

**MICROFLORA SUBGINGIVAL PRESENTE EN DIENTES ADYACENTES A
ZONA EDÉNTULA A REHABILITAR CON IMPLANTES EN PACIENTES
SANOS CON HISTORIA DE ENFERMEDAD PERIODONTAL**

ANGÉLICA MARÍA DELGADO LEON

PE-082004

DIEGO ALEJANDRO INFANTE GOMEZ

PE- 082008

LAILY VIVIANA SÁNCHEZ AVILA

PE- 082002

PAOLA ANDREA GONZÁLEZ NIETO

PE-082003

INSTITUCIÓN UNIVERSITARIA COLEGIOS DE COLOMBIA

COLEGIO ODONTOLÓGICO

DEPARTAMENTO DE POSTGRADO

BOGOTÁ D.C.

I-2010

INSTITUCIÓN UNIVERSITARIA COLEGIOS DE COLOMBIA
COLEGIO ODONTOLÓGICO

TABLA DE CONTENIDO

1. ASPECTOS TEÓRICO CIENTÍFICOS.....	6
1.1. Problema	6
1.2. Justificación	7
1.3. Marco teórico	7
1.4. Objetivos	22
1.4.1. Objetivo general	22
1.4.2. Objetivos específicos	22
2. ASPECTOS METODOLÓGICOS	22
2.1. Tipo de estudio	22
2.2. Población estudio	22
2.3. Criterios de selección.....	23
2.3.1. Criterios de inclusión.....	23
2.3.2. Criterios de exclusión.....	23
2.4. Muestreo y Muestra	24
2.5. Variables.....	25
2.6. Procedimiento.....	26
2.7. Instrumento para recolección de datos.....	31
2.8. Análisis y procesamiento	32
2.9. Implicaciones éticas.....	32
3. RESULTADOS.....	36
4. DISCUSION	42
5. CONCLUSION	44
BIBLIOGRAFIA	45

1. ASPECTOS TEÓRICO CIENTÍFICOS

1.1. Problema

La terapéutica implantológica se ha convertido en uno de los procedimientos de mayor aplicabilidad en el reemplazo de dientes perdidos.

El éxito o fracaso de la oseointegración, en la terapia implantar, básicamente se encuentra asociada a la interacción que ocurre entre los tejidos del huésped, la colonización bacteriana y la naturaleza físico-química de la superficie del implante.

La colonización microbiana de la superficie del implante se describe como una competencia por ganar este espacio, entre los tejidos del huésped y las bacterias de la cavidad oral. En los últimos años se ha incrementado el uso de los implantes dentales, como una opción en el tratamiento dental. Sin embargo se ha encontrado que tiempo después de la colocación del implante, estos son colonizados por microflora, normal de la cavidad oral.

Ya que esta comunidad es amplia, y dentro de esta hay periodonto-patógenos que pueden afectar estos implantes a futuro por esto nos preguntamos ¿Cuál es la microflora subgingival presente en los dientes adyacentes a zonas edéntulas que van a ser rehabilitadas con implantes en pacientes sanos con historia de enfermedad periodontal?

1.2. Justificación

Es identificar microorganismos patógenos subgingivales en dientes adyacentes a zonas edéntulas que van a ser rehabilitadas con implantes puesto que estos periodonto-patógenos que están en la flora normal de la cavidad oral podrían producir patologías peri-implantares que ponen en riesgo el éxito o la supervivencia de la terapia implantológica.

1.3. Marco teórico

La placa bacteriana es una estructura no calcificada constituida por componentes salivares y numerosos géneros bacterianos en crecimiento continuo. El término "biopelícula" se usa para denotar una comunidad de bacterias envueltas en una masa extracelular polimérica que se acumula en una superficie. Las diferentes especies acumuladas en dicha estructura pueden proteger contra la colonización por patógenos exógenos o constituir el inicio, progresión y destrucción de las estructuras periodontales ^(3,26).

El biofilm de la placa consta, sobre todo, de microorganismos y proteínas del huésped que se adhieren al diente a los pocos minutos de practicada la higiene dental. En la encía sana, los microorganismos grampositivos, como *Actinomyces* y los estreptococos, dominan el biofilm de la placa. En posteriores etapas de

formación (días o semanas de higiene bucodental deficiente), la placa «madura» y se produce un desplazamiento hacia los anaerobios gramnegativos y organismos móviles. Algunos de los microorganismos asociados con mayor frecuencia a las enfermedades periodontales son: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, así como treponemas.

El World Workshop on Clinical Periodontics, un grupo dedicado a la revisión de los microorganismos periodontales específicos como agentes causales de las enfermedades periodontales de 1996, limitó su investigación a tres microorganismos: *A. actinomycetemcomitans*, *B. forsythus* y *P. gingivalis*⁽¹⁾. Probablemente porque aceptaron las modificaciones de Socransky a los postulados de Koch ⁽²⁾. Entre otros criterios, los requerimientos de estas modificaciones para considerar un agente patógeno periodontal son:

- El microorganismo debe estar presente en mayor cantidad en los focos activos de la enfermedad que en los focos no activos.
- La eliminación del microorganismo debe detener la progresión de la enfermedad.
- El microorganismo debe poseer factores de virulencia relevantes en el proceso patológico.
- El microorganismo debe desencadenar una respuesta inmunológica celular o humoral.

- Las pruebas de patogenicidad animal deben indicar potencial patológico.

Para comprender el protagonismo de las comunidades microbianas como indicadores de riesgo, es importante el concepto de «biología de sistemas». Este concepto se ha aplicado para clasificar la constelación de especies (y sus interrelaciones) en la enfermedad y la salud ⁽³⁾, así como los clonotipos bacterianos (en subespecies) asociados con los diferentes estados de salud y enfermedad. Este último concepto, conocido como epidemiología molecular, es útil para identificar las siguientes situaciones:

- Relaciones genéticas de los clones individuales dentro de las especies para identificar a las especies que se comportan como patógenos frente a las que se comportan como comensales ⁽⁴⁾.
- Cambios en el genoma bacteriano según el crecimiento en diferentes condiciones ambientales o en diferentes células del huésped.
- Cambios en el genoma de las células del huésped, cuando las células del huésped se presentan con especies bacterianas diferentes, clones o sus productos ⁽⁵⁾.

Ha sido necesario aplicar estos métodos porque los rasgos de virulencia de las especies individuales *in vitro*, pueden comportarse de manera diferente cuando

forman parte de una comunidad bacteriana, sobre todo *in vivo*. Con las nuevas tecnologías es posible apreciar mejor la complejidad de la microflora subgingival, a medida que se dispone de un mayor conocimiento de las agrupaciones bacterianas.

En 1998, Socransky y cols.⁽³⁾ especificaron los variados complejos de bacterias hallados en pacientes sanos y enfermos. Aunque estos datos son transversales y es difícil aplicarlos a la valoración de riesgo para el paciente, los resultados no dejan de ser sorprendentes, el complejo rojo de microorganismos comprende *P. gingivalis*, *B. forsythus* y *T. denticola* y es el que se relaciona con mayor frecuencia con los parámetros clínicos de la enfermedad periodontal. Como se ha descrito detalladamente con anterioridad, en 2001 Paster y cols.⁽⁶⁾ emprendieron la gran tarea de analizar la diversidad bacteriana de la placa subgingival en situaciones de salud y de enfermedad, mediante el análisis de ARNr basado en la reacción en cadena de la polimerasa. En este estudio se evaluaron 2.522 secuencias de ARNr de muestras bacterianas, unas cultivables y otras todavía no cultivables, pertenecientes a 26 pacientes con varias formas de periodontitis, y 5 pacientes sanos de control. Incluso con el sesgo de un número más pequeño de controles sanos, pudieron aislarse 29 especies (de las cuales sólo 18 tenían nombre), confinadas exclusivamente en los sitios enfermos. Entre los microorganismos aislados conocidos estaban *B. forsythus* y *P. gingivalis*⁽⁶⁾.

