Cambios en la microbiota subgingival antes y después de la colocación de aparatología ortodontica.

Amezquita Naranjo Andrea1, Triviño Tarazona Martha Lucia[1], Botero Javier Enrique, odontólogo, periodoncista[2]. Bermúdez Paula Cristina, Odontóloga, MAS[3].
[1] Residentes del Postgrado de Ortodoncia y Ortopedia Maxilar, [2] asesor científico, [3] asesora metodológica. Colegio Odontológico Colombiano Extensión Santiago de Cali.

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 Cementacion 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.

Abstract: Dental plaque is organized in a biofilm complex, providing protection and nutrients. Several factors could influence microbial colonization such as restorations and orthodontic brackets. The aim of this study was to investigate the changes in the subgingival microbiota and clinical parameters before and after brackets installation.

Methods: clinical parameters and subgingival microbial samples were collected from 30 patients before and after bracket placement. Thirty additional patients with no orthodontic treatment served as controls. Samples were analyzed for the presence of periodontopathic and superinfecting bacteria using culture techniques. A descriptive analysis was conducted and X^2,*t* test and Mann Whitney test was used to test for differences between groups ($P \leq 0.05$).

Results: no changes in PD and CAL were observed while BOP, PI and GI increased after bracket placement ($P \leq 0.05$). *P.gingivalis, P.intermedia/nigrescens T.forsythia* and *Fusobacterium* spp were elevated in the EG after brackets installation as compared to the CG ($P \leq 0.01$). Superinfecting microorganisms such as *Enterobacter cloacae, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens* could also be retrieved.

Conclusions: bracket placement influences the accumulation of plaque and colonization important periodontopathic and superinfecting bacteria resulting in more inflammation and bleeding. Special attention on oral hygiene methods should be paid in orthodontic patients.

Keywords: bracket placement, subgingival microbiota, periodontopathic bacteria, culture techniques

Introducción

La placa dental es un complejo altamente organizado en una biopelicula que provee protección y nutrientes.[1] la rata de colonización microbiana en un ambiente subgingival depende directamente de dos factores ; el huésped y de los factores bacterianos tales como las proteínas en el fluido crevicular .[2 3 4 5 6] La composición de la microbiota subgingival esta influenciada por factores que incluyen procedimientos de higiene oral especialmente en sitios donde es favorable la retención de placa; como lo aparatos ortodónticos y restauraciones dentales, tales variables pueden inducir a la colonización de importantes microorganismos implicados en la iniciación de la inflamación gingival y posterior destrucción periodontal.[7]

Los primeros microorganismos suelen aparecer en la cavidad oral después de las primeras 8 horas de abstención en las medidas de higiene oral; las bacterias mas frecuentementemente encontradas en pacientes con inflamación gingival y bolsas periodontales cuando se comparan con sujetos sanos.[8] Son *Tannerella forsythia, Porphyromonas gingivalis, Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Prevotella intermedia /nigrescens;* Sin embargo la iniciación de la lesión inflamatoria fluctuante entre gingivitis y Periodontitis, es regulada por la interacción bacteria – hospedero.

La variación en el ambiente supragingival y subgingival por medio de restauraciones y aparatos ortodónticos fijos puede incrementar la cantidad de placa que se forma alrededor del diente. Esto ha sido observado en restauraciones como coronas metal cerámicas, donde se encontró incremento en la cantidad de bacterias periodontopaticas así como mayor inflamación comparado con dientes libres de restauraciones.[9 10 11 12]
La misma observación fue realizada alrededor de bandas y brackets.[13 14 15 16] de allí que controles de placa incorrectos o irregulares así como inflamación gingival no detectada puede desencadenar una destrucción periodontal, que va en aumento con la implementación de los aparatos ortodónticos.
El objetivo de este estudio a corto plazo fue comparar los cambios en la microbiota subgingival y los parámetros periodontales antes y después de la colocación de aparatología ortodontica. Esta idea surge de nuestro interés por conocer mas acerca de dichos cambios, como interfieren en el tratamiento y como podemos evitar posibles daños al Periodonto en los pacientes durante el tratamiento de ortodoncia activo.

