

Porphyromonas gingivalis: patógeno predominante en la periodontitis crónica

Porphyromonas gingivalis: predominant pathogen in chronic periodontitis

Resumen

Porphyromonas gingivalis es un bacilo gram negativo predominante en la Periodontitis crónica, sus múltiples factores de virulencia la hacen sumamente agresiva. En el surco gingival encuentra las condiciones para su crecimiento, interaccionando con el huésped produciendo una destrucción lenta pero constante de los tejidos del periodonto. Su predominancia ha sido considerada como un factor de riesgos para enfermedades sistémicas inflamatorias, como la del infarto de miocardio. Aunque su susceptibilidad a una diversidad de fármacos hace posible su manejo con antimicrobianos previa remoción mecánica de biofilm subgingival. En conclusión la revisión abarca diversas características de la bacteria, que nos unen al consenso de que *Porphyromonas gingivalis* es el patógeno de mayor relevancia en la periodontitis crónica, así como su presencia en diversas formas de patologías periodontales.

Palabras clave: *Porphyromonas gingivalis*, factores de virulencia, periodontitis crónica.

Abstract

Porphyromonas gingivalis is a gram negative bacillus predominant in chronic periodontitis, multiple virulence factors make it extremely aggressive. In the gingival sulcus find the conditions for growth, interacting with the host produces a slow but steady destruction of periodontal tissue. Its dominance has been considered a risk factor for systemic inflammatory diseases such as myocardial infarction. Although its susceptibility to a variety of drugs makes possible its handling with antimicrobials after mechanical removal of subgingival biofilm. In conclusion this review covers various features of the bacteria, which lead us to the consensus that the pathogen *Porphyromonas gingivalis* is more relevant in chronic periodontitis, and its presence in various forms of periodontal diseases

Key words: *Porphyromonas gingivalis*, virulence factors, chronic periodontitis.

**Donald Ramos Perfecto¹,
Hilda Moromi Nakata¹, Elba
Martínez Cadillo¹**

1 Dpto. de CC. Básicas. Laboratorio de Microbiología Facultad de Odontología Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Correspondencia:

CD Donald Ramos Perfecto
Av. Germán Amezaga s/n, Lima 1, Perú.
Facultad de Odontología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
E-mail: dramos_37@hotmail.com

Fecha de recepción: 13-04-11

Fecha de aceptación: 14-06-11

Introducción

Las bacterias son los microorganismos con mayor presencia en el Biofilm dental¹ subgingival, estando por ello más relacionadas con las patologías periodontales, como la periodontitis crónica.^{2,3} De todos los microorganismos aislados de esta lesión, el predominante es la *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*),^{4,1} un gram negativo, anaerobio estricto que aprovecha las condiciones que da el huésped para generar mayor daño. Esta bacteria produce varios factores de virulencia⁵⁻⁸, así como su capacidad de invadir células periodontales, dándose una protección contra el sistema de defensa del huésped.⁹⁻¹² También se ha identificado a este microorganismo, como un factor de riesgo para infecciones pulmonares, parto pretérmino y bajo peso al nacer.¹²⁻¹⁴ Su presencia en placas ateroscleróticas incrementan el riesgo de infarto del miocardio¹⁵⁻¹⁷, aislándose también de abscesos dentoalveolares¹⁸ y trompas ováricas.¹⁹

Taxonomía

El género Bacteroides, agrupó en su primera clasificación, un conjunto de bacterias heterogéneas, con características de ser anaerobios obligados, gram negativo, no esporulados y de forma bacilar,²⁰ con la aplicación de nuevas técnicas de identificación a base de biología molecular, como el ADN-ADN hibridación,²¹ y estudio de sus características bioquímicas, se pudo identificar un grupo homogéneo de especies a partir de los bacteroides, llamados ahora *Porphyromonas*, que en sus inicios estuvo formando por 3 especies, *P. gingivalis*, *P. asaccharolyticus* y *P. endodontales*.²⁰⁻²² Estas especies presentaban la característica de ser no fermentadores, utilizar como sustrato el nitrógeno y obtener su energía a partir de triptocasa y peptona.²¹ Estudios posteriores a base de la secuencia de rRNA de 16S, han alejado más genealógicamente del género Bacteroides, conociéndose en la actualidad alrededor de 12 especies, habiendo una, *P. Catoniae*, que es sacarolítica.²³