Es patente que al disponer de más conocimientos sobre la contribución de estos miembros de la comunidad a un nivel molecular, es posible distinguir los serotipos y clonotipos individuales más asociados con la enfermedad. En una especie particular de bacteria patógena, existen múltiples serotipos (basados en el tipo de lipopolisacárido o cápsula) con capacidad de infectar al huésped. Algunos serotipos bacterianos están asociados a enfermedad aguda e incluso, a la muerte, mientras que otros serotipos pueden ser relativamente benignos. Dentro de un serotipo particular, existe un potencial para múltiples clonotipos (basados en la secuencia de ADN) que imparten su propio nivel de virulencia. Este hecho quizá se aprecia mejor en los estudios genéticos de clonicidad ⁽⁴⁾, en los que, por ejemplo, cepas de microorganismos específicos producen un aumento de un rasgo de virulencia importante que permite que estas cepas causen enfermedad. Esto indicaría que no son las especies bacterianas las que están relacionadas con la enfermedad, sino más bien una variante específica o clon de estas especies (y de aquí su factor o factores de virulencia). Esta subagrupación, por consiguiente, expresaría probablemente un patrón molecular específico relacionado con la enfermedad más estrechamente que la mera presencia de especies bacterianas en sí mismas.

La placa subgingival se localiza a nivel del espacio virtual del surco gingival escasamente colonizado en estado de salud periodontal, sin embargo, la cantidad y diversidad de microorganismos aumentan en presencia de enfermedad, desarrollando a este nivel una biopelícula y transformándose el espacio virtual en

auténtica bolsa, que lleva a la destrucción del hueso alveolar. Esta biopelícula se caracteriza por adoptar una estructura diferente a las de localización supragingival y radicular que sólo se adhieren a la superficie dental.

El desarrollo de la placa subgingival se lleva a cabo según el clásico esquema de colonización, sucesión y asociaciones microbianas descrito por Socransky y cols.⁽⁷⁾.

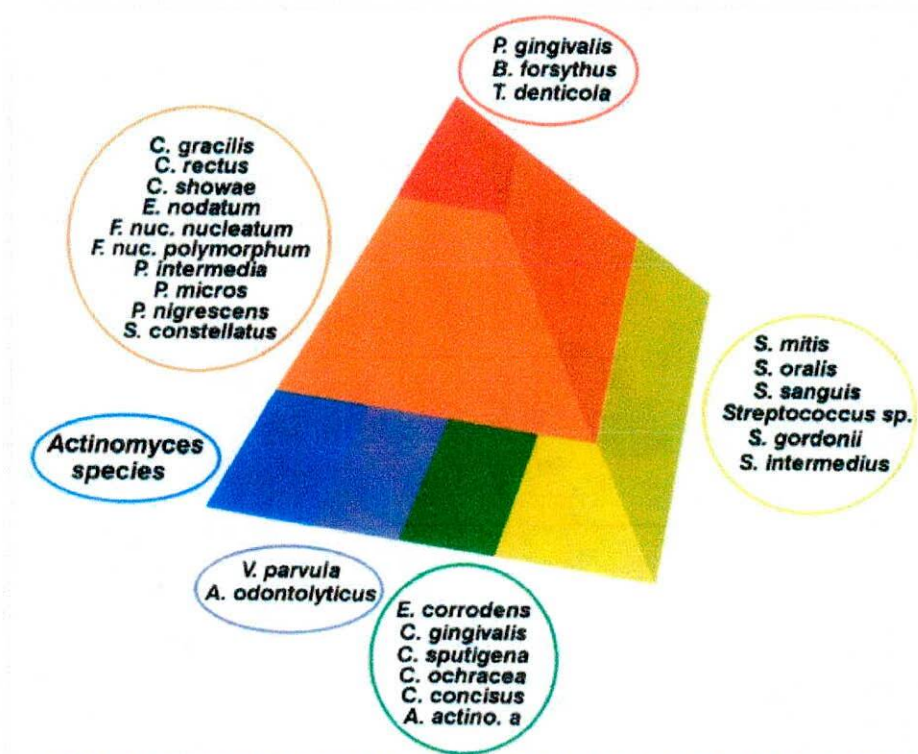


Figura tomada de Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith G, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol 1998; 25:134-144.

Patogénesis de la enfermedad periodontal

Para determinar la patogénesis de la gingivitis es dada por el acumulo de placa bacteriana presentando clínicamente enrojecimiento gingival, edema, hemorragia, cambios en el contorno gingival, perdida de adaptación del tejido a los dientes y el aumento del fluido gingival. La lesión inicial aparece como una inflamación aguda caracterizada por la acción quimiotáctica de los neutrofilos, cambios vasculares, células epiteliales y presencia de linfocitos T, produciendo perdida del colágeno y la lesión establecida está dominada por los linfocitos B y células plasmáticas.

La patogénesis de la periodontitis se caracteriza por la pérdida del ligamento periodontal y la interrupción de su fijación al cemento, así como la reabsorción del hueso alveolar, la perdida de inserción, la reabsorción del hueso alveolar y la migración de la adherencia epitelial a lo largo de la superficie radicular. A pesar de las similitudes histopatológicas entre gingivitis y la periodontitis, la evidencia es la falta que indique que la periodontitis es una consecuencia inevitable de la gingivitis.

Por otra parte, los mecanismos patogénicos explicar la progresión de las lesiones de gingivitis las lesiones de periodontitis no están claras, y los factores que conducen a la iniciación de las lesiones de periodontitis se desconocen.

La virulencia bacteriana

Es dada por la iniciación y progresión de la periodontitis son dependientes de la presencia de microorganismos capaces de causar enfermedad. Aunque más de

300 especies de microorganismos. La capacidad colonizar, de evadir Tres características principales de los microorganismos para que actúen como patógenos antibacterial mecanismos de defensa del huésped, y la capacidad de la para producir sustancias que directa puede iniciar una destrucción tisular. Ahora es evidente que dentro de una especie dada patógenas, como la *Actinobacillus actinomycetemcomitans* o *Porphyromonas gingivalis*, sólo un subconjunto de las bacterias tipos o subtipos genéticos clonales o puede ser patogenicos. Así pues, la presencia de un patógeno especies de bacterias en la placa subgingival puede por sí sola no implica que un agente patógeno está presente con características de virulencia necesarios para iniciar o propagar las lesiones de periodontitis. ⁽¹⁰⁾.

El perfil microbiano de la enfermedad periodontal varía en diferentes poblaciones humanas. Este estudio evaluó los datos demográficos, clínicos y aspectos microbiológicos de la periodontitis en una muestra multigeograficos en Colombia. Se utilizaron trescientos veinticinco pacientes con periodontitis crónica (PC), 158 pacientes con periodontitis agresiva (AGP), y 137 con gingivitis de cinco regiones del país fueron estudiados. Los datos Clínicos, microbiológicos, y sociodemográficos se recogieron. Se identificación causal se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa 16S rARN de muestras agrupadas subgingival, y la presencia de bacilos entéricos Gram-negativos fue evaluado por la cultura. Se llevaron a cabo el análisis Bivariados y multivariados. Como

resultado de este estudio la *Porphyromonas gingivalis* ocurrió en el 71,5% de los individuos con periodontitis, *Tannerella forsythensis* ocurrió en el 58,5%, *Campylobacter rectus* ocurrió en el 57,5%, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ocurrió en el 23,6%, y bacilos entéricos se produjo en el 34,5%. *P. gingivalis* fue más común en PC y AGP que los controles. *A. actinomycetemcomitans* se incrementó en comparación con los controles AGP y los pacientes con parálisis cerebral. *T. forsythensis*, *C. recto*, Y *Eikenella corrodens* tenía una escasa presencia en el Pacífico occidental, la región central, y bacilos entéricos se incrementaron en la región centroamericana ($P < 0,05$). Otros factores sociodemográficos no se asociaron con estos microorganismos. Cabe destacar que las regiones geográficas no influyen en la microbiota, pero la microbiota puede variar según la región geográfica. *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, Y *C. recto* son los microorganismos más prevalentes periodontopathic en Colombia. *A. actinomycetemcomitans* fue más común en AGP, y un gran porcentaje de la población estudiada había bacilos entéricos en la placa subgingival⁽¹¹⁾.

