

PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD PERIODONTAL

Horacio Cordero-Soberanes*

RESUMEN

Conocer actualmente las bases y herramientas disponibles para llegar a un diagnóstico preciso, que nos permita ofrecer una opción de tratamiento lo más adecuada posible, es de importancia relevante. El papel de las bacterias como factor etiológico primario en las enfermedades periodontales de los seres humanos es incuestionable, además de que la información que se ha obtenido en el área de la microbiología de la enfermedad periodontal define patrones específicos de agrupamientos o combinaciones bacterianas, así como también bacterias específicas altamente prevalentes en los diferentes estados que afectan los tejidos de soporte. Se observa de igual forma una situación similar en estados en los que el proceso de enfermedad se encuentra en fase de destrucción activa. Éstas son algunas de las razones por las que el diagnóstico por medio de la detección de periodontopatógenos, provenientes de muestras de flora subgingival es una herramienta que tenemos a la mano ante diversas situaciones; por ejemplo, periodontitis refractarias o evaluaciones de tratamientos periodontales, ayudándonos a definir los intervalos en la fase de mantenimiento; evaluando actividad de la enfermedad para planear el tratamiento o buscando identificar personas en riesgo de desarrollar un episodio destructivo inicial o recurrente, o simplemente, intentando encontrar el agente causal.

Palabras Clave: *Diagnóstico microbiológico, periodontitis, indicadores de riesgo.*

ABSTRACT

At present it is of critical importance to know the basis and tools available to establish an objective diagnosis and provide the best option for treatment. The role that bacteria play as the primary etiological factor in human periodontal diseases is unquestionable; furthermore, information obtained from the microbiology of periodontal diseases has confirmed the presence of specific profiles of bacterial clusters or combinations of these clusters in addition to specific bacteria highly prevalent in several pathologic states of the diseases.

Research has also shown a similar situation in sites considered as in an active phase of destruction. This is why diagnosis based on the detection of periodontopathic bacteria isolated from samples of subgingival flora is a helpful option against several situations such as refractory periodontitis or at evaluation of periodontal treatment result and time interval of maintenance phase in the specific patient, assessing disease activity for treatment planning, to identify persons at risk for either the initial episode or recurrent periodontal diseases, and defining the causative agent.

Key Words: *Microbiological diagnosis, Periodontitis, Risk indicators.*

ARTÍCULO RECIBIDO EL 08 DE NOVIEMBRE DEL 2000 Y ACEPTADO EL 27 DE FEBRERO DEL 2001.

INTRODUCCIÓN

Hasta el inicio de la década de los sesenta no se definía claramente el papel de la placa dentobacteriana como factor de riesgo en el desarrollo de las enfermedades periodontales¹.

Dos estudios realizados en los años de 1964 y 1965 se consideran determinantes en el inicio de la definición de esta situación.

En 1964 se demuestra, mediante un modelo experimental en roedores, que la periodontitis es una enfermedad infecciosa y en

esta circunstancia particular, transmisible², así también, en el año de 1965 surge la primera evidencia clínica que relaciona la acumulación de bacterias en el área adyacente al surco gingival y el desarrollo de cambios inflamatorios en los tejidos periodontales³.

A pesar de lo anterior, existen evidencias antiguas relacionadas con el aislamiento de grupos bacterianos o bacterias específicas de sitios periodontales, y es indudable que ha tomado tiempo determinar el papel de la placa dentobacteriana como agente etiológico primario.

* Facultad de Odontología, UNAM. UNITEC.

Desde hace más de 100 años, Willoughby Dayton Miller (1890), trabajando en el laboratorio de Robert Koch realizó algunos hallazgos con base en observaciones de placa dentobacteriana, relacionó bacterias específicas y enfermedad periodontal, p. ej., *Fusiformis fusiformis*.

Hasta 1930 se siguieron describiendo bacterias asociadas de manera específica, p. ej., estreptococos, espiroquetas y amibas^{4,5}.

Todo lo anterior se considera como los primeros avances en relación con la teoría de placa dentobacteriana. Los estudios más recientes, los cuales colocan a la misma como base fundamental del origen infeccioso de estas enfermedades, son los publicados por Newman y cols. (1976 y 1977), aclarando la asociación entre *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y periodontitis juvenil localizada^{6,7}.

