25%	100%	11%

frec. = Frecuencia de detección.

%flora = Porcentaje flora en localizaciones positivas.

TC = Raspado y alisado radicular en 1 mes.

DB-C = Raspado y alisado radicular 24 horas con curetas.

DB-us = Instrumentación con ultrasonidos e irrigación agua en 24 horas.

DB-chx = Instrumentación con ultrasonidos e irrigación clorhexidina en 24 horas.

TABLA 29. TABLA DE CONTINGENCIA 2x2, RELACIONANDO ESTRATEGIA M2 CON RESPECTO A M4 PARA *P. gingivalis* EN LAS DIFERENTES VISITAS.

Visita inicial		M4		Total
		Test +	Test -	
M2	Test +	12	3	15
	Test -	1	4	5
Total		13	7	<i>n</i> =20
		S =0,923	E =0,571	
Visita 1 mes		M4		Total
		Test +	Test -	
M2	Test +	6	1	7
	Test -	7	6	13
Total		13	7	<i>n</i> =20
		S = 0,462	E =0,857	
Visita 3 meses		M4		Total
		Test +	Test -	
M2	Test +	8	4	12
	Test -	2	6	8
Total		10	10	<i>n</i> =20
		S =0,8	E =0,6	
Visita 6 meses		M4		Total
		Test +	Test -	
M2	Test +	8	1	9
	Test -	4	7	11
Total		12	8	<i>n</i> =20
		S =0,667	E =0,875	
		S= Sensibilidad E= Especificidad		

TABLA 30. TABLA DE CONTINGENCIA 2x2, RELACIONANDO ESTRATEGIA M2 CON RESPECTO A M4 PARA *P. intermedia* EN LAS DIFERENTES VISITAS.

Visita inicial		M4		Total
		Test +	Test -	
M2	Test +	12	1	13
	Test -	4	3	7
Total		16	4	<i>n=20</i>
		S =0,75	E =0,75	
Visita 1 mes		M4		Total
		Test +	Test -	
M2	Test +	11	1	12
	Test -	6	2	8
Total		17	7	<i>n=20</i>
		S = 0,647	E =0,667	
Visita 3 meses		M4		Total
		Test +	Test -	
M2	Test +	13	2	15
	Test -	5	0	5
Total		18	2	<i>n=20</i>
		S =0,722	E =0	
Visita 6 meses		M4		Total
		Test +	Test -	
M2	Test +	14	0	14
	Test -	4	2	6
Total		18	2	<i>n=20</i>
		S =0,778	E =1	
		S= Sensibilidad E= Especificidad		

TABLA 31. TABLA DE CONTINGENCIA 2x2, RELACIONANDO ESTRATEGIA M2 CON RESPECTO A M4 PARA *M. micros* EN LAS DIFERENTES VISITAS.

Visita inicial		M4		Total
		Test +	Test -	
M2	Test +	7	2	9
	Test -	3	8	11
Total		10	10	<i>n=20</i>
		S =0,7	E =0,8	
Visita 1 mes		M4		Total
		Test +	Test -	
M2	Test +	5	3	8
	Test -	5	7	12
Total		10	10	<i>n=20</i>
		S = 0,5	E =0,7	
Visita 3 meses		M4		Total
		Test +	Test -	
M2	Test +	6	0	6
	Test -	6	8	14
Total		12	8	<i>n=20</i>
		S =0,571	E =1	
Visita 6 meses		M4		Total
		Test +	Test -	
M2	Test +	6	1	7
	Test -	0	13	13
Total		6	14	<i>n=20</i>
		S =1	E =0,929	
		S= Sensibilidad E= Especificidad		

TABLA 32. TABLA DE CONTINGENCIA 2x2, RELACIONANDO ESTRATEGIA M2 CON RESPECTO A M4 PARA *F. nucleatum* EN LAS DIFERENTES VISITAS.

Visita inicial		M4		Total
		Test +	Test -	
M2	Test +	19	0	19
	Test -	1	0	1
Total		20	0	<i>n=20</i>
		S =0,950	E =---	
Visita 1 mes		M4		Total
		Test +	Test -	
M2	Test +	19	0	19
	Test -	1	0	1
Total		20	0	<i>n=20</i>
		S =0,950	E =---	
Visita 3 meses		M4		Total
		Test +	Test -	
M2	Test +	19	0	19
	Test -	1	0	1
Total		20	0	<i>n=20</i>
		S =0,950	E =---	
Visita 6 meses		M4		Total
		Test +	Test -	
M2	Test +	19	0	19
	Test -	1	0	1
Total		20	0	<i>n=20</i>
		S =0,950	E =---	
		S= Sensibilidad E= Especificidad		

TABLA 33. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD PARA LA DETECCIÓN DE LOS DIFERENTES PATÓGENOS EN CADA VISITA, RELACIONANDO ESTRATEGIA de M2 CON RESPECTO A M4.

	Visita inicial				1 mes			
	Sensibilidad	Especificidad	Test Chi-cuadrado	Test Pearson	Sensibilidad	Especificidad	Test Chi-cuadrado	Test Pearson
<i>P. gingivalis</i>	0,923	0,571	0,058	<u>0,006</u>	0,462	0,857	0,350	0,085
<i>P. intermedia</i>	0,750	0,750	0,19	<u>0,032</u>	0,647	0,667	0,701	0,166
<i>M. micros</i>	0,700	0,800	0,072	<u>0,012</u>	0,500	0,700	0,648	0,194
<i>F. nucleatum</i>	0,950	--	--	--	0,950	--	--	--

	3 meses				6 meses			
	Sensibilidad	Especificidad	Test Chi-cuadrado	Test Pearson	Sensibilidad	Especificidad	Test Chi-cuadrado	Test Pearson
<i>P. gingivalis</i>	0,800	0,600	0,170	<u>0,037</u>	0,667	0,875	0,054	<u>0,007</u>
<i>P. intermedia</i>	0,722	0,000	1,000	0,208	0,778	1,000	0,143	<u>0,010</u>
<i>M. micros</i>	0,571	1,000	0,058	<u>0,007</u>	1,000	0,929	<u>0,0005</u>	<u>0,000</u>
<i>F. nucleatum</i>	0,950	--	--	--	0,950	--	--	--

Test Pearson $p < 0,05$ = Correlacionados significativamente.

Test chi-cuadrado $p < 0,05$ = Se descarta significativamente que sean independientes.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Genco RJ, Zambon JJ, Christersson LA. Use and interpretation of microbiological assays in periodontal diseases. *Oral Microbiol Immunol* 1986; 1:73-79.
- (2) Oliver RC, Brown LJ. Periodontal diseases and tooth loos. *Periodontology* 2000 1993; 2:117-127.
- (3) Albandar JM. Periodontal diseases in North America. *Periodontology* 2000 2002; 29:31-69.
- (4) Sheiham A, Netuveli G. Periodontal diseases in Europe. *Periodontology* 2000 2002; 29:104-121.
- (5) Bravo M, Llodra JC, Cortés J. Epidemiología- salud bucodental en España y Portugal. In: Sanz M, editor. 1° Workshop Ibérico. Control de Placa e higiene bucodental. San Lorenzo del Escorial: Ergón, 2003: 17-34.
- (6) Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology* 2000 1997; 14:9-11.
- (7) Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology* 2000 1997; 14:216-248.
- (8) Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol* 1996; 1:821-878.
- (9) Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Matchtei EE et al. Assessment of risk for periodontal disease.1.Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol* 1994; 65:260-267.
- (10) Kinane DF. Periodontitis modified by systemic factors. *Ann Periodontol* 1999; 4:54-63.
- (11) Consensus Report for Periodontal Diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol* 1996; 1:926-932.
- (12) Contreras A, Slots J. Herpesviruses in human periodontal disease. *J Periodont Res* 2000; 35:3-16.
- (13) Contreras A, Umeda M, Chen C, Bakker I, Morrison JL. Relationship between herpesviruses and adult periodontitis and periodontopathic. *J Periodontol* 1999; 70:478-484.
- (14) Ting M, Contreras A, Slots J. Herpesvirus in localized juvenile periodontitis. *J Periodont Res* 2000; 35:17-25.
- (15) Velazco CH, Coelho C, Salazar F, Contreras A, Slots J, Pacheco JJ. Microbiological features of Papillon-Lefèvre syndrome periodontitis. *J Clin Periodontol* 1999; 26:622-627.
- (16) Løe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 1965; 36:177-187.
- (17) Løe H, Theilade E, Jensen SB, Schiött CR. Experimental gingivitis in man. III. The influence of antibiotics on gingival plaque development. *J Periodont Res* 1967; 2:282-289.
- (18) Theilade E, Wright WH, Jensen SB, Løe H. Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J Periodont Res* 1966; 1:1-13.