Para el análisis de los perfiles microbiológicos en individuos sanos y en pacientes con diagnóstico de periodontitis crónica y agresiva y su asociación dado por el estudio realizado en el **laboratorio de microbiología oral y periodontal en Cali (Colombia)**. Los microorganismos de la familia de los Enterobacteriaceae, los bacilos Gram negativos no fermentadores y ciertas especies de *Cándida* se han considerado como inusuales en quienes sufren enfermedad periodontal, y en ellos

el tratamiento mecánico o antimicrobiano puede ser poco efectivo para resolver o controlar la progresión de la enfermedad. Se estudiaron los informes microbiológicos de 356 pacientes en un período de 41 meses. Las variables analizadas fueron: diagnóstico periodontal, recuento total de colonias, porcentaje de aislamiento de diez microorganismos periodontopáticos y de otros inusuales como miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, bacilos Gram negativos no fermentadores y levaduras.

Se analizaron 202 (56.7%) informes de pacientes con periodontitis crónica, 139 (39.1%) de periodontitis agresiva y 15 (4.2%) de individuos periodontalmente sanos. La presencia de microorganismos inusuales de tipo entérico fue 36% y la prevalencia de levaduras 7% en las personas con periodontitis. No se encontraron diferencias significantes entre los tres diagnósticos clínicos con respecto a la presencia de microorganismos entéricos y levaduras. La mayor prevalencia de organismos entéricos correspondió a los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter* y a bacilos Gram negativos no fermentadores. Se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre la presencia o ausencia de microorganismos infrecuentes con la de algunos microorganismos periodontopáticos en los individuos con enfermedad periodontal. Por lo tanto la microbiota inusuales de los pacientes incluidos en este estudio presentó una mayor proporción de bacilos Gram negativos entéricos. Las bacterias entéricas encontradas se caracterizan por ser agentes oportunistas para el hombre. Se requieren más estudios para

determinar el papel que los microorganismos inusuales pueden tener en la patogénesis y/o progresión de la enfermedad periodontal⁽¹²⁾.

Los microorganismos inusuales, al encontrarse junto con los organismos periodontopáticos en el microambiente de la bolsa periodontal pueden aprovecharse de condiciones como nutrientes, protección ante la respuesta inmune y economía en el gasto energético⁽⁷⁾. Sin embargo, no se han descrito con claridad los tipos de interrelaciones microbianas que pueden existir entre microorganismos periodontopáticos y superinfectantes a nivel de la microbiota subgingival. Los microorganismos inusuales tienen bajas proporciones en la cavidad oral⁽¹³⁾, sin embargo, diversas circunstancias pueden generar cambios en las condiciones del microambiente oral que facilitan el sobrecrecimiento de estos patógenos oportunistas. Dentro de ellas, se mencionan hábitos higiénicos deficientes, enfermedades de base como diabetes, cáncer, factores ambientales (tabaquismo o alcoholismo) y terapias antimicrobianas previas que permitirían el establecimiento de una microbiota oportunista. Dentro de la cavidad oral, las enterobacterias permanecen en muy bajas proporciones como microbiota normal⁽¹³⁾. Se ha descrito el componente bacteriano de diversos sitios de la boca, con 1.2% de Enterobacteriaceae en el fluido gingival crevicular; en la lengua, 3.2%; y en la saliva, 2.3%, mientras que en la placa bacteriana supragingival resultó indetectable⁽¹³⁾.

Dentro del grupo de las levaduras, el género *Cándida* predomina entre las demás como microbiota normal del tracto gastrointestinal del hombre y con frecuencia se asocia con infecciones en personas inmunodeprimidas. *C. albicans* puede invadir el tejido conectivo gingival, inhibir la función de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos, producir enzimas como colagenasas, fosfolipasas, proteasas o adherirse a prótesis dentales para establecer un proceso patológico bucal ⁽¹⁴⁾.

Estudios epidemiológicos en algunos países han mostrado diversas prevalencias de organismos inusuales en individuos con periodontitis. La presencia de levaduras como especies de *Cándida* se ha informado en pacientes estadounidenses con periodontitis refractaria (16.8%) ⁽¹⁵⁾, noruegos con periodontitis (17.5%) ⁽¹⁶⁾, y en personas bajo terapia mecánica y antimicrobiana donde se elevan hasta 10 veces su valor basal (8.7×10^2 levaduras por ml a 1.5×10^3 levaduras por ml) ⁽¹⁷⁾.

En Centro y Sur América, el componente microbiológico de la periodontitis tanto crónica como agresiva solamente se ha analizado en detalle en algunos países como República Dominicana ⁽¹⁸⁾, Brasil ⁽¹⁹⁻²¹⁾, Chile ⁽²²⁻²⁴⁾ y Argentina ⁽²⁵⁾.

Las investigaciones acerca de la composición de la flora bacteriana alrededor de un implante en condiciones saludables y en tejido peri-dentario sano, establecen similitud. Compuesta predominantemente por cocos y facultativos. Durante un proceso patológico, tanto en los tejidos periodontales como en los periimplantarios también se observa una flora bacteriana muy parecida con

predominio de bacterias anaerobias estrictas Gram negativas, bacilos móviles y espiroquetas. Existen diferencias significativas en la composición de la flora bacteriana tanto en implantes y tejido periodontal sano; cuando se compara con situaciones patológicas ya sea periimplantitis o cuadros de enfermedad periodontal. La flora bacteriana asociada con la etiología de la perimplantitis está compuesta básicamente por *Fusobacterium*, espiroquetas, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis*, *C. rectus* microorganismos también identificados en cuadros de enfermedad periodontal. ^(8,9)

Los implantes de oseointegración representan una alternativa atractiva y predecible para el reemplazo de dientes perdidos. Estudios longitudinales han mostrado que es posible mantener los implantes oseointegrados por largos periodos de tiempo en condiciones de salud y funcionalidad con un buen control de placa bacteriana. No obstante, la acumulación de placa bacteriana y su inadecuado control pueden iniciar un proceso inflamatorio de los tejidos peri-implantares marginales (peri-mucositis) o llegar a afectar el tejido óseo de soporte. La incógnita más importante que plantea es si los tejidos blandos que rodean el implante son capaces de mantener la salud periodontal. Hemos de tener en cuenta que el periodonto se produce por un proceso de desarrollo en la erupción dentaria, en cambio la mucosa periimplantaria se produce a través de un mecanismo de cicatrización. Hoy en día se admite que la estructura de la mucosa periimplantaria es parecida a la encía, cambia la dirección de las fibras colágenas que son

paralelas al implante, pero el resto desde el punto de vista morfológico y funcional es exactamente igual. Por otra parte, se sabe que ese surco periimplantario puede ser reservorio para los microorganismos patógenos desde el punto de vista periodontal⁽²⁷⁾.

