

J.V. Ríos¹
M.V. Borobio²
E. Velasco¹
A. Martínez-Sahuquillo¹
G. Machuca¹
J.R. Lacalle³
P. Bullón⁴

1 Profesor Asociado Facultad de Odontología
2 Profesor Titular Microbiología
3 Profesor Asociado Estadística
4 Catedrático de Periodoncia
Facultad de Odontología
Universidad de Sevilla

Correspondencia:
Prof. J.V. Ríos
Facultad de Odontología
Avda. Dr. Fedriani s/n
41009 Sevilla

Estudio longitudinal (2 años) de la periodontitis crónica del adulto: respuesta clínica y microbiológica

RESUMEN

Se realiza un seguimiento clínico y microbiológico durante dos años de 20 pacientes (2228 zonas) con periodontitis crónica del adulto evaluando la respuesta al raspado y alisado radicular. Se observa una recuperación de inserción al finalizar el raspado, que se pierde en parte a los dos años. Un análisis discriminante demostró que el sangrado es un buen factor de agrupación de las bolsas, encontrándose correlacionado con placa y nivel de inserción. Un análisis de regresión múltiple estimó que cuando la bolsa sangraba al comienzo del estudio, la respuesta clínica satisfactoria se reducía al 50%. Se observó una reducción de la flora patógena a los seis meses del raspado con reinstalación de los periodontopatógenos a los dos años. Además, los pacientes con evolución clínica desfavorable tenían mayor concentración al comienzo del estudio de bacilos gram negativos anaerobios y facultativos que los pacientes con evolución favorable.

PALABRAS CLAVE

Microbiología oral; Periodontitis crónica; Raspado y alisado; Estudio longitudinal.

ABSTRACT

The present longitudinal study was conducted during two years in 20 patients (2228 sites) suffering from adult chronic periodontitis to evaluate clinical and microbiological changes. It was observed a gaining in clinical attachment after of scaling an root planing, that was lost after 2 years. Discriminant analysis showed that bleeding on probing is a good factor to groupe the pockets and was related to plaque and clinical attachment loss. A multiple regression analysis demonstrated that when the pocket was bleeding at first visit good clinical response was reduced in 50%. At six months the microbiological flora was reduced, but at two years periodontal pathogens reappeared. The patients with worst clinical results had at the first visit more gram negative anaerobe and facultative bacteria than patients with good clinical evolution.

KEY WORDS

Microbial flora; Chronic Periodontitis; Scaling and root planning; Longitudinal studies.

2 INTRODUCCIÓN

La búsqueda de los agentes etiológicos de la enfermedad periodontal destructiva ha pasado a engrosar los trabajos de investigación periodontales durante los últimos 100 años. El análisis de la microbiota subgingival supone un enorme desafío para el microbiólogo periodontal, ya que se estima que residen más de 325 especies distintas en la zona subgingival⁽¹⁾. Se calcula que la bolsa periodontal alberga alrededor de 10^{10} bacterias por gramo de peso húmedo.

Para complicar aún más la situación, no se ha establecido en ningún momento que sean especies únicas o aisladas las responsables de la enfermedad periodontal; y, si consideramos que podría hablarse de infecciones mixtas por la asociación de dos o más especies microbianas, la complejidad aumenta enormemente (44850 combinaciones posibles de dos especies; y escapa a nuestras posibilidades tomar en consideración más especies).

Similar problema plantea la existencia de especies microbianas oportunistas que pueden dar lugar a confusiones, ya que se aprovecharían de las condiciones ambientales producidas por el verdadero patógeno. Se puede caer en el error, a lo largo de una investigación, de considerar como verdaderos patógenos a especies que sólo indicarían la degradación⁽²⁾ del nicho ecológico por el avance de la enfermedad, de ahí que en la actualidad, diferenciar las especies marcadoras de las verdaderamente patógenas representa un desafío considerable⁽³⁾.

Estudios recientes sobre la etiología microbiana de la enfermedad periodontal^(4,6) indican que *Prevotellas* y *Porphyromonas* tienen una especial importancia en el proceso que nos ocupa. Se encuentran asociadas a una boca sana *Prevotella melaninogenica*, *denticola* y *loeschii*. Se ha observado que *P. endodontalis* está asociado a infecciones endodontaes, y que *P. intermedia*, aunque patógena, parece ser la menos específica de todos, dado que existe en presencia de gingivitis, periodontitis, infecciones endodontaes y abscesos endodónticos. Con mucha probabilidad la especie más patógena y virulenta es *P. gingivalis*, estrechamente asociada a la periodontitis destructiva quizás por su gran poder proteolítico.

No obstante, todos estos trabajos relacionan esta

microflora con los signos clínicos de la enfermedad medidos en un momento dado. Falta por comprobar qué influencia puede tener en la evolución de la enfermedad la presencia de un microorganismo específico, así como valorar la relación de una posible recolonización con la reactivación del proceso destructivo, con las importantes implicaciones pronósticas que ello conlleva. Por todo ello, hemos diseñado este estudio con los objetivos fundamentales de estudiar la etiología bacteriana de la enfermedad y evaluar la respuesta clínica al tratamiento de nuestros pacientes con periodontitis crónica del adulto, indagar la importancia o no del sangrado como determinante de la evolución, y finalmente, intentar establecer una correlación clínica/microbiológica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se admitieron en el presente estudio veinte pacientes remitidos al Servicio de Periodoncia de la Facultad de Odontología de Sevilla. Los requisitos de inclusión fueron:

- No distinción de sexo o raza.
- Edad comprendida entre 30 y 50 años.
- Poseer un mínimo de 20 dientes.
- No ser portador de ningún tipo de prótesis.
- No padecer enfermedad sistémica.
- No estar tomando ningún medicamento.
- No haber consumido antibióticos en los últimos seis meses ni inmunosupresores en los dos últimos años.
- No haberse sometido a una tartrectomía simple en el último año ni haberse realizado nunca raspado y alisado radicular o cirugía periodontal.
- Al menos el 50 % de los dientes deben presentar bolsas mayores de 3 mm (al comprobarlo se realizaba una elección de las zonas de estudio microbiológico).
- Las bolsas periodontales mayores de seis milímetros no superarán el 10% del total.
- No evidencia radiográfica de haber perdido más de un 25% de hueso alveolar.
- Exclusión del estudio a todo paciente que necesitara medicación antibiótica en el transcurso de la investigación (por procesos dentales o por patología intercurrente).
- Consentimiento informado.

