



Ocurrencia de bacilos Gram negativos no fastidiosos y levaduras en la microbiota subgingival de pacientes chilenos con periodontitis

Nora Silva Steffens,* Jorge Gamonal Aravena,§ Marta Gajardo Ramírez*

RESUMEN

Antecedentes y objetivos: Grupos definidos de bacterias patógenas presentes en la microbiota subgingival se han asociado con periodontitis; actualmente, la terapia periodontal convencional tiende a la supresión o erradicación de patógenos periodontales específicos. En algunos pacientes se han podido observar casos de mala respuesta o de refractariedad a la terapia periodontal. Autores han asociado este hecho, en parte, a la presencia de patógenos inusuales en el saco periodontal, razón por la cual, el objetivo de este estudio fue determinar la ocurrencia de bacilos Gram negativos no fastidiosos y levaduras en la microbiota subgingival de un grupo de pacientes chilenos con periodontitis (crónica y agresiva). **Material y métodos:** Se tomaron muestras de placa subgingival a 75 pacientes con periodontitis (crónica o agresiva), utilizando conos de papel, los que fueron depositados en RTF frío (4°C) y transportados al laboratorio para su procesamiento. **Resultados:** Se determinó que un 22.6% de pacientes presentaba bacilos Gram negativos no fastidiosos y un 9.3% levaduras, el 64.8% de los aislados se identificó como *Alcaligenes faecalis*, el 17.6% *Escherichia coli* y el 17.6% restante fue *Pseudomonas aeruginosa*. **Conclusiones:** No hubo diferencia significativa entre ambos tipos de periodontitis ($p > 0.05$).

Palabras clave: Periodontitis, bacilos Gram negativos no fastidiosos, levaduras, microbiota subgingival.

Key words: Periodontitis, non fastidious Gram negative rods, yeasts, subgingival microbiota.

INTRODUCCIÓN

Las periodontitis son enfermedades infecciosas del periodonto causadas tanto por el sobrecrecimiento de patógenos periodontales en la microbiota subgingival, como por la respuesta inmunoinflamatoria local inducida por ellos, en individuos susceptibles.^{1,2} Estas patologías se han asociado con la presencia de ciertas bacterias específicas, o complejos bacterianos, en su mayoría bacilos Gram negativos, anaeróbicos fastidiosos. Entre dichas especies se encuentran *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola* y *Prevotella intermedia/nigrescens*. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, especie capnofílica, también se ha descrito como fuertemente asociada a

ABSTRACT

Background and aim: Groups of defined bacteria in the subgingival microbiota have been associated with periodontitis. Therefore, periodontal therapy is directed toward the suppression or elimination of particular periodontal pathogens. Some patients are refractory or poorly responsive to periodontal therapy. Some authors have related them with the presence of unusual pathogens in the subgingival microbiota. Thus, the aim of this work was to study the prevalence of non fastidious Gram negative rods and yeasts in the subgingival microbiota of a group of Chilean aggressive and chronic periodontitis patients. **Material and methods:** Subgingival plaque samples from 75 periodontitis patients (chronic or aggressive) were obtained with paper points and deposited in cold RTF (4°C) to be analyzed immediately. **Results:** 22.6% of patients harbored non fastidious Gram negative rods, and yeasts a 9.3% of them. In the first group 64.8% of isolates was *Alcaligenes faecalis*, 17.6% *Escherichia coli* and the other 17.6% was *Pseudomonas aeruginosa*. **Conclusions:** No significant difference was observed between both groups of periodontitis patients ($p > 0.05$).

periodontitis.³⁻¹⁰ Actualmente la terapia periodontal convencional tiende a la supresión o erradicación de patógenos periodontales específicos^{11,12} y la antibioterapia sistémica se usa especialmente en el tratamiento de infecciones periodontales severas. Esta últi-

Financiamiento:

Proyecto PRI/ODO 00/13 Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Laboratorios DENTAID S.A.