Callan y col 2005 ⁽²⁸⁾, mediante pruebas de ADN, realizaron un estudio microbiológico en pacientes parcialmente edéntulos para la detección de 8 cepas periodonto-patogénicas distintas, a partir de muestras tomadas de 43 implantes óseo-integrados en condiciones estables, en la interface implante abutment, 25 días después de la segunda fase quirúrgica. Los resultados revelaron una moderada a elevada proporción de las cepas estudiadas: *A. actinomycetemcomitans* 41,9%, *T. forsythensis* 60,5%, *C. rectus* 44,2%, *E. corrodens* 60,5%, *Fusobacterium nucleatum* 48,8%, *P.gingivalis* 46,5%, *P. intermedia* 55,8% y *T. denticola* 51,2%. Estos resultados, demuestran la translocación de bacterias hacia los implantes, provenientes de la flora dentaria residual.

La comparación de la microflora en sitios dentales y sitios de implantes colectados como muestras de curetas, ninguna diferencia en los conteos bacterial del DNA total fue encontrada entre las muestras de curetas de sitios dentales versus sitios de implantes. Sin embargo, la proporción de *Streptococos oralis* y *Fusobacterium periodonticum* fue significativamente más alta en sitios dentales. La prueba de

detección de bacterias periodontales patógenas consiste en la identificación simultánea de las tres especies bacterianas que constituyen el complejo "rojo" (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Bacteroides forsythus*) y de dos bacterias pertenecientes al complejo "naranja" (*Prevotella intermedia* y *Campylobacter rectus*) implicadas en la periodontitis. ⁽³⁾.

En el estudio de Mombelli ⁽²⁹⁾ en los implantes colocados en pacientes con historia de enfermedad periodontal previa encontraron que la microflora presente en la cavidad oral antes de la colocación de los implantes determinaba la composición de la microflora encontrada en los implantes colocados ^(29,30). En estudios de las bacterias alrededor de implantes y dientes se encontraron diferencias en la composición microbiana en pacientes con historia de periodontitis o periimplantitis, incluso cuando la enfermedad no estaba activa. Estos pacientes parecen tener una mayor susceptibilidad al crecimiento de estos organismos ^(29, 31).

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Identificar mediante cultivo la microflora subgingival presente en dientes adyacentes a una área edéntula a rehabilitar con implantes en sujetos sanos con historia de enfermedad periodontal.

1.4.2. Objetivos específicos

- Determinar la microflora de dientes adyacentes a una zona edéntula que va a ser rehabilitada con implantes en el momento pre-quirúrgico.
- Identificar la presencia de bacilos entéricos en la microflora subgingival en dientes adyacentes a una área edéntula a rehabilitar con implantes.

2. ASPECTOS METODOLÓGICOS

2.1. Tipo de estudio

Descriptivo transversal in vitro.

2.2. Población estudio

Pacientes de la clínica de periodoncia de UNICOC Cuyo plan de tratamiento contiene terapia Implantológica.

2.3. Criterios de selección

2.3.1. Criterios de inclusión

- Pacientes parcialmente edentulos sanos, con historia de enfermedad periodontal.
- Pacientes con previa terapia de mantenimiento.
- Pacientes con registros periodontales normales con profundidades al sondaje menores a 3mm.

2.3.2. Criterios de exclusión

- Pacientes con enfermedad periodontal activa, o relacionada a condiciones sistémicas.
- Mujeres en embarazo.
- Pacientes totalmente edéntulos.

2.4. Muestreo y Muestra

27 pacientes (57 muestras)

PRIMER GRUPO Compara la flora subgingival patógena presente en dientes adyacentes a un área edéntula a rehabilitar con implantes en sujetos sanos con historia de enfermedad periodontal.

SEGUNDO GRUPO Compara la flora subgingival patógena presente en dientes adyacentes en terapia post implantológica.

2.5 Variables

VARIABLES	DEFINICIÓN	TIPO DE VARIABLE	OPERACIONALIZACIÓN	ESCALA	INSTRUMENTO
Edad	Evolución cronológica desde el nacimiento hasta el momento del estudio. Tiempo que ha vivido una persona.	Cuantitativa	Años cumplidos	Discreta	Cedula
Sexo	Condición orgánica que distingue al hombre de la mujer. Descripción fenotípica del ser humano.	Cualitativa	Femenino Masculino	Nominal (dicotómica)	Documento de identidad
Numero de microorganismos	Cantidad de microorganismos por cada una de las muestras	Cuantitativa	1,2,3,4,	Discreta	Formato de resultados.
Complejos	Asociación de microorganismos según grado de patogenicidad.	Cualitativa	Rojo Naranja Azul Amarillo Verde	Nominal	Asociación de especies subgingivales Socransky
Bacilos Entéricos	Microorganismos inusuales	Cualitativa	Negativo Positivo	Nominal	Examen de laboratorio
Zona a rehabilitar con implante	Zona parcialmente edentula	Cuantitativa	Anterior superior Anterior Inferior Posterior Superior Posterior Inferior	Discreta	Sextantes
Microorganismos	Son formas de vida muy pequeñas que sólo pueden ser observadas a través del microscopio.	Cuantitativa	Actinomyces spp Prevotella Intermedia/nigrescens Fusobacterium spp Actinomyces spp Bacilos entéricos	Discreta	Recuento UFC

2.6 Procedimiento

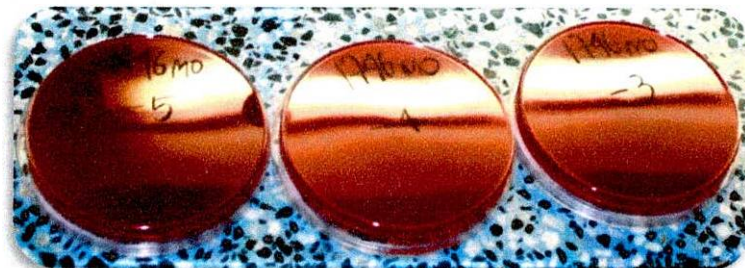
- Solicitud de permiso a dirección de clínicas del C.O.C
- Solicitud de consentimiento informado a los participantes en la investigación
- Se clasificaran los pacientes de la muestra según criterios.
- Recolección de muestras en el área edentula a implantar, y posterior al implante en el surco periimplantar en los sujetos seleccionados según los criterios de inclusión y exclusión.
- Antes de la toma de la muestra se elimino la placa supragingival con curetas y se aisló el sector con rollos de algodón. Para cada muestra fue tomada en 3 aéreas de los dientes adyacentes a la zona edéntula a rehabilitar. Se inserto tres puntas de papel absorbente estéril (New Stetic No. 40) en la superficie vestibular, palatina o lingual y proximal al espacio edéntulo; durante 20 segundos, pasados los cuales, se transfiere a un tubo con 2,0 ml de medio de transporte VMGA III (que mantiene la viabilidad de los microorganismos sin permitir su multiplicación). Todas las puntas para cultivo se recolectaron en el mismo frasco con medio VMGA III con el objeto de obtener un “pool” para ser analizado. Las muestras se llevaron al Laboratorio de Microbiología Oral del Instituto UIBO de la Universidad El Bosque en un tiempo no mayor a 24 horas después de tomada la muestra, donde se realizo su siembra y cultivo de acuerdo al protocolo de Slots.

LABORATORIO

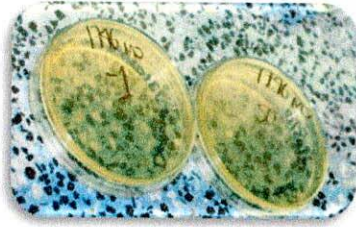
Se realizaron cinco diluciones en base 10 a partir del medio VMGA III, se sembraron 100 μ L de las diluciones 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵ en agar brucella sangre enriquecido con hemina y menadiona (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD) y se llevaron a incubación a 36°C en atmósfera de anaerobiosis (Anaerogen, Oxoid, Hampshire, England) durante siete días.



2mL Medio transporte VMGA III (*Viability Medium Göteborg Anaerobically*)
Mantiene la viabilidad de los microorganismos sin permitir su multiplicación.