- B
- El
- m
- E
- m
- R
- qu
- do
- E
- m
- E
- m
- E
- mi
- Se

En to
pacie
se ex
patol
tratar
Se
para
hemo
utiliz
contr
mod.
sonda
(0.22
de e
exam

Co
inser
punc
resina
vacío
pacie
esta p
que la
al nive
Con

Los pacientes admitidos se incluyeron en el siguiente protocolo:

1) Clínico

- *Basal*: Impresiones de alginato, serie periapical. Elección de zonas de estudio microbiológico (4-6 mm y sangrado positivo).
- *Exploración 1 (día 0)*: Toma de tres muestras microbiológicas. Toma de índices clínicos.
- *Raspado y alisado* (por cuadrantes, en sesiones quincenales; cuatro en total, durante un período de dos meses).
- *Exploración 2 (día 90)*: Índices clínicos y tomas microbiológicas en las mismas zonas.
- *Exploración 3 (día 180)*: Índices clínicos y tomas microbiológicas en las mismas zonas.
- *Exploración 4 (1 año)*: Índices clínicos.
- *Exploración 5 (2 años)*: Índices clínicos y microbiológicos.

Se definieron como zonas de estudio⁽⁷⁾ seis por diente. En total se investigaron 2228 zonas en diez y siete pacientes, ya que de los veinte pacientes originales, dos se excluyeron debido a la ingesta de antibióticos por patología intercurrente, y uno se perdió al recibir tratamiento protésico por necesidades estéticas.

Se calculó el índice de placa según Silness y Loe⁽⁸⁾ para cada zona de estudio, así como el índice de hemorragia según van der Velden^(9,10). Para ello utilizamos una sonda electrónica de presión controlada⁽¹¹⁾ ajustada a 25 gr (Vine Valley Research mod. 250), en la que se insertó la parte activa de una sonda periodontal milimetrada de 0.40 mm de diámetro (0.22 Newton) (177 N/cm²). Todas las determinaciones de este índice fueron realizadas por un mismo examinador.

Con este mismo aparato se objetivaron los niveles de inserción⁽¹²⁾ de cada zona de estudio, tomando como punto fijo de referencia el borde libre de una placa de resina termoplástica (Marca Erkodur 2 mm) adaptada al vacío (Marca Vacformat/Dreve) sobre los modelos del paciente. Igualmente se determinó la distancia entre esta placa de resina y el margen gingival libre, de forma que la profundidad de bolsa quedó registrada al restar al nivel de inserción el margen gingival libre.

Con el fin de realizar el sondaje en el mismo sitio a lo

largo de todo el estudio, la sonda se introdujo en la bolsa a través de una ranura marcada previamente en la placa de resina con el fin de evitar errores en la reproductibilidad de las medidas⁽¹³⁾. Todos estos niveles fueron registrados por un mismo examinador calibrado, el cual se ajustó siempre al medio milímetro inferior. Dado el volumen de zonas investigadas, no consideramos imprescindible realizar test de regresión hacia la media⁽¹⁴⁾ y preferimos no duplicar las medidas para evitar falsos aumentos de profundidad posiblemente originados por actuación sobre los tejidos⁽¹⁵⁾.

2) Microbiológico

Se realizó la toma de muestras para estudio microbiológico (cualitativo y porcentual) en tres zonas⁽¹⁶⁾ de cada paciente (de 5 mm de profundidad)⁽¹⁷⁾ tras aislarlas con cuidado y secar su superficie supragingival con algodón estéril (nunca con aire)⁽¹⁸⁾. A continuación se eliminaba con suma atención la placa supragingival con una cureta Columbia 13-14, poniendo especial énfasis en no tocar encía ni producir sangrado.

Posteriormente se introdujo en el fondo de la bolsa una punta de cureta Columbia 13-14 estéril (mantenida con un porta igualmente esterilizado), extrayéndola tras remover la máxima cantidad posible de placa subgingival, incluyéndola inmediatamente (bajo corriente de CO₂) en 2 ml de medio de transporte prerreducido V.I.P.⁽¹⁹⁾ para su inmediato traslado al Dpto. de Microbiología. Los tubos con las muestras se agitan durante veinte segundos (Vortimixer, marca Whirlimixer 50 W, 50-60 Hz), para realizar a continuación diluciones seriadas en base 10 hasta 10⁻⁵ en medio de thioglicolato (DIFCO). De cada dilución se sembró una alícuota de 0,1 ml en los siguientes medios:

- Para aislamiento de aerobios: Agar sangre (AS) para recuento total de aerobios. *Haemophilus* para aislamiento de *Haemophilus*.
- Para aislamiento de anaerobios: Brain heart infusión agar sangre (BHIA) para recuento total de anaerobios y facultativos; Brucella agar Kanamicina-Vancomicina sangra lacada para aislamiento de *Porphyromonally Prevotella*; Tryptic-soy agar-bacitracina-vancomicina (TSBV) para aislamiento de *Actinobacillus*; Tood agar-clindamicina (TAC) para aislamiento de *Eikenella*;

Tabla 1 Agrupación flora periodontal (22-23-24 modificado)

Grupos microbiológicos	Flora bucal endógena	Periodontopatógenos
Facultativos		
Cocos gram positivos	<i>Streptococcus spp</i> <i>Staphylococcus spp</i> <i>Str. pneumoniae</i>	
Cocos gram negativos	<i>Neisseria spp</i>	
Bacilos gram positivos	<i>Lactobacillus spp</i> <i>Corynebacterium spp</i>	
Bacilos gram negativos	<i>Haemophilus spp</i>	<i>Capnocytophaga</i> <i>Eikenella corrodens</i>
Anaerobios		
Cocos gram positivos		<i>Peptostreptococcus</i>
Cocos gram negativos	<i>Veillonella parvula</i>	
Bacilos gram positivos	<i>A. ctynomycetales</i>	<i>Clostridium spp</i> <i>Eubacterium spp</i>
Bacilos gram negativos	<i>P. melaninogenica</i> <i>P. denticola</i> <i>P. loeschii</i>	<i>Fusobacterium spp</i> <i>P. asaccharolytica</i> <i>P. intermedia</i> <i>P. gingivalis</i>

Columbia nalidixico-bacitracina-colistina (BGA) para aislamiento de *P. gingivalis* y *Capnocytophaga*; Phenyl-etyl-alcohol (PEA) para aislamiento de *Fusobacterium*.

Los dos primeros medios se incubaron 24-48 horas en ambiente de CO₂ y los demás en cámara de anaerobiosis (FORMA Sci) durante 7 días. Todas las colonias con morfología diferente se identificaron a nivel de especie y se expresaron sus concentraciones en tantos por ciento del total de aislamientos de cada muestra.

Las placas de anaerobiosis se incubaron de 4 a 7 días, a 35° C en una cámara de anaerobios (marca COY), mientras que las de aerobiosis lo fueron durante 48 horas, en estufa a 35°C.

La identificación posterior de los gérmenes aislados se realizó según la metodología de Sutter y cols.⁽²⁰⁾, Hardie⁽²¹⁾ y Romond⁽²²⁾. Para algunos análisis se consideró

la flora bucal endógena (asociados a salud periodontal), respecto de los periodontopatógenos (Tabla 1)⁽²³⁻²⁵⁾.