- (19) Newman HN, Socransky S. Predominant cultivable microbiota in periodontosis. *J Periodont Res* 1997; 12:120-128.
- (20) Newman HN, Socransky S, Savitt ED, Propas DA, Crawford A. Studies of the microbiology of periodontosis. *J Periodontol* 1976; 47:373-379.
- (21) Slots J. The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. *Scand J Dent Res* 1976; 84(1):1-10.
- (22) Slots J. The predominant cultivable microflora advanced periodontitis. *Scand J Dent Res* 1977; 85(2):114-121.
- (23) Tanner ACR, Haffer C, Bratthall GT, Visconti RA, Socransky S. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J Clin Periodontol* 1979; 6:278-307.
- (24) Greenstein G. Microbiologic assessments of enhance periodontal diagnosis. *J Periodontol* 1988; 59(8):508-515.
- (25) van Wilkelhoff AJ, Winkel EG. Infecciones y tratamientos periodontales. *Periodoncia* 1997; 7(2):116-125.
- (26) Socransky S, Haffajee A. Evidence of bacterial aetiology: a historical perspective. *Periodontology* 2000 1994; 5:7-25.
- (27) Williams CA, Winkler JR, Grassi M, Murray PA. HIV-associated periodontitis complicated by necrotizing stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990; 69:351-355.
- (28) Winkler JR, Robertson PB. Periodontal disease associated with HIV infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 73:145-150.
- (29) Listgarten MA. Electron microscopic observations of the bacterial flora of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J Periodontol* 1965; 36:328-339.
- (30) Rosling BG, Nyman S, Lindhe J. The effect of systematic plaque control on bone regeneration in infrabony pockets. *J Clin Periodontol* 1976; 3:38-53.
- (31) Rosling BG, Nyman S, Lindhe J, Jern B. The healing potential of the periodontal tissues following different techniques of periodontal surgery in plaque-free dentitions. A 2-year clinical study. *J Clin Periodontol* 1976; 3:233-250.
- (32) van Wilkelhoff AJ, Rams TE, Slots J. Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontology* 2000 1996; 10:45-78.
- (33) Ebersole JL, Taubman MA. Immunology of periodontal diseases. *Periodontology* 2000 1994; 5:112-141.
- (34) Haffajee A, Socransky S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology* 2000 1994; 5:78-111.
- (35) Fritzell KE. Infections of hand due to human mouth organisms. *Lancet* 1940; 60:135.
- (36) Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontology* 2000 1999; 20:136-167.
- (37) Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco RJ. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology* 2000 1999; 20:168-238.

- (38) Mitchell DF, Johnson M. The nature of the gingival plaque in the hamster; production, prevention and removal. *J Dent Res* 1956; 35:651-655.
- (39) Dick DS, Shaw JH. The infectious and transmissible nature of the periodontal syndrome of the rice rat. *Archives of Oral Biology* 1966; 11:1095-1108.
- (40) Wray D, Grahame L. Periodontal bone loss in mice induced by different periodontopathic organisms. *Archives of Oral Biology* 1992; 37:435-438.
- (41) Kornman KS, Holt SC, Robertson PB. The microbiology of ligature-induced periodontitis in the cynomolgus monkey. *J Periodont Res* 1981; 16:363-371.
- (42) Kornman KS, Siegrist B, Soskolne WA, Nuki K. The predominant cultivable subgingival flora of beagle dogs following ligature placement and metronidazole therapy. *J Periodont Res* 1981; 16:251-258.
- (43) Lindhe J, Hamp SE, L e H. Plaque induced periodontal disease in beagle dogs. Four-year clinical, roentgenographical and histometrical study. *J Periodont Res* 1975; 10:243-255.
- (44) Evans RT, Klausen B, Sojar HT, Bedi GS, Sfintescu C, Ramamurthy NS et al. Immunization with *Porphyromonas gingivalis* fimbriae protects against periodontal destruction. *Infection and Immunity* 1992; 60:2962-2935.
- (45) Persson GR, Engel D, Whitney C, Darveau R, Weinberg A, Brunsvold M et al. Immunization against *Porphyromonas gingivalis* inhibits progression of experimental periodontitis in nonhuman primates. *Infection and Immunity* 1994; 62:1026-1031.
- (46) Ebersole JL, Brunsvold M, Steffensen B, Wood R, Holt SC. Effects of immunization with *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* on progression of ligature-induced periodontitis in the nonhuman primate *Maccaca fascicularis*. *Infection and Immunity* 1991; 59:3351-3359.
- (47) Moore WEC. Microbiology of periodontal disease. *J Periodont Res* 1987; 22:335-341.
- (48) Moore WEC, Moore LVH. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontology* 2000 1994; 5:66-77.
- (49) Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RB, Lau CN, Levanos VA et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001; 183(12):3770-3783.
- (50) Socransky S, Haffajee A. The bacterial aetiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* 1992; 63:322-331.
- (51) Asikainen S. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and spirochetes in relation to age in localized juvenile periodontitis. *J Periodontol* 1986; 57:537-541.
- (52) Aass AM, Preus HR, Gjerme P. Association between detection of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and radiographic bone loss in teenagers. A 4-year longitudinal study. *J Periodontol* 1992; 63:682-685.
- (53) Tonetti MS. Etiology and pathogenesis. In: Lang NP, Karring T, editors. *Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology*. London: Quintessence books., 1993: 54-89.
- (54) Tanner ACR, Goodson JM. Sampling of microorganisms associated with periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 1986; 1:15-20.

- (55) Haffajee A, Socransky S. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology* 2000 2002; 28:12-55.
- (56) Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontology* 2000 1997; 14:33-53.
- (57) Schenkein HA. Finding genetic risk factors for periodontal diseases: is the climb worth the view? *Periodontology* 2000 2002; 30:79-90.
- (58) Deas DE, Mackey SA, McDonnell HT. Systemic disease and periodontitis: manifestations of neutrophil dysfunction. *Periodontology* 2000 2003; 32(1):82-104.
- (59) Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology* 2000 2001; 25(1):8-20.
- (60) Michalowicz BS, Aeppli D, Virag JG, Klump DG, Hinrichs JE, Segal NS et al. Periodontal findings in adult twins. *J Periodontol* 1991; 62:293-299.
- (61) Nares S. The genetic relationship to periodontal disease. *Periodontology* 2000 2003; 32:36-49.
- (62) Hart TC, Kornman KS. Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology* 2000 1997; 14:202-215.
- (63) Garrison SW, Holts C, Nichols FC. Lipopolysaccharide-stimulated PGE2 release from human monocytes. *J Periodontol* 1988; 59:684-687.
- (64) Garrison SW, Nichols FC. LPS-elicited secretory responses in monocytes: altered release of PGE2 but not IL-1Beta in patients with adult periodontitis. *J Periodont Res* 1989; 24:88-95.
- (65) Kornman KS, Crane A, Wang H-Y, diGiovine FS, Newman HN, Pirk FW et al. The interleukin 1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1997; 24:72-77.
- (66) Salvi GE, Lawrence HP, Offenbacher S, Beck JD. Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology* 2000 1997; 14:173-201.
- (67) Hujoel PP, Drangsholt C, Spiekerman C, DeRouen TA. Periodontitis-systemic disease associations in the presence of smoking-causal or coincidental? *Periodontology* 2000 2002; 30:51-60.
- (68) Kenney EB, Kraal JH, Saxe SR, Jones J. The effect of cigarette smoke on human oral polymorphonuclear leukocytes. *J Periodont Res* 1977; 12:227-234.
- (69) Kraal JH, Chancellor MB, Bridges RB, Bemis KG, Hawke JE. Variations in the gingival polymorphonuclear leukocyte migration rate induced by tobacco smoke. *J Periodont Res* 1977; 12:242-249.
- (70) Bennet KR, Read PC. Salivary immunoglobulin A levels in normal subjects, tobacco smokers and patients with minor aphthous ulceration. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1982; 53:461-465.
- (71) Haber J. Smoking is a major risk factor for periodontitis. *Curr Opin Periodontol* 1994;12-18.