Morfología y estructura

P. gingivalis es un bacilo corto o cocobacilo, que mide de 0.5 - 0.8 um x 1 - 3.5 um²¹ anaerobio estricto, gram negativo, siendo considerado un comensal en la cavidad oral.¹¹ Su pared celular presenta a nivel de la membrana externa las endotoxinas, son capsulados, no esporulados, sin flagelos y abundantes fimbrias de diferentes tipos. A nivel superficial presenta vesículas que contienen una variedad de enzimas que juegan un rol importante en su virulencia. Así también produce múltiples enzimas con capacidad de degradar compuestos proteicos.^{11,24-26}

Factores de virulencia

Cápsula: constituido por polisacáridos, siendo un gen codificante de epimerasa *epsC* esencial para su síntesis, existiendo 6 serotipos capsulares de K1 - K6. Esta juega un rol importante en la evasión del sistema inmunológico, eludiendo la

fagocitosis, opsonización y accionar del complemento.^{2,4,11,24,25}

Endotoxina (LPS): Presenta en la membrana externa de la bacteria, compuesta en parte por el lípido A, que estaría participando en la interrupción de la homeostasis inmunológica del huésped⁶, ocasiona inflamación gingival, asociada con la destrucción del tejido conectivo y la reabsorción del hueso alveolar por activación de osteoclastos y causa la liberación de prostaglandinas E₂, así como un incremento de IL18 y IL1B.^{11, 25, 27, 28}

Vesículas de membrana externa: Son sacos cerrados que se encuentran a un nivel más externo de la bacteria, presentan en su interior numerosas enzimas como; fosfolípasa C, proteasas, fosfatasa alcalina, hemolisinas, lipopolisacáridos. Estas son liberadas, produciendo daño a las células periodontales y neutrófilos.^{11,25,29,30}

Hemaglutininas: Son proteínas codificadas por el gen *hag* y estas pueden ser 5 de A-E, promueven la colonización por mediación de la unión bacteriana a receptores oligosacáridos en células humanas.^{11,24,25}

Fimbrias: Presentes en forma peritrica de 0.3 a 3.0 μm de largo y 5 nm de ancho, compuestos por monómeros de fimbriolina, codificados por el gen *fimA*, pudiéndose clasificar en 6 variantes, del tipo I al V y el Ib. Estas presentan capacidad de unirse a diferentes sustratos, moléculas, y células, como epitelial, fibrinogeno, fibronectina, lactoferrina. A su vez presenta propiedades quimiotácticas y de inducción de citoquinas. Se ha podido detectar a las *P. gingivales* con fimbrias *fimA* tipo II y IV en la progresión de la periodontitis y a las de tipo I, V en adultos sanos.^{11,24,25}

Proteínas cisteinproteasas: Son compuestos bacterianos que proporcionan nutrientes para el crecimiento bacteriano, produciendo un daño colateral al huésped, degradando colágeno de diferentes tipos. Estas proteínas son llamadas gingipainas, produciendo el 85 % de la actividad proteolítica generada por *P. gingivalis* y el 100 % de la actividad tipo tripsina. Las gingipainas son productos de 3 genes *rgpA*, *rgpB*, *Kgp*.²⁵ Se ha podido determinar que entre las acciones que producen están; la degradación de fibronectina, fibrinogeno y de las uniones de las células epiteliales, activación del sistema de coagulación y sistema calicreina – quinina. Interrumpen en la defensa del huésped al degradar IL₈, un importante

quimiotáctico y C₃ cuya activación produce C_{3a} y C_{3b}, este último un potente opsonizante.^{8,11,24,26}

Proteínas no cisteinproteasas: Estas son la collagenasa, proteasa⁷, hemaglutinina¹¹, una enzima tipo convertora de endotelina, una dipeptidilpeptidasa³¹ y la periodontaina, esta última, degrada las proteínas desnaturalizadas y los polipéptidos²⁵.