Es claro que diferentes componentes en las floras que caracterizan las enfermedades periodontales son evidentes, p. ej., gingivitis (*Actinomyces*, *Streptococcus sp.*), periodontitis del adulto (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, anaerobios de pigmentación negra)⁸, gingivitis ulcerativa necrosante aguda (espiroquetas, *Prevotella intermedia*)⁹, periodontitis juvenil localizada (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*)^{6,7}. Periodontitis rápidamente progresiva (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*)¹⁰, periodontitis prepuberal (*Capnocytophaga sputigena*, *Prevotella intermedia*)¹¹, y periimplantitis (*Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium sp.*)¹².

Hablando de periodontitis, en los seres humanos se sabe que entre diez y 30 especies de bacterias presentes en la flora subgingival están relacionadas de una o de otra forma con la etiología de la misma. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis* se consideran como “muy fuertemente asociadas”. *Bacteroides forsythus*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum* y algunas especies de treponema están “fuertemente asociadas”, seis especies adicionales están “moderadamente asociadas” y varias más en proceso de investigación¹³.

Por todo lo anterior, se puede decir que el diagnóstico microbiológico en varias formas de periodontitis puede depender de la identificación de los microorganismos involucrados específicamente, siendo éstos aislados de muestras de flora subgingival obtenidas del fondo de las lesiones periodontales¹⁴.

Las indicaciones del diagnóstico microbiológico periodontal son las siguientes. (1) Buscando determinar el agente causal, (2) intentado evaluar actividad de enfermedad periodontal al planear el tratamiento, (3) monitorear los efectos del tratamiento, (4) definir los intervalos en la fase de mantenimiento, (5) en pacientes o sitios, los cuales son refractarios al tratamiento convencional, y (6) para identificar

personas en riesgo de presentar un episodio de enfermedad o recurrencia¹⁵.

EL CONCEPTO DE ACTIVIDAD DE ENFERMEDAD PERIODONTAL
La periodontitis es la inflamación de los tejidos de soporte de los dientes, caracterizada por la destrucción progresiva que conduce a la pérdida del hueso y del ligamento periodontal^{15,16,17}.

La actividad de enfermedad periodontal, se define como el estado de enfermedad caracterizado por la pérdida del hueso de soporte y la inserción de tejido conectivo¹⁵.

Como se indicó, la historia destructiva natural de la periodontitis sigue períodos de remisión y exacerbación; varios modelos se han desarrollado para explicar estos fenómenos.

(1) **Paradigma continuo**, el cual nos habla de una destrucción continua y progresiva de los tejidos periodontales¹⁸; (2) **teoría de ataques al azar**, en la cual se definen períodos de destrucción seguidos por períodos de no-destrucción, apareciendo indefinidamente en relación al tiempo y al sitio en un mismo individuo¹⁹; (3) **ataque múltiple asincrónico**, en el que se propone que la destrucción se presenta durante un período definido y entonces la enfermedad cae en un período de remisión¹⁹. Existe información que sustenta estos tres modelos de destrucción temporal de los tejidos periodontales y es posible que se manifieste en diferentes sitios e individuos dependiendo del tipo de enfermedad periodontal presente²⁰.

MÉTODOS APLICADOS EN EL DIAGNÓSTICO PERIODONTAL
Durante mucho tiempo se clasificó a las enfermedades periodontales como gingivitis y periodontitis. Se creía que la gingivitis derivaba inevitablemente en periodontitis. Con base en la información con que contamos actualmente se sabe que clínicamente nos podemos estar enfrentando ante diversas situaciones, las cuales están seguramente caracterizadas por complejas interacciones entre el hospedero y los microorganismos o floras bacterianas específicas al sitio o al tipo de periodontitis en particular, por lo que se justifica el argumento de que la gingivitis no siempre deriva en periodontitis¹⁵.

Se sabe que los patrones de destrucción que caracterizan a las lesiones en periodontitis están definidos por períodos de remisión y exacerbación, siempre con tejido periodontal inflamatorio crónico.

Lo anterior ha propiciado que los métodos de diagnóstico aplicados en periodoncia, con el objeto de medir las características del proceso de enfermedad y no únicamente la destrucción provocada por la misma, sean cada vez más sensibles y específicos; sin embargo, la información con relación a la historia natural de las enfermedades periodontales y la patogenia de las mismas es aún incompleta, por lo que es difícil de establecer una interpretación exacta de las mediciones^{15,16}.

No obstante, existen diversos métodos de diagnóstico de aplicación cotidiana y otros restringidos al área estrictamente de investigación (Tabla 1 y 5)¹⁵.