- (72) da Silva AM, Newman HN, Oakley DA. Psychosocial factors in inflammatory periodontal diseases. A review. *J Clin Periodontol* 1995; 22:516-526.
- (73) Moss ME, Beck JD, Kaplan R, Offenbacher S, Weintraub JA, Koch G et al. Exploratory case-control analysis of psychosocial factors and adult periodontitis. *J Periodontol* 1996; 67(suppl):1060-1069.
- (74) LeResche L, Dworkin SF. The role of stress in inflammatory disease, including periodontal disease: review of concepts and current findings. *Periodontology* 2000 2004; 30:91-103.
- (75) Armitage GC. Classifying periodontal diseases- a long-standing dilemma. *Periodontology* 2000 2002; 30:9-23.
- (76) The American Academy of Periodontology. Proceedings of the World Workshop in Clinical Periodontics. Chicago: The American Academy of Periodontology., 1989.
- (77) Attstöm R, van der Velden U. Consensus report (epidemiology). In: Lang NP, Karring T, editors. Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontics. London: Quintessence, 1994: 120-126.
- (78) Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4:1-6.
- (79) Ximenez-Fyvie LA, Haffajee A, Som S, Thompson M, Torresyap G, Socransky S. The effect of repeated professional supragingival removal on the composition of the supra- and subgingival microbiota. *J Clin Periodontol* 2000; 27:637-647.
- (80) Drisko CH. Nonsurgical periodontal therapy. *Periodontology* 2000 2001; 25:77-88.
- (81) Al-Yahoufi Z, Mombelli A, Wicki A, Lang NP. The effect of plaque control in subjects with shallow pockets and high prevalence of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol* 1995; 63:540-547.
- (82) Beltrami M, Bickel M, Baehni PC. The effect of supragingival plaque control on the composition of the subgingival microflora in human periodontitis. *J Clin Periodontol* 1987; 14:161-164.
- (83) Garret JS. Effects of nonsurgical periodontal therapy on periodontitis in humans. A review. *J Clin Periodontol* 1983; 10:515-523.
- (84) Lindhe J, Westfelt E, Nyman S, Socransky S, Haffajee A. Long-term effect of surgical/non-surgical treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1984; 11:448-485.
- (85) Rosling BG, Slots J, Webber RL, Christersson LA, Genco RJ. Microbiological and clinical effects of topical subgingival antimicrobial treatment on human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1983; 10:487-514.
- (86) Quirynen M, Teughels W, De Soete M, van Steenberghe TJM. Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects. *Periodontology* 2000 2002; 28:72-90.
- (87) Slots J, Rams TE, Schonfeld SE. In vitro activity of chlorhexidine against enteric rods, pseudomonas and actinobacter from human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1991; 6:62-64.

- (88) Grenier D, Bertrand J, Mayrand D. *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles promote bacterial resistance to chlorhexidine. *Oral Microbiol Immunol* 1995; 10:319-320.
- (89) Walker C, Borden LC, Zambon JJ, Bonta Y, DeVizio W, Volpe AR. The effects of a 0.3% triclosan-containing dentifrice on the microbial composition of supragingival plaque. *J Clin Periodontol* 1994; 21:334-341.
- (90) Herrera D, Sanz M, Jepsen SB, Needleman I, Roldán S. A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2002; 29(Supp.3):136-159.
- (91) Genco RJ. Antibiotics in the treatment of human periodontal diseases. *J Periodontol* 1981; 52:545-558.
- (92) Radvar M, Pourtaghi N, Kinane DF. Comparison of 3 periodontal local antibiotic therapies in persistence periodontal pockets. *J Periodontol* 1996; 67:860-865.
- (93) Kinane DF, Radvar M. A six-month comparison of three periodontal local antimicrobial therapies in persistent periodontal pockets. *J Periodontol* 1999; 70:1-7.
- (94) Ainamo J, Lie T, Ellingsen BH, Hansen BF, Johansson LA, Karring T et al. Clinical response to subgingival effects of topical subgingival application of metronidazole 25% gel and scaling treatment of adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 1992; 19(9):723-729.
- (95) Zambon JJ, Haraszthy VI. The laboratory diagnosis of periodontal infections. *Periodontology* 2000 1995; 7:69-82.
- (96) Greenstein G, Polson A. Microscopic monitoring of pathogens associated with periodontal diseases. A review. *J Periodontol* 1985; 56:740-747.
- (97) Offenbacher S, Odle B, Van Dyke T. The microbial morphotypes associated with periodontal health and adult periodontitis: composition and distribution. *J Clin Periodontol* 1985; 12:736-749.
- (98) Listgarten MA, Levin S. Positive correlation between the proportions of subgingival spirochetes and motile bacteria and susceptibility of human subjects to periodontal deterioration. *J Clin Periodontol* 1981; 8:122-138.
- (99) Listgarten MA. Microbiological testing in the diagnostic of periodontal disease. *J Periodontol* 1992; 63:332-337.
- (100) Wolf L, Dahlén G, Aepli D. Bacteria risk markers for periodontitis. *J Periodontol* 1994; 64:498-510.
- (101) Omar AA, Newman HN, Bulman J, Osborn J. Darkground microscopy of subgingival plaque from the top to the bottom of the periodontal pocket. *J Clin Periodontol* 1990; 17:364-370.
- (102) Armitage GC, Dickinson WR, Jenserseck RS, Levine SM, Chambers DW. Relationship between the percentage of subgingival spirochetes and the severity of periodontal disease. *J Periodontol* 1982; 53:550-556.
- (103) Listgarten MA, Schifter C. Differential dark field microscopy of subgingival bacteria as an aid in selecting recall intervals: results after 18 months. *J Clin Periodontol* 1982; 9:305-316.

- (104) Listgarten MA, Levin S, Schifter C, Sullivan P, Evian CI, Rosenberg ES. Comparative differential dark-field microscopy of subgingival bacteria from tooth surfaces with recent evidence of recurring periodontitis and from nonaffected surfaces. *J Periodontol* 1984; 55:398-401.
- (105) Mombelli A, van Osten MAC, Schurch E, Lang NP. The microbiota associated with successful or failing osseo-integrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol* 1987; 2:145-152.
- (106) Carasol M, Herrera JI, Alánde FJ, Sanz M. El diagnóstico microbiológico de las enfermedades periodontales. II. Métodos "clásicos" utilizados para la detección de patógenos. *Periodoncia* 1998; 8(1):3-10.
- (107) Loomer PM. Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *Periodontology* 2000 2004; 34:49-56.
- (108) Listgarten MA, Schifter C, Sullivan P, George C, Rosenberg ES. Failure of a microbiological assay to reliably predict disease recurrence in a treated periodontitis population receiving regularly scheduled prophylaxes. *J Clin Periodontol* 1986; 13:768-773.
- (109) Listgarten MA, Sullivan P, George C, Schifter C, Rosenberg ES. Comparative longitudinal study of 2 methods of scheduling maintenance visits: 4-year data. *J Clin Periodontol* 1989; 16:105-115.
- (110) Chen C, Slots J. Microbiological test for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology* 2000 1999; 20:53-64.
- (111) Slots J, Rams TE, Listgarten MA. Yeasts, enteric rods and pseudomonas in the subgingival flora of severe adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1988; 3:47-52.
- (112) Slots J. Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol* 1982; 15:606-609.
- (113) Alsina M, Olle E, Frias J. Improved low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol* 2001; 39(2):509-513.
- (114) Lau L, Sanz M, Herrera D, Morillo JM, Martín C, Silva A. Quantitative Real-time PCR versus culture. A comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 2004; In press.
- (115) Calsina G, Lee Y-S, Newman HN, Kornman KS, Nachani S, Fleming TF. Rapid antimicrobial resistance screening method for *Bacteroides intermedius*. *Oral Microbiol Immunol* 1991; 6:111-114.
- (116) Nachani S, Scuteri A, Newman HN, Avanesian AB, Lomeli SL. E-test: A new technique for antimicrobial susceptibility testing for periodontal microorganisms. *J Periodontol* 1992; 63:576-583.
- (117) Listgarten MA, Lai C-H, Young V. Microbial composition and pattern of antibiotics resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis. *J Periodontol* 1993; 64:155-161.
- (118) Shelburne CE, Sandberg GP, Binsfeld CA, Wolff LF, Curry RA. Monoclonal antibodies to lipopolysaccharide of four oral bacteria associated with periodontal disease. *J Periodont Res* 1993; 28:1-9.

