CAMBIOS QUE OCURREN EN LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA SUBGINGIVAL EN PACIENTES QUE RECIBEN APARATOLOGÍA ORTODÓNTICA

ANDREA AMEZQUITA NARANJO
MARTHA LUCIA TRIVIÑO TARAZONA

Tesis para optar al título de Especialista en ortodoncia y ortopedia maxilar

Asesores

Dr Javier Botero
Periodoncista Universidad de el Valle

Dra Paula Cristina Bermúdez
Docente del Colegio Odontológico Colombiano

COLEGIO ODONTOLOGICO COLOMBIANO
POSTGRADO DE ORTODONCIA Y ORTOPEDIA MAXILAR
SANTIAGO DE CALI
7 de noviembre de 2005

Nota de aceptación

_____

_____

_____

_____

Presidente de Jurado

_____

Jurado

_____

Jurado

Santiago de Cali, noviembre de 2005

A nuestras familias, que nos apoyaron
durante todo el tiempo que estudiamos

AGRADECIMIENTOS

Las autoras expresan sus agradecimientos a:

Dra. Paula Cristina Bermúdez por su incondicionable apoyo
Dr. Javier Botero por su tiempo y dedicación

A nuestros compañeros por su colaboración y paciencia en el momento de las muestras y recolección de pacientes.

Santiago de Cali, noviembre de 2005

Señores
Biblioteca
Colegio Odontológico Colombiano Extensión Santiago de Cali
Ciudad

Autorizamos a la Unidad de Investigación del Colegio Odontológico Colombiano Extensión Santiago de Cali, a consultar y reproducir con fines de investigación parcial o totalmente el contenido del trabajo del grado titulado ¿CUALES SON LOS CAMBIOS QUE OCURREN EN LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA SUBGINGIVAL EN PACIENTES QUE RECIBEN APARATOLOGÍA ORTODÓNTICA?, presentado a la Unidad de Investigación como requisito del programa para optar por el título de Especialista en Ortodoncia y Ortopedia Maxilar, siempre que mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de investigación y sus autores.

ANDREA AMEZQUITA NARANJO
C.C. No. 66.762.970 de Palmira

MARTHA LUCIA TRIVIÑO TARAZONA
C.C. No. 52.254.339 de Bogotá

DESCRIPCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

AUTORES:	AMEZQUITA NARANJO ANDREA TRIVIÑO TARAZONA MARTHA LUCIA
TÍTULO:	¿CUALES SON LOS CAMBIOS QUE OCURREN EN LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA SUBGINGIVAL EN PACIENTES QUE RECIBEN APARATOLOGÍA ORTODÓNTICA?
FECHA DE TERMINACIÓN:	Santiago de Cali noviembre 2005 - II
NÚMERO DE PÁGINAS:	41
TIPO DE ILUSTRACIONES	Tablas y figuras
MATERIAL Y ANEXO	(diapositivas, grabaciones, CD ROOM, etc)
FACULTAD:	Odontología
TÍTULO OBTENIDO:	Especialista en Ortodoncia y Ortopedia Maxilar

DESCRIPTORES O PALABRAS CLAVES: colocación de aparatología, microbiota subgingival, bacterias peridontopaticas, técnicas de cultivo

CONTENIDO

Pág.

1. INTRODUCCIÓN 13

1.2 OBJETIVOS 18

1.2.1 Objetivo General 18

1.2.2 Objetivos Específicos 18

2. METODOLOGÍA 19

2.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN 19

2.2 TAMAÑO DE LA MUESTRA 19

2.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN 19

2.3.1 Criterios de inclusión 19

2.3.2 Criterios de exclusión 19

2.4 VARIABLES 20

2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO 21

2.6 SESGOS 21

2.6.1 Examinador 21

2.6.2 Instrumento 21

2.6.3 Clasificación y estado del paciente 21

2.6.4 Cultivo microbiológico 22

2.6.5 Aparatología ortodontica 22

2.6.6 Sesgo de selección 22

2.6.7 Muestra microbiológica 22

2.7 RIESGOS Y BENEFICIOS 23

3. PRESUPUESTO 24

3.1 CRONOGRAMA 24

4. RESULTADOS 25

5. DISCUSIÓN 29

6. CONCLUSIONES 31

BIBLIOGRAFÍA 32

ANEXOS 37

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Variables **20**

Tabla 2. Presupuesto **24**

Tabla 3. Cronograma **24**

Tabla 4. Descripción demográfica y clínica en pacientes con y sin aparatología Ortodóntica **26**

Tabla 5. Porcentaje (%) de la microbiota subgingival cultivable en pacientes con y sin aparatología ortodontica **26**

Tabla 6. Bacilos entéricos gram negativos aislados de pacientes con y sin aparatología ortodontica **27**

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Fotografía clínica toma de la muestra microbiológica **27**

Figura 2. Frecuencia de detección (%) de microorganismos periodontopaticos en pacientes con y sin aparatología ortodontica **28**

LISTA DE ANEXOS

Pág.

Anexo A. Cuestionario de criterios de inclusión **37**

Anexo B. Consentimiento escrito informado **38**

Anexo C. Recolección de la información **40**

RESUMEN

La placa dental esta organizada en una biopelicula provista de nutrientes llamado Biofilm. Algunos factores podrían influenciar la organización de la biopelicula y la colonización microbiana en restauraciones y aparatos ortodónticos.

El objetivo de este estudio fue investigar los cambios en la microbiota subgingival y los parámetros clínicos antes y después de la colocación de aparatología ortodontica.

Materiales y métodos: se registraron parámetros clínicos periodontales y muestras de fluido crevicular en 60 individuos; 30 de ellos fueron examinados nuevamente después de la cementación de aparatología ortodontica. Las muestras fueron analizadas para detectar la presencia de periodontopáticos y bacterias superinfectantes usando técnicas de cultivo. Se realizó un análisis descriptivo y se utilizaron t student y Mann Whitney test para analizar las diferencias entre los grupos ($P \leq 0.05$).

Resultados: no se encontraron cambios en profundidad al sondaje (PD) y nivel clínico de inserción (CAL), mientras en sangrado al sondaje (BOP), índice de placa (IP) e índice gingival (IG) se detecto incremento después de la colocación de la aparatología ($P \leq 0.05$). *P.gingivalis, P.intermedia/nigrescens T.forsythia y Fusobacterium spp* estuvieron elevadas en el grupo intervenido en comparación con el grupo al que no se le coloco aparatología ortodontica. ($P \leq 0.01$). Fueron encontrados microorganismos superinfectantes tales como, *Enterobacter cloacae, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens.*

Conclusiones: la colocación de aparatología ortodontica es de gran influencia para la acumulación de placa bacteriana, de igual manera la colonización de periodontopáticos y bacterias superinfectantes dando como resultado mayor inflamación y sangrado.

Se debe tener especial atención y cuidado en los métodos de higiene oral de los pacientes sometidos a tratamientos de ortodoncia.

Palabras claves: colocación de aparatología, microbiota subgingival, bacterias peridontopaticas, técnicas de cultivo.

1. INTRODUCCIÓN

La terapia ortodontica hace parte integral de cualquier tratamiento oral actual y en ningún momento es deseable encontrarse con complicaciones de origen periodontal. Varios estudios han mostrado la relación que existe entre la colonización subgingival de microorganismos periodontopáticos y el desarrollo de enfermedad periodontal e incluso la afinidad que tienen las sustancias de origen bacteriano por los aparatos ortodónticos. Esta acumulación incrementada de microorganismos y sus metabolitos, puede resultar en inflamación e incluso llevar a un proceso periodontal inflamatorio destructivo. Es por lo tanto importante estudiar la microbiota subgingival antes y después de la colocación de aparatos ortodónticos para establecer cambios tanto en sentido cualitativo y cuantitativo de la composición microbiana que puedan servir en el desarrollo de planes preventivos orales en pacientes que reciben tratamiento ortodóntico

Las bacterias habitan la boca del ser humano desde el nacimiento hasta la muerte. Colonizan los tejidos blandos incluyendo la encía, mejillas, lengua y tónsilas y cuando los dientes están presentes, colonizan tanto por encima como por debajo del margen gingival. Más de 500 especies bacterianas han sido aisladas de la cavidad oral humana. Estos microorganismos han evolucionado para poder ocupar el espacio subgingival[1]. Es de destacar, que a pesar de vivir en cercana proximidad a un tejido altamente vascularizado como lo es el tejido conectivo gingival y el ligamento periodontal, solo un pequeño grupo de estas bacterias causan enfermedad en humanos sanos. Esto es el resultado de un sistema de defensa complejo que constantemente monitorea la colonización bacteriana y previene la intrusión de estas en los tejidos. Existe entonces, un balance dinámico entre la placa bacteriana y el sistema de defensa innato del huésped. A medida que la placa bacteriana se adapta para sobrevivir y colonizar, el sistema inmune limita el sobrecrecimiento mediante la combinación de mecanismos innatos y adquiridos de defensa[2]. Las bacterias liberan constantemente antigenos que son reconocidos como foráneos dando como resultado una respuesta inmune. Las bacterias que forman la placa bacteriana representan unos organismos altamente evolucionados y especializados que se han adaptado y más aun, continúan adaptándose para sacar el mayor provecho del medio subgingival.[3,4]

Un biofilm se define como poblaciones bacterianas incluidas en una matriz adherente unas a otras y / o a superficies o interfases. Dentro de las características importantes de un biofilm están: sistema circulatorio primitivo, comunidad ecológica, cooperatividad metabólica, diversos microambientes (pH, tensión de oxigeno, potenciales eléctricos), crecimiento bacteriano restringido,

resistencia a las defensas del huésped y a los antimicrobianos. La colonización de un diente luego de haberse lavado comienza rápidamente. En unas cuantas horas se forma una película sobre la superficie dental que consiste de proteínas y glicoproteinas encontradas en la saliva y fluido crevicular. La película provee receptores para la adherencia de estreptococos como *S.gordonii y A.naeslundii*, dos de los colonizadores iniciales, creando un ambiente inicial para la coagregación bacteriana. La coagregación se basa en la interacción específica de los factores de adhesión producidos por algunas bacterias en interacción con otras. El resultado de estas interacciones es la formación de un complejo ordenamiento de bacterias. Los estreptococos y fusobacterias son dos de los géneros bacterianos mas frecuentes ya que han sido encontrados en casi todas las muestras de placa bacteriana obtenidas de sujetos tanto sanos como enfermos. Los estreptococos son los colonizadores más predominantes en la película y proveen abundantes factores de adhesión para otras especies. Por lo tanto estos microorganismos juegan un papel importante en la formación del biofilm como estructura principal de la placa bacteriana[5].

