

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Estomatología III (Medicina y Cirugía Bucofacial)



**Análisis de la composición microbiana del biofilm
subgingival en pacientes dominicanos con
periodontitis crónica**

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

TUTOR

Dra. Elena Figuero Ruiz

AUTOR

Sofía China Schiermeyer

Madrid, 2017

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
2. JUSTIFICACIÓN	10
3. HIPÓTESIS	11
4. OBJETIVOS	12
5. MATERIAL Y MÉTODOS	13
6. RESULTADOS	19
7. DISCUSIÓN	25
8. CONCLUSIONES	35
9. BIBLIOGRAFÍA	36

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedades periodontales

Las enfermedades periodontales son un conjunto de enfermedades de origen infeccioso que cursan con la inflamación de los tejidos de soporte de los dientes. Son actualmente patologías altamente prevalentes a nivel mundial (Philstrom y cols. 2005; Papapanou 2012), y suponen uno de los factores más importantes para la pérdida dentaria (Kassebaum y cols. 2014; Petersen y cols. 2012; Heitz-Mayfield y cols. 2003; Schatzle y cols. 2003).

La periodontitis severa fue en 2010 la sexta patología más prevalente, afectando a un 11,2% de la población mundial (743 millones de personas). Esta prevalencia aumenta con la edad, alcanzando su pico máximo a partir de los 40 años, sin diferencias significativas entre hombres y mujeres. Los datos de incidencia de ese mismo año señalan que se diagnosticaron 701 nuevos casos por cada 100.000 habitantes de la población mundial. En Europa la prevalencia en 2010 es de 11,8% y la incidencia de 743,3 por cada 100.000 habitantes (Kassebaum y cols. 2014).

La clasificación actualmente más extendida de las enfermedades periodontales es la de la Asociación Americana de Periodoncia de 1999 (Armitage 1999). En ella se hace una clara distinción entre las enfermedades gingivales y la periodontitis. Las enfermedades gingivales o gingivitis son una reacción inflamatoria reversible de los tejidos periodontales. Por otro lado, las periodontitis se caracterizan por una reacción inflamatoria crónica con destrucción del aparato de soporte del diente (periodonto). En particular, la periodontitis se caracteriza por la formación de bolsas periodontales y/o

recesiones gingivales. Es el tipo de periodontitis más frecuente y, aunque suele ser más común en adultos, puede comenzar a cualquier edad. La prevalencia y la severidad de la periodontitis crónica aumentan con la edad y tanto la cantidad de dientes afectados como la progresión pueden ser muy variables. Además, la periodontitis crónica se puede clasificar según su severidad y extensión. La extensión es el número de localizaciones afectadas y, como norma general, hablamos de periodontitis localizada cuando se afecta el 30% o menos de la dentición, y de generalizada cuando es más del 30%. En cuanto a la severidad, esta se puede definir para toda la dentición o para localizaciones concretas y, en líneas generales, se valora según el nivel de inserción clínica, y se considera leve cuando existe de 1 a 2mm de pérdida de inserción, moderada cuando es de 3 a 4mm y severa a partir de 5mm (Armitage 1999).

El factor etiológico primario de la periodontitis es la presencia de bacterias organizadas en biofilm, que se desarrollan como comunidades interactivas de microorganismos. Las relaciones entre las bacterias embebidas en un biofilm pueden ser de simbiosis, cuando existe una relación beneficiosa entre las bacterias que conforman el biofilm y entre estas y el hospedador, o esta relación puede ser de disbiosis, que consiste en un cambio en la comunidad de microorganismos asociada con salud, y esto resulta en la aparición de una patología (Sanz y cols. 2017).

En el biofilm asociado a periodontitis, el fluido crevicular es una fuente principal de nutrientes para los microorganismos que los conforman, que se caracteriza por especies proteolíticas y anaerobios. Para facilitar su supervivencia, algunos microorganismos son capaces de esquivar la respuesta del hospedador mediante la liberación de ciertas moléculas tales como leucotoxinas o proteinasas, y algunos de estos microorganismos incluso son

capaces de adaptarse a un ambiente alterado por la respuesta inmune, y se denominan por ello “inflamófilos” (Hajishengallis 2014).

En pacientes con periodontitis, se consideraba que la estructura del biofilm se componía principalmente de bacterias Gram negativas y proteolíticas. Ciertas bacterias se consideraban patógenos principales, tales como *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. No obstante, se ha observado recientemente que esta estructura del biofilm y la organización de los microorganismos en periodontitis se basa en un modelo de disbiosis.

La disbiosis consiste en la pérdida o reducción de organismos potencialmente beneficiosos para el hospedador que se suelen encontrar en estado de salud. En asociación con periodontitis, la disbiosis se caracteriza por un aumento en la diversidad de microorganismos, que puede ser el resultado de una débil respuesta inmune local, aumento de la disponibilidad de nutrientes especialmente en el fluido crevicular, o por la aparición de nichos como la bolsa periodontal (Dewhirst y cols. 2010, Camelo-Castillo y cols. 2015).

No obstante, no se descartan aquellos casos en los que la periodontitis puede deberse a la acción específica de un microorganismo, como es el caso del clon JP2 de *A. actinomycetemcomitans* en casos de periodontitis agresiva (Haubek y cols. 2008).

En general, las comunidades de microorganismos relacionadas con periodontitis tienen la capacidad de resistir la respuesta inmune e inflamatoria para permanecer en un ambiente de anaerobiosis y aprovechar la disponibilidad de nutrientes que ofrecen el fluido gingival crevicular y la sangre (Sanz y cols. 2010).

Aunque la organización en el biofilm y el estado de disbiosis actúan como elementos clave en el inicio de la periodontitis, la destrucción de los tejidos periodontales se produce como consecuencia de la respuesta inmunitaria desencadenada en el huésped. Las células que conforman el sistema inmune, como los leucocitos activados a nivel gingival, son responsables de la generación de mediadores inflamatorios, tales como citoquinas, prostaglandinas y metaloproteinasas, que promueven la destrucción de los tejidos periodontales; se reduce la proporción de linfocitos polimorfonucleares y se activan otras células como las células dendríticas de Langerhans y linfocitos intraepiteliales. Estas células presentan antígenos bacterianos a células T CD4 y CD8, activando la respuesta inmune adaptativa y perpetuando un estado de inflamación y destrucción de tejido (Sanz y cols. 2017).

A esta interacción compleja entre la infección bacteriana y la respuesta del sistema inmune del hospedador se le suma la influencia de factores de riesgo genéticos y adquiridos, considerándose por ello la periodontitis una enfermedad multifactorial (Page & Korman 1997; Page y cols. 1997; Sanz y cols. 2010).

1.2 Prevalencia de periodontopatógenos

Varios estudios, usando principalmente el cultivo microbiológico para el análisis de las muestras, han intentado asociar la presencia de diferentes patógenos con el diagnóstico de periodontitis, mostrando una gran variedad de resultados en diferentes poblaciones y entornos (Moore 1987; Van Winkelhoff y cols. 1996; Van Winkelhoff y cols. 1994; Haffajee y cols. 1999).