- (119) Wolff LF, Anderson L, Sandberg GP, Aeppli D, Shelburne CE. Fluorescence immunoassay for detecting periodontal bacterial pathogens in plaque. *J Clin Microbiol* 1991; 29:1645-1651.
- (120) Strzempko MN, Simon SL, French CK, Lippke JA, Raia FF, Savitt ED et al. A cross-reactivity study of whole genomic DNA probes for *Haemophilus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides intermedius*, and *Bacteroides gingivalis*. *J Dent Res* 1987; 66:1543-1546.
- (121) Bonta Y, Zambon JJ, Neiders M, Genco RJ. Rapid identification of periodontal pathogens in subgingival dental plaque: comparison of indirect immunofluorescence microscopy with bacterial culture for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Dent Res* 1985; 64:793-798.
- (122) Zambon JJ, Reynolds HS, Chen C, Genco RJ. Rapid identification of periodontal pathogens in subgingival dental plaque: comparison of indirect immunofluorescence microscopy with bacterial culture for detection of *Bacteroides gingivalis*. *J Periodontol* 1985; suppl:32-40.
- (123) Gmür R, Strub JR, Guggenheim B. Prevalence of *Bacteroides forsythus* and *Bacteroides gingivalis* in subgingival plaque of prosthodontically treated patients on short recall. *J Periodont Res* 1989; 24:113-120.
- (124) Wang J-C, Lai C-H, Listgarten MA. *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Bacteroides forsythus* in plaque subjacent to bridge pontics. *J Clin Periodontol* 1988; 25:330-333.
- (125) Nisengard RJ, Mikulski L, McDuffie DM, Bronson P. Development of a rapid latex agglutination test for periodontal pathogens. *J Periodontol* 1992; 63:611-617.
- (126) Kamiya I, Okuda K, Hara K. Flow-cytometric identification and detection of *Porphyromonas gingivalis* by a LPS specific monoclonal antibody. *J Periodontol* 1994; 65:309-315.
- (127) Ebersole JL, Frey DE, Taubman MA, Smith DJ, Socransky S, Tanner ACR. Serologic identification of oral *Bacteroides* spp. by enzyme-linked immunosorbant assay. *J Clin Microbiol* 1984; 19:639-644.
- (128) Carasol M, Alández FJ, Herrera JI, Sanz M. El diagnóstico microbiológico de las enfermedades periodontales. III. Nuevas tecnologías para la detección de patógenos. *Periodoncia* 1988; 8(2):75-84.
- (129) Wolff LF, Anderson L, Sandberg GP, Reither L, Binsfeld CA, Corinaldesi G et al. Bacterial concentration fluorescence immunoassay (BCFIA) for the detection of periodontopathogens in plaque. *J Periodontol* 1992; 63:1093-1101.
- (130) Wolff LF, Aeppli D, Philstrom B, Sandberg GP, Shelburne CE. Natural distribution of 5 bacteria associated with periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1993; 20:699-706.
- (131) Snyder B, Zambon JJ, Reynolds HS. Clinical significance of EVALUSITE™ periodontal test sensitivity in adult periodontitis. *J Dent Res* 1994; 73:305-306.
- (132) Ebersole JL, Cappelli D, Steffen MJ. Characteristics and utilization of antibody measurements in clinical studies of periodontal disease. *J Periodontol* 1992; 63:1110-1116.

- (133) Taubman MA, Haffajee A, Socransky S, Smith DJ, Ebersole JL. Longitudinal monitoring of monitoring of humoral antibody in subjects with destructive periodontal diseases. *J Periodont Res* 1992; 27:511-521.
- (134) Haffajee A, Socransky S, Dzink JL, Taubman MA, Ebersole JL, Smith DJ. Clinical, microbiological and immunological features of subjects with destructive periodontal diseases. *J Periodontol* 1998; 15:240-246.
- (135) Schenck K. IgG, IgA and IgM serum antibodies against lipopolysaccharide from *bacteroides gingivalis* in periodontal health and disease. *J Periodont Res* 1985; 20:368-377.
- (136) Lee W, Aitken S, Kulkarni G. Collagenase activity in recurrent periodontitis: relationship to disease progression and doxycycline therapy. *J Periodont Res* 1991; 26:479-485.
- (137) Golub LM, Kaplan R, Mulvihill JE, Ramamurthy NS. Collagenolytic activity of crevicular fluid and of adjacent gingival tissue. *J Dent Res* 1979; 58:2132-2136.
- (138) Bretz WA, Lopatin DE, Loesche WJ. Benzoyl-arginine naphthylamide (BANA) hydrolysis by *Treponema denticola* and/or *Bacteroides gingivalis* in periodontal plaques. *Oral Microbiol Immunol* 1990; 5:275-279.
- (139) Loesche WJ, Bretz WA, Lopatin DE, Stoll J, Rau CF, Hillenburg KL et al. Multi-center clinical evaluation of a chairside method for detecting certain periodontopathic bacteria in periodontal disease. *J Periodontol* 1990; 61:189-196.
- (140) Loesche WJ, Giordano J, Hujoel PP. The utility of the BANA test for monitoring anaerobic infections due to spirochetes (*Treponema denticola*) in periodontal disease. *J Dent Res* 1990; 69:1696-1702.
- (141) Loesche WJ, Syed SA, Stoll J. Trypsin-like activity in subgingival dental plaque: a diagnostic marker for spirochetes and periodontal disease? *J Periodontol* 1987; 58:266-273.
- (142) Laughon BE, Syed SA, Loesche WJ. API ZYM system for identification of *Bacteroides* spp., *Capnocytophaga* spp., and spirochetes of oral origin. *J Clin Microbiol* 1982; 15:97-102.
- (143) Loesche WJ, Lopatin DE, Giordano J, Alcoforado G, Hujoel PP. Comparison of the benzoil-DL-arginine naphthylamide (BANA) test, DNA probes, and immunological reagents for ability to detect anaerobic periodontal infections due to *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Bacteroides forsythus*. *J Clin Microbiol* 1992; 30:427-433.
- (144) Seida K, Saito A, Yamada S, Ishihara K, Naito Y, Okuda K. A sensitive enzymatic method for detection of *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* and *Bacteroides forsythus* in subgingival plaque samples. *J Periodont Res* 1992; 27:86-91.
- (145) Ishihara K, Naito Y, Kato T, Takazoe I, Okuda K, Eguchi J et al. A sensitive enzymatic method (SK-013) for detection and quantification of specific periodontopathogens. *J Periodont Res* 1992; 2:81-85.
- (146) Kuru B, McCullough MJ, Yilmaz S, Porter SR. Clinical and microbiological studies of periodontal diseases in Sjögren's syndrome patients. *J Clin Periodontol* 2002; 29:92-102.

- (147) Hemmings KW, Griffiths GS, Bulman JS. Detection of neutral protease (Periocheck) and BANA hydrolase (Perioscan) compared with traditional clinical methods of diagnosis and monitoring of chronic inflammatory periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1997; 24:110-114.
- (148) Yoshie H, Hirose Y, Suzuki T, Hara K. Relationship between peptidase activity from *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Bacteroides forsythus* and attachment loss. *Periodontal Clin Investig* 1996; 18(2):31-38.
- (149) Yoshie H, Ohtake T, Hasegawa K, Hara K. Detection of peptidase activity from *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Bacteroides forsythus* as a method of periodontal therapy evaluation. *Periodontal Clin Investig* 1995; 17(1):23-28.
- (150) Smith GLF, Socransky S, Sansome C. "Reverse" DNA hybridation method for the rapid identification of subgingival microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* 1989; 4:141-145.
- (151) Moncla BJ, Braham P, Dix K, Watanabe S, Schwartz D. Use of synthetic oligonucleotide DNA probes for the identification of *Bacteroides gingivalis*. *J Clin Microbiol* 1990; 28:324-327.
- (152) Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques. A review. *J Clin Periodontol* 2004; In press.
- (153) Savitt ED, Strzempko MN, Vaccaro KK, Peros WJ, French CK. Comparison of cultural method and DNA probe analyses for the detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides intermedius* in subgingival plaque samples. *J Periodontol* 1988; 59(431):438.
- (154) Genco RJ, Loos BG. The use of genomic DNA fingerprinting in studies of the epidemiology of bacteria in periodontitis. *J Clin Periodontol* 1991; 18:396-405.
- (155) Petit MDA, Steenberg TJM, Scholte LMH, van der Velden U, de Graaf J. Epidemiology and transmission of *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* among children and their family members. *J Clin Periodontol* 1993; 20:641-650.
- (156) Petit MDA, van Steenberg TJM, Timmerman MF, de Graaf J, van der Velden U. Prevalence of Periodontitis and suspected periodontal pathogens in families of adult periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1994; 21:76-85.
- (157) Han N, Hoover CI, Winkler JR, Ng CY, Armitage GC. Identification of genomic clonal types of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol* 1991; 29:1574-1578.
- (158) Zambon JJ, Sunday GJ, Smutko JS. Molecular genetic analysis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* epidemiology. *J Periodontol* 1990; 61:75-80.
- (159) Papapanou PN, Baelum V, Luan WM, Madianos PN, Chen X, Fejerskov O et al. Subgingival microbiota in adult Chinese: prevalence and relation to periodontal disease progression. *J Periodontol* 1997; 68:651-666.
- (160) Ximenez-Fyvie LA, Haffajee A, Socransky S. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000; 27:648-657.