Mientras que en la gingivitis la microbiota subgingival es principalmente aerobia, en la bolsa periodontal la microbiota es anaerobia y se encuentran muy pocas proporciones de cocos gram positivos[6]. Así pues se forma un micro-ambiente que es especial para la colonización de los microorganismos. Sin embargo, el surco periodontal y la bolsa periodontal no representan un ambiente favorable para la microbiota oral y solo ciertos microorganismos altamente evolucionados son capaces de colonizar y sobrevivir. Se entiende entonces que el cambio en el pH , temperatura., nutrientes y tensión de oxigeno puede limitar el crecimiento de los microorganismos[12]. Inicialmente colonizan microorganismos gram positivos predominantemente las formas cocoides en unas condiciones en donde existe un balance entre las defensas del organismos y las bacterias. El desafío microbiano es constante y en cualquier momento puede romperse el balance y permitir la colonización de microorganismos gram negativos que son los que dan inicio al proceso destructivo conocido como periodontitis. A medida que se profundiza la bolsa periodontal, anteriormente surco periodontal, cambia de un ambiente aerobio a un ambiente anaerobio más restrictivo[6]. Así bien, la microbiota subgingival puede estar compuesta por más de 300 especies diferentes de microorganismos pero de los cuales solo unos pocos han sido relacionados con el inicio y progreso de la periodontitis. Estos microorganismos han sido identificados como *Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus, Prevotella intermedia* y *Fusobacterium nucleatum*[7]. Microorganismos como el *Actinobacillus actinomycetemcomitans,* y *Porphyromonas gingivalis* poseen factores de virulencia como leucotoxina (*A.actinomycetemcomitans*), colagenasas, lipopolisacárido (LPS) que son altamente dañinos para el huésped [8-9-10-11] e incluso son capaces de iniciar destrucción periodontal en animales de experimentación[12]. *Bacteroides forsythus* ha sido encontrado en altos niveles en lesiones

periodontales activas en comparación con sitios con gingivitis y sanos[13]. *Prevotella intermedia* presenta los mismos factores de virulencia de *Porphyromonas gingivalis* y ha sido cultivada en altos porcentajes de pacientes con periodontitis[14] *Fusobacteium nucleatum* es uno de los microorganismos mas comunes alcanzando el 7-10% de la microbiota cultivable de muestras obtenidas en bolsas periodontales profundas[15]. No obstante, bacterias sobreinfectantes pueden crecer igualmente dentro de la bolsa periodontal como resultado de la enfermedad más que como su causa. Sus niveles se pueden incrementar incluso por encima de los verdaderos patógenos periodontales y por lo tanto dificultar su identificación. Un ejemplo de estas bacterias son los bacilos entéricos gram negativos. La presencia de bacilos entéricos gram negativos no es un hallazgo común en periodontitis ya que hacen parte de una microbiota foránea a la cavidad oral y por lo tanto se considera como una sobreinfección. Estos microorganismos son implicados en el 68 y el 100% de las infecciones intrahospitalarias y su capacidad de transmisión persona a persona representa un gran problema de salud publica[16]. Una de las mas importantes es la *Pseudomona.aureginosa* que ha sido implicada en infecciones de oído, ojo, heridas, endocarditis y es la mayor causa de infecciones nosocomiales. *Pseudomona .aureginosa* puede invadir tejidos y causar daño a nervios y osteomielitis y su tratamiento generalmente incluye debridamiento de los tejidos infectados y administración de antibióticos[17]. Los bacilos entéricos gram negativos tienen la capacidad de producir potentes factores de virulencia como adhesinas invasivas, proteínas antifagociticas y enterotoxinas[18], especialmente de *E.coli*, que son empleadas en los laboratorios de microbiología como parámetro para evaluar factores de virulencia producidos por otros microorganismos.

La relación que existe entre bacilos entéricos gram negativos y su papel en enfermedad periodontal no es clara aun. Slots et al[19] encontraron una alta prevalencia de mas de 50% de bacilos entéricos gram negativos con un 23% de la microbiota cultivable en 24 pacientes con periodontitis crónica severa de la Republica Dominicana. Los resultados mostraron una mayor frecuencia de bacilos entéricos gram negativos que los microorganismos relacionados con periodontitis. Wahab et al[20] encontraron resultados similares en Sudan y al comparar con estudios paralelos fue mucho mayor que en Estados Unidos. Al parecer, el establecimiento de una bolsa periodontal provee las condiciones óptimas para la colonización y el establecimiento de estos microorganismos que en algunos casos, sobrepasan en cantidad a los microorganismos que frecuentemente son identificados en enfermedad periodontal.

Muy pocos estudios hay disponibles sobre los cambios de la microbiota subgingival relacionado con la colocación de aparatología ortodontica pero se puede extrapolar de alguna forma los

estudios realizados en prótesis fija. Este evento simularía la colocación de bandas o aparatos retentivos. No obstante, el análisis de la información debe ser tomada cuidadosamente.

Un estudio en animales[21] evaluó los efectos del sobrecontorno y subcontorno de dientes sobre el estado periodontal. Por un periodo de 9 semanas permitieron el acumulo de placa hasta el momento de sacrificio de los animales. No se encontraron cambios significativos en el periodonto en dientes con subcontorno mientras que los dientes sobrecontorneados permitieron la impactación de alimentos y la retención de placa observándose microscópicamente un infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos y células plasmáticas en la zona marginal del tejido, formación de *rete pegs*, vasos sanguíneos ensanchados y proliferación coronal del margen de 0.5-1.0mm. Aunque no se observaron alteraciones en el aparato de inserción, los cambios inflamatorios pueden ser vistos en la primera semana implicando que su progresión sin tratamiento puede llevar a la perdida de inserción. La prevalencia de los sobrecontornos en restauraciones dentales está entre el 25-76% y basta solo con 0.2-0.8mm de exceso para causar problemas serios sobre el periodonto. El mecanismo patogénico de los sobrecontornos sobre el periodonto es la interferencia con la higiene oral. Tales condiciones permiten el crecimiento de microorganismos periodontopaticos[22]. Tal et al. (1989)[23] en un estudio experimental en perros evaluaron el abuso del espacio biológico con amalgamas sobrecontorneados por un periodo de un año. Los autores observaron un promedio de recesión de tejido marginal de 3.16mm, perdida ósea de 1.17mm y clínicamente un tejido inflamado con sangrado al sondaje leve. Microscópicamente el tejido conectivo inmediatamente debajo de la restauración se encontraba densamente infiltrado por células inflamatorias. Aunque, al momento del sacrificio de los animales, no se observo actividad osteoclastica, la violación del espacio biológico condujo a la perdida progresiva de inserción hasta un punto en donde el periodonto logra estabilizarse. Sin embargo, la continúa acumulación de placa mantiene la actividad inflamatoria en el área. Lo mismo puede ser observado durante la colocación de bandas ortodonticas y de esta forma favorecer el acumulo de placa y el desarrollo de la enfermedad periodontal. En un estudio split mouth[24], se observó que los dientes experimentales (brackets y bandas) presentaron un mayor índice gingival, de placa y detección subginigval de *A.actinomycetemcomitans* en comparación con los dientes control (no aparatología). Si bien la colocación de aparatos ortodónticos no afecta la microbiota subgingival en general, genera cambios en los sitios retentivos de placa bacteriana[25]. Con la colocación de brackets y bandas, se elevan significativamente los cambios clínicos periodontales en comparación con pacientes sin aparatología ($p<0.001$). Estas condiciones de inflamación incrementada y acumulo de placa supragingival resultan muy favorables para el crecimiento de la placa bacteriana subgingival[26].

Los efectos de la restauraciones clínicamente perfectas y restauraciones sobrecontorneadas sobre la microbiota han sido estudiados en humanos. Por medio de cultivo microbiológico selectivo se determinó que la microbiota inmediatamente después de la inserción de las restauración sobreontorneadas es predominantemente gram negativa anaerobia con bacilos y algunas bacterias anaerobias facultativas, similar a lo encontrado en una periodontitis crónica. En contraste, la microbiota observada en restauraciones clínicamente perfectas, fue similar a la encontrada en salud periodontal y gingivitis[27]. En el área de la ortodoncia ocurre un evento similar. Es muy frecuente encontrar bandas sobrecontorneadas que albergan una gran cantidad de microorganismos. En pacientes ortodónticos, la microbiota subgingival puede cambiar de una microbiota principalmente gram positiva, a una gram negativa compuesta por *Bacteroides forsythus, Porphyromonas gingivalis* y otros facultativos[28]. En sólo 6 semanas, se pueden observar la aparición de bacilos y espiroquetas y al cabo de 7 meses, ya es posible observar una microbiota que alberga una gran cantidad de microorganismos periodontopáticos[29]. Un hallazgo interesante, es que los pacientes con buena higiene oral, los cambios toman mas tiempo en ocurrir.