Inductor de metaloproteinasas de la matriz: No es un producto generado por *P. gingivalis*, pero si lo induce, para que sea producida por fibroblastos, leucocitos y macrófagos. Estas metaloproteinasas degradan la mayoría de moléculas de la matriz extracelular, como el colágeno, fibronectina y la laminina.^{11,25} *P. gingivalis* inactiva los inhibidores tisulares de metaloproteinasas, específicamente el tipo 1, que tiene mucha relación con la destrucción del colágeno tipo I y fibronectina.²⁵

Fisiopatología

P. gingivalis es considerado un colonizador secundario, comensal del surco gingival, que llega por contagio o transmisión por individuos infectados, por medio de la saliva principalmente.³² Su capacidad de adherirse principalmente por sus fimbrias peritricas tipo Ib, II así como por sus vesículas de membrana, hemaglutininas, cápsula, le permiten dar el primer paso en la colonización del surco, poder adaptarse e invadir las células epiteliales en un periodo aproximado de 20 minutos,³³ pudiendo replicarse dentro de ellas y diseminarse a las células de alrededor. Esta característica de invadir la célula, le da la capacidad de evadir las defensas del huésped. Así también su capacidad de degradar diversas proteínas, componentes del surco gingival, ligamento periodontal y hueso alveolar, además de alterar la respuesta innata y específica del anfitrión. A todo esto se suma un factor huésped, que ante la presencia de esta bacteria, activa una diversidad de respuestas que pueden incrementar el proceso inflamatorio, presente en el surco, haciendo crónico el proceso de destrucción del periodonto.

Aislamiento bacteriano

P. gingivalis es un microorganismo anaeróbico estricto, que esta predominantemente en las bolsas periodontales, específicamente en el biofilm subgingival y es por eso que la muestra para

su aislamiento es a partir del biofilm subgingival, que se toma con diferentes instrumentos, como curetas, cintas, conos de papel.^{34,35} Siendo el más utilizado el cono de papel número 30 ó 40, que se colocan dentro del surco o bolsa periodontal, por un periodo de 20 a 60 seg, para luego ser llevado a un medio de transporte como VMGA-III,³⁶ BHI, Tioglicolato, y luego ser sembrado en medios enriquecidos como Agar sangre suplementado o el medio selectivo Agar Columbia antibiótico³⁷ e incubar a 37 °C por 7 a 14 días, en condiciones de anaerobiosis, que puede ser por Jarra, cámara o sobres de anaerobiosis.³⁸ Pasado el tiempo, la lectura de las colonias debe reconocer características como; tamaño de 1-2 mm, forma redonda, convexa y ser pigmentados de un color marrón a negro. La coloración gram debe evidenciar una morfología coccobacilar de 0.5x1-2 μm y ser negativa. Para la identificación final se puede utilizar, un kit de pruebas bioquímicas específicas, la prueba BANA: Benzoil-DL-Arginina-Naftilamida,^{39,40} los test serológicos tipo ELISA^{41,42} y la prueba de fluorescencia negativa con UV.⁴³ Las pruebas con base en la biología molecular como PCR (reacción en cadena de polimerasa)^{44,45}, son muy utilizados en la actualidad por su alto porcentaje de especificidad y sensibilidad.

Porphyromona gingivalis y su relación con la periodontitis crónica

Una de las patologías más comunes en la cavidad oral es la periodontitis crónica, la cual presenta una etiología bacteriana predominante, siendo entre ellas, las que más destacan *P. gingivalis*, *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*⁴⁶, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, que son considerados como el grupo agresivo en la lesión. Pero es la *P. gingivalis* la predominante en esta patología. En el Perú, según MINSA, la enfermedad periodontal, presenta una prevalencia de 85-87 %, no habiendo reportes de la periodontitis crónica, la cual se presenta en personas por encima de los 40 años. La bacteria una vez que llega a su habitat, se condiciona al medio para vivir en condiciones de oxidoreducción negativa, así como por su diversidad de factores de virulencia, rompe la homeostasis en el surco, generando una destrucción continua y agresiva de los tejidos de sostén del diente, llegando a degradar hueso y tejidos blandos. Esta destrucción va a generar signos clásicos como enrojecimiento perisulcular, incre-

mento de la profundidad del surco gingival, sangrado al estímulo, movilidad de diversos grados, que con la cronicidad de la lesión puede perderse la pieza dentaria.