- (161) Ximenez-Fyvie LA, Haffajee A, Socransky S. Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000; 27:722-732.
- (162) Papapanou PN, Madianos PN, Dahlén G, Sandros J. "Checkerboard" versus culture: a comparison between two methods for identification of subgingival microbiota. *European Journal of Oral Sciences* 1997; 105:389-396.
- (163) Asai Y, Jinno T, Igarashi H, Ohyama Y, Ogawa T. Detection and quantification of oral treponemes in subgingival plaque by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40:3334-3340.
- (164) Morillo JM, Lau L, Sanz M, Herrera D, Silva A. Quantitative real-time PCR based on single copy gene sequence for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodont Res* 2003; 38(5):518-524.
- (165) Griffen AL, Leys EJ, Fuerst PA. Strain identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* using the polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7:240-243.
- (166) Dangtuan ST, Rudney JD. Multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2674-2678.
- (167) García L, Tercero JC, Legido B, Ramos JA, Alemany J, Sanz M. Rapid detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* and *Porphyromonas gingivalis* by multiplex PCR. *J Periodont Res* 1998; 33:59-64.
- (168) Lyons SR, Griffen AL, Leys EJ. Quantitative Real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. *J Clin Microbiol* 2000; June:2362-2365.
- (169) Chen C, Slots J. Clonal analysis of *Porphyromonas gingivalis* by the arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 1994; 9:99-103.
- (170) Preus HR, Zambon JJ, Machtei EE, Dunford RG, Genco RJ. The distribution and transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in families with established adult periodontitis. *J Periodontol* 1994; 65:2-7.
- (171) Wahlfors J, Meurman JH, Vaiseanen P, Alakuijala P, Korhonden A, Torkko H et al. Simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* by a rapid PCR method. *J Dent Res* 1995; 74:1796-1801.
- (172) Yoshida Y, Suzuki N, Nakano Y, Shibuya K, Ogawa Y, Koga T. Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes and *Porphyromonas gingivalis* in Japanese adults. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18(3):135-139.
- (173) Suzuki N, Nakano Y, Yoshida Y, Ikeda D, Koga T. Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes by Multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2001; May:2002-2005.
- (174) Preus HR, Haraszthy VI, Zambon JJ, Genco RJ. Differentiation of Strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; Oct:2773-2776.

- (175) Huang Y, Umeda M, Takeuchi Y, Ishizuka M, Yano-Higuchi K, Ishikawa I. Distribution of *Bacteroides forsythus* genotypes in Japanese periodontal population. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18(4):208-214.
- (176) Amano A, Nakagawa I, Kataoka K, Morisaki I, Hamada S. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains with fimA genotypes in periodontitis patients. *J Clin Microbiol* 1999; May:1426-1430.
- (177) Kubar A, Saygun I, Yapar M, Ozdemir A, Slots J. Real-time PCR quantification of cytomegalovirus in aggressive periodontal lesions using TaqMan technology. *J Periodont Res* 2004; 39(2):81-86.
- (178) Eguchi J, Ishihara K, Watanabe A, Fukumoto Y, Okuda K. PCR method is essential for detecting *Mycobacterium tuberculosis* in oral cavity samples. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18(3):156-159.
- (179) Gebara EC, Pannuti C, Faria CM, Chehter L, Mayer MP, Lima LA. Prevalence of *Helicobacter pylori* detected by polymerase chain reaction in oral cavity of periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19(4):277-280.
- (180) Apatzidou DA, Riggio MP, Kinane DF. Quadrant root planing versus same-day full-mouth root planing. II. Microbiological findings. *J Clin Periodontol* 2004; 31:141-148.
- (181) Haffajee A, Socransky S. Effect of sampling strategy on the false-negative rate for detection of selected subgingival species. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7:57-59.
- (182) Renvert S, Wikström M, Helmersson M, Dahlén G, Claffey N. Comparative study of subgingival microbiological sampling techniques. *J Periodontol* 1992; 63:797-801.
- (183) Melvin WL, Assad DA, Miller GA, Gher ME, Simonson L, York AK. Comparison of DNA probe and ELISA microbial analysis methods and their association with adult periodontitis. *J Periodontol* 1994; 65:576-582.
- (184) Hinrichs JE, Wolff LF, Philstrom B, Schaffer EM, Liljemark WF, Bandt CL. Effects of scaling and root planing on subgingival microbial proportions standardized in terms of their naturally occurring distribution. *J Periodontol* 1985; 56:187-194.
- (185) Listgarten MA, Hellden L. Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans. *J Periodontol* 1978; 5:115-132.
- (186) Moore WEC, Holdeman LV, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA, Ranney R. Comparative bacteriology of juvenile Periodontitis. *Infection and Immunity* 1985; May:507-519.
- (187) Dwyer DM, Socransky S. Predominant cultivable microorganism inhabiting periodontal pockets. *Br Den J* 1968; 124:560-564.
- (188) Hartroth B, Seyfahrt I, Conrads G. Sampling of periodontal pathogens by paper points: evaluation of basic parameters. *Oral Microbiol Immunol* 1999; 14:326-330.
- (189) Baker PJ, Butler R, Wikesjo UM. Bacterial sampling by absorbent paper points. An in vitro study. *J Periodontol* 1991; 62(2):142-146.
- (190) Gavin JB, Collins AA. The occurrence of bacteria within the clinically healthy gingival crevice. *J Periodontol* 1961; 32:198-202.

- (191) Goodson JM, Offenbacher S, Farr DH, Hogan PE. Periodontal disease treatment by local drug delivery. *J Periodontol* 1985; 56:265-272.
- (192) Lander PE, Newcomb GM, Seymour GJ, Powell RN. The antimicrobial and clinical effects of a single subgingival irrigation of chlorhexidine in advanced periodontal lesions. *J Clin Periodontol* 1986; 13:74-80.
- (193) Darwish S, Hyppa T, Socransky S. Studies of the predominant cultivable microbiota of early periodontitis. *J Periodont Res* 1978; 13:1-16.
- (194) Socransky S, Haffajee A. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology* 2000 2002; 28:12-55.
- (195) Socransky S, Haffajee A, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25:134-144.
- (196) Listgarten MA. Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. *J Periodontol* 1976; 47:1-18.
- (197) Kiel RA, Lang NP. Effect of subgingival sampling techniques on periodontal microbiological culturing. *J Dent Res* 1983; 62:247-(Abstract).
- (198) Sixou M, Duffaut-Lagarrigue D, Lodter JP. A comparison between 4 subgingival bacteriologic sampling techniques. *J Biol Buccale* 1991; 19(1):16-21.
- (199) Christersson LA, Slots J, Zambon JJ, Genco RJ. Transmission and colonization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis patients. *J Periodontol* 1985; 56:127-131.
- (200) Mousques T, Listgarten MA, Stoller NH. Effect of sampling on the composition of the human subgingival microbial flora. *J Periodont Res* 1980; 15(2):137-143.
- (201) van der Velden U, van Wilkelhoff AJ, Abbas F, de Graaf J. The habitat of periodontopathic microorganisms. *J Clin Periodontol* 1986; 13:243-248.
- (202) Asikainen S, Alaluusua S, Saxen L. Recovery of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from teeth, tongue and saliva. *J Periodontol* 1991; 62:203-206.
- (203) Danser MM, van Wilkelhoff AJ, de Graaf J, Loos BG, van der Velden U. Short-term effect of full-mouth extraction on periodontal pathogens colonizing the oral mucous membrane. *J Clin Periodontol* 1994; 21:484-489.
- (204) Roldán S, Wikel EG, Herrera D, Sanz M, van Wilkelhoff 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.
- (205) Umeda M, Contreras A, Chen C, Bakker I, Slots J. The utility of whole saliva to detect the oral presence of periodontopathic bacteria. *J Periodontol* 1998; 69(7):828-833.
- (206) Mombelli A, McNabb H, Lang NP. Black-pigmenting Gram-negative bacteria in periodontal disease. I. Topographic distribution in the human dentition. *J Periodont Res* 1991; 26:301-307.
- (207) Mombelli A, McNabb H, Lang NP. Black-pigmenting Gram-negative bacteria in periodontal disease. II. Screening strategies for detection of *P.gingivalis*. *J Periodont Res* 1991; 26:308-313.