La retención de placa bacteriana de los diferentes materiales de restauración odontológica es un factor importante en el desarrollo de la enfermedad periodontal. Silness en 1974 reportó inicialmente que los dientes adyacentes a pónticos presentaban mayores índices gingivales en comparación con dientes control. Wise y Dykema (1975)[30] estudiaron la capacidad retentiva de placa bacteriana de 4 materiales restaurativos (oro tipo III, aleación de oro, porcelana, resina acrílica) y encontraron que las aleaciones de oro y la porcelana acumularon significativamente mayor cantidad de placa en comparación con la resina acrílica. Así mismo, los especimenes de resina acrílica necesitaron menos movimientos de cepillado para eliminar la poca placa bacteriana acumulada. Dentro de los limites del estudio, el periodo experimental de 48 horas permitió el acumulo significativo de placa indicando que con el paso del tiempo, la cantidad y composición de la microbiota puede cambiar y de esta forma llevar a alteraciones sobre el periodonto. Si embargo, se debe enfatizar que con una buena higiene oral y una forma adecuada de los pónticos y restauraciones, cualquier material de restauración se puede mantener limpio sin causar problemas significativos sobre el periodonto. Otro estudio[31] mostró que incluso restauraciones altamente pulidas permiten el acumulo de placa bacteriana con el tiempo. Es muy frecuente en la ortodoncia moderna, el uso de monómeros y resinas como material de adhesión de los brackets. De esta forma, estos materiales resultan ser porosos favoreciendo la colonización bacteriana. En este orden de ideas, la colocación de restauraciones y aparatología ortodontica puede permitir la acumulación de sustancias toxicas de origen bacterial (LPS)[32] que pueden iniciar o perpetuar un proceso inflamatorio gingival.

La identificación de tales microorganismos representa una estrategia diagnóstica de gran ayuda que ha resultado ser efectiva en la terapia periodontal[33] y en el seguimiento de los pacientes para identificar factores de riesgo importantes de tipo microbiano. De esta forma, la investigación de los cambios microbiológicos subgingivales en pacientes que reciben tratamiento ortodóntico pueden servir para tomar conductas preventivas, diagnosticas e incluso terapéuticas para controlar problemas periodontales.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General

Estudiar la composición de la microbiota subgingival antes y después de la colocación de aparatología ortodontica en pacientes que asisten a las clínicas de postgrado en ortodoncia del Colegio Odontológico Colombiano.

1.2.2 Objetivos Específicos

1. Analizar la frecuencia de los organismos periodontopáticos más importantes relacionados con la colocación de brackets ortodonticos como son *Actinobacillus Actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus, Prevotella intermedia, Fusobacterium nucleatum.*
2. Reportar la frecuencia de aislamiento de microorganismos superinfectantes (bacilos entéricos gram negativos) en la microbiota subgingival en pacientes que reciben aparatología ortodontica.
3. Relacionar parámetros clínicos periodontales con la frecuencia de aislamiento de los microorganismos periodontopáticos.

2. METODOLOGÍA

2.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

Se realizó un estudio descriptivo observacional de corta duración experimental que analizo los cambios de la microbiota subgingival antes y después de la colocación de aparatología ortodontica.

2.2 TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se seleccionaron 30 pacientes que iniciaron terapia ortodóntica en el Colegio Odontológico Colombiano. Se tomaron muestras microbiológicas subgingivales antes de la colocación de la aparatología y 3 meses después de colocada la aparatología para un total de 60 muestras pareadas. También se tomaron 30 pacientes de las clínicas de pregrado de el colegio odontológico con las mismas características pero que no reciban tratamiento de ortodoncia; a los que se les realizó una sola toma de muestra.

2.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN

2.3.1 Criterios de inclusión

- Sujetos Hombres y mujeres que participaran voluntariamente en el estudio previo consentimiento informado y firmado.
- Individuos con edades entre los 13 y 34 años
- Individuos que presentaron un Periodonto sano libre de signos de inflamación

2.3.2 Criterios de exclusión

- Sujetos con enfermedades sistémicas
- Sujtos con enfermedades inmunes
- Terapia periodontal 3 meses anteriores al momento de tomar las muestras.
- Consumo de antibióticos 3 meses anteriores al momento de tomar las muestras
- Consumo de corticoides en la última semana
- Consumo de AINES en la última semana
- Fumadores pesados.
- Mujeres embarazadas.

2.4 VARIABLES

Tabla 1. Variables

Nombre de la variable	Definición	Tipo	Clasificación	Categorías/unidad d medida
Sexo	Genero masculino o femenino	Cualitativa, categórica	Independiente	Femenino = 1 Masculino = 2
Índice gingival	Zonas de sangrado en el momento del sondaje	Ordinal	dependiente	0 a 3
Nivel de inserción	Distancia en mm desde el limite cemento-adamantino hasta el fondo de la bolsa gingival.	Cuantitativa continua	Dependiente	En milímetros
Profundidad al sondaje	Distancia desde el margen gingival hasta el fondo del surco	Cuantitativa continua	Dependiente	En milímetros
Presencia de microorganismos periodontopáticos	Hallazgos de microorganismos en presencias de enfermedad periodontal	Cuantitativa continua	Independiente	Numero de colonias en agar
Índice de placa O'leary	Cuantificación de la placa bacteriana por medio de una pastilla reveladora y se registra el No de superficies de diente afectadas.	Categórica	Dependiente	No de superficies con placa
Estado periodontal	Presencia o no de salud periodontal	Dicotómico	dependiente	Sano/gingivitis

2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Software GraphPad Prism versión 4.00 para Windows.

Los datos demográficos y clínicos fueron expresados en tablas de frecuencia y analizados con medidas de tendencia central, promedio, desviación estándar. Diferencias en los parametros clinicos fueron evaluados con la prueba t student pareada y no pareada. La frecuencia de deteccion de microorganismos fue analizada con chi 2 . Las proporciones de microorganismos fue evaluada con la prueba Mann Whitney test y Wilcoxon matched pair test. Se asumio significancia estadistica cuando $P<0.05$.

2.6 SESGOS

2.6.1 Examinador

Es posible encontrar errores en las mediciones de parámetros clínicos ya que fueron realizadas por estudiantes de ortodoncia de segundo año. Para controlar este sesgo los examinadores fueron calibrados por un periodoncista experimentado antes de la iniciación de toma de muestras. Un solo examinador realizó los exámenes en todas las ocasiones. De la misma forma se calibró la toma de la muestra microbiológica por un solo examinador para que fuera constante en todo momento.

2.6.2 Instrumento

Los instrumentos clínicos son susceptibles a error debido a discrepancias en la manufactura entre casas comerciales. Para disminuir este error, se empleó una sonda milimetrada UNC – 15 Hu - Friedy para la realización de todos los exámenes. Los datos fueron consignados en milímetros; aproximando siempre al milímetro siguiente, de la misma forma los hallazgos clínicos como el sangrado fueron consignados en un periodontograma estándar.

El índice gingival fue calibrado de forma visual dependiendo del estado inflamatorio de los tejidos periodontales siguiendo una escala ordinal previamente establecida. Un solo examinador realizo todos los índices gingivales. Los parámetros clínicos se registraron únicamente en los dientes que fueron tomados como índices.

2.6.3 Clasificación y estado del paciente

Con los resultados del examen clínico se determino el estado del paciente como sano o gingivitis. Los pacientes con Periodontitis no fueron incluidos en el estudio. La clasificación del estado del paciente fue determinada por un periodoncista experimentado en todos los pacientes.

2.6.4 Cultivo microbiológico

Como herramienta diagnostica se utilizó el cultivo microbiológico.

Para disminuir errores en los resultados microbiológicos, estos fueron realizados por un solo microbiólogo con más de 10 años de experiencia en microbiología oral, en el mismo laboratorio y bajo las mismas condiciones ambientales en todo momento.

2.6.5 Aparatología ortodontica

La utilización de aparatología ortodontica de diferentes marcas comerciales puede generar errores en la recolección de datos. Se empleó aparatología ortodontica de la misma marca comercial y con las mismas características en todos los pacientes.

2.6.6 Sesgo de selección

Cualquier error de selección de los sujetos de investigación afectan la validez del estudio. Por esto se definieron criterios claros de selección. Un cuestionario fue utilizado para determinar la selección e inclusión de los pacientes en el estudio.

2.6.7 Muestra microbiológica

La muestra microbiológica fue tomada antes de la colocación de la aparatología ortodontica y 3 meses después de haberla colocado. Dicha muestra fue tomada en zona vestibular, en la parte media del surco periodontal inmediatamente apical al bracket de los dientes índices (15,12, 22, 25, 35, 45).

Se aisló el sitio de muestreo con gasas estériles y se elimino la placa bacteriana supragingival. Se insertaron puntas de papel estériles (6 puntas) hasta el fondo del surco y se dejaron en esta posición por 15 segundos. Inmediatamente después se transfirieron las puntas a un frasco de vidrio con tapa de rosca de 2 ml , con VMGA III (Medio de transporte) (5 % Bacto – Agar Gelatina, 0.05 % Thiothone E Peptona, 0.02% Bacto – Agar , 0.05% acido tioglicolico,0.05% L- cisterna –HCL,1.0% Na Gycerophosphate, 0.0005% acetato de fenil – mercurio, 0.0003% azul de metileno, 0.024% Ca Cl2 – 6H20, 0.042% Kcl, 0.1% NaCl, 0.01% MgSO4 – 7H20. de acuerdo a Möller 1966 [34].

Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de microbiología oral de la universidad del valle, con un máximo de 24 horas siguientes a la toma de la muestra.