3) Análisis estadístico

Se realizó con el paquete de software SPSS/PC(+)⁽²⁶⁾, en un ordenador IBM (memoria RAM 4 Megas). Las matrices de datos utilizadas se introdujeron en el paquete dBASE III(+)⁽²⁷⁾. Se realizó en las siguientes etapas:

A) **Estudio descriptivo simple** de las variables sangrado, placa, nivel de inserción, nivel de encía y bolsa, tomando como unidad experimental las zonas individuales. La significación de las diferencias entre las diferentes exploraciones se evaluó mediante un análisis de la varianza de dos vías (variable/exploración).

B) **Análisis discriminante del sangrado**, correlacionándolo con la zona topográfica, el nivel de encía, el nivel de inserción y el grado de placa. Se utilizó

Tabl
Exp
% S
Gra
Bol

la fun
signific
las vari
 incluid
de tole

C)
profund
en func
estudio
se utiliz
el coefi
correla
modelo

D) A
de los
explora
o pato
tratami

E) A
profund
los dife
por el
profund
aislada:

RESULT

A) EVO (Tabla

El p
reduce
elevanc
grado d
en cada

Pod
la férula



Tabla 2 Evolución clínica global de las zonas de estudio ($p < 0,0005$)

Exploración	Primera	Segunda	Tercera	Cuarta	Quinta
% Sangrado	64	46	44	39	44
Grado de placa	1,28	1,03	1,21	0,97	1,30
Bolsa	3,26	2,83	2,63	2,78	2,69

la función de discriminación canónica con una significación máxima de Lambda de Wilks de 1.0. Todas las variables pasaron un test de tolerancia antes de ser incluidas por el método directo, exigiéndoseles un nivel de tolerancia mínima de 0.001.

C) **Análisis de regresión múltiple** entre profundidad inicial de bolsa y su respuesta al tratamiento en función de que la bolsa sangrara o no al comienzo del estudio. Para la selección de las variables independientes se utilizó el método «paso a paso» (stepwise). Se calculó el coeficiente de regresión junto con los coeficientes de correlación y de determinación (R^2). La validez del modelo se contrastó mediante el test F de Snedecor.

D) **Análisis de la varianza**, comparando las medias de los diferentes grupos microbiológicos para cada exploración. Igualmente se agrupó la flora en habitual o patológica evaluando su evolución a lo largo del tratamiento.

E) **Análisis de regresión múltiple** entre la profundidad de bolsa inicial (variable dependiente) y los diferentes grupos de gérmenes (v independientes), por el procedimiento stepwise, así como entre la profundidad de bolsa inicial y las diferentes especies aisladas.

RESULTADOS

A) Evolución clínica de las zonas de estudio (Tabla 2)

El porcentaje de zonas que sangran al sondaje se reduce de forma paulatina durante el primer año, elevando discretamente sus niveles a los dos años. El grado de placa se reduce y aumenta de forma alternativa en cada exploración.

Podemos observar como la inserción (distancia desde la férula al fondo de la bolsa) comienza a recuperarse al

finalizar el raspado, con una nueva recuperación en los tres meses siguientes, pero comienza a perderse al año, situándose a los dos años sólo un poco mejor que al comienzo del estudio. El nivel de encía (distancia desde la férula al borde marginal de encía libre) muestra como baja la inflamación en la encía libre a consecuencia del tratamiento, agravándose la recesión gingival en el mantenimiento. En la profundidad de bolsa se observa una reducción al finalizar el raspado, que sigue mejorando en los tres primeros meses (al igual que la recuperación de inserción) manteniéndose estable a los dos años (pero por una reducción en el nivel de encía, ya que a los dos años se pierde parte de la inserción recuperada).

Probablemente, los datos queden más claros si se expresan en términos de bolsa, recuperación de inserción (al acercarse el fondo de la bolsa a la férula), y recesión gingival (al disminuir la inflamación de la encía y/o producirse retracción gingival) (Tabla 3).

B) Análisis según la profundidad inicial de bolsa

Se agruparon las zonas de estudio en intervalos según su profundidad de bolsa al comienzo del protocolo: Bolsa inicial menor de tres milímetros (Tabla 4), bolsa inicial entre 3 y 6 milímetros (Tabla 5) y bolsa inicial mayor de seis milímetros (Tabla 6).

Podemos constatar que a mayor profundidad de bolsa, más posibilidades existen de que sangre la zona, manteniéndose constante esta característica a lo largo del protocolo.

Con respecto a las bolsas, las pequeñas tienen un comportamiento muy distinto de las moderadas-grandes, ya que se observa en las primeras una pequeña pérdida de inserción a consecuencia de la instrumentación. Los efectos más beneficiosos del raspado se obtienen en las bolsas muy profundas (se reduce la bolsa 2,7 mm 38 % respecto a la bolsa inicial-, de los cuales 1,60

6

Tabla 3 Cambios globales en bolsas, considerando la recuperación de inserción y la retracción gingival ($p < 0,0005$)

	<i>Ganancia inserción</i>	<i>Bolsa</i>	<i>Recesión gingival</i>
Basal	—	3,26	—
3 meses	0,12	2,83	0,31
6 meses	0,31	2,63	0,32
1 año	0,22	2,78	0,26
2 años	0,08	2,69	0,49

Tabla 4 Evolución clínica de las bolsas menores de 3 mm ($p < 0,0005$)

<i>Exploración</i>	<i>Primera</i>	<i>Segunda</i>	<i>Tercera</i>	<i>Cuarta</i>	<i>Quinta</i>
% Sangrado	48	33	31	27	30
Grado de placa	1,02	0,72	0,88	0,56	0,94
Bolsa	1,88	2,08	1,93	2,06	1,96

	<i>Ganancia inserción</i>	<i>Bolsa</i>	<i>Recesión gingival</i>
Basal	—	1,88	—
3 meses	0,37	2,08	0,17
6 meses	0,13	1,93	0,08
1 año	0,28	2,06	0,1
2 años	0,32	1,96	0,24

Tabla 5 Evolución clínica de las bolsas entre 3-6 mm ($p < 0,0005$)

<i>Exploración</i>	<i>Primera</i>	<i>Segunda</i>	<i>Tercera</i>	<i>Cuarta</i>	<i>Quinta</i>
% Sangrado	72	51	50	43	50
Grado de placa	1,43	1,17	1,39	1,12	1,47
Bolsa	3,88	3,12	2,93	3,01	2,96

	<i>Ganancia inserción</i>	<i>Bolsa</i>	<i>Recesión gingival</i>
Basal	—	3,88	—
3 meses	0,38	3,12	0,38
6 meses	0,53	2,93	0,42
1 año	0,51	3,01	0,36
2 años	0,32	2,96	0,60

corresponden a recesión), y también en bolsas moderadas (0,92 mm de reducción -25 % respecto a la bolsa inicial-, de los cuales 0,60 corresponden a recesión).