Pocos investigadores han realizado estudios detallados de la microflora asociada a periodontitis en poblaciones diferentes a nivel geográfico o étnico usando los mismos métodos de análisis microbiológico. Uno de estos estudios (Sanz y cols. 2000), comparó pacientes con periodontitis en España y en los

Países Bajos, y se encontraron diferencias importantes en los perfiles microbiológicos. *A. actinomycetemcomitans* resultó ser más prevalente en los pacientes holandeses (23% versus 3%), mientras que *P. gingivalis* resultó ser más prevalente en los pacientes españoles (65% versus 37%). Para explicar estas diferencias, además de la posible asociación con el perfil genético de los pacientes, también resulta factible considerar la diferencia en el uso de antibióticos en estos dos países. Mientras que los Países Bajos es uno de los más restrictivos en Europa, España se encuentra entre los países más permisivos en cuanto a la prescripción de estos medicamentos. Esta hipótesis es respaldada por el mismo grupo de investigación, que observaron que la concentración mínima inhibitoria de antibióticos usados comúnmente para patógenos periodontales era mayor en España que en los Países Bajos (van Winkelhoff y cols. 2005).

En otro estudio, se comparó, mediante la técnica de hibridación en tablero de ajedrez, la microbiota asociada a periodontitis en pacientes de Estados Unidos, Suecia, Brasil y Chile. Se observó que 13 de las 40 especies incluidas en el análisis diferían entre los diferentes países. *P. gingivalis* y *T. denticola* se encontraron en un 6,6%, 1,6%, 7,5% y 11,9% respectivamente, y 2,3%, 0,8%, 6,7% y 4,2% respectivamente en sujetos de Estados Unidos, Suecia, Brasil y Chile. Por otro lado, en el caso de *T. forsythia* su prevalencia no difirió entre países, con un rango de entre 6,2 a 8,5% (Haffajee y cols. 2004).

En particular, en Latinoamérica, el “complejo rojo” de bacterias (*P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola*) se encuentra en niveles elevados en pacientes procedentes de América Latina con periodontitis (Gajardo y cols. 2005; Herrera y cols. 2008) Especialmente bacterias negropigmentadas de la especie *Porphyromonas* y *Prevotella* son detectadas en pacientes con periodontitis (58%), gingivitis (37%) y pacientes sanos (15%) (Cortelli y cols. 2005). La

mayoría de los estudios microbiológicos en estos países se centran en el estudio de las bacterias pertenecientes a este “complejo rojo”, con atención especial a *P. gingivalis*. Este microorganismo en particular presenta una prevalencia del 89% en pacientes con periodontitis, 30% en pacientes con gingivitis y 8% en pacientes periodontalmente sanos (Missailidis y cols. 2004).

No obstante, estas cifras no se pueden generalizar, como se observa en un estudio realizado por Herrera y cols. 2008 en el que se analizó la microbiota de pacientes con periodontitis crónica en Colombia y en Chile y también en España. Los pacientes de Colombia presentaban periodontitis más severa, mayores recuentos totales de bacterias y niveles elevados de *P. gingivalis* y enterobacterias Gram negativas. En Chile los pacientes tenían una mayor prevalencia de *Parvimonas micra* y *Eikenella corrodens* mientras que los recuentos de *A. actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *T. forsythia* y *Capnocytophaga spp.* eran más bajos. En los pacientes españoles, sin embargo, se detectó una total ausencia de enterobacterias Gram negativas y niveles elevados de *P. intermedia* (97,2%) (Herrera y cols. 2008).

En particular, en República Dominicana, solo se han realizado dos estudios hasta la fecha que analizan la microflora subgingival en pacientes dominicanos con periodontitis, y ambos presentan resultados diferentes. Slots y cols. en el año 1991 realizaron el primer estudio en el que, mediante el examen microscópico directo, se observó que organismos no móviles y cocos comprendían el 85% de microorganismos totales y las espiroquetas solo representaban el 3%. El cultivo no selectivo mostró un 53% de organismos Gram negativos, 15% de *Fusobacterium nucleatum*, 7% de anaerobios negropigmentados y 10% de *P. micra* (Slots y cols. 1991).

Por el contrario, en un estudio reciente, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se detectó una prevalencia de bacterias del “complejo rojo” de aproximadamente el 90% en pacientes con periodontitis crónica, especialmente *T. forsythia*, lo que difiere de lo descrito en otros países de América Latina.

2. JUSTIFICACIÓN

La distribución de las distintas especies de patógenos periodontales varía entre distintas localizaciones geográficas y entre distintos grupos étnicos. Debido a estas variaciones y para crear un enfoque terapéutico individualizado y dirigido por el diagnóstico microbiológico, es necesario tener información acerca de la prevalencia de los patógenos asociados a periodontitis.

En la República Dominicana, no se ha realizado ningún estudio de cultivo microbiológico con medios específicos para la detección de los principales patógenos periodontales en el biofilm subgingival de pacientes con periodontitis crónica. Los datos obtenidos hasta ahora son escasos y contradictorios y no existe evidencia clara acerca de cuál es la prevalencia de dichos patógenos en esta población determinada.

3. HIPÓTESIS

En pacientes de la República Dominicana con periodontitis crónica, la prevalencia de la mayoría de patógenos periodontales es similar a otros países de América Latina, con una mayor prevalencia de patógenos periodontales pertenecientes al complejo rojo, tales como *P. gingivalis* y *T. forsythia*.

4. OBJETIVO

Determinar la composición microbiana (recuentos, proporción y prevalencia) de los principales patógenos presentes en el biofilm subgingival en pacientes dominicanos con periodontitis crónica.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Diseño del estudio:

Se diseñó un estudio transversal descriptivo que fue aprobado por el comité ético de la Universidad Pontificia Católica Madre y Maestra (PUCMM), Santo Domingo.

5.2. Selección de sujetos.

Se seleccionaron sujetos que acudían a la clínica de estomatología del Campus Santo Tomás de Aquino de la Universidad Pontificia Católica Madre y Maestra (PUCMM), Santo Domingo. Tras determinarse el cumplimiento de los criterios de inclusión, ser adecuadamente informados y dar su consentimiento fueron incluidos en el estudio.

5.3. Criterios de inclusión:

- Criterios demográficos:
 - Pacientes mayores de 18 años.
 - No fumadores.
- Criterios clínicos:
 - Al menos 15 dientes presentes.
 - Al menos 3 localizaciones interproximales no contiguas con profundidad de sondaje (PS) ≥ 4 mm.

5.4. Criterios de exclusión:

- Criterios clínicos:

- Haber recibido terapia periodontal en los 12 meses previos al ingreso en el estudio.
- Criterios médicos:
 - Tabaquismo.
 - Sujetos con enfermedad sistémica o condición que pudiera afectar a la respuesta de los tejidos gingivales o a la capacidad de ejecutar un adecuado control de placa (embarazo, diabetes, alteraciones cuantitativas o cualitativas en células polimorfonucleares, otros trastornos inmunológicos, etc.).
 - Tratamiento con anti-inflamatorios de larga duración.
 - Necesidad de profilaxis antibiótica para realizar el examen periodontal.
 - Haber recibido terapia con antibióticos en los 6 meses previos al estudio.

5.5. Registro de variables clínicas.

Se realizó una exploración periodontal completa para determinar si el paciente cumplía los criterios de inclusión/exclusión señalados. Aquellos pacientes que cumplían los criterios de inclusión, recibieron información sobre el objetivo del estudio y se les invitó a participar mediante la firma de un consentimiento informado.

Las variables clínicas registradas fueron:

- Profundidad de sondaje (PS) y recesión (REC) en milímetros. El nivel de inserción clínica (NIC) se calculó mediante la suma de la profundidad de sondaje y la recesión.