Los microorganismos fueron mecánicamente dispersados de las puntas de papel con un vortex a una velocidad máxima durante 45 segundos y luego fueron diluidos según el logaritmo en base 10 en VMG I (0.25% triptosa, 0.25% thiothone E peptona, 0.5% NaCl). Con una varilla de vidrio

esterilizada la muestra fue esparcida sobre la superficie del agar de las disoluciones de 10^{-3}, 10^{-4} y 10^{-5} en tres placas con agar-sangre brucellas (BBL Microbiology systems®, Cockeysville, Md, 5% bacto agar de sangre de cordero defibrinada, 0.2% eritrocitos de cordero hemolisados, 0.0005% hemina y 0.00005% menadiona). Después se incubo a 35 C° en una cámara anaeróbica (85% N2-10% H2-5% CO2) por 5 a 7 días y se determinaron los porcentajes bacterianos en cada placa de agar de acuerdo a los métodos de identificación de Slots [35] para identificación bacteriana presuntiva. Para la detección de anaeróbicos facultativos se utilizó un medio selectivo TSBV (tripticasa - soya - agar suplementado con 75 µg/ml de Bacitracina - 5 mg/ml de Vancomicina y 5% de suero estéril de caballo) incubadas por 4 días en un ambiente 10% CO2 (CO_2 Oxoid System®). Los microorganismos examinados de acuerdo a la morfología de las colonias incluyen los periodontopáticos putativos: *Actinobacillus actinomycetemcomitans, Prevotella intermedia, Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus, Campylobacter rectus, Fusobacterium* spp, *Peptostreptococcus micros, Capnocytophaga* spp, β hemolytic *Streptococcus* spp, *Staphylococcus* spp y microorganismos superinfectantes *Enterobacteriaceae* spp, *Pseudomonadaceae* spp, y *Candida* spp.

2.7 RIESGOS Y BENEFICIOS

La toma microbiológica es un procedimiento no invasivo con puntas de papel endodonticos estériles, que no implican riesgos biológicos y no atentan contra la salud periodontal de los pacientes.

El estado de salud general y/o periodontal del paciente no se alterara por ninguno de los procedimientos realizados por los investigadores.

Están de mas los beneficios que se consiguen al desarrollar este proyecto ya que provee información importante sobre los cambios que pueden ocurrir en la microbiota subgingival periodontal con la colocación de aparatología ortodontica.

3. PRESUPUESTO

Presupuesto calculado para el procesamiento de 30 muestras microbiológicas subgingivales. Los valores están expresados en miles de pesos.

Tabla 2. Presupuesto

RUBRO	FUENTES		TOTAL
	GMP*	COC	
Personal	13.640	22.750	**36.390**
Equipos	259.293	25.000	**284.293**
Software	0	0	**0**
Materiales	0	2.145	**2.145**
Salidas de Campo	0	0	**0**
Material bibliográfico	0	0	**0**
Publicaciones	0	500	**500**
Servicios técnicos	0	0	**0**
Viajes	0	0	**0**
Construcciones	No financiable	0	**0**
Mantenimiento	No financiable	0	**0**
Administración	2.300	0	**2.300**
Total	**275.233**	**50.395**	**325.628**

* Grupo de Medicina Periodontal Universidad del Valle

3.1 CRONOGRAMA

Tabla 3. Cronograma

Actividad	Meses													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Coordinación del proyecto														
Estandarización de la toma de muestras microbiológicas														
Recolección de datos														
Análisis de datos														
Informe preliminar														
Informe de resultados finales														
Preparación articulo científico														
Sustentación proyecto														

4. RESULTADOS

Se estudió la microbiota subgingival en 60 individuos con un rango de edad de 13 a 34 años y promedio de 18.7 años; el grupo experimental estaba conformado por 30 individuos que fueron examinados antes y después de la colocación de aparatología ortodóntica y el grupo control lo conformaron los 30 individuos quienes no presentaban ningún tipo de aparatología ortodóntica,
No se observo ninguna diferencia con respecto a la edad o genero.

La descripción demográfica y clínica de los pacientes se muestra en la tabla 1, Al analizar los resultados de las mediciones clínicas periodontales halladas en ambos grupos la variable CAL no presentó diferencias estadísticamente significantes en la comparación entre grupos. Al ser comparadas las mediciones iniciales con las mediciones realizadas a los tres meses en el grupo experimental existen diferencias significantes ($p<0.05$) en la variable PD; además al comparar las mediciones iniciales con el grupo control, las variables BOP e IP presentaron diferencias significantes ($p<0.05$). Al revisar los parámetros periodontales, el grupo experimental durante la primera medición presenta un mayor porcentaje de acumulación de placa bacteriana y mayor sangrado.

En la tabla 2, muestra el porcentaje de microbiota subgingival cultivable antes y después de la colocación de la aparatología ortodontica. Se detectaron microorganismos con tendencia al aumento como *P.gingivalis, T.forsythia, P.intermedia/nigrescens y A.actinomycetemcomitans Campylobacter spp, E.corrodens* se encontraron en bajas proporciones en ambos grupos, *T.forsythia, Campylobacter spp en el inicio del tratamiento no se encontraron y a los tres se encuentran pero en baja cantidad.* Las bacterias de Superinfectantes como el *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens,* fueron detectadas (Tabla 2, Tabla 3). En la tabla 3 reportamos una variedad de bacterias superinfectantes y sus referencias.

La frecuencia de detección microorganismos periodontopaticos y bacterias del superinfectantes se muestran en la figura 2. El descubrimiento de *P.gingivalis, P.intermedia/nigrescens y spp de Fusobacterium* en el grupo experimental fue más alto después de la colocación de la aparatología ortodontica comparando con grupo control ($P\leq0.01$). *T.forsythia* sólo se encontró en el grupo experimental después de la colocación de la aparatologia y esta diferencia fue significativa ($P\leq0.01$).

Tabla 4. Descripción demográfica y clínica en pacientes con y sin aparatología ortodóntica

Parámetro	Grupo Experimental		Grupo Control
	Inicio	3 meses	
Sujetos	30	30	30
Edad promedio±SD	18.7 ± 5.6		19.3 ± 6.2
Genero n(%)	F 18 (60)		F 17 (56.7)
PD (mm) promedio ± SD	1.6 ± 0.3*[a]	1.7 ± 0.4	1.8 ± 0.4
CAL (mm) promedio ± SD	0.5 ± 0.6	0.01 ± 0.1	0.4 ± 1.8
BOP (%) promedio ± SD	11.6 ± 14.6*	19.4 ± 21.9**	4.4 ± 8.6
IP(%) promedio ± SD	7.0 ± 6.0*	9.2 ± 5.0**	5.1 ± 2.6
GI promedio ± SD	0.2 ± 03	0.4 ± 0.5*	0.1 ± 0.2
Estado periodontal n(%)			
Sano	19 (63.3)	19 (63.3)	27 (90)
Gingivitis	11 (36.7)	11 (36.7)	3 (10)

SD: desviación estándar, PD: profundidad al sondaje, CAL: nivel inserción clínica

BOP: sangrado al sondaje, IP: índice de placa, GI: índice gingival

*P<0.05 comparado con el grupo control (Two tailed t test)

**P≤0.01 comparado con el grupo control (Two tailed t test)

[a] P<0.05 comparado con el grupo experimental a los 3 meses (Two tailed paired t test)

Tabla 5. Porcentaje (%) de la microbiota subgingival cultivable en pacientes con y sin aparatología ortodontica

Microorganismos	Grupo Experimental		Grupo Control
	Inicio	3 meses	
Complejo Rojo			
P.gingivalis	0.033 ± 0.18	0.70 ± 1.48	0.23 ± 0.72
T.forsythia	0	0.57 ± 2.51	0.10 ± 0.40
Complejo Naranjas			
P.intermedia / nigrescens	0.15 ± 0.40	0.93 ± 2.36	0.26 ± 1.41
Fusobacterium spp	2.03 ± 3.95	5.70 ± 10.46	1.75 ± 3.42
M.micros	0.033 ± 0.18	0	0.11 ± 0.55
Campylobacter spp	0	0.03 ± 0.18	0.017 ± 0.09
Eubacterium spp	0.06 ± 0.25	0.08 ± 0.26	0.10 ± 0.54
Complejo Verde			
A.actinomycetemcomitans	0.004 ± 0.12	0.007 ± 0.31	0.003 ± 0.009
E.corrodens	0.89 ± 2.18	0.52 ± 1.18	0.52 ± 1.19
Otros			
D.pneumosintes	0	0	0
Bacilos entericos gram negativos	4.16 ± 15.0	3.92 ± 14.94	1.07 ± 4.01

Tabla 6. Bacilos entéricos gram negativos aislados de pacientes con y sin aparatología ortodontica