C) Análisis discriminante del sangrado

Se realizó un análisis discriminante del sangrado

para evaluar la **calidad** de este parámetro en la agrupación de las bolsas, correlacionándolo con la zona topográfica, el nivel de encía, el nivel de inserción y el grado de placa. La matriz de estructura que muestra la correlación entre las variables discriminadas y las funciones canónicas discriminantes se muestra ordenando estas variables por el tamaño de su

Tab

Exp

%

Gr

Bo

Bas

3 m

6 m

1 a

2 a

correla

de caso

• Plac

• Nive

• Zon

• Mar

Tod

es un l

(80 %)

con el

de la b

con la

los sei

sangra

de enc

aparez

medid

margen

inflama

que int

D) An

Se e

indep

estimá

distint

1. Cua

Bols

Tabla 6 Evolución clínica de las bolsas mayores de 6 mm ($p < 0,0005$)

Exploración	Primera	Segunda	Tercera	Cuarta	Quinta
% Sangrado	80	65	49	53	50
Grado de placa	1,35	1,31	1,10	1,20	1,25
Bolsa	7,18	5,06	4,56	4,40	4,50
	Ganancia inserción		Bolsa	Recesión gingival	
Basal	-		7,20	-	
3 meses	1,20		5,00	1,00	
6 meses	1,40		4,60	1,20	
1 año	1,10		4,40	1,70	
2 años	1,10		4,50	1,60	

correlación con la función discriminante (el porcentaje de casos correctamente agrupados correspondió al 80%):

- Placa .50477
- Nivel de inserción .37584
- Zona .32134
- Margen de encía -.31027

Todo esto nos indica, en primer lugar, que el sangrado es un buen factor de agrupación para nuestras bolsas (80 %), y en segundo lugar, que está muy relacionado con el nivel de placa y con el nivel de inserción (suelo de la bolsa). También se correlaciona en menor medida con la zona (ya vimos en un estudio previo⁽²⁸⁾ cerrado a los seis meses de evolución de este protocolo que sangran mucho más las interproximales) y con el nivel de encía libre (no debe extrañarnos que en el SPSS aparezca una correlación negativa, porque nuestras medidas se toman desde el borde de la férula hasta el margen gingival libre, y por lo tanto, al disminuir la inflamación aumenta la medida, contrariamente a lo que intuitivamente podríamos esperar).

D) Análisis de regresión múltiple

Se estimó un modelo de regresión múltiple, que incluyó la variable «bolsa inicial» (B1) como variable independiente, y «bolsa final» como dependiente, estimándose la reducción final de bolsa en dos supuestos distintos (en ambos $p < 0,0005$):

1. Cuando la bolsa inicial no sangraba:

$$\text{Bolsa final} = -0,59 \cdot B1 + 0,32 \quad (\text{Múltiple } R = 46 \%)$$

2. Cuando la bolsa inicial sangraba:

$$\text{Bolsa final} = -0,26 \cdot B1 + 0,05 \quad (\text{Múltiple } R = 46 \%)$$

De un modo práctico, podemos asignar valores a la bolsa inicial, y veremos que la reducción estimada en la bolsa a consecuencia del tratamiento es la mitad de buena cuando la bolsa sangraba al comienzo del ensayo que cuando no lo hacía (Tabla 7).

E) Análisis microbiológico

Se investigaron tres localizaciones por paciente y exploración. (en total 51 sitios estudiados). El número total de aislamientos disminuyó a lo largo del protocolo: 445 en la primera exploración, 295 en la segunda, 205 en la tercera y 212 en la quinta.

Los diferentes grupos de gérmenes aparecen en la tabla 8, comparándose sus concentraciones a lo largo del protocolo. En las dos últimas filas quedan reflejadas las concentraciones de gérmenes habituales versus patógenos en cada una de las exploraciones. Puede observarse que la beneficiosa respuesta microbiológica con reducción de los gérmenes patógenos se observa a los seis meses, pero éstos se reinstauran nuevamente a los dos años.

Tomando como unidad experimental al paciente y no a las zonas de estudio, se investigaron las concentraciones iniciales de los diferentes grupos de gérmenes según evolucionaran los pacientes favorablemente, se estacionaran, o empeoraran. Como criterio clínico de evolución favorable, se consideró como tal al paciente que

Tabla 7 Reducción estimada de bolsas según sangrado

Bolsa inicial (mm)	Reducción cuando no sangra	Reducción cuando sí sangra
2	0,88 mm estimados	0,47 mm estimados
4	2,08 mm estimados	0,99 mm estimados
6	3,28 mm estimados	1,50 mm estimados

Tabla 8 Concentración de los diferentes grupos de gérmenes a lo largo del protocolo (p < 0,005)

Tipo de gérmenes	Basal	3 meses	6 meses	2 años
C + F*	30,3	29,4	36	5,1
B + F*	12,5	17,3	18,4	42
C - F*	1,5	5,2	6,5	1,8
B - F*	12,8	13,9	17	22,8
C + A*	6,4	11,1	2,4	2,6
B + A*	7,4	6,5	4,3	2
C - A*	3,3	1,1	2,1	1,6
B - A*	28,4	15,5	15	21,1
Total	100	100	100	100
Habituales	77,04	70,36	87,09	73,93
Patógena	18,198	18,68	12,42	22,66

* C: cocos; B: bacilos; +: gram positivo; -: gram negativos; F: facultativos; A: anaerobios

Tabla 9 Concentración media de los gérmenes según evolución clínica de los pacientes (p < 0,05)

Tipo de gérmenes	Evolución positiva	Sin cambios	Evolución negativa
C + F*	36,1	28,1	19,1
B + F*	26,1	20,8	15,5
C - F*	0,7	3,3	12
B - F*	14,8	15,3	18,2
C + A*	10,5	4,9	3,8
B + A*	3,2	5,7	7
C - A*	2	2,3	0,8
B - A*	6,6	19,6	23,6
Pérdidas dentarias	Ninguna	Una	Siete

* C: cocos; B: bacilos; +: gram positivo; -: gram negativos; F: facultativos; A: anaerobios

redujo la profundidad media de sus bolsas en más de un 15 % o recuperó al menos un 10 % de inserción media; aquellos que aumentaron la profundidad media de sus bolsas en un 15 % o perdieron más de un 10 % de inserción se consideraron de evolución negativa; el resto se consideró como evolución clínica estacionaria (Tabla 9).

Al final de dicha tabla se correlaciona la evolución

clínica y microbiológica con el número de pérdidas dentarias en todo el estudio. Podemos observar que están aumentados los bacilos gram positivos y negativos anaerobios así como los gram negativos facultativos en los pacientes con mala evolución clínica. Por el contrario, un porcentaje elevado de gram positivos facultativos se correspondió con una evolución favorable.