* Profesora Asistente, Departamento de Patología, Área de Microbiología, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

§ Profesor Asociado, Departamento de Odontología Conservadora, Área de Periodoncia Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

ma puede, eventualmente, suprimir patógenos periodontales que residen en la lengua o en otras superficies orales retardando la recolonización subgingival por estos patógenos.¹³ Sin embargo, el empleo de antibióticos tales como penicilinas, tetraciclinas, metronidazol o clindamicina, no ha brindado el resultado esperado, aun cuando tetraciclinas a bajas concentraciones pueden inhibir el crecimiento *in vitro* de la gran mayoría de estos microorganismos.^{14,15} La pobre respuesta que se observa con alguno de estos agentes se debería, principalmente, a la existencia de una comunidad compleja de bacterias con potencial patogénico en las lesiones periodontales, razón por la cual el uso de una combinación de drogas ha adquirido gran importancia. Terapias combinadas incluyen, por ejemplo, la mezcla metronidazol-amoxicilina, que controlaría infecciones periodontales causadas por microorganismos anaeróbicos obligados y aerotolerantes.^{16,17} Sin embargo, aun cuando se emplee antibioticoterapia sistémica combinada, algunos pacientes siguen presentando una pobre respuesta al tratamiento y continúa en ellos la destrucción del periodonto.¹⁸ Es por esto que en la actualidad se está dando gran importancia a la presencia, en el saco periodontal, de microorganismos no contemplados habitualmente en la patogénesis de las periodontitis y que por lo tanto no son considerados en el tratamiento de rutina. Es así que los investigadores han centrado la atención en patógenos inusuales presentes en sacos periodontales tales como levaduras, enterobacterias y otros bacilos Gram negativos no fastidiosos. Estudios epidemiológicos en diversas partes del mundo, han reportado la presencia de levaduras y organismos entéricos en el saco periodontal cuya prevalencia, aunque variable, ha sugerido su asociación con algunos tipos de periodontitis.¹⁹⁻²⁵ En Chile, todavía hay muy poca información sobre la ocurrencia de patógenos inusuales en pacientes con periodontitis y menos aún de su asociación con casos refractarios al tratamiento. Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue investigar mediante cultivo microbiológico la ocurrencia de bacilos Gram negativos no fastidiosos y levaduras, en la microbiota subgingival de un grupo de pacientes chilenos con periodontitis (crónica o agresiva), para determinar la prevalencia de las especies identificadas y su relación porcentual respecto de la microbiota total cultivada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

Se seleccionaron 75 pacientes entre quienes acudían a la Escuela de Graduados de la Facultad de

Odontología de la Universidad de Chile o al Centro de Diagnóstico y Tratamiento Eloísa Díaz, del sector Norte de la Región Metropolitana de Santiago, Chile. En este grupo había 59 mujeres y 16 hombres, cuyas edades fluctuaron entre los 13 y 52 años. Los pacientes seleccionados presentaban periodontitis crónica o agresiva y no habían recibido tratamiento periodontal, no presentaban enfermedades sistémicas y no habían recibido antibióticos ni terapia antiinflamatoria no esteroide en los últimos 6 meses. El protocolo de investigación fue explicado a todos los pacientes quienes previo a su participación firmaron un consentimiento informado, revisado y aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. De acuerdo al protocolo, todos los pacientes iniciaron su tratamiento periodontal dentro de dos semanas después de detectada la enfermedad.

Parámetros clínicos

Los parámetros clínicos fueron medidos siempre por el mismo investigador, calibrado especialmente para estos fines (JG). En todos los dientes de cada paciente, excluyendo los terceros molares, se examinó la acumulación de placa supragingival (PI), el sangramiento al sondaje (BOP), el nivel de inserción clínica (CAL) y la profundidad al sondaje (PD). Estos dos últimos parámetros se midieron con una sonda electrónica computarizada (Florida)[#]. Los seis sitios examinados en cada diente fueron: mesiobucal, bucal, distobucal, distolingual, lingual y mesiolingual.

Muestras de placa dental subgingival

Las muestras de placa subgingival de cada paciente fueron obtenidas desde 4 sitios periodontalmente afectados (uno por cuadrante), con una profundidad de saco mayor a 5 mm y una pérdida de inserción mayor a 3 mm. Después de aislar cada sitio con tórulas de algodón y secar con aire, los depósitos supragingivales fueron totalmente removidos con curetas^{**}. Las muestras subgingivales fueron obtenidas introduciendo durante 20 s, dos conos[§] de papel (Nº 30) estériles, en las zonas más profundas del saco periodontal. Las cuatro muestras de cada paciente (8 conos) se depositaron en 2 mL de medio de transporte frío (RTF) sin EDTA (Solución 1: K₂HPO₄ 0.6%, Solución 2: NaCl

Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, USA

** Hu Friedy, Gracey, USA.

§ Johnson & Johnson, USA

1.2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.2%, KH_2PO_4 0.6%, MgSO_4 0.25%. Mezclar 75 mL de solución 1 y 75 mL de solución 2, agregar: Na_2CO_3 8% (5 mL) Dithiothreitol 1% (20 mL) Rezasurina 0.1% (1 mL) agua destilada 814 mL.²⁶ Los viales con las muestras se transportaron al laboratorio de microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, mantenidos siempre a 4°C. Cada muestra fue procesada dentro de las 3 horas siguientes a la toma.