- Índice de placa (IP), detectable visualmente o con sonda periodontal como presente/ausente.
- Sangrado al sondaje (BOP), detectado como presente/ausente 30 segundos después del sondaje.
- Sangrado al sondaje (BOP), detectado como presente/ausente 30 segundos después del sondaje.
- Número de dientes presentes.

Estos datos se emplearon para establecer el diagnóstico periodontal de cada sujeto.

5.6. Toma de muestra de fluido crevicular gingival (FCG).

En cada paciente se seleccionó la localización más accesible con la mayor profundidad de sondaje y sangrado al sondaje de cada cuadrante (Mombelli et al. 1991).

Tras la eliminación cuidadosa de los depósitos de placa supragingival, se aislaron las zonas de interés mediante rollos de algodón y secado con aire. Se introdujeron dos puntas de papel estériles (tamaño medio, Maillefer, Ballaigues, Suiza) de forma consecutiva en la profundidad de la bolsa o del surco periodontal y se dejaron en esa posición durante 10 segundos. Las puntas de papel de las cuatro localizaciones seleccionadas se introdujeron en un único vial con 2 ml de fluido de transporte reducido (RTF) (Sanz et al. 2000).

Las muestras obtenidas se almacenaron a 4°C y se mantuvieron a esta temperatura durante el transporte al laboratorio de investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid. Las muestras fueron analizadas en un periodo de 24 a 36 horas después de que fueran tomadas.

5.7. Procesado de las muestras microbiológicas

Las muestras fueron procesadas mediante cultivo microbiológico en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Odontología (Universidad Complutense, Madrid).

Se vorteo el vial dónde se encontraban las puntas de papel durante 30 segundos y se prepararon diluciones seriadas 1:10 en PBS (phosphate-buffered saline). De cada dilución se plaquearon 100 μ l en medio agar no selectivo (Oxoid no 2; Oxoid, Basingstoke, UK), suplementado con sangre de caballo al 5%, hemina (5mg/l) y menadiona (1mg/l) para la determinación del recuento total de anaerobios y para la identificación de los patógenos bacterianos específicos.

Para el recuento de *A. actinomycetemcomitans*, las muestras también se plaquearon en placas de medio Denta-1 (Alsina et al. 2001).

Después de 7-14 días de incubación anaeróbica (80% de N₂, 10% CO₂ y 10% de H₂), los recuentos totales y los recuentos de colonias representativas (aquellos con morfologías de colonias que sean compatibles con la morfología del agente patógeno diana) se llevaron a cabo en aquellas placas que albergaran entre 30-300 colonias.

Las colonias sospechosas se identificaron además por microscopía, el estudio de la tinción de Gram y la actividad enzimática (incluyendo N-acetil- β -D-glucosaminidasa, α -glucosidasa, α -galactosidasa, α -fucosidasa, esculina, indol y la actividad de tipo tripsina). Los recuentos de colonias se expresaron en unidades formadoras de colonias (UFC) por ml de muestra original. Los recuentos totales de anaerobios fueron calculados, así como la cantidad de los patógenos periodontales detectados (*A. actinomycetemcomitans*, *P.*

gingivalis, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *P. micros*, *C. rectus*, *F. nucleatum*, *Capnocytophaga spp.*, *E. corrodens*).

5.8. Análisis estadístico

Unidad de análisis: el paciente

Variables objeto de estudio:

- a. Como variables clínicas se analizaron profundidad de sondaje, recesión, sangrado al sondaje, índice de placa y nivel de inserción clínico.

- b. Como variables microbiológicas, se analizaron las siguientes variables:
 - **Recuento total de patógenos**: el total de patógenos anaerobios presentes en las muestras fue calculado a partir de los recuentos totales presentes en las placas agar sangre y Dentaid-1, multiplicados por el factor dilución. Estos resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml).
 - **Recuento individual de cada patógeno**: fue calculado a partir de los recuentos individuales de los patógenos presentes en las placas agar sangre y Dentaid-1, multiplicándolo por el factor de dilución. Los resultados se reflejaron en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml).
 - **Proporción media de cada patógeno**: tras la identificación y recuento de los patógenos periodontales, también fue calculada la proporción que presentaba cada uno de ellos respecto al recuento total de la flora anaerobia, expresado en porcentaje (%).

- **Prevalencia de cada patógeno:** definida como el porcentaje de pacientes que albergan el microorganismo en relación al total de muestras positivas (%).

Se realizó estadística descriptiva presentando los valores de media y desviación estándar (DE) para todos los valores analizados.

6. RESULTADOS

6.1. Descripción de la muestra y características clínicas periodontales:

Las variables clínicas registradas en los pacientes se resumen en la siguiente tabla (Tabla 1):

	Media	DE
IP global (%)	58,64	32,02
Nº dientes	21,65	3,94
PS Global (mm)	2,63	0,62
- <i>PS Superior (mm)</i>	2,93	0,78
- <i>PS Inferior (mm)</i>	2,35	0,59
- <i>PS Interproximal (mm)</i>	2,92	0,69
- <i>PS Superficies libres (mm)</i>	2,04	0,55
REC Global (mm)	0,38	0,79
- <i>REC superior (mm)</i>	0,31	0,80
- <i>REC inferior (mm)</i>	0,45	0,83
- <i>REC interproximal (mm)</i>	0,24	0,80
- <i>REC superficies libres (mm)</i>	0,67	0,82
CAL global (mm)	3,01	1,15
- <i>CAL superior (mm)</i>	3,25	1,25
- <i>CAL inferior (mm)</i>	2,80	1,20
BOP global (%)	49,86	26,93
- <i>BOP superior (%)</i>	55,34	25,62
- <i>BOP inferior (%)</i>	44,60	30,61
- <i>BOP interproximal (%)</i>	49,48	29,27
- <i>BOP superficies libres (%)</i>	50,64	26,63

Tabla 1. Variables clínicas. (BOP: sangrado al sondaje; DE: desviación estándar; IP: índice de placa; PS: profundidad de sondaje; REC: recesión; CAL: nivel de inserción clínica).

Como podemos observar, la profundidad de sondaje media global es de 2,63mm con una desviación estándar de 0,62mm. En cuanto a la recesión, la media es de 0,38mm con una desviación estándar de 0,79mm. Por otro lado, los datos obtenidos muestran un índice de placa del 58,64% (DE=32,02%) y la media de sangrado al sondaje es 49,86% (DE=26,93%).

6.2. Prevalencia de detección

n=28	Aa	Pg	Pi	Pm	Fn	Tf	Cr	Ec	Capnoc sp.
Prevalencia (n)	3	24	26	7	19	18	3	8	3
Prevalencia (%)	11	86	93	25	68	64	11	29	11

Tabla 2. Prevalencia de cada patógeno. (Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; Capn: *Capnocytophaga*; Cr: *Campylobacter rectus*; Ec: *Eikenella corrodans*; Fn: *Fusobacterium nucleatum*; Pi: *Prevotella intermedia*; Pg: *Porphyromonas gingivalis*; Pm: *Parvimonas micra*; Tf: *Tannerella forsythia*).