- (208) Mombelli A, Gmür R, Gobbi C, Lang NP. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in adult periodontitis. I. Topographic distribution before and after treatment. J Periodontol 1994; 65:820-826.
- (209) Mombelli A, Gmür R, Gobbi C, Lang NP. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in adult periodontitis. II. Characterization of isolated strains and effect of mechanical periodontal treatment. J Periodontol 1994; 65:827-834.
- (210) Gobbey EB, Ash MM. Oxidation reduction potential of developing plaque, periodontal pockets and gingival sulci. J Periodontol 1969; 40:630-633.
- (211) Mettraux GR, Gusberti FA, Graf H. Oxygen tension (pO₂) in untreated human periodontal pockets. J Periodontol 1984; 55:516-521.
- (212) Gibbons RJ, MacDonald JB. Hemin and vitamin K compounds as required factors for the cultivation of certain strains of *Bacteroides melaninogenicus*. J Bacteriol 1960; 80:164-169.
- (213) Gunsolley JC, Chinchilli VN, Savitt ED. Analysis of site specific periodontal bacteria sampling schemes. J Periodontol 1992; 63:507-514.
- (214) Christersson LA, Fransson CL, Dunford RG, Zambon JJ. Subgingival distribution of periodontal pathogenic microorganisms in adult periodontitis. J Periodontol 1992; 63:418-425.
- (215) van Wilkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. J Clin Periodontol 2002; 29:1023-1028.
- (216) Salkin LM, Freedman AL, Mellado JR, Stein MD, Schneider DB, Butler L. Importancia clínica de los estudios microbiológicos. Segunda parte: Análisis comparativo de muestras microbiológicas obtenidas simultáneamente de las mismas localizaciones y cultivadas en el mismo laboratorio. Int J Periodontics Restorative Dent 2003; 23:121-127.
- (217) Mellado JR, Freedman AL, Salkin LM, Stein MD, Schneider DB, Cutler RH. Importancia clínica de los estudios microbiológicos: análisis comparativo de muestras microbiológicas obtenidas de la misma localización y cultivadas en dos laboratorios independientes. Int J Periodontics Restorative Dent 2001; 21:233-239.
- (218) Komiya A, Kato T, Nakagawa T, Saito A, Takahashi J, Yamada S et al. A rapid DNA probe method for detection of *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Periodontol 2000; 71:760-767.
- (219) Dzink JL, Socransky S, Haffajee A. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. J Clin Periodontol 1988; 15:316-323.
- (220) Beck JD. Issues in assessment of diagnostic tests and risk for periodontal diseases. Periodontology 2000 1995; 7:100-108.
- (221) Boyer BP, Ryerson CC, Reynolds HS, Zambon JJ, Genco RJ. Colonization by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in adult periodontitis patients as detected by the antibody-based Evalusite Test. J Clin Periodontol 1996; 23:477-484.

- (222) Listgarten MA, Wong MY, Lai C-H. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Bacteroides forsythus* in an *A. actinomycetemcomitans*-positive patient population. J Periodontol 1995; 66:158-164.
- (223) van Steenberg TJM, Rosling BG, Soder PO, Ladry RG, van der Velden U, Timmerman MF et al. A 15-month evaluation of the effects of repeated subgingival minocycline in chronic adult periodontitis. J Periodontol 1999; 70:657-667.
- (224) van Steenberg TJM, Timmerman MF, Mikx FHM, de Quincey G, van der Weijden GA, van der Velden U et al. Discrepancy between culture and DNA probe analysis for the detection of periodontal bacteria. J Clin Periodontol 1996; 23:955-959.
- (225) Riggio MP, Macfarlane TW, Mackenzie D, Lennon A, Smith AJ, Kinane DF. Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and in subgingival plaque samples. J Periodont Res 1996; 31:496-501.
- (226) Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis. Oral Microbiol Immunol 1996; 11:266-273.
- (227) Slots J, Flynn MJ, Li G. Polymerase chain reaction analysis of the *Porphyromonas gingivalis* collagenase gene. Clin Infect Dis 1995; 20(suppl 2):s167-s168.
- (228) Morillo JM, Lau L, Sanz M, Herrera D, Martín C, Silva A. Quantitative real-time polymerase chain reaction based on single copy gene sequence for detection of periodontal pathogens. J Clin Periodontol 2004; In press.
- (229) van Wilkelhoff AJ, de Graaf J. Microbiology in the management of destructive periodontal disease. J Clin Periodontol 1991; 18:406-410.
- (230) Mombelli A, Casagni F, Madianos PN. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. J Clin Periodontol 2002; 29:10-21.
- (231) Rosenberg ES, Torosian JP, Hammond BF, Cutler SA. Routine anaerobic bacterial culture and systemic antibiotic usage in the treatment of adult periodontitis: a 6-year longitudinal study. Int J Periodontics Restorative Dent 1993; 13:213-243.
- (232) Levy D, Csima A, Birek P, Ellen RP, McCulloch CA. Impact of microbiological consultation on clinical decision making: a case-control study of clinical management of recurrent periodontitis. J Periodontol 1993; 64:1029-1039.
- (233) Renvert S, Dahlén G, Wikström M. Treatment of periodontal disease based on microbiological diagnosis. Relation between microbiological and clinical parameters during 5 years. J Periodontol 1996; 67:562-571.
- (234) Eickholz P, Kugel B, Pohl S, Naher H, Staehle HJ. Combined mechanical and antibiotic periodontal therapy in a case of Papillon-LeFèvre syndrome. J Periodontol 2001; 72:542-549.
- (235) Ishikawa I, Kawashima Y, Oda S, Iwata T, Aarakawa S. Three case reports of aggressive periodontitis associated with *Porphyromonas gingivalis* in younger patients. J Periodont Res 2002; 37:324-332.

- (236) Wennström JL, Dahlén G, Svensson J, Nyman S. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius*: predictors of attachment loss? *Oral Microbiol Immunol* 1987; 2:158-162.
- (237) Haffajee A, Socransky S, Smith C, Dibart S. Microbial risk indicators for periodontal attachment loss. *J Periodont Res* 1991; 26:293-296.
- (238) Haffajee A, Dibart S, Kent RL, Socransky S. Factors associated with different responses to periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 1995; 22:628-636.
- (239) Haffajee A, Socransky S, Dibart S, Kent RL. Response to periodontal therapy in patients with high or low levels of *P.gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* and *B. forsythus*. *J Clin Periodontol* 1996; 23:336-345.
- (240) Rams TE, Listgarten MA, Slots J. Utility of 5 major putative periodontal pathogens and selected clinical parameters to predict periodontal breakdown in patients on maintenance care. *J Clin Periodontol* 1996; 23:346-354.
- (241) Dahlén G, Rosling BG. Identification of bacterial markers by culture technique in evaluation of periodontal therapy. *Int Dent J* 1998; 48:104-110.
- (242) Buchmann R, Muller RF, Heinecke A, Lange DE. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in destructive periodontal disease. Three-year follow-up results. *J Periodontol* 2000; 71:444-453.
- (243) Chaves ES, Jeffcoat MK, Ryerson CC, Snyder B. Persistent bacterial colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months therapy. *J Clin Periodontol* 2000; 27:897-903.
- (244) Slots J, Rosling BG. Suppression of the periodontopathic microflora in localized juvenile periodontitis by systemic tetracycline. *J Clin Periodontol* 1983; 10:465-486.
- (245) Loesche WJ, Syed SA, Morrison JL, Laughon BE, Grossman NS. Treatment of periodontal infections due to anaerobic bacteria with short-term treatment with metronidazole. *J Clin Periodontol* 1981; 8:29-44.
- (246) Socransky S, Haffajee A, Dzink JL. Relationship of subgingival microbial complexes of clinical features at the sampled sites. *J Clin Periodontol* 1988; 15:440-444.
- (247) Mandell RL, Tripoli LS, Savitt ED, Goodson JM, Socransky S. The effect of treatment on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis. *J Periodontol* 1986; 57:94-99.
- (248) Christersson LA, Slots J, Rosling BG, Genco RJ. Microbiological and clinical effects of surgical treatment of localized juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol* 1985; 12:456-476.
- (249) Cobb CM. Non-surgical pocket therapy: Mechanical. *Ann Periodontol* 1996; 1:443-490.
- (250) Petersilka GJ, Ehmke B, Flemmig TF. Antimicrobial effects of mechanical debridement. *Periodontology* 2000 2002; 28:56-71.
- (251) Kho P, Smales FC, Hardie J. The effect of supragingival plaque control on the subgingival microflora. *J Clin Periodontol* 1985; 12:676-686.