Procedimientos microbiológicos

Las muestras de placa subgingival fueron dispersadas mediante agitación a velocidad máxima en un agitador^ψ, durante 45 s y luego diluidas en forma seriada hasta 10^{-4} . 100 μL de las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} fueron sembrados en placas de agar sangre no-selectivo (agar columbia menadiona/hemina, 5% sangre de cordero) y éstas incubadas a 35°C durante 7 a 14 días,²⁷ en jarra con generador de anaerobiosis. Después de este tiempo se efectuó el recuento de la microbiota anaeróbica total cultivable, resultado que fue expresado como unidades formadoras de colonias por mL de muestra (UFC/mL). 100 μL de la muestra sin diluir se sembraron en placas de medios selectivos Mc-Conkey y Sabouraud, para detectar bacilos Gram negativos no fastidiosos y levaduras, respectivamente. Estas placas se incubaron en aerobiosis por 24 a 48 h y el recuento de las especies investigadas, expresado como porcentaje de la microbiota total cultivada. La identificación inicial de las especies aisladas se realizó mediante análisis del aspecto macroscópico colonial bajo lupa estereoscópica (Stemi 2000C, Zeiss) y de la morfología celular y agrupación, mediante frotis, tinción de Gram y observación microscópica (100x). La identificación final se realizó por medio de pruebas bioquímicas en galerías comerciales para enterobacteriaceas y bacilos Gram negativos no fermentadores (API 20 E y API 20 NE[&]) y para levaduras (API 20 AUX[&]), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Análisis estadístico

En este estudio se consideró al paciente como unidad de observación, evaluándose los parámetros clínicos y microbiológicos para cada individuo ingresado al estudio. Todos los parámetros fueron analizados usando el test de Anova de una vía para 3 grupos y el test de Tukey para comparaciones múltiples.

RESULTADOS

En el total de pacientes seleccionados para este estudio ($n = 75$), 44 tenían periodontitis agresiva (58.6%) y 31 periodontitis crónica (41.3%). El 50% de los pacientes con periodontitis agresiva presentaba la forma localizada y el otro 50% la forma generalizada. Los criterios usados para la clasificación clínica de los pacientes se presentan en el *cuadro I*.

En el *cuadro II* se observan los parámetros generales y clínicos que caracterizaron a los grupos de pacientes estudiados y se muestra que las únicas diferencias estadísticamente significativas encontradas entre los grupos de periodontitis agresiva vs periodontitis crónica, fue para la edad ($p < 0.05$). En relación a los parámetros clínicos evaluados, se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos con periodontitis agresiva generalizada y periodontitis crónica, para el nivel de inserción clínica (CAL), profundidad al sondaje (PD) e índice de sangramiento al sondaje (BOP) ($p < 0.005$).

Bacilos Gram negativos no fastidiosos se encontraron en 17 de los 75 pacientes estudiados, determinando una prevalencia de 22.6% dentro del grupo estudiado. Levaduras se encontraron en 7 pacientes, correspondiendo este hallazgo a un 9.3% de prevalencia ($p > 0.05$). En el *cuadro III* se muestra el número de pacientes portadores de bacilos Gram negativos no fastidiosos y levaduras en los diferentes grupos y el porcentaje correspondiente respecto del total de pacientes ($n = 75$).

Las especies de bacilos Gram negativos no fastidiosos identificadas en este estudio fueron *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Alcaligenes faecalis*. Este último fue el que se detectó en mayor porcentaje (64.8%) respecto de las otras dos especies (17.6%), el porcentaje promedio en relación a la microbiota total cultivable fue de 27.3, 15.2 y 4.3% respectivamente, como se observa en el *cuadro IV*. Las especies de levaduras aisladas fueron todas *Candida albicans*, y el porcentaje en relación a la microbiota total cultivable fue de 0.64%.