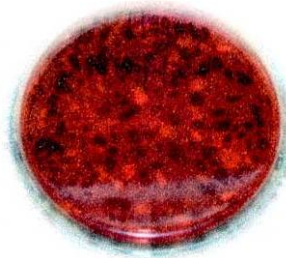
Agar Brusella



Incubo 72 horas

Agar Dentair

Aggregatibacter son capnofilicos necesitan de CO₂



Agar MacConkey para el aislamiento de las bacterias entéricas.



VORTEX



- Dilución es 1000 para completar 100.
- Los caldos de dilución de los frasco con 2,0 mL de **VMGA III (*Viability Medium Göteborg Anaerobically*)** preparado y esterilizado en la cual las bacterias anaeróbicas facultativas permanecen sin multiplicarse por 48 horas.
- El cultivo de identificación de las especies se realizó de acuerdo con el protocolo de Slots, cuyas técnicas están estandarizadas en el laboratorio donde se analizaron las muestras; se sembraron 100 μ L de las diluciones 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵ (cada dilución es de 100 para completar 1000 (-5, -4, -3)).
- (-1) para agar dentair.
- (-2) no se utiliza pero si para hacer las diluciones seriadas, pero no se siembra, se puede sembrar pero crecería demasiado.
- La muestra que nosotros traemos es para dental dentair y agar MacConkey para identificación de bacilos entéricos.

SIEMBRA:

- La muestra se toma 100 microlitros de VMG y quedan los caldos de 900 microlitros como diluciones seriadas y luego se vuelve a centrifugar.
- Se flamea el tubo para evitar que se contamine.
- Con una varilla para extender la muestra de la más diluida a la más concentrada.
- Se coloca en el **agar brucella** sangre enriquecido con hemina y menadiona
- La muestra sin diluir se sembró 1 para agar dentair y en agar MacConkey para el aislamiento de las bacterias entéricas, el cual se incubó en aerobiosis durante 24 a 48 horas a 37°C. Las bacterias entéricas se reconocieron por sus características morfológicas y tintoriales.
- **Agar dentair** para identificación *aggregatibacter* son capnofílicos porque necesitan de CO₂ es por eso que con una vela y una loncherita de vidrio se necesita para crecer, se incuba 72 horas.
- **Las bacterias anaerobias** se coloca con el sobre de anaerobiosis y en una lonchera y el indicador, se ponen a incubar se demora de 7 a 8 días.
- Posteriormente se realizaron las coloraciones de gram para el conteo de colonias reconociéndolas en un estereoscopio y mediante pruebas bioquímicas confirmatorias.

2.7 Instrumento para recolección de datos

FECHA: _____

NOMBRE DEL PACIENTE: _____

EDAD: _____ SEXO: _____ DIENTE: _____

SITIOS MUESTREADOS PARA EL "POOL"

1. MESO – VESTIBULAR
2. CENTRO – VESTIBULAR.
3. DISTO – VESTIBULAR.
4. MESO – PALATINO.
5. CENTRO - PALATINO.
6. DISTO – PALATINO.

FECHA DE TOMA DE LA MUESTRA _____

HORA DE TOMA DE MUESTRA _____

RECUERDO DE BACIOS ENTERICOS (X) PRESENTE ____ AUSENTE ____.

2.8 Análisis y procesamiento

Se elaboró una tabla validada en Excel, los datos se procesaron en un programa estadístico SPSS versión 16, se realizó análisis estadístico descriptivo univariado (distribución de frecuencias de variables categóricas, media, mediana y desviación estándar de variables continuas) y bivariado en donde este último se aplicó la ANOVA de una vía, se consideró $P \leq 0,05$.

2.9 Implicaciones éticas

Según la resolución 8430 de 1993 en el artículo 11 nuestra investigación tiene un riesgo mínimo

CONSENTIMIENTO INFORMADO

INSTITUCION UNIVERSITARIA COLEGIOS DE COLOMBIA (UNICOC)

COLEGIO ODONTOLOGICO

“MICROFLORA SUBGINGIVAL PATÓGENA PRESENTE EN DIENTES ADYACENTES A ZONAS EDÉNTULAS A REHABILITAR CON IMPLANTES EN PACIENTES SANOS CON HISTORIA DE ENFERMEDAD PERIODONTAL”

INVESTIGADORES:

Angélica María Delgado
Diego Alejandro Infante
Paola Andrea González
Laidy Viviana Sánchez A.
Janneth Pedroza

Usted ha sido invitado a participar en este estudio, para lo cual debe leer cuidadosamente este consentimiento, puede encontrar palabras o procedimientos que usted no entienda, puede preguntar a los investigadores quienes resolverán sus dudas al respecto. Usted puede llevar este consentimiento informado y consultar con otras personas sobre su participación antes de tomar la decisión.

En la boca existen diferentes microorganismos que pueden producir enfermedades, algunos de estos, se encuentran en el fondo de la encía que cubre el diente, este estudio tiene como objetivo, conocer cuáles son los microorganismos que se encuentran en el fondo de la encía de los dientes cercanos a donde se le van a colocar los implantes para su tratamiento de rehabilitación, posterior al tratamiento periodontal que le ha realizado su odontólogo.

Permitiendo prevenir posibles fracasos en su tratamiento de rehabilitación con implantes.

En este estudio participarán 27 pacientes que asisten a la clínica de Periodoncia del Colegio Odontológico, para el procedimiento de la toma de muestra, inicialmente se realizará la eliminación de los restos de comida (placa bacteriana) con instrumentos odontológicos, después se aislará la zona con rollos de algodón, y se procederá a tomar 6 muestras de la saliva (fluido intragingival) de uno o dos dientes cercanos a la zona que no presentan dientes, introduciendo una punta de papel absorbente estéril en cada sitio por 20 segundos. Todas las muestras se recolectarán en un frasco con una preparación química que garantice su duración, y serán llevadas al Laboratorio de Microbiología Oral del Instituto UIBO (Unidad de Investigación Básica Oral) de la Universidad El Bosque, Bogotá D.C., en un tiempo no mayor a 24 horas, después de tomada la muestra para garantizar su integridad. Su participación en el estudio será aproximadamente de 15 minutos.

Los resultados del análisis de la muestra identificando los microorganismos, permitirán determinar si es necesario establecer un tratamiento antimicrobiano para el control de dichos microorganismo, lo cual será comunicado a usted y al odontólogo que está realizando su rehabilitación para determinar el tratamiento adecuado.

Este procedimiento no genera ningún riesgo para usted, se tomarán todas las medidas de bioseguridad adecuadas para dicho procedimiento. De acuerdo a la resolución 08430 de 1998, esta investigación es clasificada como de **RIESGO MINIMO**. Las molestias ocasionadas serán mínimas, propias del aislamiento de la zona para la toma de la muestra.

Por su participación en este estudio no recibirá ninguna compensación económica, así mismo no tendrá ningún costo adicional para usted, solo cancelará el costo normal del tratamiento de su rehabilitación.

La decisión de participar en este estudio es voluntaria, usted podrá retirarse en cualquier momento del estudio, si así lo considera necesario, sin afectar la realización de su tratamiento de rehabilitación. Usted se compromete a asistir a la cita acordada con el investigador y tendrá derecho a solicitar y recibir información en cualquier momento de la investigación. Su participación en el estudio terminará en el momento en que no cumpla la cita para la toma de la muestra o cuando los investigadores consideren que su participación ha terminado.

Los datos recolectados en este estudio son confidenciales y solo serán utilizados con fines académicos y científicos, en ningún momento será revelada su identidad, la información será codificada para su manejo y manejada solo por los investigadores. Esta información será archivada en el centro de investigaciones y podrá ser utilizada para futuras investigaciones o como documento de consulta en la Biblioteca de UNICOC.