Materiales y Métodos

Tipo de estudio

Observacional descriptivo de corta duración.

Muestra

Pacientes atendidos en las clínicas de el colegio odontológico colombiano sede Cali fueron invitados a participar en este estudio. Se tomaron 30 pacientes que fueron sometidos a tratamiento ortodóntico para la toma de la muestra antes y después de la colocación de la aparatología, a quien llamamos grupo A (grupo de intervención) y 30 pacientes a los que no se les realizo tratamiento ortodóntico, se les tomo solo una muestra, para efectos comparativos, a quienes llamamos grupo B (grupo de no intervención). Inicialmente los pacientes contestaron cuestionarios que indicaran que podían ser incluidos en el estudio, los criterios para inclusión de los pacientes fueron; pacientes que voluntariamente aceptaran participar en el estudio, pacientes sanos, libres de enfermedad periodontal, que no hubieran consumido AINES, corticoesteroides o antibióticos por lo menos una semana antes a la toma de la muestra, pacientes no fumadores, no mujeres embarazadas, y cuyas edades oscilaran entre los 13 y 35 años.
Después de ser incluidos en el estudio, todos los sujetos fueron informados de el propósito de la investigación y dieron su autorización por medio de consentimiento informado por escrito, a través de un documento diseñado bajo los parámetros contenidos en la resolución 8430 de 1993 del ministerio de salud de colombia, donde se estipulan las normas técnicas, científicas y administrativas para investigar con seres humanos, dicha resolución incluye normatividad internacional contenida en la declaración de Helsinki.

Examen clínico

Un completo examen periodontal fue llevado a cabo antes de la toma de las muestras, para reducir variabilidad un solo examinador previamente entrenado realizo todas las mediciones; el sondaje se realizo con la misma sonda periodontal (UNC-15, Hu friedy). En todos los casos.

Únicamente los dientes índices fueron examinados; segundos premolares superiores, incisivos laterales superiores, segundos premolares inferiores. Solo las superficies meso-vestibulares fueron muestreadas.

los siguientes parámetros fueron consignados : profundidad al sondaje (PD), nivel clínico de inserción (CAL), sangrado al sondaje (BOP), índice de placa de acuerdo a O´leary et al (IP),[17] índice gingival de acuerdo a Löe y Sillness (IG)[18]

Vale la pena agregar que la higiene oral de los pacientes no pudo ser controlada durante el estudio; a pesar de que a todos los pacientes se les realizo instrucción en técnicas de higiene oral después de la colocación de la aparatología ortodontica.