DISCUSIÓN

La presencia de microorganismos tales como levaduras y bacilos Gram negativos no fastidiosos en la microbiota subgingival está cobrando una gran relevancia en la actualidad debido al potencial periodontopático que se ha descrito para estos microorganismos. El presente trabajo constituye un estudio pionero en nuestro país, enfocado en determinar la prevalencia de bacilos Gram negativos no fastidiosos y levaduras, en

^ψ Thermolyne maxi mix II type 37600, IOWA USA.

[&] Biomerieux

la microbiota subgingival de un grupo de pacientes chilenos con periodontitis (n = 75).

Como se ha reportado en la literatura, en EUA se encontró un 10.2% de prevalencia para bacilos Gram negativos no fastidiosos y un 16.8% para levaduras.¹⁹ Slots y cols reportaron sacos periodontales infectados con levaduras en pacientes con periodontitis refracta-

ria, donde la especie aislada con mayor frecuencia fue *C. Albicans*.²⁴ Las levaduras son capaces de adherirse y de provocar una reacción inflamatoria en la mucosa,²⁸ causando daño en el tejido periodontal. Dahlen & Wilkstrom, en grupo de pacientes suecos,²⁹ recuperaron bacilos entéricos en un 34.9%, y levaduras en un 7.3%, de las muestras periodontales analizadas. Es-

Cuadro I. Criterios clínicos para la clasificación de los tipos de periodontitis.

Tipo de periodontitis	Criterios clínicos
Periodontitis agresiva localizada	<ul style="list-style-type: none"> • Edad de inicio: < 20 años • CAL \geq 4 mm en 2 o más primeros molares y/o incisivos • Ausencia de CAL en caninos, premolares o segundos molares
Periodontitis agresiva generalizada	<ul style="list-style-type: none"> • Edad de inicio: >30 años • CAL \geq 4 mm en 2 o más primeros molares y/o incisivos; caninos, premolares o segundos molares
Periodontitis crónica generalizada	<ul style="list-style-type: none"> • Edad de inicio: > 35 años • CAL \geq 4 mm en al menos 30% de dientes en boca

Cuadro II. Parámetros generales y clínicos promedio en cada grupo (Nº, %, promedio \pm SD).

Parámetro	Periodontitis agresiva localizada (n = 22)	Periodontitis agresiva generalizada (n = 22)	Periodontitis crónica (n = 31)
Género (mujeres)	19 (43.1%)	14 (31.8%)	24 (77.4 %)
Edad promedio(rango) •	25.39 \pm 6.01 (13-35)	29.9 \pm 6.36 (20-45)	40.5 \pm 7.24 (25-58)
Nivel de inserción clínica (CAL)*	3.43 \pm 0.53	3.85 \pm 0.65	3.39 \pm 0.60
Profundidad al sondaje (mm) (PD)*	3.73 \pm 0.58	4.01 \pm 1.06	3.47 \pm 0.44
Índice de placa (PI)	50.57 \pm 7.88	58.36 \pm 20.71	58.36 \pm 20.71
Tabaquismo (%)	27.3%	27.3%	35.5%
Sangramiento al sondaje (BOP)*	37.79 \pm 10.44	49.53 \pm 15.74	61.00 \pm 17.82

*p < 0.005 Se encontró una diferencia estadísticamente significativa al comparar periodontitis agresiva generalizada vs periodontitis crónica, con respecto a CAL, PD, y BOP.

• p < 0.05 La edad fue estadísticamente significativa al comparar periodontitis agresiva localizada y generalizada vs periodontitis crónica.

Cuadro III. Ocurrencia subgingival de bacilos Gram negativos no fastidiosos y levaduras en los grupos estudiados.

Microorganismos	Periodontitis agresiva localizada		Periodontitis agresiva generalizada		Periodontitis crónica	
	N	%	N	%	N	%
Bacilos Gram negativos no fastidiosos	2	2.6	5	6.7	10	13.3
Levaduras	1	1.3	2	2.7	4	5.4

N: número de pacientes portadores en cada grupo

%. porcentaje respecto del total de pacientes

No hubo diferencias significativas entre los grupos estudiados, al comparar la presencia de bacilos Gram negativos no fastidiosos y levaduras en las distintas entidades clínicas.

Cuadro IV. Especies de bacilos Gram negativos no fastidiosos y levaduras aislados de pacientes con periodontitis, porcentaje relativo de cada especie en su grupo y porcentaje promedio en relación a la microbiota total cultivable.