AGRUPACIONES Y BACTERIAS ESPECÍFICAS IMPORTANTES

Los modelos metodológicos aplicados al conocimiento de la patogenia de la enfermedad periodontal incluyen la presencia de placa dentobacteriana y de una flora subgingival específica, compuestas por agrupaciones bacterianas relacionadas con diferentes situaciones clínicas; p. ej., estado de salud, gingivitis y periodontitis (Tabla 2).

El modelo propuesto por Zambon y cols. (1994), toma en consideración seis aspectos en el proceso patogénico de la enfermedad periodontal²³.

El evento inicial e ineludible es la infección subgingival con la presencia de bacterias específicas provenientes de otros miembros familiares, posteriormente la colonización de toda la mucosa y en especial del epitelio del surco gingival es favorecido por factores bacterianos como las fimbrias y por factores del hospedero como las moléculas salivales. Además, algunas especies de periodontopatógenos pueden inclusive invadir la encía (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*), evadir los mecanismos de defensa produciendo leucotoxinas o factores que suprimen los linfocitos, y destruir los tejidos periodontales a través de factores de virulencia como la colagenasa y otras enzimas. Todo lo anterior conlleva a la presencia clínica de signos y síntomas de inflamación, lo que sugiere el

establecimiento de una terapia periodontal específica. Sin embargo, la enfermedad periodontal como otras enfermedades crónicas es recurrente; esta recurrencia se ve facilitada por la retransmisión de especies patogénicas en pacientes de los cuales ya han sido erradicados los patógenos infectantes. Por lo anterior, el paciente puede entrar en un ciclo de infección, terapia de antiinfección, reinfección y retratamiento. (Diagrama 1).

<p>Signos de inflamación Sangrado gingival Sangrado al sondeo Enrojecimiento y tumefacción Supuración</p>
<p>Mediciones de sondeo Profundidad de la bolsa al sondeo Niveles de inserción al sondeo</p>
<p>Radiografías y otras técnicas de imagen Radiografías periapicales Radiografías de substracción digital Análisis de imágenes por densitometría asistida por computadora Búsqueda de hueso radiofarmacéuticamente por el consumo de 99m-Tc-MDP (técnica que busca detectar alteraciones en metabolismo óseo).</p>

Tabla 1. Métodos clínicos en el diagnóstico periodontal.

Salud	Gingivitis	Periodontitis
<p><i>Streptococcus oralis</i> <i>Streptococcus sanguis</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Streptococcus gordonii</i> <i>Streptococcus mutans</i> <i>Streptococcus anginosus</i> <i>Streptococcus intermedius</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Rothia dentocariosa</i> <i>Actinomyces naeslundii</i> <i>Actinomyces gerencseriae</i> <i>Actinomyces odontolyticus</i> <i>Peptostreptococcus micros</i> <i>Eubacterium nodatum</i> <i>Capnocytophaga ochracea</i> <i>Capnocytophaga gingivalis</i> <i>Campylobacter gracilis</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>sp. polymorphum</i></p>	<p><i>Streptococcus oralis</i> <i>Streptococcus sanguis</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Streptococcus intermedius</i> <i>Capnocytophaga ochracea</i> <i>Capnocytophaga gingivalis</i> <i>Campylobacter gracilis</i> <i>Prevotella loescheii</i> <i>Peptostreptococcus micros</i> <i>Eubacterium nodatum</i> <i>Actinomyces naeslundii</i> <i>Actinomyces israelii</i> <i>Campylobacter concisus</i> <i>Actinomyces odontolyticus</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>sp. nucleatum</i> <i>Eubacterium brachy</i> <i>Eikenella corrodens</i> <i>Actinobacillus</i> <i>actinomycetemcomitans</i> Serotipo a</p>	<p><i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Actinobacillus</i> <i>actinomycetemcomitans</i> Serotipo b <i>Bacteroides forsythus</i> Espiroqueta PRO <i>Treponema denticola</i> <i>Prevotella intermedia</i> <i>Prevotella nigrescens</i> <i>Campylobacter rectus</i> <i>Peptostreptococcus micros</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>sp. vicentii</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>sp. nucleatum</i> <i>Selenomonas noxia</i> <i>Selenomonas flueggeii</i> Especies entéricas <i>Lactobacillus uli</i> <i>Veillonella parvula</i></p>

FUENTE. Darveau y cols. (1997).²²

Tabla 2. Especies subgingivales asociadas con salud, gingivitis y periodontitis.