Tratamiento mecánico y antimicrobiano

El tratamiento para la reducción y eliminación de *P. gingivalis* en la periodontitis crónica y otras formas de periodontitis, se basa en la remoción del Biofilm subgingival, por medio de la fase I del tratamiento periodontal, recomendando la remoción en una sola cita. A su vez se indica la mejora de la fisioterapia del paciente, a un nivel de control del índice de higiene oral a 20 %. Otro elemento que puede ayudar a mejorar el tratamiento es el uso de antimicrobianos, ya sea locales como la clorhexidina al 0.12 % aplicado 2 veces por día por un periodo de 10 a 14 días,⁴⁷ sistémicos como la amoxicilina de 500 mg y Ácido clavulánico de 125 mg x 7 días,^{48,49} amoxicilina de 500 mg y metronidazol de 500 mg por 5-7 días,⁵⁰ fluoroquinolonas como la moxifloxacina en dosis de 400 mg x día⁵¹ y la azitromicina de 500 mg por día, en 3 días consecutivos vía oral.⁵² Es fundamental que todo tratamiento periodontal tenga una fase de mantenimiento periódico de cada 3 meses, para ver la evolución de la lesión y hacer monitoreo del marcador microbiológico de *P. gingivalis*,³⁶ ya que su presencia podría indicar riesgo de una posible recidiva de la patología.⁵³

Discusión

Autores como Yilmaz², Kuramitsu⁷, consideran a la *P. gingivalis* como el patógeno comensal, habitante del surco gingival, con múltiples factores de virulencia, capaz de agredir y alterar la homeostasis periodontal, concordando lo mencionado por Furata,²⁹Jain,⁶ Lamont,¹⁰ Holt.²

Slot³⁷ y Dhalen³⁶ y otros investigadores han podido recuperar este microorganismo de muestras patológicas periodontales, siendo el más predominante en la Periodontitis crónica, similar a los que otros autores como Loesche⁴² y Riep⁴⁵ pudieron encontrar en sus investigaciones.

P. gingivalis y su relación con patologías sistémicas, va dirigida en la actualidad, a ser un factor de riesgo en la arteriosclerosis e infarto de miocardio, según Deshpande¹⁶ y Van Dyke,¹⁷ aunque

otros autores como Souccar,¹⁵ Dymock¹⁸ y Hirata¹⁹ lo relacionan a parto prematuro, bajo peso al nacer, cuadros neumónicos y abscesos a distancia.

Holt²⁵ determina en sus investigaciones que la gingipaina es el mayor factor de destrucción de tejidos del hospedero, así como participante en la invasión, adhesión, activación de matriz de metaloproteínas y destrucción de componentes del complemento e interleuquinas, produciendo una disfunción de la respuesta inmunológica del anfitrión. Esto concuerda con Lamont¹¹ y Pathirana.²⁶

Diferentes autores han determinado que la fase I de la terapia periodontal es fundamental para el control y eliminación de este patógeno, pudiendo mejorar con el apoyo de antimicrobianos sistémicos por vía oral, como amoxicilina más ácido clavulánico según Ardila,⁴⁸ o amoxicilina más metronidazol según Griffiths,⁵⁰ aunque estudios recientes de Oteo⁵² han reportado buenos resultados con el uso de azitromicina en 3 dosis cada 24 horas.

Conclusiones

P. gingivalis es el patógeno predominante en la periodontitis crónica, siendo la gingipaina su mayor factor de virulencia. A su vez es un factor de riesgo para patologías tan mortales como el infarto de miocardio. Su aislamiento es posible en diferentes medios de cultivo, con muestras de biofilm subgingival y su control se basa en la terapia mecánica apoyada con el uso de antimicrobiano local o sistémica.

Referencias bibliográficas

1. Davey ME. Techniques for the growth of *Porphyromonas gingivalis* biofilm. *Periodontol 2000*. 2006; 42: 27-35.
2. Yilmaz O. The chronicles of *Porphyromona gingivalis*: the microbium, the human oral epithelium and their interplay. *NIH Microbiology*. 2008; 154(10): 2897-2903.
3. Darveau RP. The oral microbial consortium's interaction with the periodontal innate defense system. *DNA Cell Biol*. 2009; 28(8): 389-395.
4. Brunner J, Scheres N, El Idrissi NB, Deng DM, Laine ML, Van Winkelhoff AJ. The capsule of *Porphyromona gingivalis* reduces the immune

response of human gingival fibroblasts. *BMC Microbiology*. 2010; 10(5): 1-11.