Solamente firme este consentimiento si considera que han sido resueltas todas sus preguntas y fueron satisfactorias las respuestas para usted. Usted recibirá una copia de este consentimiento que podrá llevar y la otra será guardada en el archivo de la investigación.

CONSENTIMIENTO Y FIRMAS

FECHA _____

El Doctor: _____ me ha explicado de forma satisfactoria qué es, cómo se hace y para qué sirve esta investigación. También se me han explicado y he comprendido por qué y para que la están realizando.

YO _____ mayor de edad, Identificado (a) con Cedula de Ciudadanía No _____ de _____ autorizo a los Doctores Angélica María Delgado, Diego Alejandro Infante Paola Andrea González, Laidy Viviana Sánchez Ávila residentes del postgrado de Periodoncia de la Institución Universitaria Colegios de Colombia, Colegio Odontológico, y al personal auxiliar que se requiera para que diligencien el instructivo correspondiente sobre la información necesaria para este proyecto de investigación y así mismo para que realicen las actividades de toma de muestra de saliva (fluido crevicular) en cavidad oral.

Teniendo en cuenta además mis deberes como lo son suministrar la información, seguir indicaciones, asistir a la cita y no recibir beneficios monetarios por parte de los investigadores.

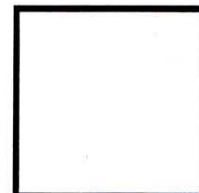
Se me han resuelto todas mis dudas sobre el procedimiento de la investigación y la importancia de la identificación de los microorganismos que pueden producir problemas en mi boca afectando el éxito de mi rehabilitación con implantes.

Me comprometo a seguir las indicaciones de los investigadores para el buen desarrollo de la investigación. Recibiré copia del presente documento el cual consta de 3 páginas

Lugar y fecha: _____

Firma: _____

Nombre del paciente: _____



3. RESULTADOS

Se incluyeron en el presente estudio 27 pacientes 18 hombres y 9 mujeres con edades entre 27 y 66 años con un promedio de edad de 44 ± 11 años.

Con relación al número de implantes por pacientes el 63% (n=17) requerían de 1 implante, el 33.3% (n=9) 2 implantes y solo 1 paciente requería de 4 implantes (Tabla. 1). En los 27 pacientes se tomaron un total de 57 muestras siguiendo el protocolo antes mencionado. En 2 pacientes (7.4%) no se reporto ningún crecimiento microbiano en el cultivo. El numero de microorganismos por pacientes vario entre 1 y 38 respectivamente. Del total de muestras (n=57) el numero de microorganismos vario entre 1 y 8 especies (Tabla 3).

Tabla 1. Distribución porcentual de pacientes según Edad, Género y número de implantes

Genero	n	%
Femenino	19	70,4
Masculino	8	29,6
Total pacientes	27	100,0
Edad agrupada	n	%
< 30	3	11,1
30-39	6	22,2
40-49	10	37,0
>=50	8	29,6
Total pacientes	27	100,0
Número de implantes por paciente	n	%
1,00	17	63,0
2,00	9	33,3
4,00	1	3,7
Total pacientes	27	100,0

En cuanto a los microorganismos del complejo, en las 57 muestras se identificaron 185 microorganismos siendo el más frecuente el *Actinomyces spp* (n=47, 25,4%), le sigue en frecuencia la *Prevotella Intermedia/nigrescens* (n= 38, 20,5%), es de anotar que 2 muestras presentaron *Tannerella Forsythensis* (n= 2, 1,1%).(Tabla. 2)

Tabla 2. Distribución porcentual de microorganismos y según el complejo

Microorganismo del complejo	n	%
<i>Actinomyces spp</i>	47	25,4
<i>Prevotella Intermedia/nigrescens</i>	38	20,5
<i>Fusobacterium spp</i>	34	18,4
<i>Capnocytophaga spp</i>	22	11,9
<i>Campylobacter spp</i>	16	8,6
<i>Micromonas micros</i>	10	5,4
<i>Prevotella melaninogenica</i>	10	5,4
<i>Eikenella corrodens</i>	5	2,7
<i>Tannerella Forsythensis</i>	2	1,1
<i>Streptococcus del grupo viridans</i>	1	,5
Total microorganismos	185	100,0
Complejo	n	%
Naranja	130	70,3
Azul	47	25,4
Verde	5	2,7
Rojo	2	1,1
Amarillo	1	,5
Total microorganismos complejo	185	100,0

Los microorganismos del complejo naranja fueron los más frecuentes (n=130, 70,3%), le sigue en frecuencia el complejo azul (n= 47, 25,4%), el complejo rojo es de anotar que estuvo presente en dos muestras con 1,1%.

En cuanto a los Microorganismos inusuales se identificaron bacilos entéricos (n=9, 15,8%), le sigue *Candida albicans* (n=6, 10,5%), en iguales proporciones se identificaron el *Dialister pneumosintes* y el *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (n=3, 5,3%).(Tabla. 3)

Tabla 3. Distribución porcentual de microorganismos Inusuales

Microorganismos inusuales	n	%
<i>Dialister pneumosintes</i>	3	5,3
<i>Candida albicans</i>	6	10,5
<i>Bacilos entéricos</i>	9	15,8
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	3	5,3
Total muestras	57	100,0

En las Figura 1 y 2 se observan los recuentos y porcentajes de UFC según los microorganismos del complejo en donde se ve la variabilidad pero estadísticamente no hay una diferencia significativa entre los porcentajes de UFC y los microorganismos ($p= 0,70$). Y en el recuento con un valor de ($p= 0,77$).

Figura 1. Valores de la mediana del porcentaje de UFC según el tipo de microorganismo.

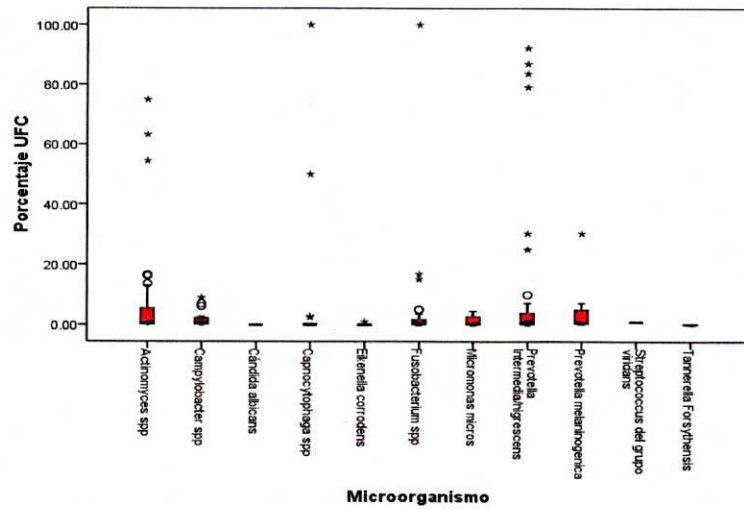
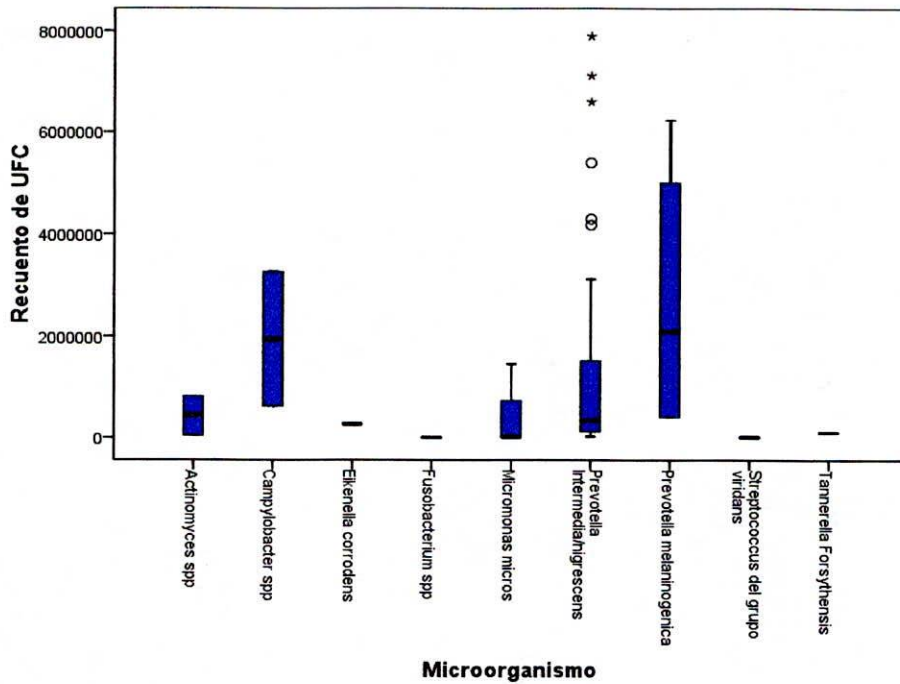