Muestra microbiológica

Las muestras microbiológicas fueron tomadas en los sitios proximales de los dientes índice antes y después de la Cementacion de los brackets (Figura 1.). Puntas de papel estériles fueron insertadas en el surco y se mantuvieron allí por 15 segundos. Las puntas de papel fueron colocadas en un vial que contenía VMGA III como medio de trasporte.
La placa supragingival fue removida del diente muestreado con gasas estériles y posteriormente se aislaron con rollos de algodón.
Las muestras fueron analizadas usando técnicas de cultivo microbiológico para presencia de periodontopáticos de acuerdo con Slots.[19]
Todas las muestras fueron procesadas después de 24 horas en un cuarto a una temperatura atmosférica de 25ºC e inmediatamente incubadas en CO2 y sistema de cultivos anaerobios en placas de agar sangre Brucella, luego se incubaron nuevamente en una cámara atmosférica de 35ºC por 7 días. La identificación presuntiva fue ejecutada según los métodos descritos por Slots & Reynolds[20], Rams et al[21] ; estos sistemas son positivos para:
A.Actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis,Prevotella intermedia / nigrescens Tannerella forsythia, Campylobacter spp, Eubacterium spp, Fusobacterium spp, Micromonas micros, Eikenella corrodens, Capnocytophaga spp, Dialister pneumosintes, entericos Gram negativos.
La cantidad total viable para microorganismos (TVC) fue definida como el número de colonias formadas en La placa de medio no selectivo para periodontopáticos. Las especies encontradas en el medio selectivo fueron enumeradas y su porcentaje de TVC fue calculado. Fue de especial atención el hecho de encontrar crecimiento de entericos Gram negativos y levaduras en TSBV y agar Brucella. Los entericos Gram negativos fueron sub – cultivados y las colonias fueron purificadas en placas de agar MacConkey y Cetrimide estas fueron identificadas usando una estandarización con un test bioquímico (API 20E®, bioMerieux, Inc, USA)
Para disminuir errores en los resultados microbiológicos, este análisis fue realizado por un solo microbiólogo con más de 10 años de experiencia en microbiología oral, en el mismo laboratorio (laboratorio de microbiología de la Universidad del Valle) y bajo condiciones ambientales controladas.


Figura 1.

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.

Resultados

Los parámetros clínicos y demográficos se muestran en la tabla 1. No se encontraron diferencias con respecto a la edad y el género. La profundidad al sondaje y el nivel clínico de inserción se mantuvieron constantes en ambos grupos, mientras el sangrado al sondaje, el índice gingival el índice de placa mostraron un incremento significativo en el grupo intervenido tres meses después de haber colocado los brackets. (p<0.05).

La tabla 2 describe la microbiota subgingival cultivable antes y después de la colocación de los brackets. Fueron detectados en bajas proporciones en ambos grupos microorganismos periodontales importantes tales como: *P gingivalis, T. forsythia, P. Intermedia/nigrescens y A.actinomycetemc*

En general, tres meses después de haber colocado los brackets. Se encontró aumento de microorganismos y diferencias estadísticamente significativas para *Fusobacterium* spp (p≤0.05); Bacterias superinfectantes tales como *Enterobacter cloacae, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens* éstas se encuentran reportadas en la tabla 2 y 3.

La frecuencia de detección de bacterias periodontopáticas y superinfectantes es mostrada en la tabla 2. La detección de *P.gingivalis, P.intermedia/nigrescens* y *Fusobacterium* spp en el grupo de intervención fue mayor después de tres meses de la colocación de los brackets comparado con el grupo no intervenido (P≤0.01). *T.forsythia* fue detectada solamente después de la colocación de la aparatología y tuvo una significancía estadística de (P≤0.01).

Tabla 1. Descripción demográfica y clínica en pacientes con y sin aparatología ortodóntica

Parámetro	Grupo A		Grupo B
	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

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 B (Two tailed t test)

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

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

Tabla 2. Porcentaje (%) de la microbiota subgingival cultivable en pacientes con y sin aparatología ortodontica

Microorganismos	Grupo Al		Grupo B
	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 Naranja			
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 3. 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[1]
Klebsiella oxytoca	Capsula, expolisacaridos, invasividad	Fang et al. 2004, Struve & Krogfelt 2003[1]
Pseudomonas spp	Exotoxina A, proteasas extracelulares (AprA, LasB, y PrpL)	Gaines et al. 2005, Sarkisova et al. 2005[1]
Enterobacter aerogenes	Resistencia antimicrobianos, plasmidos, capsula	Halda-Alija 2004[1]
Enterobacter gergoviae	Resistencia antimicrobianos, plasmidos, capsula	Halda-Alija 2004[1]
Klebsiella pneumoniae	Capsula, expolisacaridos, invasividad	Fang et al. 2004, Struve & Krogfelt 2003[1]
Pseudomonas putida	Exotoxina A, dipeptidos ciclicos DKPs (señalizacion interbacteriana),	Nelson et al. 2002, Degrassi et al. 2002[1]
Serratia marcescens	Endotoxinas, hemaglutininas, resistencia sistema inmune	Podschun et al. 2001 [1]