5. Laine ML, Appelmeik BJ, Van Winkelhoff AJ. Prevalence and distribution of capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis patients. *J. Dents Res* 1997; 76(12):1840-1844.
6. Jain S, Darveau RP. Contribution of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide to periodontitis. *Periodontol 2000* 2010; 54:53-70.
7. Kuramitsu HK, Yoneda M, Madden T. Proteases and collagenases of *Porphyromona gingivalis*. *Adv. Dent. Res.* 1995; 9(1): 37-40.
8. Tokuda M, Duncan M, Cho MI, Kuramitsu HK. Role of *Porphyromona gingivalis* protease activity in colonization of oral surface. *Infect. Immun.* 1996; 64(10): 4067-4073
9. Duncan MJ, Nakao S, Skobe Z, Xie H. Interactions of *Porphyromona gingivalis* with epithelial cells. *Infect. Immun.* 1993; 61(5): 2260-2265.
10. Lamont RJ, Chan A, Belton CM, Izutsu KT, Vasel D, Weinberg A. *Porphyromona gingivalis* Invasion of Gingival Epithelial Cells. *Infect. Immun.* 1995; 63(10): 3878-3885.
11. Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the Gum line: Pathogenic Mechanisms of *Porphyromona gingivalis*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998; 62(4): 1244-1263
12. Jotwani R, Cutler CW. Adult periodontitis – specific bacterial infection or chronic inflammation? *J. Med. Microbiol* 1998; 47: 187-188.
13. Offenbacher S, Bogges KA, Murtha AP, Jared HL, Lief S, Mc Kaig RG. Progressive periodontal disease and risk of very preterm delivery. *Obstet Gynecol* 2006; 107:29-36.
14. Scannapieco FA. Pneumonia in nonambulatory patients the role of oral bacteria and oral hygiene. *J. Am. Dent. Assoc.* 2006; 137: 219-255.
15. Souccar NM, Chakhtoura M, Ghafari JG, Abdelnoor AM. *Porphyromona gingivalis* in dental plaque and serum c reactive protein levels in pregnancy. *J. Infect Dev Ctries.* 2010; 4(6): 362-366.
16. Deshpande RG, Khan MB, Genco CA. Invasión of aortic and heart endothelial cells by *Porphyromona gin-*