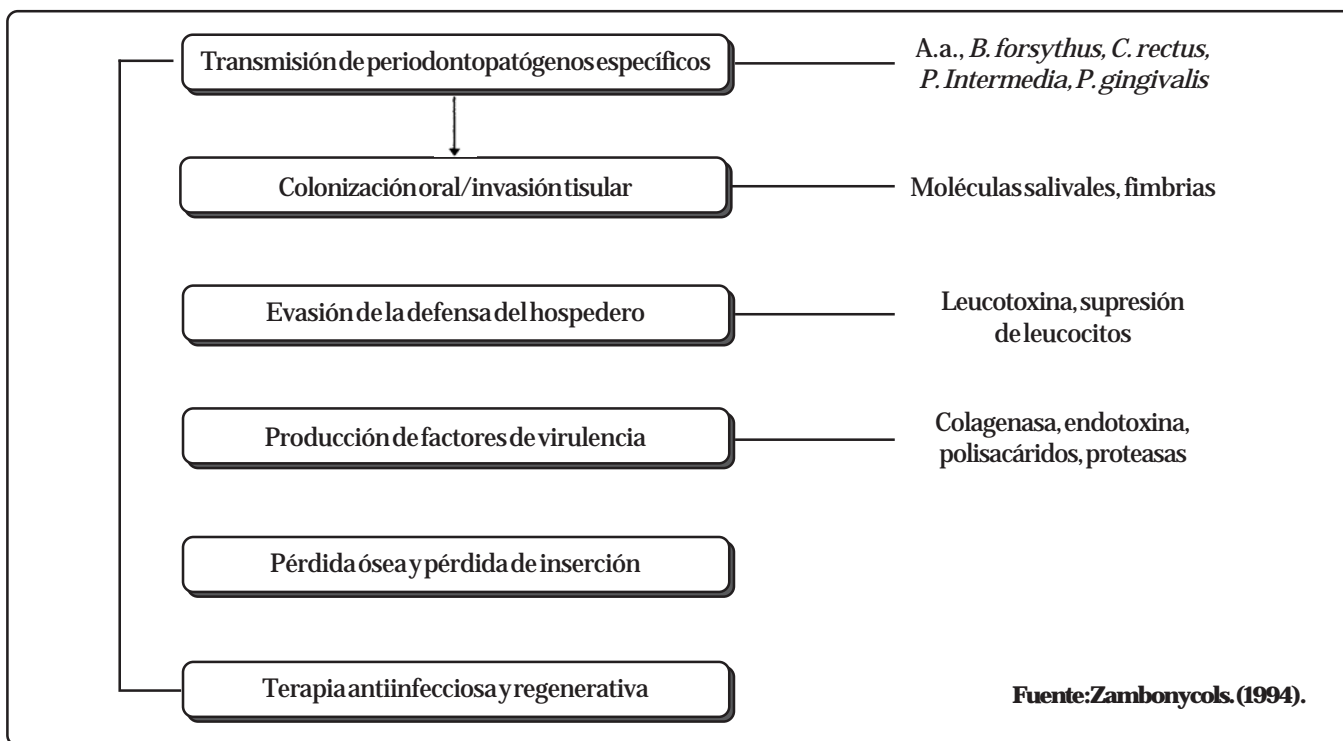


Diagrama 1. Patogenia de la enfermedad periodontal.

Con base en lo expuesto, es aplicable el diagnóstico microbiológico, el cual debe:

1. Diferenciar formas de enfermedad periodontal.
2. Identificar inicio de enfermedad.
3. Identificar personas y dientes susceptibles al inicio y progresión de enfermedad.
4. Establecer un monitoreo de respuesta al tratamiento²⁴.

La presencia de una flora periodontopatógena específica ha permitido tomar en cuenta las bacterias como **marcadores de riesgo** (específicamente indicadores de riesgo) en el desarrollo de enfermedad periodontal.

Los indicadores de riesgo son todas aquellas variables que no son necesariamente etiológicas de periodontitis; pero sí están asociadas con la misma. Es el marcador que ha sido apoyado con mayor frecuencia por los resultados de estudios transversales, en los que se han pretendido definir la presencia y la relación de bacterias o grupos de bacterias específicas y el desarrollo de enfermedad periodontal^{6,7,8,10}.