Al realizar un análisis de regresión múltiple tomando como variable independiente los diferentes grupos de gérmenes, y como variable dependiente la profundidad de bolsa, solo se observó significación estadística con los cocos gram positivos facultativos ($p = 0,006$), aunque con un R Múltiple de tan solo 36%, por lo que pensamos que su significación clínica es muy escasa.

Al realizar idéntico análisis de regresión múltiple con las diferentes especies, en vez de con los grupos de gérmenes globales, se observó en la exploración basal una correlación entre la profundidad de bolsa y la concentración de *Capnocytophaga* ($p = 0,0048$; Múltiple R = 40%). En la segunda exploración, se correlacionó la profundidad de bolsa con la concentración de *Capnocytophaga* y *Porphyromona assacharolitica* ($p = 0,0028$; Múltiple R = 48%). En la tercera exploración, no se encontró asociación con ningún germen, y en la exploración final (2 años) el germen asociado a mayor profundidad de bolsa fue el *Propionibacterium* ($p = 0,006$; Múltiple R = 57 %).

DISCUSIÓN

A) Respuesta clínica al tratamiento

Los cambios longitudinales deben evaluarse analizando el nivel de inserción⁽²⁹⁾, que comienza a recuperarse al finalizar el raspado, siendo máxima su ganancia tres meses después; se pierde prácticamente a los dos años, y la reducción de bolsa que se ve a esas alturas del protocolo es a expensas de recesión gingival en casi su totalidad.

Si analizamos ahora el comportamiento de las bolsas entre 3 y 6 mm observaremos una reducción inicial del 20% de la bolsa que sube al 25% a los tres meses del raspado, manteniéndose prácticamente sin cambios al año y a los dos años. Sin embargo, la inserción conseguida a los seis meses se pierde en parte a los dos años situándose en niveles similares a los obtenidos al finalizar el raspado. Esta reducción final de bolsa se consigue en 1/3 por ganancia de inserción, y los 2/3 restantes por descenso en el margen gingival libre (disminución en la inflamación de la encía y recesión). Estos resultados están en la línea de los expuestos por Van Winkelhoff y cols.⁽³⁰⁾, que informan de una reducción en la

profundidad de bolsa tras el raspado y alisado radicular, con una ganancia significativa de inserción.

Curiosamente, en bolsas mayores de seis mm es donde hemos obtenido mejor respuesta clínica (30% de reducción de bolsa al finalizar el raspado que sube a 37% a los seis meses y se mantiene a los dos años), con una buena ganancia de inserción (estable en el tiempo) y un componente de recesión que no llega a los 2/3. Ya Bardesten y cols.⁽³¹⁾ demostraron que tras cuatro años de raspado y alisado las localizaciones con bolsas muy profundas -no incluyeron molares en su ensayo- no fueron más difíciles de mantener que las bolsas menos profundas. Sin embargo no pensamos que el raspado y alisado sea la mejor técnica para estas bolsas profundas, ya que hemos observado que el porcentaje de sangrado se mantiene alto, y la bolsa, aunque muy reducida de 7,20 mm de media a 4,50, continúa siendo muy grande.

Estos resultados eran los esperados y están de acuerdo con lo que refieren la mayoría de los autores^(32,33), aunque por último, nos gustaría llamar la atención sobre el efecto del raspado meticuloso en las bolsas menores de 3 mm, ya que hemos observado un 10% de aumento de bolsa al finalizar el raspado (4% a los dos años) con recesión gingival muy discreta, pero con pérdida de inserción de 0.37 mm que se mantuvo a los dos años. Claffey y cols.⁽³⁴⁾, investigando la efectividad del tratamiento tras el raspado y alisado de 1248 zonas en 9 pacientes, observaron que aproximadamente un 5% de los sitios perdían inserción.

Opinamos, con ellos, que la mayor parte de la pérdida de inserción registrada pudiera ser debida a la acción directa de los instrumentos, o bien al proceso de remodelación durante la fase de curación consecutivo al tratamiento, más que a la progresión misma de la enfermedad periodontal.

Con seguridad, la consecuencia más importante que podemos obtener es que con el raspado y alisado radicular sólo vamos a observar beneficios importantes en bolsas de tres milímetros o más. Sin embargo el sangrado disminuye a lo largo del protocolo en todas las profundidades, incluidas las bolsas menores de 3 mm, por lo que consideramos que siempre se debe realizar el tratamiento en toda la cavidad oral, y no recomendamos raspar surcos menores de 3 mm si no sangran al sondaje (quizás un pulido con copas insinuándonos suavemente de modo subgingival sería la única actuación a este

10 nivel). En cualquier caso, compartimos la filosofía de Ramfjord y Caffesse⁽³⁵⁾ quienes opinan que para las profundidades de sondaje de 1-3 mm el pulido y alisado radicular sería el tratamiento de elección, observando que en bolsas de 4 a 6 mm el raspado y alisado radicular proporciona mejor resultado que la eliminación quirúrgica de las bolsas, y que en bolsas de 7 a 12 mm no observaron diferencias significativas entre el raspado y el tratamiento quirúrgico (probablemente por un falta de potencia del método⁽³⁶⁾), aunque Caffesse⁽³⁷⁾ constató en otro estudio una relación directa entre el porcentaje de cálculo residual tras tratamiento y la profundidad de bolsa, con mejores resultados en bolsas profundas si se establecía un acceso quirúrgico.

Por otro lado, el porcentaje de zonas que sangran al sondaje se reduce de forma paulatina durante el primer año, elevando discretamente sus niveles a los dos años. Si analizamos el sangrado según la profundidad inicial, podremos observar que a mayor profundidad de bolsa inicial, más posibilidades existen de que la zona sangre al sondaje, manteniéndose constante esta característica a lo largo del protocolo.

Estos datos están de acuerdo con los aportados por Chaves y cols.⁽³⁸⁾ quienes observaron cambios importantes en la determinación del sangrado al sondaje en función de la profundidad de bolsa. Por otra parte, Lang y cols.⁽³⁹⁾ afirman que el sangrado al sondaje aumenta conforme mayor es la profundidad de bolsa. Opinan que el sangrado al sondaje es un signo limitado pero útil en el diagnóstico clínico, y se encuentra asociado a una mayor pérdida de inserción. Sin embargo hace tales afirmaciones tras analizar un estudio retrospectivo, y está contra lo postulado por Vanooteghem y cols.⁽⁴⁰⁾, quienes postulan que el sangrado proporciona una pobre precisión diagnóstica. De hecho, los periodoncistas no podemos admitir una fiabilidad exacta del sangrado al sondaje al estar influenciado por numerosos factores, como por ejemplo el hecho de que el paciente se haya cepillado poco tiempo antes de entrar en el gabinete, pudiendo producir este acto una elevación temporal de las tasas de sangrado al sondaje⁽⁴¹⁾.