- (252) Loos BG, Claffey N, Crigger M. Effects of oral hygiene measures on clinical and microbiological parameters of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1988; 15:211-216.
- (253) Umeda M, Takeuchi Y, Noguchi K, Huang Y, Koshy G, Ishikawa I. Effects of nonsurgical periodontal therapy on the microbiota. *Periodontology* 2000 2004; 36:98-120.
- (254) Mousques T, Listgarten MA, Phillips R. Effect of scaling and root planing on the composition of the human subgingival microbial flora. *J Periodont Res* 1980; 15:144-151.
- (255) Sbordone L, Ramaglia L, Gulletta E, Iacono V. Recolonization of the subgingival microflora after scaling and root planing in human periodontitis. *J Periodontol* 1990; 61:579-584.
- (256) Dahlén G, Lindhe J, Sato K, Hanamura H, Okamoto H. The effect of supragingival plaque control on the subgingival microbiota in subjects with periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1992; 19:802-809.
- (257) Badersten A, Nilveus R, Egelberg J. Effect of nonsurgical periodontal therapy. I. Moderately advanced periodontitis. *J Clin Periodontol* 1981; 8:57-72.
- (258) Badersten A, Nilveus R, Egelberg J. Effect of nonsurgical periodontal therapy. II. Severely advanced periodontitis. *J Clin Periodontol* 1984; 11:63-76.
- (259) Pedrazzoli V, Kilian M, Karring T, Kirkegaard E. Effect of surgical and non-surgical periodontal treatment on periodontal status and subgingival microbiota. *J Clin Periodontol* 1991; 18:598-604.
- (260) Haffajee A, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL, Socransky S. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1997; 24:324-334.
- (261) Cugini MA, Haffajee A, Smith C, Kent RL, Socransky S. The effect of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases: 12-month results. *J Clin Periodontol* 2000; 27:30-36.
- (262) Renvert S, Wikström M, Dahlén G, Slots J, Egelberg J. Effect of root debridement on the elimination of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* from periodontal pockets. *J Clin Periodontol* 1990; 17:345-350.
- (263) Lavanchy DL, Bickel M, Baehni PC. The effect of plaque control after scaling and root planing on the subgingival microflora in human periodontitis. *J Clin Periodontol* 1987; 14:295-299.
- (264) DOUNGUDOMDACHA S, RAWLINSON A, WALSH TF, DOUGLAS CWI. Effect of non-surgical periodontal treatment on clinical parameters and the numbers of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* at adult periodontitis sites. *J Clin Periodontol* 2001; 28:437-445.
- (265) Cobb CM. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence-based perspective of scaling and root planing. *J Clin Periodontol* 2002; 29(Suppl.2):6-16.
- (266) van der Weijden GA, Timmerman MF. A systematic review on the clinical efficacy of subgingival debridement in the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002; 29(Suppl.3):55-71.

- (267) Ali RW, Lie T, Skaug N. Early effects of periodontal therapy on the detection frequency of four putative periodontal pathogens in adults. *J Periodontol* 1992; 63:540-547.
- (268) Renvert S, Wikström M, Dahlén G, Slots J, Egelberg J. On the inability of root debridement and periodontal surgery to eliminate *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from periodontal pockets. *J Clin Periodontol* 1990; 17(351):355.
- (269) van Wilkelhoff AJ, van der Velden U, de Graaf J. Microbial succession in recolonizing deep periodontal pockets after a single course of supra- and subgingival debridement. *J Clin Periodontol* 1988; 15:116-122.
- (270) Harper S, Robinson P. Correlation of histometric, microbial and clinical indicators of periodontal disease status before and after root planing. *J Clin Periodontol* 1987; 14:190-196.
- (271) Haffajee A, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL, Socransky S. Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planing. *J Clin Periodontol* 1997; 24:767-776.
- (272) Gunsolley JC, Zambon JJ, Mellot CA, Brooks CN, Kaugars CC. Periodontal therapy in young adults with severe generalized periodontitis. *J Periodontol* 1994; 65:268-273.
- (273) Mombelli A, Schmid B, Rutar A, Lang NP. Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. *J Periodontol* 2000; 71:14-21.
- (274) Sato K, Yoneyama T, Okamoto H, Dahlén G, Lindhe J. The effect of subgingival debridement on periodontal disease parameters and the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol* 1993; 20:359-365.
- (275) Shiloah J, Patters MR. DNA probes analyses of the survival of selected periodontal pathogens following scaling, root planing and intra-pocket irrigation. *J Periodontol* 1994; 64:568-575.
- (276) Saglie R, Newman MG, Carranza FA jr, Pattison GL. Bacterial invasion of gingiva in advanced periodontitis in humans. *J Periodontol* 1982; 53:217-222.
- (277) Adriaens PA, Edwards CA, De Boever JA, Loesche WJ. Ultrastructural observations on bacterial invasion in cementum and radicular dentin of periodontally diseased human teeth. *J Periodontol* 1988; 50:493-503.
- (278) Wikström M, Renvert S, Johnson M, Dahlén G. Microbial associations in periodontitis sites before and after treatment. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8:213-218.
- (279) 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*. *J Periodontol* 1999; 70:574-580.
- (280) Darby I, Mooney J, Kinane DF. Changes in subgingival microflora and humoral immune response following periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 2001; 28:796-805.
- (281) Quirynen M, Mongardini C, De Soete, Pauwels M, Coucke W, Van Eldere J et al. The role of chlorhexidine in the one-stage full-mouth disinfection treatment of patients with

- advanced adult periodontitis. Long-term clinical and microbiological observations. *J Clin Periodontol* 2000; 27:578-589.
- (282) Quirynen M, Mongardini C, Pauwels M, Bollen CML, Van Eldere J, van Steenberghe TJM. 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.
- (283) Quirynen M, Mongardini C, van Steenberghe TJM. The effect of a 1-stage full-mouth disinfection on oral malodour and microbial colonization of the tongue in periodontitis. *J Periodontol* 1998; 69:374-382.
- (284) Badersten A, Nilveus R, Egelberg J. Effect of nonsurgical periodontal therapy. IV. Operator variability. *J Clin Periodontol* 1985; 12:190-200.
- (285) Schenk G, Flemmig TF, Lob S, Ruckdeschel G, Hickel R. Lack of antimicrobial effect on periodontopathic bacteria by ultrasonic and sonic scalers in vitro. *J Clin Periodontol* 2000; 27:116-119.
- (286) Tunkel J, Heinecke A, Fleming TF. A systematic review of efficacy of machine-driven and manual subgingival debridement in the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002; 29(Suppl.3):72-81.
- (287) Drisko CH. Root instrumentation. Power-driven versus manual scalers, which one? *Dent Clin North Am* 1998; 42:229-244.
- (288) Leon L, Vogel R. A comparison of the effectiveness of hand scaling and ultrasonic debridement in furcations as evaluated by differential dark-field microscopy. *J Periodontol* 1987; 58:86-95.
- (289) Dragoo MR. A clinical evaluation of hand and ultrasonic instruments on subgingival debridement. I. With unmodified and modified ultrasonic inserts. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1992; 12:310-323.
- (290) Clifford LR, Needleman I, Chan YK. Comparison of periodontal pocket penetration by conventional and microultrasonic inserts. *J Clin Periodontol* 1999; 26:124-130.
- (291) Kocher T, Tersic-Orth B, Plagman H-C. Instrumentation of furcation with modified sonic scaler inserts. A study on manikins (II). *J Clin Periodontol* 1998; 25:451-456.
- (292) Bollen CML, Quirynen M. Microbiological response to mechanical treatment in combination with adjunctive therapy. *J Periodontol* 1996; 67:1143-1158.
- (293) Oosterwaal PJM, Mikx FHM, van't Hof MA, Renggli HH. Short-term bactericidal activity of chlorhexidine gel stannous fluoride gel and amine fluoride gel tested in periodontal pockets. *J Clin Periodontol* 1991; 18:97-100.
- (294) Oosterwaal PJM, Mikx FHM, Van den Brink ME, Renggli HH. Bactericidal concentrations of chlorhexidine-digluconate, amine fluoride gel and stannous fluoride gel for subgingival bacteria tested in serum at short contact times. *J Periodont Res* 1989; 24:155-160.
- (295) Reynolds MA, Lavigne CK, Minah GE, Suzuki JB. Clinical effects of simultaneous ultrasonic scaling and subgingival irrigation with chlorhexidine. Mediating influence of periodontal probing depth. *J Clin Periodontol* 1992; 19(8):595-600.