Las bacterias consideradas como factores de riesgo son agentes causales directos de enfermedad periodontal, y han sido identificadas por medio de estudios longitudinales²⁵.

Los sitios con periodontitis contienen más de 350 especies de bacterias; aun así, se han logrado asociar algunas de éstas con la enfermedad y son consideradas indicadores de riesgo de la misma (Tabla 3).

Porphyromonas gingivalis
Actinobacillus actinomycetemcomitans
Fusobacterium nucleatum
Campylobacter rectus
Prevotella intermedia
Eikenella corrodens
Bacteroides forsythus
 Especies de espiroquetas o treponemas

Fuente: Wolff cols. (1994)²⁵.

Tabla 3. Microorganismos indicadores de riesgo para periodontitis.

La presencia de ciertas bacterias y una elevada carga bacteriana de las mismas ha mostrado una asociación positiva con una mayor profundidad de bolsa, pérdida ósea, pérdida de niveles de inserción clínica e índices de sangrado (Tabla 4).

Sino existe asociación entre dos factores (bacteria y profundidad de sondeo) los momios son iguales a 1. Una razón de dos indica la **posibilidad de asociación**, mientras que 3 y 4 indican una **fuerte asociación** o una **muy fuerte asociación**, respectivamente. La asociación negativa indica < 0 = 10 a la 3 bacterias, la positiva baja o ligera > 0 = 10 a la 3 bacterias y < 0 = 10 a la 5 y altamente positiva > 0 = 10 a la 5 bacterias.

La mayoría de los estudios transversales muestra situaciones similares a la que se ejemplifica en la Tabla 4.

Fuerte asociación o muy fuerte asociación entre sondeos > 0 = 5 mm. y conteos > 0 = 10 a la 5 bacterias, esto es, razones

Profundidad de bolsa	>5mm.	Vs.	< o = 5 mm.
	Sitios positivos Vs. sitios negativos		Sitios altamente positivos Vs. sitios negativos o ligeramente positivos
Bacterias			
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	3,6		3,9
<i>Actinobacillus actinomyces comitans</i>	2,5		3,0
<i>Prevotella intermedia</i>	2,1		4,0
<i>Eikenella corrodens</i>	2,3		2,7
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1,4		2,8
Fuente: Wolffcols. (1994)²⁵.			

Tabla 4. Razones de momios para la asociación entre profundidad de sondeo y niveles de periodontopatógenos.

de momios hasta 3.9 para *Porphyromonas gingivalis* en sitios con bolsas periodontales profundas, pero con las variables evaluadas ya definidas al momento en el que se realiza el levantamiento de datos, lo cual no permite establecer una relación de causalidad²⁴.

Para conocer una relación causal, es necesario realizar estudios longitudinales en los que la relación causa-efecto aún no se ha definido. No obstante, la información obtenida en estudios transversales es útil, ya que la naturaleza multifactorial y las variaciones en la flora subgingival han ayudado a conocer perfiles microbiológicos de alguna manera constantes^{26,27}.

Porphyromonas gingivalis, *Actinobacillus actinomyces comitans*, y *Bacteroides forsythus* son los microorganismos que han mostrado una mayor asociación con el desarrollo de periodontitis²⁸.

A pesar de esto, los resultados son variables; p. ej., en grupos en los cuales existe una asociación positiva entre el desarrollo de periodontitis y sitios con altos porcentajes de bacterias medidas al inicio de la observación (grupo prueba), hay asociaciones positivas también en los sitios control, en los cuales no se registran cantidades elevadas de microorganismos al inicio, pero sí una pérdida de inserción y actividad de enfermedad importante al finalizar el estudio.

Existen diferentes marcadores que no son los únicos marcadores o indicadores de riesgo, que pueden ser aplicables a los modelos propuestos en el desarrollo de enfermedad periodontal. El modelo propuesto por Page y Kornman en 1997, define algunos otros factores en participación conjunta con el factor microbiológico, lo que puede explicar el por qué de los resultados cuestionables derivados de los estudios prospectivos (Diagrama 2).

Esto es, el factor microbiológico es inamovible en cualquier modelo metodológico de enfermedad periodontal, pero existen datos controversiales que sugieren la participación de otros factores y tal vez muestren que la participación del factor

microbiológico sea únicamente de un 20 % si se toman en cuenta factores como fumar, el cual puede tener mayor participación²⁸.

El nuevo paradigma que involucra el modelo propuesto por Page y Kornman (1997), ha generado varios nuevos conceptos.