Ainamo y Bay⁽⁴²⁾ aseguran que el sangrado al sondaje podría utilizarse para identificar las zonas que deben ser retratadas en la fase de mantenimiento, y nosotros estamos con ellos ya que hemos constatado una peor evolución de las zonas sangrantes, y hoy en día es la

herramienta más asequible que tenemos -aunque limitada- ya que está ampliamente demostrado que ni la placa⁽⁴³⁾, ni la inflamación gingival, ni la profundidad de bolsa pueden servir de indicador para preveer la pérdida de inserción⁽⁴⁴⁾. De hecho, coincidimos plenamente con Magnusson y cols.⁽⁴⁵⁾, quienes observaron mayor sangrado en las zonas con peor evolución, sin grandes diferencias -respecto de las que tenían mejor- en placa o en microbiología⁽⁴⁶⁾.

Al hacer el análisis discriminante del sangrado observamos que éste es un buen factor de agrupación para nuestras bolsas (80%), encontrándose muy relacionado con el nivel de placa (más sangrado a mayor placa) y con el nivel de inserción (más sangrado a mayor profundidad). Además, al estimar un modelo de regresión múltiple observamos que con el tratamiento se conseguía la mitad de efecto beneficioso de reducción de bolsa cuando sangraba al comienzo del ensayo que cuando no lo hacía, por tanto, y dado que actualmente se acepta el patrón episódico de la enfermedad periodontal⁽⁴⁷⁾ parece correcto afirmar que debe ponerse especial atención al tratamiento de las bolsas sangrantes.

B) Efecto del tratamiento sobre la microflora periodontal

Es posible que la disminución verificada en la proporción de los gérmenes periodontopatógenos y en el total de gérmenes gram negativos se correlacione con la favorable evolución clínica que hemos advertido en nuestro protocolo, donde hemos aislado todos los grupos bacterianos a excepción de las enterobacterias, que algunos autores⁽⁴⁸⁾ intentan asociar a periodontitis no VIH.

Desde el punto de vista de respuesta clínica coincidimos pues con Van Winkelhoff y cols.⁽²⁴⁾, quienes evidenciaron que el raspado y alisado radicular disminuye la profundidad de bolsa, con una ganancia significativa de inserción, encontrando una correlación positiva con la reducción de los microorganismos subgingivales (sobre todo de la *P. gingivalis*).

Dzink y cols.⁽⁴⁹⁾ asocian *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Wolinella recta* a sitios activos, que sufren una pérdida de inserción significativa en el transcurso de dos meses, relacionan a las especies de *Porphyromonas melaninogenica*, *denticola* y *loeschii* con individuos

sin destrucción virulenta proteolítica puedan evolucionar a lesiones tratamiento

Coincidimos con los gérmenes periodontopatógenos constatar las especies

Si analizamos anaerobios en la patología que con el tratamiento disminuye la respuesta de los halófilos a descender a la clínica favorable

Esta proporción menos microorganismos bacteriológicos de Slots y cols. de *P. gingivalis* que habíamos correlacionado

Opsvick y cols. entre la clínica que no se correlaciona microbiológicamente

Concluimos mediante el estudio de microorganismos sobre el efecto y su reciprocidad desde un punto de vista microbiológico inducir a cambios en los datos

sin destrucción periodontal; y catalogan como el más virulento a *P. gingivalis* por su gran actividad proteolítica. Quizás las poblaciones de *P. gingivalis* puedan estar ligadas a un retardo en la cicatrización de lesiones periodontales profundas después del tratamiento instrumental^(50,51).

Coincidimos con Haffajee y cols.⁽⁵²⁾ en que los gérmenes que con más frecuencia se aíslan en pacientes periodontales son los *Streptococcus*, y hemos podido constatar, al igual que estos autores, que en cada sujeto las especies predominantes han sido diferentes.

Si analizamos los bacilos gram negativos anaerobios⁽⁵³⁾, que desempeñan una función importante en la patogénesis de la enfermedad^(54,55), comprobamos que con el raspado y alisado radicular conseguimos disminuir sus niveles, aunque cuando valoramos la respuesta global de los gérmenes patógenos respecto de los habituales (Tabla 8), observamos que empiezan a descender a los seis meses, mientras que la respuesta clínica favorable ya empezaba a obtenerse a los tres.

Esta posibilidad de que estén disociadas, o por lo menos no se integren al unísono la clínica y la bacteriología, ya fue apuntada por el grupo de trabajo de Slots y cols.⁽⁵⁶⁾ quienes encontraron que la presencia de *P. gingivalis* se asociaba a pérdida de inserción, pero que había numerosas lesiones cuya clínica no se correlacionaba con los hallazgos microbiológicos.

Opsvig y cols.⁽⁵⁷⁾ apoyan esta aparente separación entre la clínica y la microbiología, al haber contemplado que no existen diferencias significativas en la microbiología de bolsas de 5 mm con y sin sangrado.

Concluyen que, por el momento, no es posible mediante la vigilancia de las proporciones de microorganismos, obtener información racionalizada sobre el estado microbiológico de la región subgingival y su reciprocidad con la actividad lesional. Por tanto desde un punto de vista práctico, basar sólo en datos microbiológicos un tratamiento periodontal, puede inducir a error: debemos apoyarnos continuamente en los datos clínicos. Además, no debemos olvidar que

para una correcta evaluación microbiológica influyen el momento de la toma de la muestra, el nº de bacterias que en ella se incluyen, la posibilidad de que se tome de una zona activa o en reposo, y las complicadas y aun no totalmente aclaradas relaciones entre patógenos específicos y gérmenes habituales y/o oportunistas, por lo que no podemos aún considerar ningún patrón de referencia al 100 %.

Además al investigar una posible asociación entre sitios activos o en reposo, puede ocurrir que no lleguemos a ninguna conclusión por obstáculos en el cómputo de los resultados^(58,59) (posibilidad de asociaciones mixtas⁽⁶⁰⁾, influencia de la edad^(61,62), efecto de la estrategia de la toma de muestras⁽⁶³⁾, etc). No debe extrañarnos por tanto que nosotros no hayamos obtenido resultados importantes o significativos en los test de regresión que intentaron correlacionar la clínica con la microbiología. Sin embargo, pudimos constatar (Tabla 9) que los pacientes con evolución clínica desfavorable tenían una mayor concentración al comienzo del estudio de bacilos gram negativos tanto anaerobios como facultativos, y que esta concentración era muy escasa en los pacientes que evolucionaron favorablemente, lo cual se encuentra en la línea de lo postulado por Kornman y cols.⁽⁶⁴⁾, quienes afirman que pueden establecerse diferentes patrones de periodontitis, mediante análisis cluster de los parámetros clínicos y microbianos.