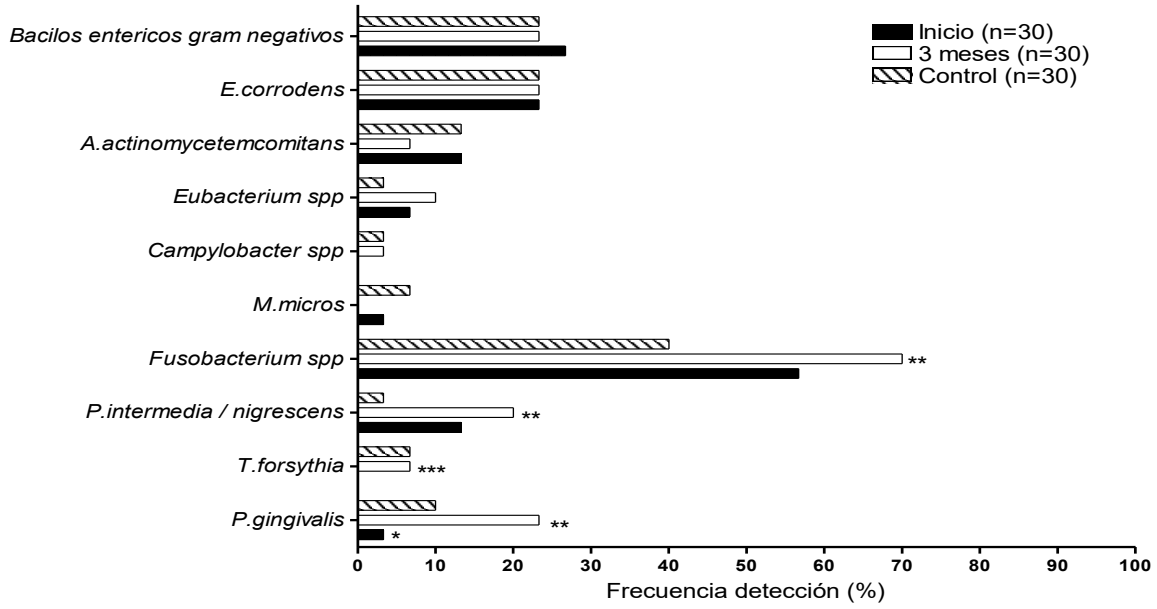
Microorganismos	Factores de Virulencia	Referencia
Enterobacter cloacae	Resistencia antimicrobianos, plasmidos, capsula	Halda-Alija 2004[36]
Klebsiella oxytoca	Capsula, expolisacaridos, invasividad	Fang et al. 2004, Struve & Krogfelt 2003[37]
Pseudomonas spp	Exotoxina A, proteasas extracelulares (AprA, LasB, y PrpL)	Gaines et al. 2005, Sarkisova et al. 2005[38]
Enterobacter aerogenes	Resistencia antimicrobianos, plasmidos, capsula	Halda-Alija 2004[39]
Enterobacter gergoviae	Resistencia antimicrobianos, plasmidos, capsula	Halda-Alija 2004[40]
Klebsiella pneumoniae	Capsula, expolisacaridos, invasividad	Fang et al. 2004, Struve & Krogfelt 2003[41]
Pseudomonas putida	Exotoxina A, dipeptidos ciclicos DKPs (señalizacion interbacteriana),	Nelson et al. 2002, Degrassi et al. 2002[42]
Serratia marcescens	Endotoxinas, hemaglutininas, resistencia sistema inmune	Podschun et al. 2001 [43]

Figura 1. Fotografía clínica toma de la muestra microbiológica

Puntas de papel estériles fueron insertadas en el surco previa eliminación de placa y saliva, la punta se inserta durante 15 segundos. La muestra es transferida a un vial que contiene VMGA III como medio de transporte y fueron procesadas en el laboratorio en las siguientes 24 horas



Figura 2. Frecuencia de detección (%) de microorganismos periodontopaticos en pacientes con y sin aparatología ortodontica



*$P \leq 0.01$comparado con el grupo experimental a los 3 meses (X^2 test)

**$P \leq 0.01$ comparado con el grupo control (X^2 test)

***$P \leq 0.01$comparado con el grupo experimental inicio (X^2 test)

5. DISCUSIÓN

Este estudio comparó la composición de la microbiota subgingival antes y después de la colocación de brackets en pacientes sometidos a tratamiento de ortodoncia. Este trabajo tomó solo los cambios en dientes con brackets en lugar de bandas ortodonticas ya que estas son frecuentemente colocadas subgingivalmente y se pueden encontrar cambios similares ha los hallados en restauraciones protésicas. Se encontró que la colocación de los brackets influencia la composición de la microbiota subgingival en forma directa. Los parámetros clínicos:

Índice de placa, índice gingival y sangrado al sondaje se incrementaron después de la colocación de los aparatos ortodónticos, indicando que la acumulación de placa bacteriana es la razón principal de la inflamación gingival observada en estos pacientes.

La acumulación de placa supragingival muestra una influencia importante en la composición de la microbiota subgingival.

Estos mismos hallazgos están reportados en varias investigaciones como la de Paolantonio en 1999[44] donde realizaron muestras microbiológicas en dientes con bandas y brackets y encontraron aumento en el índice gingival, mayor acumulación de placa y detección subgingival de *A.actinomycetemcomitans*

En este estudio se encontraron particularmente microorganismos que están relacionados con el inicio de la inflamación y la enfermedad periodontal[45]. Esta manifestación esta soportada porque después de un periodo corto de tiempo (3 meses) de la colocación de la aparatología la frecuencia de detección de *P.gingivalis, T.forsythia, Intermedia y Fusobacterium spp* se incremento significativamente ($P<0.05$). estos hallazgos resultan semejantes a los reportados por Lee y Col en el 2005 quienes a diferencia de nosotros tomaron una única muestra microbiológica en pacientes tres meses después de instalada la aparatología, ellos utilizaron PCR como medio de cultivo para la detección de patógenos periodontales y encontraron que *T.forsythia, T. denticola y P. Nigrescens* tuvieron mayor prevalencía en pacientes con ortodoncia comparados con pacientes no sometidos a tratamiento de ortodoncia[46]. Esto sugiere que el tratamiento ortodóntico puede afectar la presencia de microorganismos periodontales. Convirtiéndose en un factor contribuyente a la acumulación de placa.

Los factores de virulencia de los patógenos periodontales han sido estudiados y en gran parte explican porque están elevados en pacientes con enfermedad periodontal al ser comparados con sujetos sanos.[47]

Esto quiere decir que la sola presencia de microorganismos específicos no hace que el paciente presente enfermedad periodontal, puesto que esto depende de la interacción del complejo bacteria – huésped.[48] [49] [50] [51]

En menor frecuencia se encontró la presencia de bacterias superinfectantes, a saber, bacilos entericos gram negativos, y Aunque estos no son habitantes comunes en la cavidad oral, su contribución a la iniciación y /o complicación de la enfermedad periodontal no ha sido dilucidada. Algunos estudios muestran que existe alta prevalencía en pacientes con bolsas periodontales profundas en contraste con sitios superficiales en pacientes sanos.[52],[53],[54]la higiene oral y el poco cuidado en el almacenamiento de los cepillos dentales dentro del baño[55] son variables que pueden explicar la presencia de estos microorganismos. En este estudio fue posible identificar *Enterobacter cloacae, Klebsiella oxytoca, Pseudomonads* spp. Y otros microorganismos en las muestras de placa subgingival (tabla 3). Dado que estos organismos tienen un potente factor de virulencia que daña el sistema inmune y degrada los componentes de la matriz de tejido conectivo,[56],[57],[58],[59],[60],[61],[62],[63] a largo plazo puede ser capaz de inducir un proceso inflamatorio que resulta en enfermedad periodontal.

De esta forma, los pacientes ortodónticos necesitan una especial atención en su condición periodontal. La colocación de aparatología ortodontica fija o removible impide una correcta higiene oral resultando en mayor acumulación de placa, inflamación y sangrado.[64] Por consiguiente el uso de métodos e instrumentos de higiene oral apropiados facilitan el control de placa.[65] El uso de aditamentos especiales para pacientes ortodónticos como los cepillos interdentales y tipos especiales de seda dental pueden mejorar el control de placa en los pacientes ortodónticos.[66] [67]

6. CONCLUSIONES

La colocación de aparatología ortodontica crea sitios de retención de placa bacteriana propicios para la colonización de bacterias Gram negativas (periodontopaticas y superinfectantes) que favorecen el desarrollo de la enfermedad periodontal.

Se encontró una alta detección de bacilos entericos Gram negativos tanto en pacientes con aparatología ortodontica como sin ella, la importancia de estos microorganismos en el desarrollo y progreso de la enfermedad periodontal aun es incierto.

Se puede concluir que la colocación de aparatología ortodontica influencia la acumulación y composición de la microbiota subgingival resultando en inflamación y sangrado. Un especial cuidado en la higiene puede ayudar a los pacientes ortodónticos a prevenir la enfermedad periodontal durante el tratamiento activo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Darveau R, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. Periodontology 2000 1997 ;14 :12-32.

2. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontol 2000 1994; 5: 78–111.

3. Listgarten MA. The structure of dental plaque. Periodontology 2000 1994;5:52-65.

4. Moore WEC, Moore LVH. The bacteria of periodontal diseases. Periodontology 2000 1994;5:66:77.

5. Socransky SS Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol 2000 2002;28:12-55.

6. Lindhe J. Periodontología clínica e implantología odontológica. España. Panamericana 2000: 191-225.

7. Moore WEC, Moore LVH. The bacteria of periodontal diseases. Periodontol 2000 1994;5:66-77

8. Slots J & Listgarten M. *Bacteroides gingivalis, Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1988;15:85-93.

9. Lally ET & cols. Structure / function aspects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. *J Periodontol* 1996;67:298-308.

10. Fives-Taylor P, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans. Periodontol 2000* 1999;20:136-167.

11. Holt SC, Kesavalu L, Walter S, Genco CA.. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis* . *Periodontol 2000* 1999;20:168-238.

12. Holt SC, Ebersole J, Felton J, Brunsvold M, Kornman KS. Implantation of *Bacteroides gingivalis* in nonhuman primates initiates progression of periodontitis. *Science* 1988;239:55-57.

13. Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. J Clin Periodontol 1988;15:316-323

14. Tanner ACR Haffer C, Bratthal GT, Visconti RA, Socransky SS. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. J Clin Periodontol 1979;6:278-307.