- (296) Schlagenhauf U, Stellwag P, Fiedler A. Subgingival irrigation in the maintenance phase periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 1990; 17:650-653.
- (297) Haskel E, Esquenasi J, Yussim L. Effects of subgingival chlorhexidine irrigation in chronic moderate periodontitis. *J Periodontol* 1986; 57(5):305-310.
- (298) Taggart JA, Palmer RM, Wilson M. A clinical and microbiological comparison the effects of water and 0,02% chlorhexidine as coolants during ultrasonic scaling and root planing. *J Clin Periodontol* 1990; 17(1):32-37.
- (299) Chapple IL, Walmsley AD, Saxby MS, Moscrop H. Effect of subgingival irrigation with chlorhexidine during ultrasonic scaling. *J Periodontol* 1992; 63(10):812-816.
- (300) Quirynen M, Papaioannou W, van Steenberghe TJM. Intraoral transmission and the colonization of oral hard surfaces. *J Periodontol* 1996; 67:986-993.
- (301) Quirynen M, Listgarten MA. The distribution of bacterial morphotypes around natural teeth and titanium implants ad modum Branemark. *Clin Oral Impl Res* 1990; 1:8-12.
- (302) Quirynen M, De Soete M, Dierickx K, van Steenberghe D. The intra-oral translocation of periodontopathogens jeopardises the outcome of periodontal therapy. A review of the literature. *J Clin Periodontol* 2001; 28:499-507.
- (303) Beikler T, Abdeen G, Schnitzer S, Sälzer S, Ehmke B, Heinecke A et al. Microbiological shifts in intra- and extraoral habitats following mechanical periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 2004; 31:777-783.
- (304) Papaioannou W, Bollen CML, Van Eldere J, Quirynen M. The adherence of Periodontopathogens to periodontal probes. A possible factor in intra-oral transmission? *J Periodontol* 1996; 67:1164-1169.
- (305) Quirynen M, Bollen CML, Vanderkerckhove BNA, Dekeyser Ch, Papaioannou W, Eysen. Full-vs. Partial-mouth disinfection in the treatment of periodontal infections: Short-term clinical and microbiological observations. *J Periodontol* 1995; 74(8):1459-1467.
- (306) Mongardini C, van Steenberghe D, Dekeyser Ch, 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.
- (307) De Soete, Mongardini C, Pauwels M, Haffajee A, Socransky S, van Steenberghe D et al. One-Stage full-mouth disinfection. Long-term microbiological results. Analyzed by checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Periodontol* 2001; 72:374-382.
- (308) Bollen CML, Mongardini C, Papaioannou W, van Steenberghe D, Quirynen M. The effect of a one-stage full-mouth disinfection on different intra-oral niches. Clinical and microbiological observations. *J Clin Periodontol* 1998; 25:56-66.
- (309) Bollen CML, Vandekerckhove BNA, Papaioannou W, Van Eldere J, Quirynen M. Full-versus partial-mouth disinfection in the treatment of periodontal infections. A pilot study: long-term microbiological observations. *J Clin Periodontol* 1996; 23:960-970.
- (310) Vandekerckhove BNA, Bollen CML, Dekeyser Ch, Darius P, Quirynen M. Full- versus partial-mouth disinfection in the treatment of periodontal infections. Long-term clinical observations of a pilot study. *J Periodontol* 1996; 67:1251-1259.

- (311) Gilmore EL, Bhaskar SN. Effect of tongue brushing on bacteria and plaque formed in vitro. *J Periodontol* 1972; 43:418-422.
- (312) Wolffe GN, van der Velden U. Reproducibility of phase-contrast microscope measurements of percentage motile microorganisms in samples removed from the dorsum of the tongue. *J Periodont Res* 1987; 22:366-369.
- (313) van Wilkelhoff AJ, van der Velden U, Clement M, de Graaf J. Intra-oral distribution of black-pigmented *Bacteroides* species in periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 1988; 3:83-85.
- (314) Schiott CR, Briner WW, Löe H. Two years oral use of chlorhexidine in man. II. The effect on the salivary bacterial flora. *J Periodont Res* 1976; 11:145-152.
- (315) Kalaga A, Addy M, Hunter B. Comparison of chlorhexidine delivery by mouthwash and spray on plaque accumulation. *J Periodontol* 1989; 60:127-130.
- (316) Hardy JH, Newman HN, Strahan JD. Direct irrigation and subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1982; 9:57-65.
- (317) Oosterwaal PJM, Mikx FHM, Renggli HH. Clearance of a topically applied fluorescein gel from periodontal pockets. *J Clin Periodontol* 1990; 17:613-615.
- (318) Lofthus JE, Waki MY, Jolkowsky DL. Bacteremia following subgingival irrigation and scaling and root planing. *J Periodontol* 1991; 62:602-607.
- (319) Aguilón JC, Ferreira V, Nuñez E. Immunomodulation of LPS ability to induce the local Shwartzman reaction. *Scand J Immunol* 1996; 44:551-555.
- (320) Apatzidou DA, Kinane DF. Quadrant root planing versus same-day full-mouth root planing. I. Clinical findings. *J Clin Periodontol* 2004; 31:132-140.
- (321) Apatzidou DA, Kinane DF. Quadrant root planing versus same-day full-mouth root planing. III. Dynamics of the immune response. *J Clin Periodontol* 2004; 31:152-159.
- (322) Grossi SG, Skrepcinski FB, DeCaro T, Robertson PB, Ho AW, Dunford RG et al. Treatment of periodontal disease in diabetics reduces glycated hemoglobin. *J Periodontol* 1997; 68:713-719.
- (323) Syed SA, Loesche WJ. Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Appl Microbiol* 1972; 24(4):638-644.
- (324) Hamp SE, Nyman S, Lindhe J. Periodontal treatment of multiroot teeth. Results after 5 years. *J Clin Periodontol* 1975; 2:126-135.
- (325) Clark WB, Magnusson I, Namgung YY, Yang MCK. The strategy and advantage in use of an electronic probe for attachment measurement. *Advances in Dental Research* 1993; 7:152-157.
- (326) Cullinan MP, Westerman H, Hamlet SM, Palmer JE, Faddy MJ, Seymour GJ. The effect of a triclosan-containing dentifrice on the progression of periodontal disease in an adult population. *J Clin Periodontol* 2003; 30:414-419.
- (327) Rühling A, König J, Rolf H, Kocher T, Schwahn C, Plagman H-C. Learning root debridement with curettes and power-driven instruments. Part II: Clinical results following mechanical, nonsurgical therapy. *J Clin Periodontol* 2003; 30:611-615.

- (328) Pavicic MJAMP, van Wilkelhoff AJ, Douqué NH, Steures RWR, de Graaf 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.
- (329) Sanz M, van Wilkelhoff AJ, Herrera D, Dellelijn-Kippuw N, Simon R, Winkel EG. Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. European Journal of Oral Sciences 2000; 108:383-392.
- (330) Rosenberg R, Ash MM. The effect of root roughness on plaque accumulation and gingival inflammation. J Periodontol 1974; 45:146-150.
- (331) Waerhaug J. Effect of rough surfaces upon gingival tissue. J Dent Res 1956; 35:323-325.
- (332) Quirynen M, Bollen CML. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. J Clin Periodontol 1995; 22:1-14.
- (333) Claffey N, Loos BG, Gentes B, et al. The relative effects of therapy and periodontal disease on loss of probing attachment after root planing. J Clin Periodontol 1988; 15(163):189.
- (334) Saglie R, Johanson J, Flotra L. The zone of completely and partially destructed periodontal fibers in pathological pockets. J Clin Periodontol 1975; 2:198-202.
- (335) Boretti G, Zappa U, Graf H, Case D. Short-term effects of phase I therapy on crevicular cell populations. J Periodontol 1995; 66:235-240.
- (336) Oosterwaal PJM, Matee MI, Mikx FHM, Hof MA, Renggli HH. The effect of subgingival debridement with hand and ultrasonic instruments on the subgingival microflora. J Clin Periodontol 1987; 14:528-533.
- (337) Checchi L, Pelliccioni GA. Hand versus ultrasonic instrumentation in the removal of endotoxins from root surfaces in vitro. J Periodontol 1988; 59:398-402.
- (338) Copulus TA, Low SB, Walker CB, Trebilcock YY, Hefti AF. Comparative analysis between a modified ultrasonic tip and hand instruments on clinical parameters of periodontal disease. J Periodontol 1993; 64:694-700.
- (339) Slots J, Ting M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. Periodontology 2000 1999; 20:82-121.
- (340) Rams TE, Feik D, Listgarten MA, Slots J. *Peptostreptococcus micros* in human periodontitis. Oral Microbiol Immunol 1992; 7:1-6.
- (341) Dzink JL, Gibbons RJ, Childs WC III, Socransky S. The predominant cultivable microbiota of crevicular epithelial cells. Oral Microbiol Immunol 1988; 4:1-5.
- (342) Slots J, Hafström C, Rosling BG, Dahlén G. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* in subgingival smears by the indirect fluorescent-antibody technique. J Periodont Res 1985; 20:613-620.

- (343) Nagata MJH, Anderson GB, Bonaventura GT, Sundefeld ML, Caffesse RG. Full-Mouth disinfection versus standard treatment of periodontitis: a clinical study. *J Periodontol* 2001; 72:1636.