Figura 2. Valores de la mediana del recuento de UFC según el tipo de microorganismo



En las figuras 3 y 4 se observan los recuentos y porcentajes de UFC según el complejo en donde no se encontró diferencia estadísticamente significativa en cuanto al recuento y porcentajes de UFC según el complejo.

Figura 3. Valores de la mediana del recuento de UFC según el complejo.

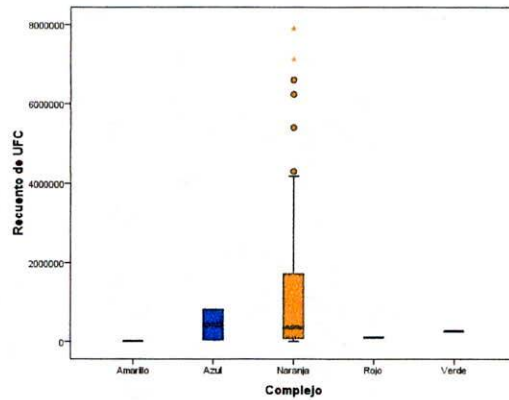
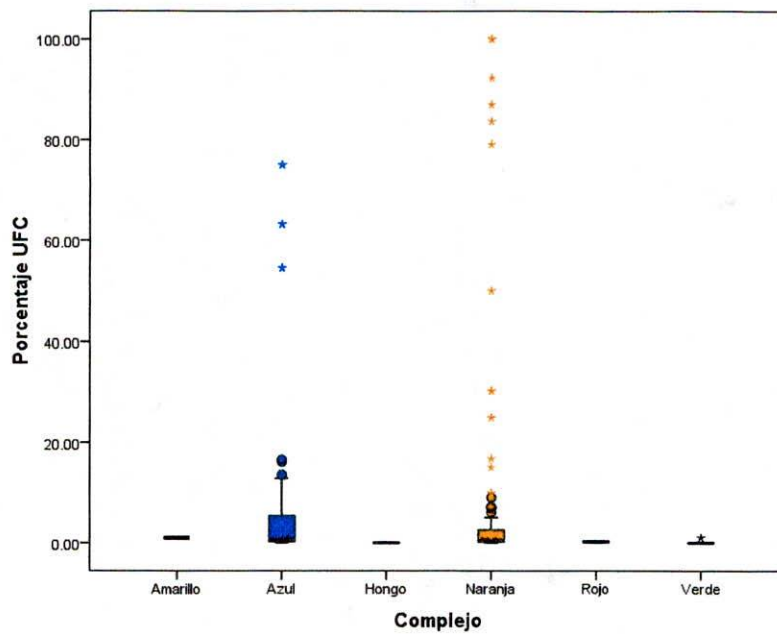


Figura 4. Valores de la mediana del porcentaje de UFC según el complejo.



En las figuras 5 y 6 se observan los recuentos y porcentajes de UFC según la zona a rehabilitar en donde no se encontró diferencia estadísticamente significativa en cuanto al recuento y porcentajes de UFC según la zona a rehabilitar.

Figura 5. Valores de la mediana de recuento de UFC según la zona a rehabilitar con implante.

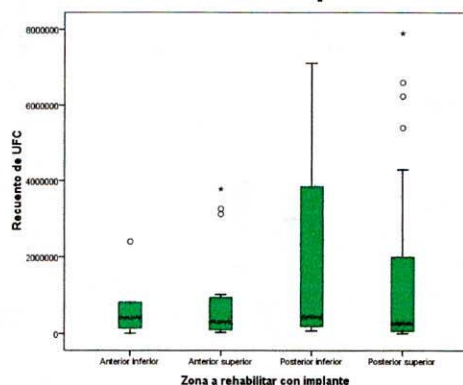
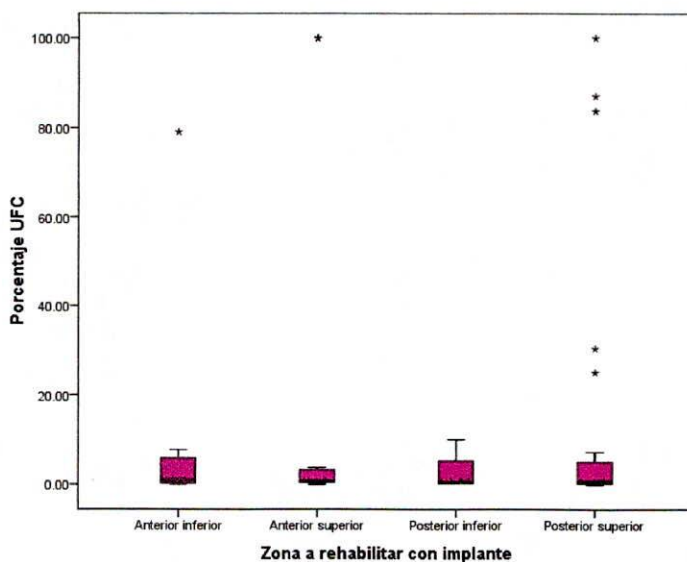


Figura 6. Valores de la mediana del porcentaje de UFC según la zona a rehabilitar con implante.



En conclusión, no se encontró diferencia estadísticamente significativa en cuanto al recuento y porcentaje de UFC con relación a microorganismos, complejos y zonas a rehabilitar.

4. DISCUSION

El cultivo selectivo es un método sencillo de identificación de microorganismos, avances técnicos recientes han permitido el uso de sondas de ADN y técnicas de amplificación para identificar el ADN de los microorganismos patógenos periodontales, estas sondas carecen de sensibilidad y la especificidad para algunos organismos; En la actualidad las pruebas que se utilizan habitualmente para la detección altamente sensible y específica de los patógenos periodontales es el PCR que tiene como objetivo el gen de una región específica del agente.⁽³²⁾

La presencia de *Tannerella Forsythensis* que pertenece al complejo rojo descrito por Socransky fue encontrado en 2 pacientes equivalente al 1,1% en el total de los 27 pacientes, lo que se correlaciona con la disminución de los integrantes de los microorganismos del complejo rojo, después de la terapia periodontal. ^(33,34).

Algunas especies subgingivales de microorganismos han demostrado relevancia en la etiología y progresión de la enfermedad periodontal tales como la *Prevotella Intermedia/nigrescens* (n= 38, 20,5%) y el *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (n=3, 5,3%). ^(33,34).

Dentro de la microflora subgingival se establecen diferentes microorganismos que no han sido agrupados de acuerdo a la clasificación de Socransky, dentro de los cuales se incluyen el *Dialister pneumosintes*, *Candida albicans*, *Bacilos entéricos*. Mombelli ⁽³⁵⁾ establece que la relación del *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* con periodontitis agresiva está condicionada por la susceptibilidad del paciente, de

igual forma la persistencia de este microorganismo después de terapias de mantenimiento puede ser justificada a la resistencia del mismo a los diferentes tratamientos.