La idea de considerar a la acumulación bacteriana adyacente al surco gingival, como una película biológica, y la presencia de factores genéticos y ambientales participando como factores de riesgo involucrados en una relación causal con el desarrollo de enfermedad, son conceptos que han cambiado los enfoques en la aplicación de métodos diagnósticos; sin embargo, el diagnóstico microbiológico no deja de ser atractivo para apoyar las decisiones clínicas, ya que es mejor el apoyo técnico de un diagnóstico bien sustentado que la valoración clínica y radiográfica que únicamente se realiza al diagnosticar enfermedades como periodontitis juvenil localizada o periodontitis refractarias al tratamiento, evaluando subjetivamente el aspecto microbiológico.

MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE MICROORGANISMOS ORALES

Desde que se hicieron las primeras observaciones de muestras microbiológicas, obtenidas de la superficie de los dientes por medio de microscopios rudimentarios en el año de 1683 por Anton Van Leeuwenhoek²⁹, es claro que han existido múltiples esfuerzos por estudiar microorganismos asociados a enfermedad periodontal por medio de la aplicación de diversas técnicas (Tabla 5).

La naturaleza mixta de los complejos microbiológicos, que caracterizan la flora subgingival asociada a lesiones periodontales, se ha tomado en cuenta desde que se realizaron estudios en animales, en los que se demostró la participación de combinaciones de especies en el desarrollo de abscesos experimentales, situaciones que no se presentaban al inocular las bacterias por separado³⁰.

Actualmente, no es clara aún la participación de los elementos presentes en combinaciones asociadas con enfermedad