En relación a los resultados de **la prevalencia de cada bacteria** (porcentaje de sujetos positivos para cada bacteria) podemos analizarlos en la Tabla 2 y Figura 1. El 93% de los pacientes presentaban *P. intermedia*, el 86% de ellos *P. gingivalis*, el 68% de los pacientes presentaban *F. nucleatum* y el 64% *T. forsythia*. Si continuamos en orden decreciente, el 29% de los pacientes presentaban *E. corrodans*, 25% presentaban *P. micra*, y finalmente, tanto *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus* como *Capnocytophaga spp* se presentaban en un 11% de los pacientes.



Figura 1. Prevalencia de cada patógeno. (Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; Capn: *Capnocytophaga*; Cr: *Campylobacter rectus*; Ec: *Eikenella corrodans*; Fn: *Fusobacterium nucleatum*; M: *media*; Pi: *Prevotella intermedia*; Pg: *Porphyromonas gingivalis*; Pm: *Parvimonas micra*; Tf: *Tannerella forsythia*)

6.3. Recuento total e individual de patógenos

En los pacientes analizados en el estudio, se determinó un **recuento total de bacterias anaerobias** de $1,16 \times 10^7$ (DE = $1,41 \times 10^7$) (UFC/ml).

RECUELTOS (UFC/ml) <i>n</i> =28	Media (DE)
Flora bacteriana total	$1,16 \times 10^7$ ($1,41 \times 10^7$)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	$1,33 \times 10^4$ ($6,80 \times 10^4$)
<i>P. gingivalis</i>	$2,68 \times 10^6$ ($5,73 \times 10^6$)
<i>P. intermedia</i>	$5,42 \times 10^5$ ($4,04 \times 10^4$)
<i>T. forsythia</i>	$4,09 \times 10^5$ ($7,47 \times 10^5$)
<i>P. micra</i>	$2,28 \times 10^4$ ($5,34 \times 10^4$)
<i>C. rectus</i>	$2,86 \times 10^4$ ($8,97 \times 10^4$)
<i>F. nucleatum</i>	$1,37 \times 10^5$ ($2,01 \times 10^5$)
<i>Capnocytophaga spp.</i>	$2,54 \times 10^4$ ($1,00 \times 10^5$)
<i>E. corrodens</i>	$2,50 \times 10^4$ ($5,06 \times 10^4$)

Tabla 3. Recuento total e individual de cada patógeno (Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; Capn: *Capnocytophaga*; Cr: *Campylobacter rectus*; DE: desviación estándar; Ec: *Eikenella corrodens*; Fn: *Fusobacterium nucleatum*; M: media; Pi: *Prevotella intermedia*; Pg: *Porphyromonas gingivalis*; Pm: *Parvimonas micra*; Tf: *Tannerella forsythia*)

En cuanto al **recuento individual de cada bacteria** (UFC/ml), como podemos observar en la Figura 2, la bacteria detectada en mayor cantidad es *P. gingivalis* con $2,68 \times 10^6$ UFC/ml (DE = $5,73 \times 10^6$). En segundo lugar, se encuentra *P. intermedia* $5,42 \times 10^5$ (DE = $4,04 \times 10^4$), seguida de *T. forsythia* cuya cantidad es de $4,09 \times 10^5$ (DE = $7,47 \times 10^5$) y *F. nucleatum* $1,37 \times 10^5$ (DE = $2,01 \times 10^5$). En

menor cantidad se detecta *C. rectus* con $2,86 \times 10^4$ (DE = $8,97 \times 10^4$), de, *Capnocytophaga spp.* con $2,54 \times 10^4$ (DE = $1,00 \times 10^5$) y la cantidad de *E. corrodens* es $2,5 \times 10^4$ (DE = $5,06 \times 10^4$). Menor aún es la cantidad detectada de *P. micra* que es de $2,28 \times 10^4$ (DE = $5,34 \times 10^4$), y *A. actinomycetemcomitans* $1,33 \times 10^4$ UFC/ml (DE = $6,8 \times 10^4$).

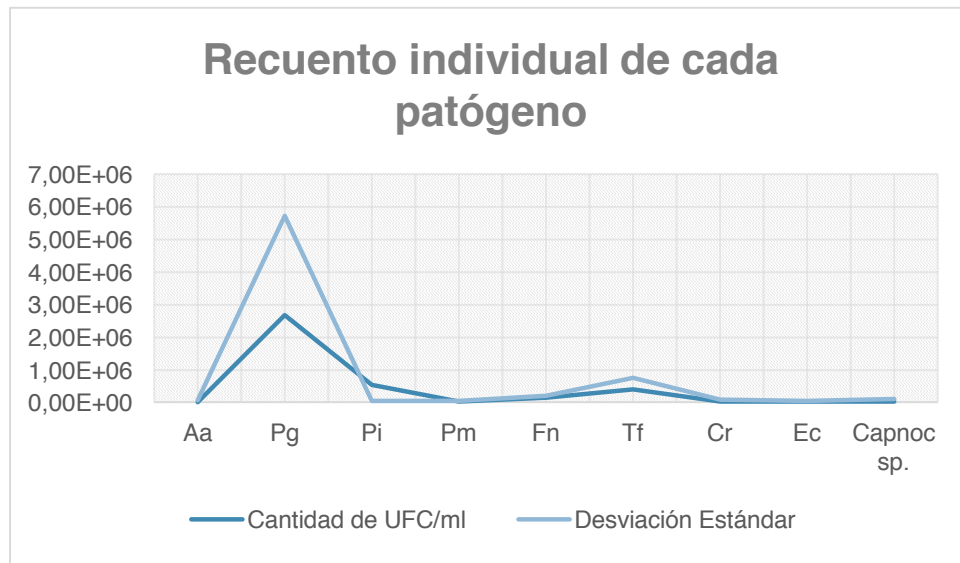


Figura 2. Recuento individual de cada patógeno (UFC/ml). (Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; Capn: *Capnocytophaga*; Cr: *Campylobacter rectus*; DE: desviación estándar; Ec: *Eikenella corrodans*; Fn: *Fusobacterium nucleatum*; M: media; Pi: *Prevotella intermedia*; Pg: *Porphyromonas gingivalis*; Pm: *Parvimonas micra*; Tf: *Tannerella forsythia*)

6.4. Proporción media

<i>n=28</i>	<i>Aa</i>	<i>Pg</i>	<i>Pi</i>	<i>Pm</i>	<i>Fn</i>	<i>Tf</i>	<i>Cr</i>	<i>Ec</i>	<i>Capnoc sp.</i>
Proporción Media (%)	0,41	16,95	4,81	1,15	2,28	2,48	0,18	0,52	0,28
Desviación Estándar	2,12	17,58	6,09	3,42	2,67	5,15	0,61	1,44	1,19

Tabla 4. Proporción Media. (*Aa*: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Capn*: *Capnocytophaga*; *Cr*: *Campylobacter rectus*; *DE*: desviación estándar; *Ec*: *Eikenella corrodans*; *Fn*: *Fusobacterium nucleatum*; *M*: media; *Pi*: *Prevotella intermedia*; *Pg*: *Porphyromonas gingivalis*; *Pm*: *Parvimonas micra*; *Tf*: *Tannerella forsythia*)

En cuanto a la **proporción media de cada bacteria**, y como podemos analizar en la Figura 3, se encuentra en mayor proporción *P. gingivalis* con un porcentaje del 16,95% (DE = 17, 58), seguida de *P. intermedia* con un resultado del 4,81% (DE = 6,09) y *T. forsythia* con 2,48% (DE = 5,15). En menor proporción media se detecta *F. nucleatum* 2,28% (DE = 2,67) y *P. micra* con 1,15% (DE = 3,42). Las menores proporciones medias son las pertenecientes a para *E. corrodans* 0,52% (DE = 1,44), *Capnocytophaga spp.* 0,28% (DE = 1,19), *A. Actinomycetemcomitans* 0,41% (DE = 2,12) y *C. rectus* 0,18% (DE = 0,61).