El problema quizás resida en que el cambio que se produce en las zonas activas, y que algunos autores toman como indicador de actividad lesional, pudiera no ser el primer acontecimiento de la bolsa, sino el resultado del cambio en la biología del tejido conjuntivo-vascular que promoviera modificaciones en el medio ambiente tisular local. Ello favorecería el desequilibrio de la flora gingival con aumento de bacterias periodontopatógenas y reinstalación de gram negativos anaerobios⁽⁶⁵⁾.

La solución a las numerosas cuestiones latentes se logrará mediante investigaciones realizadas con espíritu científico, y en esta línea de trabajo esperamos efectuar nuevos proyectos que eleven el nivel de la profesión.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Moore WEC, Holdeman LV, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA, Palcanis KG, Ranney RR. Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. *Infection and Immunity* 1985; **48**: 507-519.
- 2 Midtvedt T. Ecosystems: development, functions and consequences of disturbances, with special reference to the oral cavity. *J Clin Periodontol* 1990; **17**: 474-478.

J.V. Ríos
M.V. Borobio
E. Velasco
A. Martínez-Sahuquillo
G. Machuca
J.R. Lacalle
P. Bullón

Estudio longitudinal (2 años) de la periodontitis crónica del adulto: respuesta clínica y microbiológica

- 12 3 Socransky SS, Haffajee AD, Smith GLF, Dzink JL. Difficulties encountered in the search for the etiologic agents of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1987; **14**: 588-593.
- 4 Slots J. Subgingival microflora in periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1979; **6**: 351-382.
- 5 Haffajee AD, Socransky SS, Smith C, Dibart S. Relation of baseline microbial parameters to future periodontal attachment loss. *J Clin Periodontol* 1991; **18**: 744-750.
- 6 Beck JD, Zambon IJ, Genco RJ, Tudor GE. Evaluation of oral bacteria as risk indicators for periodontitis in older adults. *J Periodontol* 1992; **63**: 93-99.
- 7 Gunsolley JC, Best AM. Considerations in the analysis of site-specific dichotomous responses. *J Periodontol Res* 1992 (Spec issue); **27**: 352-355.
- 8 Silness J, Løe H. Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand* 1964; **22**: 121-135.
- 9 Van der Velden U. Probing force and the relationship of the probe tip of the periodontal tissues. *J Clin Periodontol* 1979; **6**: 106-114.
- 10 Van der Velden U, De Vries JH. The influence of probing force on the reproductibility of pocket depth measurements. *J Clin Periodontol* 1980; **7**: 414-420.
- 11 McCulloch CAG, Birek P, Hardy V. Comparison of gingival attachment level measurements with an automated periodontal probe and a pressure-sensitive probe. *J Periodont Res* 1987; **22**: 348-352.
- 12 Carlos JP, Brunelle JA, Wolfe MD. Attachment loss vs. pocket depth as indicator of periodontal disease: A metodologic note. *J Periodontol Res* 1987; **6**: 524-525.
- 13 Fleiss JL, Mann J, Paik M, Goultchin J, Chilton NW. A study of inter- and intra-examiner reliability of pocket depth and attachment level. *J Periodont Res* 1991; **26**: 122-128.
- 14 Egelberg J. The impact of regression towards the mean on probing changes in studies on the effect of periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 1989; **16**: 120-123.
- 15 Watts T. Constant force probing with and without a stent in untreated periodontal disease: the clinical reproducibility problem and possible sources of error. *J Clin Periodontol* 1987; **14**: 407-411.
- 16 Savitt ED, Darack AP, Killoy J, Lieberman MG. Site selection criteria for microbiological testing of periodontal microorganisms. *J Periodontol* 1991; **62**: 558-561.
- 17 Mombelli A, McNaab H, Lang NP. Black-pigmenting Gram-negative bacteria in periodontal disease. II. Screening strategies for detection of *P. gingivalis*. *J Periodont Res* 1991; **26**: 308-313.
- 18 Tanner ACR, Goodson JM. Sampling of microorganisms associated with periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 1986; **1**: 15 - 20.
- 19 Holdeman LV, Cato EP, Moore WEC. *Anaerobe laboratory manual*. 4a Ed. Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg VA. EEUU. 1978.
- 20 Sutter VL, Citron DM, Edelstein MAC, Finegold SM. *Wadsworth anaerobic bacteriology manual*. Fourth Ed. Star Publishing Company. UCLA. USA. 1985.
- 21 Hardie JM. Application of chemotaxonomic techniques to the taxonomy of anaerobic bacteria. *Scand J Infect Dis* (Suppl) 1989; **62**: 7 -14.
- 22 Romond C. New diagnostic methods for anaerobic bacteria. *Scand J Infect Dis* (Suppl) 1989; **62**: 35-40.
- 23 Newman MG, Socransky SS. Predominant cultivable microbiota in periodontosis. *J Periodont Res* 1977; **12**: 120-128.
- 24 Tanner ACR, Haffer C, Bratthall GT, Visconti RA, Socransky SS. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J Clin Periodontol* 1979; **6**: 278-307.
- 25 Dzink JL, Tanner ACR, Haffajee AD, Socransky SS. Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. *J Clin Periodontol* 1985; **123**: 648-659.
- 26 SPSS Inc. *SPSSX*. Mac Graw and Hill Co. New York, 1984.
- 27 Byers RA. *Introducción a las bases de datos con DBASE II PLUS*. Mac Graw and Hill Co. Mexico, 1987.
- 28 Ríos JV, Bullón P, Borobio MV, Fernandez A, Martínez-Sahuquillo A, Machuca G. Índices clínicos y microbiología de la enfermedad periodontal: su valor pronóstico. Proyecto PM88-0171 CICYr. *Arch Odontol* (pendiente publicación).
- 29 Yang MCK, Namung YY, Marks RG, Magnusson I, Clark WB. Change detection on longitudinal data in periodontal research. *J Periodont Res* 1993; **28**: 152 -160.
- 30 Van Winkelhoff AJ, Van der Velden U, De Graaff J. Microbial succession in recolonizing deep periodontal pockets after a single course of supra- and subgingival debridement. *J Clin Periodontol* 1987; **15**: 116 -122.
- 31 Badersten A, Nilveus R, Egelberg J. 4 -year observations of basic periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 1987; **14**: 438-444.
- 32 Lindhe J, Nyman S, Karring T. Scaling and root planing in shallow pockets. *J Clin Periodontol* 1982; **9**: 415.
- 33 Isidor F, Karring T, Attstrom R. The effect of root planing as compared to that of surgical treatment. *J Clin Periodontol* 1984; **11**: 669.
- 34 Claffey N, Loos B, Gantes B, Martin M, Heins P, Egelberg J. The relative effects of therapy and periodontal disease on loss of probing attachment after root debridement. *J Clin Periodontol* 1988; **15**: 163-169.
- 35 Ramfjord SP, Cafesse RG, Morrison EC, Hill RW, Kerry GJ, Appleberry EA, Nissie RR, Stults DL. 4 modalities of periodontal treatment compared over 5 years. *J Clin Periodontol* 1987; **14**: 445-452.
- 36 Hujoel PP, Baab DA, DeRouen TA. The power of test to detect differences between periodontal treatments in published studies. *J Clin Periodontol* 1992; **19**: 779 - 784.
- 37 Caffesse RG, Sweeney PL, Smith BA. Scaling and root planing with