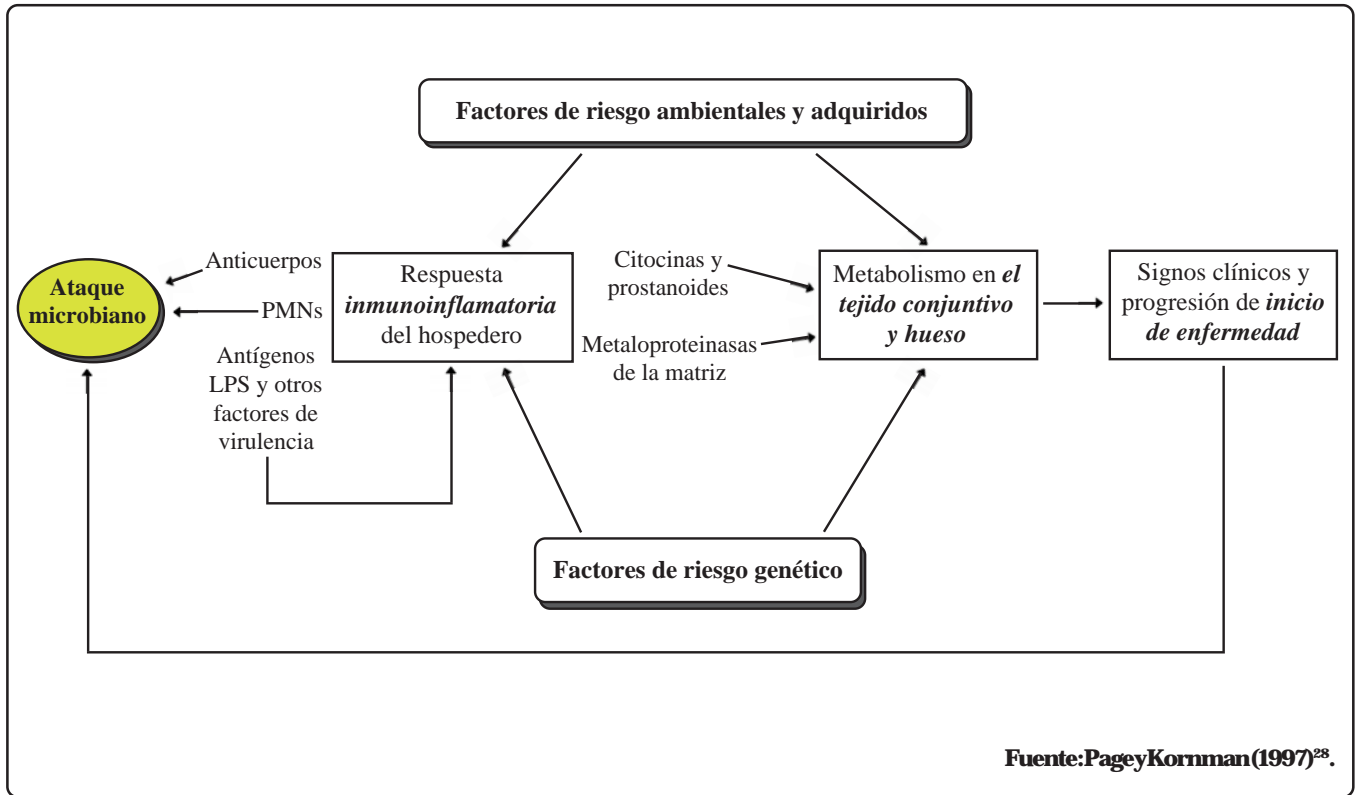


Diagrama 2. Patogénesis de la periodontitis humana.

Método	Identificación de especies específicas	Detección de proporciones de organismos específicos en muestras clínicas	Permitir realizar pruebas de sensibilidad antibiótica	Requiere viabilidad en microorganismo	Aplicación en enfermedad periodontal
1. Microscopía directa					
contraste de fase/campo oscuro	No	Limitada	No	Sí (movilidad)	Limitada
Microscopía de luz (tinción Gram)	No	Limitada	No	No	Limitada
2. Cultivo					
Medios no selectivos	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Medios selectivos	Sí	Limitada	Sí	Sí	Sí
3. Inmunodiagnóstico					
Inmunofluorescencia indirecta	Sí	Sí	No	No	Sí
Citometría de flujo	Sí	No	No	No	Sí
ELISA	Limitada	No	No	No	Limitada
Aglutinación	Sí	No	No	No	Limitada
4. Sondas de ácidos nucleicos ADN/ARN					
Sondas de oligonucleótidos	Sí	No	No	No	Sí

Fuente: SlotsyRams (1992)³⁰.

Tabla 5. Métodos para analizar la microflora oral.

periodontal, pero se conocen agrupaciones como las formadas por *Porphyromonas gingivalis* con o sin *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides forsythus* *Campylobacter rectus* con *Streptococcus intermedius* *Peptostreptococcus micros* *Streptococcus intermedius* *Fusobacterium nucleatum*; algunas otras combinaciones, como *Porphyromonas gingivalis* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* o *Bacteroides forsythus* y *Treponema denticola*³¹.

Lo anterior justifica que la aplicación de técnicas, que permitan la valoración de especies múltiples presentes en las muestras, sea prudente. Una de las más utilizadas es la técnica de "Checkerboard", la cual por medio de hibridación de ADN-ADN, permite la identificación de varias especies en grandes cantidades de muestras³¹.

Dichas técnicas no ofrecen algunas características del cultivo microbiológico, están confinadas a la identificación de especies únicas.

Actualmente, se conocen entre 50 y 100 clonas diferentes de *Porphyromonas gingivalis*, y además no se sabe la prevalencia exacta ni la participación de cada una de éstas en la enfermedad periodontal²⁸.

Esto es, uno de los aspectos en experimentación es definir por qué se ha observado una alta concentración de microorganismos periodontopatógenos en sitios, tanto sanos como enfermos, o por qué sitios definidos como de "alto riesgo", ya que presentan altas concentraciones de periodontopatógenos al inicio de una evaluación longitudinal, no desarrollan pérdida de nivel de inserción importante y los sitios control, catalogados como "no de alto riesgo" si desarrollan deterioro periodontal³¹.

Lo anterior indica, entre muchos detalles no especificados, que las ventajas que ofrecen las técnicas microbiológicas han rebasado las posibilidades que ofrece el conocimiento del paradigma de patogenia de enfermedad periodontal, por lo que, desde la aplicación de técnicas tan sencillas como la microscopía de campo oscuro hasta las sondas de ADN, y no olvidando al cultivo microbiológico, la microscopía de inmunofluorescencia y la detección enzimática (prueba BANA), la aplicación clínica de los mismos parece altamente útil pero no concluyente en su aplicación general.

REFERENCIAS

1. Page RC. Critical Issues in Periodontal Research. J Dent Res 1995; 74 (4): 1118-1128.
2. Keyes PH, Jordan HV. Periodontal Lesions in the Syrian Hamster. 111. Finding related to an infectious and transmissible component. Arch Oral Biol 1964; 9: 377-400.
3. Løe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. J Periodontol 1965; 36: 177-187.
4. Slots J, Rams TE. Contemporary Oral Microbiology and Immunology. First ed. St. Louis Missouri: Mosby year book, 1992: 425-443.