Microorganismos	Especies aisladas	Pacientes Nº %	% relativo de cada especie en su grupo	% promedio en relación a microbiota total cultivable
Bacilos Gram	<i>Escherichia coli</i>	3 (4.0)	17.6	27.30
Negativos no fastidiosos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3 (4.0)	17.6	15.20
	<i>Alcaligenes faecalis</i>	11 (14.6)	64.8	4.30
Levaduras	<i>Candida albicans</i>	7 (9.3)	100.0	0.64

tos resultados, especialmente para levaduras, se correlacionan cercanamente con el 9.3% de prevalencia obtenido en este trabajo. También en concordancia con los estudios mencionados, en este trabajo se encontró una ocurrencia de 22.6% para bacilos Gram negativos no fastidiosos. Por otra parte, los datos reportados sobre la prevalencia de estos bacilos muestran fluctuaciones entre los diferentes estudios. Así, tenemos desde un 14% en pacientes con periodontitis de EUA²⁴ a un 61.1% en pacientes rumanos;⁸ una prevalencia de un 67% en pacientes de República Dominicana;⁶ de 92% en pacientes sudaneses;⁷ un 31.2 en una población de Brasil²⁵ y un 35% aproximadamente en Colombia (comunicación personal Profesor Adolfo Contreras). Es probable que estas diferencias se deban, por una parte, a diferencias en el medio de transporte y en el período que transcurre desde que se toma la muestra hasta que es procesada, en los diferentes laboratorios. De acuerdo a Ali y cols,^{7,8} un prolongado tiempo de transporte de las muestras en medio VMGA III, podría permitir la multiplicación de bacilos entéricos, dando como resultado un aumento de la positividad. Con el fin de minimizar esto, en el trabajo realizado por Barbosa y cols,²⁵ los especímenes fueron procesados antes de 24 horas, posteriores a la toma de muestra. En este trabajo se utilizó RTF mantenido a 4°C, como medio de transporte y las muestras fueron procesadas antes de 3 horas, después de tomadas. Por otra parte, la alta prevalencia de bacilos Gram negativos no fastidiosos en ciertas poblaciones puede ser causada por la ingestión de agua de bebida o alimentos contaminados, e incluso por una inadecuada higiene personal.⁶ Otra consideración importante son las evidencias sobre el aislamiento a partir de muestras subgingivales de estas bacterias y de levaduras, asociada al uso de diversos agentes antimicrobianos sistémicos,¹⁹ ya que, como se ha descrito, una consecuencia del uso excesivo de antibióticos, tanto en medicina general como en periodoncia, es la sobreinfección por levaduras, como resultado de

la alteración de la homeostasis de la microbiota comensal de la cavidad bucal.^{30,31}

Diversos estudios han asociado levaduras del género *Candida* y bacilos entéricos con patologías periodontales. Es así que *C. albicans*, y otras especies de levaduras dentro del género, se han aislado en alto número en la microbiota subgingival o en el tejido gingival de abscesos periodontales agudos.²⁹ También se han aislado levaduras en muchos casos de periodontitis con pobre respuesta al tratamiento mecánico,³² sugiriendo un posible rol de este microorganismo en la patogénesis de la periodontitis marginal.^{19,29,30}

Por el contrario, Rams y cols no encontraron diferencias significativas al relacionar la presencia de organismos superinfectantes, como las levaduras y bacilos Gram negativos no fastidiosos del saco periodontal de individuos con periodontitis recurrente, comparado con individuos sanos, en quienes la proporción de microorganismos sobreinfectantes fue menor al 1% de la microbiota, porcentaje que no justificaría daño a nivel periodontal.³¹ En nuestro estudio se aislaron levaduras del género *Candida* y la especie identificada en todos los casos fue *C. albicans* (100%). *C. albicans* se aisló en un porcentaje promedio de 0.64% en relación a la microbiota total cultivada. En otros estudios, *C. albicans* se aisló en un alto porcentaje de las muestras, pero en porcentajes inferiores al 1% en relación a la microbiota total cultivable, lo cual es considerado poco relevante por diversos autores.^{19,26,28,30} Los bacilos Gram negativos no fastidiosos por su parte, son considerados patógenos oportunistas en diversos sitios del organismo humano^{29,31,33-35} y poseen muchos factores de virulencia de posible relevancia en la enfermedad periodontal.¹⁹ Tanto así, que se considera que muchos de ellos representan una causa de fracaso en la terapia periodontal, cuando se encuentran presentes en la placa subgingival.³⁶ Se ha demostrado por ejemplo, que *Pseudomonas aeruginosa* es invasiva para los tejidos.³⁶ elabora leucotoxinas extracelulares,³⁷ suprime la proliferación linfocitaria e inactiva componentes del complemento.^{38,39}