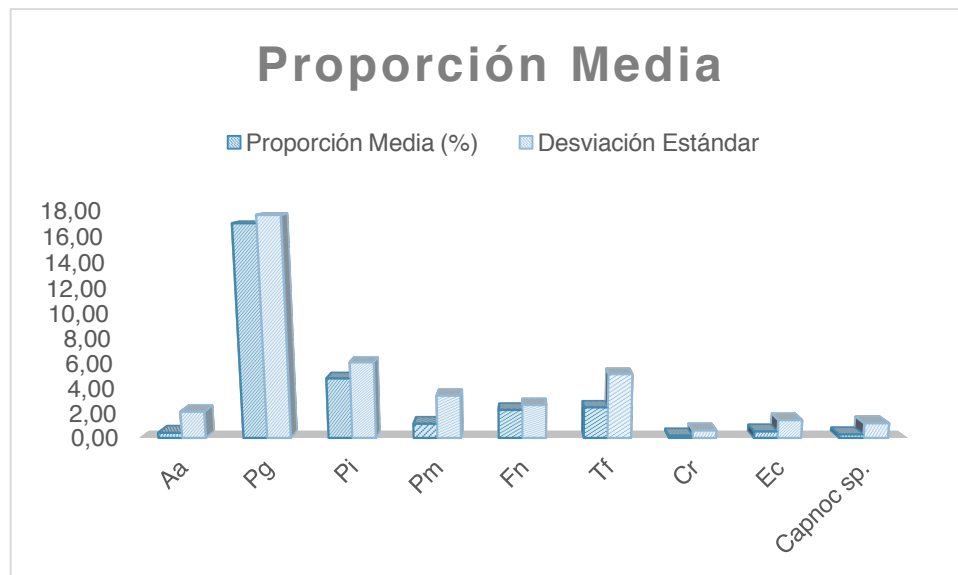


Figura 3. Proporción Media. (*Aa*: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Capn*: *Capnocytophaga*; *Cr*: *Campylobacter rectus*; *DE*: desviación estándar; *Ec*: *Eikenella corrodans*; *Fn*: *Fusobacterium nucleatum*; *M*: media; *Pi*: *Prevotella intermedia*; *Pg*: *Porphyromonas gingivalis*; *Pm*: *Parvimonas micra*; *Tf*: *Tannerella forsythia*)

7. DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue evaluar la composición microbiana y prevalencia de los principales patógenos presentes en el biofilm subgingival de pacientes con periodontitis crónica de Santo Domingo.

Se observó que el patógeno más prevalente en estos pacientes es *P. intermedia* (93%). A su vez, los patógenos pertenecientes al complejo rojo, *P. gingivalis* y *T. forsythia*, también se detectaron frecuentemente, con una prevalencia del 86 y 93% respectivamente.

A la hora de comparar los resultados obtenidos en este estudio, es importante recalcar que son pocos los estudios que se han realizado analizando la composición microbiana subgingival en pacientes latinoamericanos (Lopez 2004; Gajardo y cols. 2005; Ximenez-Fyvie y cols. 2006, Botero y cols. 2007, Lafaurie y cols. 2007, Herrera y cols. 2008) y aún menos estudios que evalúan la microbiota subgingival de pacientes dominicanos (Slots y cols. 1991; Collins y cols. 2016). Debido a esto, el estudio de la microbiota subgingival en determinados países es relevante no solo para entender las implicaciones en la patogénesis de la periodontitis sino también para identificar su posible influencia en el resultado del tratamiento.

Por otro lado, es difícil realizar comparaciones y asociaciones directas porque los estudios incluyen poblaciones dispares y diferentes métodos microbiológicos para el análisis de las muestras. Por ello, no está claro si las diferencias geográficas son las que causan la variabilidad de prevalencia o si es una consecuencia de diferencias metodológicas.

Existe una amplia variedad de métodos para el análisis de la microbiota subgingival, cada uno con sus ventajas e inconvenientes. Actualmente, se encuentran en uso el cultivo con medios específicos, técnicas de hibridación de ADN como es la hibridación en tablero de ajedrez, detección mediante inmunofluorescencia con anticuerpos específicos o con hibridación in situ (FISH), mediante PCR o mediante secuenciación de genes 16S rRNA. Los métodos varían en cuanto a su aplicabilidad y niveles de detección, aunque desde un punto de vista clínico únicamente aquellos patógenos que exceden un cierto nivel de detección pueden inducir la enfermedad.

La técnica de cultivo microbiológico con medios específicos sigue siendo a día de hoy el “gold standard” para el análisis de la microbiota subgingival. En el presente estudio se utilizó el medio Dentaaid-1 (Alsina y cols. 2001) para la detección de *A. actinomycetemcomitans* y placas de agar sangre no selectivo (Blood Agar Base II®, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), suplementado con hemina (5 mg/L), menadiona (1 mg/L) y 5% de sangre de caballo estéril. Esto permite realizar un análisis más específico de la microbiota subgingival comparado con el único estudio previo que existe, con técnica de cultivo, acerca de la microbiología de pacientes dominicanos (Slots y cols. 1991) en el que se empleó únicamente agar sangre no selectivo para el cultivo de las bacterias.

Además, es fundamental tener en consideración la técnica de toma de muestras. La razón por la que, en el presente estudio, se toman las muestras de las cuatro localizaciones más profundas de cada cuadrante está basada en evidencia de diferentes estudios, que demuestran que esta estrategia de muestreo aumenta las posibilidades de detectar los principales patógenos periodontales (Mombelli y cols. 1991; Wikström y cols. 1991). En cambio, Slots y cols. seleccionan únicamente 3 localizaciones en cada paciente para la toma

de muestras, por lo que la variedad de bacterias detectables disminuye considerablemente.

Por otro lado, cabe remarcar que la toma de muestras mediante puntas de papel permite identificar más cantidad de patógenos que, por ejemplo, muestreo mediante curetas (Sanz y cols. 2000). Otro método son las muestras de saliva, las cuales son más fáciles de recolectar y, en teoría, los niveles de patógenos periodontales en saliva podrían ser usados para detectar la presencia de periodontitis (Saygun y cols. 2011). No obstante, el nivel de un patógeno en saliva puede no corresponderse con el nivel subgingival de un determinado paciente, por lo que no siempre permitiría determinar de forma correcta la presencia o ausencia de enfermedad.

Las bacterias pertenecientes al complejo rojo, *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola*, juegan un papel importante en la patogénesis de la periodontitis (Haffajee y cols. 1998, Sanz y cols. 2000, Gajardo y cols. 2005). En el presente estudio, tanto *P. gingivalis* como *T. forsythia* fueron detectados con elevada prevalencia en la mayoría de los pacientes.