5. Carlsson J, Lindhe J. Periodontología clínica. 2a. ed. Buenos Aires, Argentina: Ed. Médica Panamericana, 1992: 122-140.
6. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: Currents concepts. J Periodontol 1992; 63: 322-331.
7. Newman MG, Socransky SS, Savitt ED, Propas DA, Crawford A. Studies of the microbiology of periodontitis. J Periodontol 1976; 47: 373-379.
8. Newman MG, Socransky SS. Predominant cultivable microbiota in Periodontitis. J Periodont Res 1977; 12: 120-128.
9. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The pathogenesis of Periodontitis. Periodontology 2000 1997; 14: 12-32.
10. Slots J. The predominant cultivable microflora of advanced Periodontitis. Scand J Dent Res 1977; 85: 114.
11. Listgarten MA, Socransky SS. Ultrastructural characteristics of a Spirochete in the lesion of acute necrotizing ulcerative gingivostomatitis (Vincent's infection). Ach Oral Biol 1964; 9: 95.
12. Moore WEC, Holdeman LV, Smibert RM, Ash DE, Burmeister JA, Ranney RR. Bacteriology of severe Periodontitis in young adult humans. Infect Immun 1982; 38: 1137.
13. Sweeney EA, Alcoforado GAP, Nyman S, Slots J. Prevalence and microbiology of localized Prepuberal Periodontitis. Oral Microbiol Immunol 1987; 2: 65.
14. Alcoforado GAP, Rams TE, Feik D, Slots J. Microbial aspects of failing osseointegrated dental implants in humans. J Parodontologie 1981; 10: 11-18.
15. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiologic agents of destructive periodontal diseases. Periodontology 2000 1994; 5: 78-111.
16. Caton J. Periodontal diagnosis and diagnostic aids. In: Proceedings of the world workshop in clinical periodontics. The American Academy of Periodontology 1989; 1: 1-8.
17. Genco RJ, Zambon JJ, Christersson LA. Use and interpretation of microbiological assays in periodontal diseases. Oral Microbiol Immunol 1986; 1: 73.
18. A. A. P. Glossary of Periodontal terminology. J Periodontol 1986; 57: 1-63.
19. Løe H, Anerud A, Boyesen H, Smith M. The natural history of periodontal disease in man. The rate of periodontal destruction before 40 years of age. J Periodontol 1978; 49: 595-607.
20. Socransky SS, Haffajee AD, Goodson JM, Lindhe J. New concepts of destructive periodontal disease. J Clin Periodontol. 1984; 11: 1-21.
21. Haffajee AD, Socransky SS, Dzink JL, Taubman MA, Ebersole JL. Clinical, microbiological and immunological features of subjects with refractory periodontal diseases. J Clin Periodontol 1988; 15: 390.
22. Listgarten MA. Microbiological testing in the diagnosis of periodontal disease. J Periodontol 1992; 63: 332-337.
23. Zambon JJ, Grossi S, Dunford R, Haraszthy VBI, Preus H, Genco RJ. Molecular pathogenesis of periodontal disease. First ed. Washington, DC: The American Society of Microbiology, 1994: 3-12.

24. Lindhe J, Karring T, Lang NP. Clinical Periodontology and Implant Dentistry. 3rd ed.: Munksgaard, 1998: Chapter 13.
25. Wolff L, Dahlén G, Aepli D. Bacteria as risk markers for Periodontitis. J Periodontol 1994; 64: 498-510.
26. Skaar DD, Wolff LF, Aepli DM, Bloomquist CG, Liljemark WF. A follow-up case report of Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease. J Clin Periodontol 1992; 19: 288-292.
27. Dzink JL, Tanner ACR, Haffjee AD, Socransky SS. Gram-negative species associated with active destructive periodontal lesions. J Clin Periodontol 1985; 12: 648-659.
28. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of Periodontitis. Periodontology 2000 1997; 14: 216-248.
29. Lindhe J. Periodontología clínica. 2ª ed. México: Ed. Médica Panamericana, 1992: 122-143.
30. Clinical Periodontology and Implant dentistry. Third Edition. Munksgaard Ed, 1998: 138-188.
31. Slots J, Taubman MA. Contemporary Oral Microbiology and Immunology. First ed. Mosby year book ed, 1992: 275-282.