En este estudio la presencia de *Bacilos entéricos* coincide con los reportes publicados en los estudios de (Betancourt 2006) ,el cual encontró 11,1 en pacientes con periodontitis crónica; 7,3 en pacientes con periodontitis agresiva y 5,3 de pacientes sanos, (Mayorga 2006) encontró 13,1% para pacientes con periodontitis crónica, 15,2% para periodontitis agresiva y 10% para pacientes sanos; (Contreras 2000) encontró 29,8% en pacientes sanos y una prevalencia en pacientes con periodontitis de 34,5%. ^(11,12,36).

5. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos de microflora oral obtenidos en este estudio coincide con la microflora descrita por los diversos autores en pacientes que han recibido terapia periodontal
- La evidente aparición de *Tannerella Forsythensis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* reflejan la posible correlación de su aparición en estado de salud con el postulado de Mombelli de desarrollo de patogenicidad dependiendo de la susceptibilidad de los pacientes.
- De igual forma el mismo autor cita la presencia constante de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* después de tratamientos periodontales atribuibles a la resistencia de este microorganismo a los tratamientos mecánicos y posiblemente a una resistencia a los antimicrobianos como resultado de una prescripción del medicamento sin restricción en Colombia.
- Los estudios realizados para detectar presencia de Bacilos entéricos no han sido enfocados en una población parcialmente edentula específicamente, lo cual puede ser evidente en el presente estudio.

BIBLIOGRAFIA

1. Offenbacher S, Zambon JJ. Consensus report for periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol* 1996; 1: 926 – 932.
2. Slots J, Taubman M. *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*. St Louis: Mosby – Year Book, 1992;428p.
3. Sockansky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 134 – 144.
4. Loos BG, Dyer DW, Whittman Ts, Selander Rk. Genetic structure of populations of *Porphyromonas gingivalis* associated with periodontitis and other oral infections. *Infect Immun* 1993;61: 204 – 212.
5. Maeda S, Otsuka m, Hirata Y, Mitsuno Y, Shiratori Y, Masuho Y. cDNA microarray analysis of *Helicobacter pylori*-mediated alteration of gene expression in gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 : 284: 443 – 449.
6. Paster B, Boches s, Galvin J, Erickson R, Lau C, Ilevanos V. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001: 183:3770 – 3783.
7. Sigmund S, Sockansky & Anne D. Haffajee, Dental biofilms: difficult therapeutic targets, *periodontology* 2000, Vol. 28, 2002, 12 – 55.

8. Wolinsky LE, de Camargo PM, Erard JC, Newman MG. A study of in Vitro attachment of *Streptococcus sanguis* and *Actinomyces viscosus* to saliva treated titanium. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1989; 4: 27-31.

9. Drake DR, Paul J, Keller JC. Primary bacterial colonization of implant surface. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999; 14: 226-232.

10. Informational Paper, The Pathogenesis of Periodontal Diseases, *J Periodontol* 1999;70:457-470.

11. Adolfo contreras, Gloria Lafaurie. Demographic, Clinical, and Microbial Aspects of Chronic and Aggressive Periodontitis in Colombia: A Multicenter Study *JCP* abril 2007.

12. Marisol Betancourth, Roger Arce, Javier Botero, Adriana Jaramillo, Carlos Cruz, Adolfo Contreras 2006 *Microorganismos inusuales en surcos y bolsas periodontales, Colombia Medica: Vol 37 No.1* 2006.

13. Chow AW, Roser SM, Brady FA. Orofacial odontogenic infections. *Ann Intern Med* 1978; 88: 392-402.

14. Järvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M. Candida yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. *Oral Dis* 2004; 10: 106-112.
15. Slots J, Rams TE, Listgarten MA. Yeasts, enteric rods and pseudomonads in the subgingival flora of severe adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1988; 3: 47-52.
16. Reynaud AH, Nygaard-Ostby B, Boygard GK, Eribe ER, Olsen I, Gjermo P. Yeasts in periodontal pockets. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 860-864.
17. Rams TE, Babalola OO, Slots J. Subgingival occurrence of enteric rods, yeasts and staphylococci after systemic doxycycline therapy. *Oral Microbiol Immunol* 1990; 5: 166-168.
18. Slots J, Rams TE, Feik D, Taveras HD, Gillespie GM. Subgingival microflora of advanced periodontitis in the Dominican Republic. *J Periodontol* 1991;62:543-7.
19. Barbosa FC, Mayer MP, Saba-Chuifi E, Cai S. Subgingival occurrence and antimicrobial susceptibility of enteric rods and pseudomonads from Brazilian periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16:306-10.

20. Cortelli JR, Cortelli SC, Jordan S, Haraszthy VI, Zambon JJ. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005;32:860-6.
21. Klein MI, Goncalves RB. Detection of *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) and *Porphyromonas gingivalis* by polymerase chain reaction in subjects with different periodontal status. *J Periodontol* 2003; 74:798-802.
22. Gajardo M, Silva N, Gómez L, León R, Parra B, Contreras A et al. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J Periodontol* 2005;76:289-94.
23. López NJ. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in progressive adult periodontitis. *J Periodontol* 2000;71:948-54.
24. López NJ, Mellado JC, Leighton GX. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia* in juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol* 1996;23:101-5.
25. Nogueira MA, Fernandez CL, Furman C, Chiappe V, Marcantoni M, Bianchini H. Clinical and microbiological study of adult periodontal disease. *Rev Argent Microbiol* 2001;33:133-40.

26. Wilson M. Bacterial biofilms and human disease. *Sci Prog* 2001;84: 235-54.
27. Poyato – Ferrera M., Egea JJ, Bullon- Fernandez P, Comparison of Modified bass Technique with Normal Toothbrushing Practices for Efficacy in Supragingival Plaque Removal. *Int Journal Dent*, 2.003 May; 1 : 110 – 114.
28. Callan D, Cobb C, Williams K. Dna probe identification of bacteria colonizing internal surfaces of the implant-abutment interface: a preliminary study. *J Periodontol* 2005; 76: 115-120.
29. Mombelli A, Marxer M, Gaberthuel T, Grunder U, Lang NP. The microbiota of osseointegrated implants in patients with a history of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1995;22:124-30.
30. Wood MR, Vermilyea SG. A review of selected literature on evidence-based treatment planning for dental implants:report of the Comitee on Research in Fixed Prosthodontics of the Academy of Fixed Prosthodontics. *J Prosthet Dent* 2004;92:5: 447-462.
31. Quirynen M, Listgarten MA. Distribution of bacterial morphotypes around natural teeth and titanium implants ad modum Branemark. *Clin Oral Implants Res* 1990;1:8-12.

32. Makoto Umeda, Yasuo takeuchi, Kazuyuki noguchi, Effects of nonsurgical periodontal therapy on the microbiota, *periodontology* 2000, vol.36, 2004, 98 – 120.
33. Stefan Renvert & G. Rutger Persson, Supportive periodontal therapy, *Periodontology* 2000, Vol.36, 2004, 179 – 195.
34. Anne D, Haffajee, Ricardo P. Teles & Sigmund S. Sockansky, The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota, *Periodontology* 2000, Vol.42, 2006, 219 – 258.
35. Mombelli A, Maxer M, Gabethiel T, Grunder V, Lang NP. The microbiota of osseointegrated implants in patients with a history of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 124-130.
36. Sedgley CM, Sammaranayake LP, Chan JCY. 4 – year longitudinal study of the oral prevalence of enteric Gram-negative rods and yeasts in Chinese children. *Oral Microbiol Immunol* 1997; 12: 183 – 188.