En el caso de *P. gingivalis*, se determinó una prevalencia del 86%, la cual es considerablemente más alta que la descrita en la literatura (27-51%) (Ali y cols. 1994; Dahlen y cols. 1995; Slots y cols. 1986; Van der Weijden y cols. 1994; Kornman y cols. 1991). Es también más alta que la descrita por Slots y cols., que observaron un 37% de prevalencia de esta bacteria. No obstante, una prevalencia aún mayor que la del presente estudio fue observada por Collins y cols. en pacientes con periodontitis crónica, alcanzando el 93,3%, similar a otros estudios realizados en Colombia (Botero y cols. 2007), Chile (Gajardo y cols. 2005) y España (Herrera y cols. 2008). Esta evidencia muestra que la

prevalencia de *P. gingivalis* presenta una importante variabilidad, pero sin un patrón geográfico claro.

T. forsythia en el presente estudio, se encontró una prevalencia del 68%. Esta prevalencia es menor respecto a los datos de Collins y cols., 2016 en cuyo estudio fue la bacteria más frecuentemente detectada (96,7%). No obstante, la prevalencia de esta bacteria en el presente estudio es mayor que la descrita en otros países latinoamericanos como Chile (16,2%) y Colombia (39%) (Herrera y cols. 2008). Difiere también de la prevalencia observada en algunos países europeos como Reino Unido (Ledder y cols. 2007) y España (Herrera y cols. 2008). No obstante, una prevalencia similar es descrita en los Países Bajos (73,3%) (Sanz y cols. 2000). Es probable que, en el estudio de Collins y cols., el uso de PCR permitió observar esta especie bacteriana con mayor frecuencia que en el presente estudio.

En el presente estudio, la prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* es del 11%, algo menor que el rango de prevalencia descrito en la literatura (entre 20 y 40%) aunque prevalencias más altas y más bajas también han sido establecidas (Ali y cols. 1994; Ali y cols. 1996; Van der Weijden y cols. 1994). Si se compara específicamente con los datos disponibles acerca de pacientes dominicanos, la prevalencia es menor que en el estudio realizado por Collins y cols. en el cual se encuentra una prevalencia del 33,3% de *A. actinomycetemcomitans* en el grupo de pacientes con periodontitis crónica y un 24,7% de prevalencia en toda la población estudiada (Collins y cols. 2016). En este caso, las discrepancias pueden ser debidas a diferencias metodológicas pues la técnica de análisis de las muestras es distinta, en el presente estudio cultivo con medios específicos mientras que Collins y cols. emplearon PCR.

P. intermedia es el patógeno más prevalente en el presente estudio (93%), lo cual representa una prevalencia mayor que la anteriormente descrita en pacientes dominicanos por Slots y cols. (75%) y Collins y cols. (53,3%). Los resultados obtenidos son comparables también con otros datos de la literatura, donde se describe una prevalencia del 75-100% de esta bacteria (Mc Nab y cols. 1992; Preus y cols. 1995). No obstante, también en el caso de este patógeno existe una importante variabilidad que no sigue estrictamente un patrón geográfico, como se puede observar comparando la prevalencia del presente estudio con los datos descritos para Chile (19,4%), Colombia (72,5%) y España (97,2%) (Herrera y cols. 2008).

F. nucleatum se encontró con una prevalencia del 68% en el presente estudio, una prevalencia algo más baja respecto a los datos disponibles de República Dominicana: 80% (Collins y cols. 2016) y 100% (Slots y cols. 1991). En general se describe en la literatura una prevalencia de entre 80 y 100% que se corresponde también con datos más recientes de otros países latinoamericanos, siendo la prevalencia en Chile (63,9%) (Herrera y cols. 2008) la más parecida a la obtenida en pacientes dominicanos en el presente estudio.

Otra de las bacterias analizadas, *C. rectus*, se detectó con una prevalencia del 11%, dato que dista mucho de algunas prevalencias descritas anteriormente (70-100). No obstante, prevalencias comparables se han descrito en Estados Unidos (Korman y cols. 1991) y, particularmente, en República Dominicana, el único dato acerca de la prevalencia de este microorganismo es algo más elevado que lo observado en este estudio (33%) (Slots y cols. 1991). Las razones para estas discrepancias y la importancia relativa de esta especie bacteriana en la etiología de la periodontitis están aún por determinar.

P. micra se detectó con una prevalencia del 25%. La más parecida fue encontrada en Chile (29,7%), mientras que en República Dominicana Slots y cols. reportan una prevalencia del 87% de esta bacteria y Collins y cols. incluso un 90% de prevalencia. (Herrera y cols. 2008; Collins y cols. 2016; Slots y cols. 1991). El porcentaje de *P. micra* parece poder estar relacionado con el hábito tabáquico (Sanz y cols. 2000), no obstante, en el presente estudio no se dispone de este dato por lo que no es posible hacer una comparación.

E. corrodens, en la población estudiada se detectó con una prevalencia del 29%. Este dato difiere de lo observado anteriormente en República Dominicana donde la prevalencia fue de 90% (Collins y cols. 2016), y se asemeja más a los datos obtenidos de países como Chile (34,3%), Colombia (27,5%), Estados Unidos (10%) e incluso España (11,1%) (Herrera y cols. 2008, Kornman y cols. 1991).

Finalmente, *Capnocytophaga spp.* presentó una prevalencia de 11%, más que el <2,5% detectado en pacientes dominicanos por Slot y cols. Este dato del presente estudio está en concordancia con otros países de América Latina como Chile (12,5%) y Colombia (9.8%) y también con prevalencias observadas en España (16,7%) (Herrera y cols. 2008).

No se encontraron microorganismos tales como bacilos entéricos, estafilococos, y otras bacterias sobreinfectantes. Estos organismos no se encuentran habitualmente en la microflora subgingival salvo en poblaciones específicas con patologías del sistema inmune. No obstante, se han descrito en poblaciones de Sudan (Ali y cols. 1994) y Rumanía (Ali y cols. 1996) y, llamativamente, también en República Dominicana, con una prevalencia de más del 60% (Slots y cols. 1991). Esta diferencia respecto a los datos del presente estudio puede ser debido a que, en en pasado, en Santo Domingo el agua

contaminada y la higiene inadecuada actuaban como fuentes de infección con bacterias entéricas.

Respecto a la gran variabilidad observada en todos los estudios, y la ausencia de un patrón geográfico claro en cuanto a la prevalencia de los principales patógenos periodontales, además de posibles asociaciones con la genética del paciente, un factor importante como posible explicación para estas discrepancias es, como se ha mencionado anteriormente, la diferencia que existe en cuanto a la prescripción de antibióticos en los distintos países.

En República Dominicana no hay una clara restricción de la venta de antibióticos y en la industria ganadera se utilizan estos medicamentos como promotores del crecimiento avícola (Silbergeld y cols. 2008). Esto puede resultar en la aparición de cepas bacterianas multirresistentes. Collins y cols. detectaron una gran variedad de genes resistentes a la tetraciclina, con mayor prevalencia comparado con otras poblaciones de Europa y Estados Unidos (Collins y cols. 2016).

En cuanto a los datos clínicos obtenidos, podemos observar que los valores de sangrado al sondaje e índice de placa son relativamente altos, pero los datos que obtenemos referentes a profundidad de sondaje global muestran valores más bien compatibles con salud periodontal. Cabe resaltar que la profundidad de sondaje global es baja (2,63mm), en parte debido a que se trata de valores medios.