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[22] 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[23]. 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[24]. 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.[25]
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.[26] [27] [28] [29]

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.[30],[31],[32]la higiene oral y el poco cuidado en el almacenamiento de los cepillos dentales dentro del baño[33] 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,[34],[35],[36],[37],[38],[39],[40],[41] 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.[42] Por consiguiente el uso de métodos e instrumentos de higiene oral apropiados facilitan el control de placa.[43] El uso de aditamentos especiales para pacientes ortodónticos como los cepillos interdentales y tipos especiales de seda dental puede mejorar el control de placa en los pacientes ortodónticos.[44] [45]

Conclusiones
Los hallazgos de esta investigación muestran claramente que la implementación de aparatología ortodontica influencia la acumulación y composición de microbiota subgingival resultando en mayor inflamación y sangrado al sondaje. Un especial cuidado con la higiene oral de los pacientes ortodónticos puede ayudar a prevenir la enfermedad periodontal durante el tratamiento activo.

El valor agregado que nos genera esta investigación, es conocer cuales son los cambios que proporcionamos al Periodonto de los pacientes a los que les colocamos aparatología ortodontica; y como podemos evitar estos cambios para que no interfieran con el tratamiento.

Recomendaciones
A partir de los hallazgos presentados, es pertinente plantear la observación de un grupo mayor de sujetos, con mediciones mas prolongadas

Referencias

[1] Betancourt M, Botero JE, Rivera SP. Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. Colomb Med 2004; 35 (Supl 1):34-39.

[2] Löe H, Theilade E, Jensen B. Experimental gingivitis in man. J Periodontol 1965: 36: 117–187.

[3] Theilade E, Wright WH, Jensen SB, Löe H. Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. J Periodontal Res 1966: 1: 1–13.

[4] Listgarten MA. The structure of dental plaque. Periodontol 2000 1994: 5: 52–65.

[5] Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol 1998: 25: 134–144.

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

[7] Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. Periodontol 2000 1994: 5: 66–77.

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

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

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

[11] 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.

[12] 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

[13] 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.

[14] 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;19:345-9.

[15] Paolantonio M, Pedrazzoli V, di Murro C, di Placido G, Picciani C, Catamo G, De Luca M, Piaccolomini R. Clinical significance of Actinobacillus actinomycetemcomitans in young individuals during orthodontic treatment. A 3-year longitudinal study. J Clin Periodontol. 1997;24:610-7.

[16] 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;115:423-8.

[17] O'Leary TJ, Drake RB , Naylor JE. The plaque control record. J Periodontol 1972:43:38.

[18] Löe H. The gingival index, the plaque index, and the retention index. J Periodontol 1967; 38:610-616

[19] Slots J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. Oral Microbiol Immunol 1986; 1:48-55.

[20] Slots J, Reynolds HS. Long wave UV light fluorescence for identification of black pigmented Bacteroides spp. J Clin Microbiol 1982; 16:1148-1151

[21] Rams TE, Feik D, Young V, Hammond BF, Slots J. Enterococci in human periodontitis. Oral Microbiol Immunol 1992;7:249-252

[22] 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.

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

[24] 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.

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

[26] 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.

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

[28] 28 Ramberg P, Sekino S, Uzel NG, Socransky S, Lindhe J. Bacterial colonization during de novo plaque formation. J Clin Periodontol. 2003;30:990-5.

[29] 29 Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. Periodontol 2000 1997: 14: 9–11.

[30] 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.

[31] 31 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.

[32] 32 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.

[33] 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

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

[35] 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

[36] 36 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.

[37] 37 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

[38] 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.

[39] 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

[40] 40 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.

[41] 41 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.

[42] 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.

[43] 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.

[44] 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.

[45] 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.