Dahlen & Wikstrom²⁷ reportaron que en las muestras positivas para enterobacterias y *Pseudomonas*, estos organismos fueron encontrados en proporciones menores al 1% de la microbiota total cultivable, situación muy diferente a la encontrada en nuestro estudio, donde *E. coli*, *A. faecalis* y *P. aeruginosa* representaron el 27.3, 4.3 y 15.2% en relación a la microbiota total cultivable, lo que podría indicar alguna participación en aquellos sitios comprometidos con estos microorganismos, lo que es imposible dilucidar con estos resultados. Sin embargo, aun a bajos niveles, estas bacterias representan un riesgo potencial para el paciente, sobre todo cuando se emplean antibióticos como parte de la terapia, ya que esto permite la selección y el sobrecrecimiento de especies resistentes.

Si bien es cierto que en este trabajo se obtuvo un porcentaje importante de aislamiento de bacilos Gram negativos no fastidiosos, *Alcaligenes faecalis* en un 14.6%, *E. coli* y *P. aeruginosa* en un 4% de los pacientes cada una, su sola presencia en el saco periodontal no se puede considerar como agente causal de enfermedad periodontal, por lo que es necesario, a la luz de estos hallazgos, realizar estudios longitudinales que permitan asociarlos con la patogénesis de estas enfermedades. Sin embargo, es de gran relevancia tener en cuenta la posible presencia de estos microorganismos en el saco periodontal, en el momento de prescribir el tratamiento, ya que su respuesta al protocolo de tratamiento convencional puede diferir grandemente con la observada para patógenos periodontales.

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestros sinceros agradecimientos a la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y a la empresa Dentaid S.A. por el constante apoyo en la implementación y manutención del Laboratorio de Microbiología.

REFERENCIAS

- Korman KS, Page RC, Tonette MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the player. *Review Periodontology* 2000 1997; 14: 33-53.
- Slots J, Genco RJ. Black pigmented bacteroides species, capnocytophaga and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *Journal of Dental Research* 1984; 63: 412-421.
- Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994; 5: 78-111.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 134-144.
- Moore WEC, Moore LVH. Periodontal microbiota in different clinical conditions. *Periodontol* 2000 1994; 5: 66-77.
- Slots J, Rams TE, Feik D, Taveras HD, Gillespie GM. Subgingival microflora of advanced periodontitis in the Dominican Republic. *J Periodontol* 1991; 62: 543-547.
- Ali RW, Bakken V, Nilsen R, Skaug N. Comparative detection frequency of six putative periodontal pathogens in Sudanese and Norwegian chronic periodontitis patients. *J Periodontol* 1994; 65: 1046-1052.
- Ali RW, Velcescu C, Jivanescu MC, Lofthus B, Skaug N. Prevalence of 6 putative periodontal pathogens in subgingival plaque samples from Romanian chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1996; 23: 133-139.
- López N, Mellado JC, Leighton GX. Occurrence of certain bacterial species and morphotypes in juvenile periodontitis in Chile. *J Periodontol* 1995; 66: 559-567.
- Gajardo M, Silva N, Gómez L, León 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.
- Slots J, Rams TE. Systemic and topical antimicrobial therapy in periodontitis. *Periodontol* 2000 1996; 10: 5-159.
- Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000 2002; 28: 12-55.
- Muller HP, Heinecke A, Borneff M, Kiencke C, Knopf A, Pohl S. Eradication of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from the oral cavity in adult periodontitis. *J Periodontol Res* 1998; 33: 49-58.
- Baker PJ, Evans RT, Slots J, Genco RJ. Antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria from the human oral cavity. *J Dent Res* 1985; 64: 1233-1244.
- Valdés MV, Lobbins PM. Beta-lactamase producing bacteria in the human oral cavity. *J Oral Pathol* 1982; 11: 58-63.
- Slots J. Systemic in periodontics (Am Acad Periodontol position paper). *J Periodontol* 1996; 67: 831-838.
- Slots J. Primer for antimicrobial periodontal therapy. *J Periodontol Res* 2000; 35: 108-114.
- Haffajee AD, Socransky SS, Dzink JL. Clinical and microbiological features of subjects with intractable destructive periodontal disease. *J Dent Res* 1987; 66 (abstract 1868).
- Slots J, Rams TE, Litsgarten MA. Yeasts, enteric rods and pseudomonas in the subgingival flora of severe adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1988; 3: 47-52.
- Campos CM, Zelante F. Contribuição ao estudo da microbiota bucal humana. Ocorrência de enterobacterias na saliva, lingua e placa dental. *Rev Fac Odontol Sao Paulo* 1978; 16: 77-86.
- Sedgley CM, Samaranayake LP. The oral prevalence of aerobic and facultatively anaerobic gram-negative rods and yeasts in Hong-Kong Chinese. *Arch Oral Biol* 1994; 39: 459-466.
- Sedgley CM, Chu CS, Lo ECM, Samaranayake LP. The oral prevalence of aerobic and facultatively anaerobic gram-negative rods and yeasts in semi-recluse human vegetarians. *Arch Oral Biol* 1996; 41: 307-309.
- Sedgley CM, Samaranayake L, Chan JCY, Wey SHY. A 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.
- Slots J, Feik D, Rams TE. Age and sex relationships of super-infecting microorganisms in periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 1990; 5: 305-308.
- Barbosa FCB, Mayer MPA, Saba-Chubjfe, Cai S. Subgingival occurrence and antimicrobial susceptibility of enteric rods and pseudomonas from Brazilian periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16: 306-310.
- Loesche WJ, Hockett RM, Syed SA. The predominant cultivable flora of tooth surface plaque removal from institutionalized subjects. *Arch Oral Biol* 1972; 17: 1311-1325.