7.1. Limitaciones

Entre las limitaciones del presente estudio, cabe resaltar que solo un número limitado de pacientes con periodontitis crónica de Santo Domingo fueron

incluidos en el presente estudio y, debido a esto, los sujetos seleccionados podrían no ser representativos de toda la población de pacientes con periodontitis de la ciudad de Santo Domingo. Además, variables tales como la severidad de la enfermedad y el hábito tabáquico pueden influir en los resultados microbiológicos, pues ambos factores han demostrado modificar la microbiota subgingival, pero el impacto en la población actual no ha podido ser evaluado.

Por otro lado, no se estudiaron variables tales como el estatus socioeconómico y el nivel de educación, estas condiciones ambientales unidas a diferencias en los perfiles genéticos también pueden influir en la severidad de la periodontitis y su presentación clínica (Gjermeo y cols. 2002; Loos y cols. 2005).

A su vez, es importante resaltar que no existe un grupo control en este estudio. Es decir, no se incluyeron pacientes sanos o con gingivitis que permitieran establecer una comparación de los perfiles microbiológicos evaluados.

Por otro lado, la definición de periodontitis en el presente estudio solo tiene en cuenta la profundidad de sondaje, y no la pérdida de inserción. La mayoría de definiciones usadas actualmente incluyen ambas variables, como por ejemplo la Asociación Americana de Periodoncia (Page & Eke 2007), que establece la definición de periodontitis moderada en presencia de dos o más localizaciones interproximales con pérdida de inserción mayor o igual de 4mm o dos o más localizaciones con profundidad de sondaje igual o mayor de 5mm. Por otro lado, en el 5º Workshop Europeo de periodoncia (Tonetty & Claffey 2005), se estableció una definición de periodontitis que consideraba una pérdida de inserción clínica mayor o igual de 5mm en al menos el 30% de los dientes presentes.

Una importante fuente de posibles errores, que además se repite para todos los métodos de análisis, es el problema de la obtención de una muestra representativa del biofilm. Existen diferentes técnicas de toma de muestras, pero ninguna de ellas asegura una toma representativa, especialmente cuando queremos recolectarla de bolsas periodontales muy profundas (Casas y cols. 2007).

Finalmente, el éxito del análisis de la microbiota mediante cultivo depende en gran medida de la calidad del transporte de la muestra desde el paciente hasta el laboratorio. Y aunque en el presente estudio la toma de muestras siguió un abordaje estandarizado (Casas y cols. 2007), y se usaron medios específicos de transporte y plaqueo siguiendo los estándares actuales, existe un riesgo de error al tener que transportar la muestra desde Santo Domingo hasta Madrid.

7.2. Líneas futuras de investigación

Actualmente, los avances tecnológicos en el campo de la microbiología permiten estudiar las bacterias a un nivel más complejo, analizando con precisión las interacciones entre ellas y con el hospedador. Por ello, sería de interés no solo determinar qué microorganismos se encuentran presentes sino evaluar cómo interactúan en el biofilm subgingival (Díaz et al 2016).

Para poder definir las variaciones entre comunidades de microorganismos se deberían diseñar estudios con mayor número de pacientes, tanto sanos como enfermos y para que los resultados obtenidos en estudios que, como en el presente, analizan la composición microbiana en pacientes con periodontitis realmente se traduzcan en estrategias diagnósticas y de tratamiento es necesario realizar estudios longitudinales e integrar datos acerca de qué tipo de bacteria se encuentra presente y la interacción entre ellas (Sanz y cols. 2017).

Para conseguir este objetivo, se deberán diseñar estudios que incluyan el análisis avanzado de la del biofilm y la interacción de las bacterias en él, así como el análisis de la expresión de diferentes genes en situaciones tanto de simbiosis como de disbiosis. (Sanz y cols. 2017)

8. CONCLUSIÓN

Considerando las limitaciones del presente estudio, se concluye que la bacteria más prevalente en el biofilm subgingival de pacientes dominicanos con periodontitis crónica fue *P. intermedia* (93%), seguida de *P. gingivalis* (86%), *F. nucleatum* (68%) y *T. forsythia* (64%). Estos resultados se corresponden en líneas generales con lo observado en la literatura, aunque confirman la variabilidad en cuanto a porcentajes de detección de microorganismos individuales.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Ali RW, Bakken V, Nilsen R, Skaug N. Comparative detection frequency of 6 putative periodontal pathogens in Sudanese and Norwegian adult periodontitis patients. *J Periodontol* 1994;65(11):1046-1052.
- Ali RW, Velcescu C, Jivanescu M-C, Lofthus B, Skaug N. Prevalence of 6 putative periodontal pathogens in subgingival plaque samples from Romanian adult periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1996;PQ:133-139.
- Alsina M, Olle E, Frias J. Improved, low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Improved, low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol* 2001;39(2):509-13.
- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;4(1):1–6.
- Botero JE, Contreras A, Lafaurie G, Jaramillo A, Betancourt M, Arce RM. Occurrence of periodontopathic and superinfecting bacteria in chronic and aggressive periodontitis subjects in a Colombian population. *J Periodontol*. 2007 Apr;78(4):696-704.
- Camelo-Castillo AJ, Mira A, Pico A, Nibali L, Henderson B, Dono N, Tomas I. Subgingival microbiota in health compared to periodontitis and the influence of smoking. *Frontiers in Microbiology* 2015; 24:119.
- Casas A, Herrera D, Martin-Carnes J, Gonzalez I, O'Connor A, Sanz M. Influence of sampling strategy on microbiologic results before and after periodontal treatment. *J Periodontol* 2007;78:1103–1112.
- Collins JR, Arredondo A, Roa A, Valdez Y, León R, Blanc V. Periodontal pathogens and tetracycline resistance genes in subgingival biofilm of periodontally healthy and diseased Dominican adults. *Clin Oral Investig* 2016;20:349-356.

- 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;32:860–866.
- Dahlen N, Wikstrom M. Occurrence of enteric rods, staphylococci and *Candida* in subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol* 1995;1H:42-46.
- Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, Lakshmanan A, Wade WG. The human oral micro- biome. *Journal of Bacteriology* 2010;192:5002–5017.
- Diaz PI, Hoare A, Hong BY. Subgingival microbiome shifts and community dynamics in periodontal diseases. *J Calif Dent Assoc* 2016;44:421–435.
- Gajardo M, Silva N, Gomez L, Leon R, Parra B, Contreras A, Gamonal J. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J Periodontol* 2005;76:289–294.
- Gjermo, P., Rosing, C. K., Susin, C. & Oppermann, R. Periodontal diseases in Central and South America. *Periodontology* 2000. 2002;29;70–78.
- Goncalves, M. O., Coutinho-Filho, W. P., Pimenta, F. P., Pereira, G. A., Pereira, J. A., Mattos-Guaraldi, A. L. & Hirata, R. Jr. Periodontal disease as reservoir for multi-resistant and hydrolytic enterobacterial species. *Letters of Applied Microbiology* 2007;44:488–494.
- Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H, Feres M, López NJ, Socransky SS. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *J Clin Periodontol* 2004;31:996–1002.
- Haffajee AD, Japlit M, Bogren A, Kent Jr RL, Goodson JM, Socransky SS. Differences in the subgingival microbiota of Swedish and USA subjects who were periodontally healthy or exhibited minimal periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2005;32:33–39.
- Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* 1999;5:78-111.
- Hajishengallis, G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends in Immunology* 2014;35:3–11.

- Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Vaeth M, Poulsen S, Kilian M. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet* 2008;2371:237–242.
- Heitz-Mayfield LJ, Schatzle M, Loe H, Burgin W, Anerud A, Boysen H, et al. Clinical course of chronic periodontitis. II. Incidence, characteristics and time of occurrence of the initial periodontal lesion. *J Clin Periodontol* 2003;30(10):902-908.
- Herrera D, Contreras A, Gamonal J, Oteo A, Jaramillo A, Silva N, Sanz M, Botero JE, Leon R. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *J Clin Periodontol* 2008;35:106–113.
- Kassebaum NJ, Bernabe E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res* 2014;93(11):1045-1053.
- Kornman KS, Newman MG, Alvarado R, Flemmig TF, Nachnani S, Tumbusch J. Clinical and microbiological patterns of adults with periodontitis. *J Periodontol* 1991;TP:634-642.
- Lafaurie GI, Contreras A, Baron A, Botero J, Mayorga-Fay- ad I, Jaramillo A, Giraldo A, Gonzalez F, Mantilla S, Botero A, Archila LH, Diaz A, Chacon T, Castillo DM, Betancourt M, Del Rosario Aya M, Arce R. Demographic, clinical, and microbial aspects of chronic and aggressive periodontitis in Colombia: a multicenter study. *J Periodontol* 2007;78:629–639.
- Ledder RG, Gilbert P, Huws SA, Aarons L, Ashley MP, Hull PS, McBain AJ. Molecular analysis of the subgingival microbiota in health and disease. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:516–523 .
- Loos, B. G., John, R. P. & Laine, M. L. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *Journal of Clinical Periodontology* 2005;32:159–179.
- Lopez NJ, Socransky SS, Da Silva I, Japlit MR, Haffajee AD. Subgingival microbiota of Chilean patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2004;75:717–725.

- McNabb H, Mombelli A, Gmuè R R, Mathey-Dincè S, Lang NP. Periodontal pathogens in the shallow pockets of immigrants from developing countries. *Oral Microbiol Immunol* 1992;U:267-272.
- Missailidis CG, Umeda JE, Ota-Tsuzuki C, Anzai D, Mayer MP. Distribution of fimA genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in subjects with various periodontal conditions. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:224–229.
- Mombelli A, McNabb H, Lang NP. Black-pigmenting gram-negative bacteria in periodontal disease. II. Screening strategies for detection of *P. gingivalis*. *J Periodontal Res* 1991;26(4):308-13.
- Moore W. Microbiology of periodontal disease. *J Periodont Res* 1987;22:335-341.
- Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000* 1997;14:9–11.
- Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000* 1997;14:216–48.
- Page, R.C. & Eke, P.I.. Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol* 2007;78;1387–1399.
- Papapanou PN. The prevalence of periodontitis in the US: forget what you were told. *J Dent Res* 2012 10;91(10):907-908.
- Petersen PE, Ogawa H. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontol 2000* 2012;60(1):15-39.
- Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet* 2005 11/19;366(9499):1809-1820.
- Preus HR, Anerud A, Boysen H, Dunford RG, Zambon JJ, Loè E H. The natural history of periodontal disease. The correlation of selected microbiological parameters with disease severity in Sri Lankan tea workers. *J Clin Periodontol* 1995;PP:674-678.

- Renvert S, Wikstrom M, Helmersson M, Dahl en G, Claffey N. Comparative study of subgingival microbiological sam- pling techniques. *J Periodontol* 1992;63:797–801.
- Renvert S, Wikstrom M, Helmersson M, Dahl en G, Claffey N. Comparative study of subgingival microbiological sam- pling techniques. *J Periodontol* 1992: 63: 797–801.
- Rylev M, Kilian M. Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. *J Clin Periodontol* 2008; 35(8):346–361.
- Sanz M, Beighton D, Curtis MA, Cury JA, Dige I, Dommisch H, Ellwood R, Giacaman R, Herrera D, Herzberg MC, Könönen E, Marsh PD, Meyle J, Mira A, Molina A, Mombelli A, Quirynen M, Reynolds EC, Shapira L, Zaura E. Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2017;44 Suppl 18:5-11.
- Sanz M, D´Aiuto F, Deanfield J, Fernandez-Avilés F. European workshop in periodontal health and cardiovascular disease—scientific evidence on the association between periodontal and cardiovascular diseases: a review of the literature. *Eur Heart J* 2010;12(Supp B):B3-B12.
- Sanz M, van Winkelhoff AJ, Herrera D, DelleMijn-Kippuw N, Simoón R, Winkel EG. Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. *Eur J Oral Sci* 2000;108:383-392.
- Saygun I, Nizam N, Keskiner I, Bal V, Kubar A, Açikel C, Sendar M, Slots J. *J Periodontal Res* 2011;46(2):235-9.
- Schatzle M, Loe H, Burgin W, Anerud A, Boysen H, Lang NP. Clinical course of chronic periodontitis. I. Role of gingivitis. *J Clin Periodontol* 2003;30(10):887-901.
- Silbergeld EK, Graham J, Price LB. Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. *Annu Rev Public Health* 2008;29:151–169.

- Slots J, Bragd L, Wikstroè M, Dahlen N. The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *J Clin Periodontol* 1986;19:570-577.
- Slots J, Rams TE, Feik D, Taveras HD, Gillespie G. Subgingival Microflora of Advanced Periodontitis in the Dominican Republic. *Periodontol* 1991;62:543-547.
- Socransky SS, Haffajee AD. Effects of therapy on periodontal infections. *J Periodontol* 1993;64(8):754-759.
- Tonetti M.S. & Claffey N. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. Group C consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology* 2005;32 Suppl 6:210–213.
- van der Velden U, Abbas F, Armand S, Loos BG, Timmerman MF, Van der Weijden GA, van Winkelhoff AJ, Winkel EG. Java project on periodontal diseases. The natural development of periodontitis: risk factors, risk predictors and risk determinants. *J Clin Periodontol* 2006;33:540–548.
- Van Der Weijden GA, Timmerman MF, Reijerse E, Wolffe GN, Van Winkelhoff AJ, Van Der Velden U. The prevalence of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *P. intermedia* in selected subjects with periodontitis. *J Clin Periodontol* 1994;21:583-588.
- van Winkelhoff AJ, Herrera D, Oteo A, Sanz M. Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol* 2005;32:893–898.
- Van Winkelhoff AJ, Pavicic M, De Graaff J. Antibiotics in periodontal therapy. In: LANG NP, KARRING T, eds. *Proceedings of the 1st European Workshop in Periodontology*. London: Quintessence Books, 1994;258-273.
- Van Winkelhoff AJ, Rams TE, Slots J. Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontol* 2000 1996;10:45-78.

- van Winkelhoff AJ. Antibiotics in periodontics: are we getting somewhere? *J Clin Periodontol*. 2005 Oct;32(10):1094-5.
- Wikström M, Renvert S, Dahlén G, Johnsson T. Variance in recovery of periodontitis-associated bacteria caused by sampling technique and laboratory processing. *Oral Microbiol Immunol* 1991;6(2):102-6.
- Ximenez-Fyvie LA, Almaguer-Flores A, Jacobo-Soto V, Lara-Cordoba M, Sanchez-Vargas LO, Alcantara-Maruri E. Description of the subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects: chronic periodontitis and periodontal health. *J Periodontol* 2006;77:460–471.