ARCHIV
ESTOM
Volume
Número
Enero 1

and
205-

38 Cha
Kon
inde
Peri

39 Lang
prob
Clim

40 Van
Blee
resp
1987

41 Abba
of m
J Clin

42 Aina
and

43 Corb
cont
Perio

44 Jenki
of un
1988

45 Magr
WP.
of sub
1991;

46 Rosen
anaer
treatr
Perio

47 Albar
progr

48 Slots
micro
J Peri

49 Dzink
micro
J Clin

50 Harpe
clini
root p

51 Hafaje
Clinic
with
1988;

- and without periodontal flap surgery. *J Clin Periodontol* 1986; **13**: 205-210.
- 38 Chaves ES, Wood RC, Jones AA, Newbold DA, Manwell MA, Kornman KS. Relationship of «bleeding on probing» and «gingival index bleeding» as clinical parameters of gingival inflammation. *J Clin Periodontol* 1993; **20**:139-143.
- 39 Lang NP, Joss A, Orsanic T, Gusberti FA, Siegrist BE. Bleeding on probing. A predictor for the progression of periodontal disease? *J Clin Periodontol* 1986; **13**:590-596.
- 40 Vanooteghem R, Hutchens LH, Garret S, Kiger R, Egelberg J. Bleeding on probing and probing depth as indicator of the response to plaque control and root debridement. *J Clin Periodontol* 1987; **14**: 226-230.
- 41 Abbas F, Voss S, Nijboer A, Hart AAM, Van der Velden U. The effect of mechanical oral hygiene procedures on bleeding on probing. *J Clin Periodontol* 1990; **17**:199-203.
- 42 Ainamo J, Bay I. Problems and proposal for recording gingivitis and plaque. *Int Dental J* 1975; **25**: 229.
- 43 Corbet EF, Davies WIR. The role of supragingival plaque in the control of progressive periodontal disease. A review. *J Clin Periodontol* 1993; **20**:307-313.
- 44 Jenkins WMM, MacFarlane TW, Gilmour WH. Longitudinal study of untreated periodontitis: (I). Clinical findings. *J Clin Periodontol* 1988; **15**:324-330.
- 45 Magnusson I, Marks RG, Clark WB, Walker CB, Low SB, McArthur WP. Clinical, microbiological and immunological characteristics of subjects with «refractory» periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1991; **18**:291-299.
- 46 Rosenberg ES, Torosian JP, Hammond BF, Cutler SA. Routine anaerobic bacterial culture and systemic antibiotic usage in the treatment of adult periodontitis: A 6 year longitudinal study. *Int J Periodont Res Dent* 1993; **13**: 213-243.
- 47 Albandar JM. A 6-year study on the pattern of periodontal disease progression. *J Clin Periodontol* 1990; **17**:467-471.
- 48 Slots J, Rams T, Feik D, Taveras HD, Gillespie GM. Subgingival microflora of advanced periodontitis in the Dominican Republic. *J Periodontol* 1991; **62**:543-547.
- 49 Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD. The predominant cultivable microbiota of inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1988; **15**:316-323.
- 50 Harper DS, Robinson PJ. Correlation of histometric, microbial and clinical indicators of periodontal disease status before and after root planing. *J Clin Periodontol* 1987; **14**:190-196.
- 51 Haffajee AD, Socransky SS, Dzink JL, Taubman MA, Ebersole JL. Clinical, microbiological and immunological features of subject with refractory periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1988; **15**:390-398.
- 52 Haffajee AD, Socransky SS, Dzink JL, Taubman MA, Ebersole JL, Smith DJ. Clinical, microbiological and immunological features of subjects with destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1988; **15**: 240-246.
- 53 Uematsu H, Hoshino E. Predominant obligate anaerobes in human periodontal pockets. *J Periodont Res* 1992; **27**:15-19.
- 54 Van Winkelhoff AJ, Van Steenberg TJM, De Graaff J. The role of black-pigmented Bacteroides in human oral infections. *J Clin Periodontol* 1988; **15**:145-155.
- 55 Slots J, Listgarten MA. Bacteroides gingivalis Bacteroides intermedius and Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1988; **15**:85-93.
- 56 Slots J, Emrich JE, Genco RJ, Rosling BG. Relationship between some subgingival bacteria and periodontal pocket depth and periodontal pocket depth and gain or loss of periodontal attachment after treatment of adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 1985; **12**:540-552.
- 57 Opsvig E, Baab D, Williams B. Periodontal disease parameters and microflora in 5 mm pockets. *J Dent Res* 1983; **62**: 228.
- 58 Ranney RR, Best AM, Breen TJ, Moore WEC, Moore LVH. Bacterial flora of progressing periodontal lesions. *J Periodont Res* 1987; **22**:205-206.
- 59 Moore WEC, Moore LH, Ranney RR, Smibert RM, Burmeister JA, Scenkein HA. The microflora of periodontal sites showing active destructive progression. *J Clin Periodontol* 1991; **18**:729-739.
- 60 Socransky SS, Haffajee AD, Dzink JL. Relationship of subgingival microbial complexes to clinical features at the sampled sites. *J Clin Periodontol* 1988; **15**: 440-444.
- 61 Savitt ED, Kent RL. Distribution of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis by subject age. *J Periodontol* 1991; **62**:490-494.
- 62 Slots J, Feik D, Rams TE. Actinobacillus actinomycetemcomitans and Bacteroides intermedius in human periodontitis: age relationship and mutual association. *J Clin Periodontol* 1990; **17**:659-662.
- 63 Haffajee AD, Socransky SS. Effect of sampling strategy on the false-negative rate for detection of selected subgingival species. *Oral Microbiol Immunol* 1992; **7**:57-59.
- 64 Kornman KS, Newman MG, Alvarado R, Flemmig TF, Nachani S, Tumbusch J. Clinical and microbiological patterns of adults periodontitis. *J Periodontol* 1991; **62**:634-642.
- 65 Könönen E, Asikainen S, Jousimies-Somer H. The early colonization of gram-negative anaerobic bacteria in edentulous infants. *Oral Microbiol Immunol* 1992; **7**:28-31.