27. Slots J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. *Oral Microbiol Immunol* 1986; 1(1): 48-57.
28. Reynaud AH, Nygaard-Ostby B, Boygard G-K, Eribe E R, Olsen I, Gjermo P. Yeasts in periodontal pockets. *J Clin Periodontol* 2000; 28: 860-864.
29. Dahlén G, Wikstrom M. Occurrence of enteric rods, staphylococci and candida in subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol* 1995; 10: 42-46.
30. Helovu H, Hakkarainen K, Paunio K. Changes in the prevalence of subgingival enteric rods, staphylococci and yeasts after treatment with penicillin and erythromycin. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8: 75-79.
31. Rams TE, Babalola OO, Slots J. Subgingival occurrence of enteric rods, yeasts and staphylococci after systemic doxycycline therapy. *Oral Microbiology & Immunology* 1990; 5: 166-168.
32. Listgarten MA, Lai CH, Young V. Microbial composition and pattern of antibiotic resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis. *Journal of Periodontology* 1993; 64: 155-161.
33. Aucken HM, Pitt TL. Antibiotic resistance and putative virulence factors of *Serratia marcescens* with respect to O and K serotypes. *J Med Microbiol* 1998; 47: 1105-1113.
34. Hejazi A, Falkiner FR. *Serratia marcescens*. *J Med Microbiol* 1997; 46: 903-912.
35. Livrelli V, De Chaamp SC, di Martino P, Darfeville- Michaud A, Forestier C et al. Adhesive properties and antibiotic resistance of Klebsiella, enterobacter and serratia clinical isolates involved in nosocomial infections. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1963-1969.
36. Slots J, Feik D, Rams TE. Prevalence and antimicrobial susceptibility of enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae and acinetobacter in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1990; 5:149-154.
37. Pollack M, Anderson SE Jr. Toxicity of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A for human macrophages. *Infect Immun* 1978; 19: 1092-1096.
38. Issekutz TB, Stoltz JM. Suppression of lymphocyte proliferation by *Pseudomonas aeruginosa*: mediation by Pseudomonas-activated suppressor monocytes. *Infect Immun* 1985; 48: 832-838.
39. Schultz DR, Miller KD. Elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: inactivation of complement components and complement-derived chemotactic and phagocytic factors. *Infect Immun* 1974; 10: 128-135.

Dirección para correspondencia:

Profesora Nora Silva Steffens

Olivos Núm. 943, Independencia, Santiago, Chile

Fono 56-02-7463886 (Particular)

E-mail: nsilva@uchile.cl