15. Dzink JL, Tanner ACR, Haffajee AD, Socransky SS. Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. J Clin Periodontol 1985;12:648-659

16. Abbott S. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter* and *Serratia* en Murray PR (editor). Manual of clinical microbiology. 7th edition, Washinton D.C. ASM Press, 2001 : paginas 475-482

17. Kiska DL, Glilligan PH. *Pseudomonas* en Murray PR (editor). Manual of clinical microbiology. 7th edition, Washinton D.C. ASM Press, 2001 : paginas 517-525

18. Aleksic S, Bockemühl J. *Yersinia* and other *Enterobacteriaceae* en Murray PR (editor). Manual of clinical microbiology. 7th edition, Washinton D.C. ASM Press, 2001 : paginas 483-496

19. Slots J. Rams T, Feik D et al. Subgingival microflora of advanced periodontitis in the Dominican Republic. J Periodontol 1991;62:543-547

20. Wahab RA ,Vidar Bakken,V, Nilsen R and Nils Skaug. Comparative Detection Frequency of 6 Putative Periodontal Pathogens in Sudanese and Norwegian Adult Periodontitis Patients. J Periodontol 1994;65:1046-1052

21. Perel M. Axial crown contours. J Prosth Dent 1971:25:642

22. Brunsvold MA, Lane JJ. The prevalence of overhanging dental restorations and their relationship to periodontal disease. J Clin Periodontol 1990;17:67-72

23. Tal H, Soldinger M, Drelangel A, Pitaru S. Periodontal response to long term abuse of the gingival attachment by supracrestal amalgam restorations. J Clin Periodontol 1989:654-659.

24. Paolantonio M, Festa F, di Placido G, D'Attilio M, Catamo G, Piccolomini R. Site-specific subgingival colonization by Actinobacillus actinomycetemcomitans in orthodontic patients. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 1999 Apr;115(4):423-8.

25. Piccolomini R, Di Bonaventura G, Catamo G, Picciani C, Paolantonio M. Frequency of detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans in young patients during fixed orthodontic therapy. New Microbiol. 1996 Oct;19(4):345-9.

26. Paolantonio M, di Girolamo G, Pedrazzoli V, di Murro C, Picciani C, Catamo G, Cattabriga M, Piccolomini. Occurrence of Actinobacillus actinomycetemcomitans in patients wearing orthodontic appliances. A cross-sectional study. J Clin Periodontol. 1996 Feb;23(2):112-118.

27. Lang NP, Kiel RA, Anderhalden K. Clinical and microbiological effects of subgingival restorations with overhangin or clinically perfect margins. J Clin Periodontol 1983:10:563-578

28. Diamanti-Kipioti A, Gusberti FA, Lang NP. Clinical and microbiological effects of fixed orthodontic appliances. J Clin Periodontol. 1987 Jul;14(6):326-33.

29. Petti S, Barbato E, Simonetti D'Arca A. Effect of orthodontic therapy with fixed and removable appliances on oral microbiota: a six-month longitudinal study. New Microbiol. 1997 Jan;20(1):55-62.

30. Wise MD, Dykema RW. The plaque retaining capacity of four dental materials. J Prosthet Dent 1975:33:178-190

31. Keenan MP, Shillinburg HT, Duncanson MG, Wade CK. Effects of cast gold surface finishing on plaque retention. J Prosthet Dent 1980;43:168-173

32. Knoernschild KL, Rogers H, Lefebvre C, Forston W, Schuster GS. Endotoxin affinity for orthodontic brackets. Am J Orthod Dentofacial Orthop 1999;115:634-639.

33. 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.
34. Möller AJR. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Odontol Tidskr 1996;74:1-38.

35. Slots J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. Oral Microbiol Inmunol 1986;1:48-55.

36. Halda-Alija L. Incidence of antibiotic-resistant Klebsiella pneumoniae and Enterobacter species in freshwater wetlands. Lett Appl Microbiol. 2004;39(5):445-50.

37. Fang CT, Chuang YP, Shun CT, Chang SC, Wang JT. A novel virulence gene in Klebsiella pneumoniae strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. J Exp Med. 2004 Mar 1;199(5):697-705.

38. Struve C, Krogfelt KA. Role of capsule in Klebsiella pneumoniae virulence: lack of correlation between in vitro and in vivo studies. FEMS Microbiol Lett. 2003 Jan 21;218(1):149-54.

39. Nelson KE, Weinel C, Paulsen IT, Dodson RJ, Hilbert H, Martins dos Santos VA, Fouts DE, Gill SR, Pop M, Holmes M, Brinkac L, Beanan M, DeBoy RT, Daugherty S, Kolonay J, Madupu R, Nelson W, White O, Peterson J, Khouri H, Hance I, Chris Lee P, Holtzapple E, Scanlan D, Tran K, Moazzez A, Utterback T, Rizzo M, Lee K, Kosack D, Moestl D, Wedler H, Lauber J, Stjepandic D, Hoheisel J, Straetz M, Heim S, Kiewitz C, Eisen JA, Timmis KN, Dusterhoft A, Tummler B, Fraser CM. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile Pseudomonas putida KT2440. Environ Microbiol. 2002 Dec;4(12):799-808.

40. Degrassi G, Aguilar C, Bosco M, Zahariev S, Pongor S, Venturi V. Plant growth-promoting Pseudomonas putida WCS358 produces and secretes four cyclic dipeptides: cross-talk with quorum sensing bacterial sensors. Curr Microbiol. 2002 Oct;45(4):250-4.

41. Gaines JM, Carty NL, Colmer-Hamood JA, Hamood AN. Effect of static growth and different levels of environmental oxygen on toxA and ptxR expression in the Pseudomonas aeruginosa strain PAO1. Microbiology. 2005 Jul;151(Pt 7):2263-75.

42. Sarkisova S, Patrauchan MA, Berglund D, Nivens DE, Franklin MJ. Calcium-induced virulence factors associated with the extracellular matrix of mucoid Pseudomonas aeruginosa biofilms. J Bacteriol. 2005 Jul;187(13):4327-37.

43. Podschun R, Fischer A, Ullmann U. Characterisation of Hafnia alvei isolates from human clinical extra-intestinal specimens: haemagglutinins, serum resistance and siderophore synthesis. J Med Microbiol. 2001 Mar;50(3):208-14.

44. Paolantonio M, di Girolamo G, Pedrazzoli V, di Murro C, Picciani C, Catamo G,

45. Cattabriga M, Piccolomini R. Occurrence of Actinobacillus actinomycetemcomitans in patients wearing orthodontic appliances. A cross-sectional study. J Clin Periodontol. 1996;23:112-8.

46. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1998;25:134-44.

47. Lee SM, Yoo SY, Kim HS, Kim KW, Yoon YJ, Lim SH, Shin HY, Kook JK. Prevalence of putative periodontopathogens in subgingival dental plaques from gingivitis lesions in Korean orthodontic patients. J Microbiol. 2005;43:260-5.

48. Nishihara T, Koseki T. Microbial etiology of Periodontitis. Periodontology 2000 2004; 36: 14–26.

49. Socransky SS, Haffajee AD, Smith GL, Dzink JL. Difficulties encountered in the search for the etiologic agents of destructive periodontal diseases. J Clin Periodontol 1987: 14: 588–593.

50. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol 2000. 2002;28:12-55

51. Ramberg P, Sekino S, Uzel NG, Socransky S, Lindhe J. Bacterial colonization during de novo plaque formation. J Clin Periodontol. 2003;30:990-5.

52. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. Periodontol 2000 1997: 14: 9–11.

53. Slots J, Rams TE, Listgarten MA. Yeasts, enteric rods and pseudomonads in the ubgingival flora of severe adult periodontitis. Oral Microbiol Immunol. 1988;3:47-52.

54. Slots J, Feik D, Rams TE. Prevalence and antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae and Acinetobacter in human periodontitis. Oral Microbiol Immunol. 1990;5:149-54.

55. Rams TE, Babalola OO, Slots J. Subgingival occurrence of enteric rods, yeasts and staphylococci after systemic doxycycline therapy. Oral Microbiol Immunol. 1990;5:166-8.

56. Contreras A, Arce R, Botero JE, contaminación bacteriana de cepillos dentales en niños y sus padres: una cuestion de educación ,Revista de estomatología , septiembre de 2002

57. Halda-Alija L. Incidence of antibiotic-resistant Klebsiella pneumoniae and Enterobacter species in freshwater wetlands. Lett Appl Microbiol. 2004; 39:445-50.

58. Fang CT, Chuang YP, Shun CT, Chang SC, Wang JT. A novel virulence gene in Klebsiella pneumoniae strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. J Exp Med. 2004; 1;199:697-705

59. Struve C, Krogfelt KA. Role of capsule in Klebsiella pneumoniae virulence: lack of correlation between in vitro and in vivo studies. FEMS Microbiol Lett. 2003; 21;218:149-54.

60. Nelson KE, Weinel C, Paulsen IT et al. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile Pseudomonas putida KT2440. Environ Microbiol. 2002; 4:799-808

61. Degrassi G, Aguilar C, Bosco M, Zahariev S, Pongor S, Venturi V. Plant growth-promoting Pseudomonas putida WCS358 produces and secretes four cyclic dipeptides: cross-talk with quorum sensing bacterial sensors. Curr Microbiol. 2002; 45:250-4.

62. Gaines JM, Carty NL, Colmer-Hamood JA, Hamood AN. Effect of static growth and different levels of environmental oxygen on toxA and ptxR expression in the Pseudomonas aeruginosa strain PAO1. Microbiology. 2005;151:2263-75

63. Sarkisova S, Patrauchan MA, Berglund D, Nivens DE, Franklin MJ. Calcium-induced virulence factors associated with the extracellular matrix of mucoid Pseudomonas aeruginosa biofilms. J Bacteriol. 2005;187:4327-37.

64. Podschun R, Fischer A, Ullmann U. Characterisation of Hafnia alvei isolates from human clinical extra-intestinal specimens: haemagglutinins, serum resistance and siderophore synthesis. J Med Microbiol. 2001; 50:208-14.

65. Turkkahraman H, Sayin MO, Bozkurt FY, Yetkin Z, Kaya S, Onal S. Archwire ligation techniques, microbial colonization, and periodontal status in orthodontically treated patients. Angle Orthod. 2005;75:231-6.

66. Goodson JM, Palys MD, Carpino E, Regan EO, Sweeney M, Socransky SS. Microbiological changes associated with dental prophylaxis. J Am Dent Assoc. 2004; 135:1559-64.

67. Borutta A, Pala E, Fischer T. Effectiveness of a powered toothbrush compared with a manual toothbrush for orthodontic patients with fixed appliances. J Clin Dent. 2002;13:131-7.

68. Kossack C, Jost-Brinkmann PG. Plaque and Gingivitis Reduction in Patients Undergoing Orthodontic Treatment with Fixed Appliances-Comparison of Toothbrushes and Interdental Cleaning Aids A 6-Month Clinical Single-Blind Trial. J Orofac Orthop. 2005 ;66:20-38.

ANEXOS

Anexo A. Cuestionario de criterios de inclusión

Nombre:_____ Fecha:_____

Edad:_____

Genero:_____

1. Ha consumido antibióticos en los últimos tres meses? SI___ NO___
2. Cuales ¿_____
3. Es usted fumador? SI____ NO___
4. Cuantos cigarrillos fuma diariamente?_____
5. Sufre de alguna de las siguientes enfermedades: diabetes, infección HIV, enfermedades cardiovasculares, enfermedades pulmonares, enfermedades del sistema nervioso central, enfermedades de la sangre, otra._____
6. Toma algún medicamento? SI____ NO____
7. Ha tomado corticoides o AINES en la ultima semana? SI____ NO_____
8. Cuales?_____
   _
9. Esta usted embarazada? SI____NO____
10. Ha recibido terapia periodontal en los últimos 3 meses? SI___ NO___
11. Ha recibido tratamiento odontológico en el ultimo año? SI___ NO____
12. Especifique que tratamiento odontológico:_____
13. Desea participar voluntariamente en el estudio en cuestión? SI___NO___

Aceptado: SI___ NO:____

Firma paciente:_____

Firma Investigador:_____

Fecha_____

Anexo B. Consentimiento escrito informado

FORMATO DE CONSENTIMIENTO ESCRITO INFORMADO
"CAMBIOS EN LA MICROBIOTA SUBGINGIVAL EN PACIENTES ANTES Y DESPUES DE LA COLOCACION DE APARTOLOGIA ORTODONTICA¨

Para los efectos legales que corresponden, declaro que he recibido información amplia y suficiente sobre el estudio, titulado CAMBIOS EN LA MICROBIOTA SUBGINGIVAL EN PACIENTES ANTES Y DESPUES DE LA COLOCACION DE APARTOLOGIA ORTODONTICA¨. Se me ha explicado que se me tomarán muestras de placa bacteriana (placa bacteriana es el acumulo de restos alimenticios sobre los diente y la muestra es para un cultivo microbiológico) antes y 3 meses después de la colocación de los aparatos ortodónticos por expertos en el área, que no representan ningún riesgo para mi vida. Serán dos grupos, uno de 30 pacientes que van a tener aparatología ortodontica y otro sin aparatología. Las muestras son obtenidas con el fin de estudiar que bacterias existen entre los dientes y la encía, antes y después de la colocación de aparatos ortodónticos, las muestras se tomaran con puntas de papel especiales para odontología que se introducirán entre el diente y la encía, por unos segundos y luego este papel será colocado en un recipiente especial, para ser llevado al laboratorio. Soy consciente que los resultados obtenidos favorecerán a otros seres humanos, ya que se me ha explicado que estos ayudarán a entender como los microorganismos que se acumulan en los brackets afectan las encías.

Igualmente conozco que los costos adicionales que demanda la investigación corren a cargo de las investigadoras Martha L. Triviño y Andrea Amezquita, y no recibiré beneficio monetario alguno por mi participación; de igual manera me queda claro que mi participación es totalmente voluntaria y estaré en libertad de retirarme cuando así lo crea conveniente, se me ha explicado también que mi nombre no aparecerá en ninguno de los resultados obtenidos durante la investigación y estos serán manejados con total discreción y responsabilidad. Los resultados serán publicados en alguna revista odontologica y si necesito un tratamiento se me informará oportunamente. (Teléfono de contacto: 6674187-3323198, Martha L. Triviño y Andrea Amezquita)

He comprendido todo lo anterior perfectamente y por lo tanto, YO: _____ con documento de identidad: _____ expedido en _____ doy mi consentimiento para que las doctoras Martha Triviño o Andrea Amezquita y el personal auxiliar que se requiera me realicen este, y los procedimientos complementarios que sean necesarios que a juicio de los profesionales que lo lleven a cabo.

Igualmente autorizo la toma de fotografías y videos, en las cuales el manejo de la confidencialidad, privacidad e identidad serán acordes y permitidas por Ley y no estarán a disposición pública.

Recibiré copia del presente documento el cual consta de 1 página

Lugar y fecha: _____

Firma: _____

Nombre del paciente: _____

C.C: _____ de _____

Dirección: _____

Huella digital del paciente

Firma del asesor científico: _____

Nombre: _____

Registro: _____ C.C:_____de _____

Firma del testigo N° 1: _____

Nombre del testigo N° 1:_____ C.C: _____ de _____

Dirección:_____Teléfono: _____

Firma del testigo N° 2: _____

Nombre del testigo N° 2_____C.C: _____de _____

Dirección: _____ Teléfono: _____

Anexo C. Recolección de la información

Nombre del paciente:_____

Numero Historia clínica:_____

Fecha:_____

1.0. Examen periodontal:

1.1. Antes de la colocación aparatología ortodontica

Fecha:_____

Diente índice	Parámetros					
	PD	BOP	AL	IP	IG	Estado periodontal
15						
12						
22						
25						
35						
45						
Paciente						
Promedio						
SD						

Firma investigador:_____

1.2. Después de la colocación de aparatología ortodontica

Fecha:_____

Diente índice	Parametros					
	PD	BOP	AL	IP	IG	Estado periodontal
15						
12						
22						
25						
35						
45						
Paciente						
Promedio						
SD						

Firma investigador:_____

Parametros:

PD: profundidad al sondaje (mm)
AL: nivel de inserción (mm)
IG: índice gingival (0-1-2-3)
BOP: sangrado al sondaje (+/-)
IP: índice placa (5)
Estado periodontal: sano / gingivitis

Referencias

[1] Darveau R, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. Periodontology 2000 1997 ;14 :12-32.

[2] Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontol 2000 1994; 5: 78–111.

[3] Listgarten MA. The structure of dental plaque. Periodontology 2000 1994;5:52-65.

[4] Moore WEC, Moore LVH. The bacteria of periodontal diseases. Periodontology 2000 1994;5:66:77.

[5] Socransky SS Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol 2000 2002;28:12-55.

[6] Lindhe J. Periodontología clínica e implantología odontológica. España. Panamericana 2000: 191-225.

[7] Moore WEC, Moore LVH. The bacteria of periodontal diseases. Periodontol 2000 1994;5:66-77

[8] Slots J & Listgarten M. *Bacteroides gingivalis, Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1988;15:85-93.

[9] Lally ET & cols. Structure / function aspects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. *J Periodontol* 1996;67:298-308.

[10] Fives-Taylor P, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans. Periodontol 2000* 1999;20:136-167.

[11] Holt SC, Kesavalu L, Walter S, Genco CA.. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis* . *Periodontol 2000* 1999;20:168-238.

[12] Holt SC, Ebersole J, Felton J, Brunsvold M, Kornman KS. Implantation of *Bacteroides gingivalis* in nonhuman primates initiates progression of periodontitis. *Science* 1988;239:55-57.

[13] Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. J Clin Periodontol 1988;15:316-323

[14] Tanner ACR Haffer C, Bratthal GT, Visconti RA, Socransky SS. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. J Clin Periodontol 1979;6:278-307.

[15] Dzink JL, Tanner ACR, Haffajee AD, Socransky SS. Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. J Clin Periodontol 1985;12:648-659

[16] Abbott S. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter* and *Serratia* en Murray PR (editor). Manual of clinical microbiology. 7th edition, Washinton D.C. ASM Press, 2001 : paginas 475-482

[17] Kiska DL, Glilligan PH. *Pseudomonas* en Murray PR (editor). Manual of clinical microbiology. 7th edition, Washinton D.C. ASM Press, 2001 : paginas 517-525

[18] Aleksic S, Bockemühl J. *Yersinia* and other *Enterobacteriaceae* en Murray PR (editor). Manual of clinical microbiology. 7th edition, Washinton D.C. ASM Press, 2001 : paginas 483-496

[19] Slots J. Rams T, Feik D et al. Subgingival microflora of advanced periodontitis in the Dominican Republic. J Periodontol 1991;62:543-547

[20] Wahab RA ,Vidar Bakken,V, Nilsen R and Nils Skaug. Comparative Detection Frequency of 6 Putative Periodontal Pathogens in Sudanese and Norwegian Adult Periodontitis Patients. J Periodontol 1994;65:1046-1052

[21] Perel M. Axial crown contours. J Prosth Dent 1971:25:642

[22] Brunsvold MA, Lane JJ. The prevalence of overhanging dental restorations and their relationship to periodontal disease. J Clin Periodontol 1990;17:67-72

[23] Tal H, Soldinger M, Drelangel A, Pitaru S. Periodontal response to long term abuse of the gingival attachment by supracrestal amalgam restorations. J Clin Periodontol 1989:654-659.

[24] Paolantonio M, Festa F, di Placido G, D'Attilio M, Catamo G, Piccolomini R. Site-specific subgingival colonization by Actinobacillus actinomycetemcomitans in orthodontic patients. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 1999 Apr;115(4):423-8.

[25] Piccolomini R, Di Bonaventura G, Catamo G, Picciani C, Paolantonio M. Frequency of detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans in young patients during fixed orthodontic therapy. New Microbiol. 1996 Oct;19(4):345-9.

[26] Paolantonio M, di Girolamo G, Pedrazzoli V, di Murro C, Picciani C, Catamo G, Cattabriga M, Piccolomini. Occurrence of Actinobacillus actinomycetemcomitans in patients wearing orthodontic appliances. A cross-sectional study. J Clin Periodontol. 1996 Feb;23(2):112-118.

[27] Lang NP, Kiel RA, Anderhalden K. Clinical and microbiological effects of subgingival restorations with overhangin or clinically perfect margins. J Clin Periodontol 1983:10:563-578

[28] Diamanti-Kipioti A, Gusberti FA, Lang NP. Clinical and microbiological effects of fixed orthodontic appliances. J Clin Periodontol. 1987 Jul;14(6):326-33.
[29] Petti S, Barbato E, Simonetti D'Arca A. Effect of orthodontic therapy with fixed and removable appliances on oral microbiota: a six-month longitudinal study. New Microbiol. 1997 Jan;20(1):55-62.
[30] Wise MD, Dykema RW. The plaque retaining capacity of four dental materials. J Prosthet Dent 1975:33:178-190
[31] Keenan MP, Shillinburg HT, Duncanson MG, Wade CK. Effects of cast gold surface finishing on plaque retention. J Prosthet Dent 1980;43:168-173
[32] Knoernschild KL, Rogers H, Lefebvre C, Forston W, Schuster GS. Endotoxin affinity for orthodontic brackets. Am J Orthod Dentofacial Orthop 1999;115:634-639.
[33] 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.
[34] Möller AJR. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Odontol Tidskr 1996;74:1-38.
35 Slots J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. Oral Microbiol Inmunol 1986;1:48-55.
[36] Halda-Alija L. Incidence of antibiotic-resistant Klebsiella pneumoniae and Enterobacter species in freshwater wetlands. Lett Appl Microbiol. 2004;39(5):445-50.
[37] Fang CT, Chuang YP, Shun CT, Chang SC, Wang JT. A novel virulence gene in Klebsiella pneumoniae strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. J Exp Med. 2004 Mar 1;199(5):697-705.
[38] Struve C, Krogfelt KA. Role of capsule in Klebsiella pneumoniae virulence: lack of correlation between in vitro and in vivo studies. FEMS Microbiol Lett. 2003 Jan 21;218(1):149-54.

[39] Nelson KE, Weinel C, Paulsen IT, Dodson RJ, Hilbert H, Martins dos Santos VA, Fouts DE, Gill SR, Pop M, Holmes M, Brinkac L, Beanan M, DeBoy RT, Daugherty S, Kolonay J, Madupu R, Nelson W, White O, Peterson J, Khouri H, Hance I, Chris Lee P, Holtzapple E, Scanlan D, Tran K, Moazzez A, Utterback T, Rizzo M, Lee K, Kosack D, Moestl D, Wedler H, Lauber J, Stjepandic D, Hoheisel J, Straetz M, Heim S, Kiewitz C, Eisen JA, Timmis KN, Dusterhoft A, Tummler B, Fraser CM. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile Pseudomonas putida KT2440. Environ Microbiol. 2002 Dec;4(12):799-808.

[40] 40 Degrassi G, Aguilar C, Bosco M, Zahariev S, Pongor S, Venturi V. Plant growth-promoting Pseudomonas putida WCS358 produces and secretes four cyclic dipeptides: cross-talk with quorum sensing bacterial sensors. Curr Microbiol. 2002 Oct;45(4):250-4.

[41] Gaines JM, Carty NL, Colmer-Hamood JA, Hamood AN. Effect of static growth and different levels of environmental oxygen on toxA and ptxR expression in the Pseudomonas aeruginosa strain PAO1. Microbiology. 2005 Jul;151(Pt 7):2263-75.

[42] Sarkisova S, Patrauchan MA, Berglund D, Nivens DE, Franklin MJ. Calcium-induced virulence factors associated with the extracellular matrix of mucoid Pseudomonas aeruginosa biofilms. J Bacteriol. 2005 Jul;187(13):4327-37.

[43] Podschun R, Fischer A, Ullmann U. Characterisation of Hafnia alvei isolates from human clinical extra-intestinal specimens: haemagglutinins, serum resistance and siderophore synthesis. J Med Microbiol. 2001 Mar;50(3):208-14.

[44] Paolantonio M, di Girolamo G, Pedrazzoli V, di Murro C, Picciani C, Catamo G,

Cattabriga M, Piccolomini R. Occurrence of Actinobacillus actinomycetemcomitans in patients wearing orthodontic appliances. A cross-sectional study. J Clin Periodontol. 1996;23:112-8.

[45] Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1998;25:134-44.

[46] Lee SM, Yoo SY, Kim HS, Kim KW, Yoon YJ, Lim SH, Shin HY, Kook JK. Prevalence of putative periodontopathogens in subgingival dental plaques from gingivitis lesions in Korean orthodontic patients. J Microbiol. 2005;43:260-5.

[47] Nishihara T, Koseki T. Microbial etiology of Periodontitis. Periodontology 2000 2004; 36: 14–26.

[48] Socransky SS, Haffajee AD, Smith GL, Dzink JL. Difficulties encountered in the search for the etiologic agents of destructive periodontal diseases. J Clin Periodontol 1987: 14: 588–593.

[49] Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol 2000. 2002;28:12-55

[50] 50 Ramberg P, Sekino S, Uzel NG, Socransky S, Lindhe J. Bacterial colonization during de novo plaque formation. J Clin Periodontol. 2003;30:990-5.

[51] 51 Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. Periodontol 2000 1997: 14: 9–11.

[52] Slots J, Rams TE, Listgarten MA. Yeasts, enteric rods and pseudomonads in the ubgingival flora of severe adult periodontitis. Oral Microbiol Immunol. 1988;3:47-52.

[53] 53 Slots J, Feik D, Rams TE. Prevalence and antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae and Acinetobacter in human periodontitis. Oral Microbiol Immunol. 1990;5:149-54.

[54] 54 Rams TE, Babalola OO, Slots J. Subgingival occurrence of enteric rods, yeasts and staphylococci after systemic doxycycline therapy. Oral Microbiol Immunol. 1990;5:166-8.

[55] Contreras A, Arce R, Botero JE, contaminación bacteriana de cepillos dentales en niños y sus padres: una cuestion de educación ,Revista de estomatología , septiembre de 2002
[56] Halda-Alija L. Incidence of antibiotic-resistant Klebsiella pneumoniae and Enterobacter species in freshwater wetlands. Lett Appl Microbiol. 2004; 39:445-50.

[57] Fang CT, Chuang YP, Shun CT, Chang SC, Wang JT. A novel virulence gene in Klebsiella pneumoniae strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. J Exp Med. 2004; 1;199:697-705

[58] 58 Struve C, Krogfelt KA. Role of capsule in Klebsiella pneumoniae virulence: lack of correlation between in vitro and in vivo studies. FEMS Microbiol Lett. 2003; 21;218:149-54.

[59] 59 Nelson KE, Weinel C, Paulsen IT et al. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile Pseudomonas putida KT2440. Environ Microbiol. 2002; 4:799-808

[60] Degrassi G, Aguilar C, Bosco M, Zahariev S, Pongor S, Venturi V. Plant growth-promoting Pseudomonas putida WCS358 produces and secretes four cyclic dipeptides: cross-talk with quorum sensing bacterial sensors. Curr Microbiol. 2002; 45:250-4.

[61] Gaines JM, Carty NL, Colmer-Hamood JA, Hamood AN. Effect of static growth and different levels of environmental oxygen on toxA and ptxR expression in the Pseudomonas aeruginosa strain PAO1. Microbiology. 2005;151:2263-75

[62] 62 Sarkisova S, Patrauchan MA, Berglund D, Nivens DE, Franklin MJ. Calcium-induced virulence factors associated with the extracellular matrix of mucoid Pseudomonas aeruginosa biofilms. J Bacteriol. 2005;187:4327-37.

[63] 63 Podschun R, Fischer A, Ullmann U. Characterisation of Hafnia alvei isolates from human clinical extra-intestinal specimens: haemagglutinins, serum resistance and siderophore synthesis. J Med Microbiol. 2001; 50:208-14.

[64] Turkkahraman H, Sayin MO, Bozkurt FY, Yetkin Z, Kaya S, Onal S. Archwire ligation techniques, microbial colonization, and periodontal status in orthodontically treated patients. Angle Orthod. 2005;75:231-6.

[65] Goodson JM, Palys MD, Carpino E, Regan EO, Sweeney M, Socransky SS. Microbiological changes associated with dental prophylaxis. J Am Dent Assoc. 2004; 135:1559-64.

[66] Borutta A, Pala E, Fischer T. Effectiveness of a powered toothbrush compared with a manual toothbrush for orthodontic patients with fixed appliances. J Clin Dent. 2002;13:131-7.

[67] Kossack C, Jost-Brinkmann PG. Plaque and Gingivitis Reduction in Patients Undergoing Orthodontic Treatment with Fixed Appliances-Comparison of Toothbrushes and Interdental Cleaning Aids A 6-Month Clinical Single-Blind Trial. J Orofac Orthop. 2005 ;66:20-38.