- givalis*. *Infect Immun*. 1998; 66(11): 5337-5343.
17. Van Dyke TE. Resolution of inflammation- unraveling mechanistic links between periodontitis and cardiovascular disease. *J. Dent*. 2009; 37(8): 582-583.
 18. Dymock D, Weightman AJ, Scolly C, Wade WG. Molecular analysis of microflor associated with dentoalveolar abscesses. *J. clin. Microbiol*. 1996; 34(3): 537-542.
 19. Hirata R Jr., Menard C, Fournier D, Catellani MA, Mouton CH, De Souza MC. Isolation of *Porphyromona gingivalis* strain from tubal-ovarian abscess. *J. Clin. Microbiol*. 1995; 33(7):1925-1926.
 20. Shah HN, Collins MD. Proposal to restrict the genus bacteroides (castellani and chalmers) to *bacteroides fragilis* and closely related species. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 1989; 39(1):85-87.
 21. Shah HN, Collins MD. Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromona*. *Int J Syst Bacteriol* 1988; 38(1): 128-131.
 22. Magee JT, Hindmarch JM, Duerden BI, Goodwin L. Classification of oral pigmented anaerobic bacilli by pyrolysis mass spectrometry and biochemical test. *J. Med. Microbiol*. 1992; 37:56-61.
 23. Olsen I, Shah HN, Gharbia SE. Taxonomy and biochemical characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000*. 1999; 20(1):14-52.
 24. Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence factors in *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000*. 1999; 20 : 168-238.
 25. Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromona gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* : the "Red Complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000*. 2005; 38:72-122.
 26. Pathirana RD, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC. Host immune responses to *Porphyromonas gingivalis* antigens. *Periodontol 2000*. 2010; 52: 218-237.
 27. Ogawa T. Immunobiological properties of chemically defined lipid A from lipopolysaccharide of *Porphyromona(bacteroides) gingivalis*. *Eur. J. Biochem*. 1994; 219: 734-742.
 28. Kadono H, Kido J, Kataoka M, Yamauchi N, Nagata T. Inhibition of osteoblastic cell differentiation by lipopolysaccharide ride extract from *Porphyromona gingivalis*. *Infect Immun*. 1999; 67(6): 2841-2846.
 29. Furuta N, Takeuchi H, Amano A. Entry of *Porphyromona gingivalis* outler membrane vesicles into epithelial cells causes cellular functional impairment. *Infect. Immun*. 2009; 77(11): 4761-4770.
 30. Grenier D, Bertrand J, Mayrand D. *Porphyromonas gingivalis* outler membrane vesicles promotoe bacterial resistance to chlorhexidine. *Oral Microbiol. Immunol*. 1995;10:319-320.
 31. Kumagai Y, Konishi K, Gomi T, Yagishita H, Yajima A, Yoshikawa M. Enzymatic properties of dipeptidyl aminopeptidase IV produced by the periodontal pathogen *Porphyromona gingivalis* and its participation in virulence. *Infect. Immun*. 2000; 68(2): 716-724.
 32. Watson MR, Bretz WA, Loesche WJ. Presence of *Treponema denticola* and *Porphyromona gingivalis* in children correlated with periodontal disease of their parents. *J. Dent. Res*. 1994; 73(10): 1636-1640.
 33. Feng Z, Weinberg A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontol 2000*. 2006; 40(1): 50-76.
 34. Tanner ACR, Goodson JM. Sampling of microorganisms associated with periodontal disease. *Oral Microbiol. Immunol*. 1986; 1: 15-20.
 35. Kornman KS. Sampling of microorganisms associated with periodontal disease. *Oral Microbiol. Immunol*. 1986; 1: 21-22.
 36. Dahlen G. Role of suspected periodontopathogens in microbiological monitoring of periodontitis. *Adv Dent Res*. 1993; 7(2): 163-174.
 37. Slots J. Rapid identification of import periodontal microorganisms by cultivation . *Oral Microbiol. Immunol*. 1986; 1: 48-55.
 38. Doan N, Contreras A, Flynn J, Morrison J, Slot J. Proficiencies of three anaerobic culture systems for recovering periodontal pathogenic bacteria. *J. Clin. Microbiol*. 1997; 37(1): 171-174.
 39. De Andrade JA, Feres M, De Figueiredo LC, Salvador SL, Cortelli SC. the ability of the BANA test to detect different levels of *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*. *Braz. Oral Res*. 2010; 24(2): 224-30.
 40. Loesche WJ. The identification of bacteria associated with periodontal disease and dental caries by enzymatic methods. *Oral Microbiol. Immunol*. 1986; 1: 65-70.
 41. Wilson M, Lopatin D, Osborne G, Kieser JB. Prevalence of *Treponema denticola* and *Porphyromona gingivalis* in plaque from periodontally-healthy and periodontally- diseased sites. *J. Med. Microbiol*. 1993; 73(10): 406-410.
 42. Loesche WJ, Lopatin DE, Stoll J, Van Poperin N, Hujuel PP. Comparison of various detection methods for periodontopathic bacteria: can culture be considered the primary reference standard? *J. Clin. Microbiol*. 1992; 30(2): 418-426.
 43. Slots J, Reynolds HS. Long-Wave UV light fluorescence for identification of Black-pigmented Bacteroides spp. 1982; 16(6): 1148-1151.
 44. Watanabe K, Frommel TO. Detection of *Porphyromona gingivalis* in oral plaque samples by use of the polymerase chain reaction. *J. Dent. Res*. 1993; 72(6): 1040-1044.
 45. Riep B, Edesi-Neub L, Claessen F, skarabis H, Ehmke B, Flemmig TF, bernimoulin J-P, Gobel UB, Moter A. Are putative periodontal pathogens reliable diagnostic markers? *J. Clin. Microbiol*. 2009; 47(6): 1705-1711.
 46. Ramos PD, Moromi NH, Martinez CE, Mendoza RA. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: patógeno importante en la periodontitis. *Odontol. Sanmarquina* 2010; 13(2): 42-45
 47. Grenier D. Reduccion of proteolytic degradation by chlorhexidine. *J. Dent. Res*. 1993; 72(3) : 630-633.
 48. Ardila CM, Lopez MA, Guzman IC. High resistance against clindamycin , metronidazole and amoxicillin in *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolates of periodontal disease. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal*. 2010; 15(6): 947-951.

49. Andres MT, Chung WO, Roberts MC, Fierro JF. Antimicrobial susceptibilities of *Porphyromona gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* spp. Isolated in Spain. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 1998; 42(11): 3022-3023.
50. Griffiths GS, Ayob R, Guerrero A, Nibali L, Suvan J, Moles DR, Tonetti MS. Amoxicillin and Metronidazole as an adjunctive treatment in generalized aggressive periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J. Clin. Periodontol.* 2011; 38: 43-49.
51. Ardila CM. Eficacia de La moxifloxacina en infecciones odontogénicas. *Av. Odontoestomatol.* 2009; 25(4): 215-222.
52. Oteo A, Herrera D, Figuero E, O'Connor A, Gonzalez I, Sanz M. Azithromycin as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of *Porphyromonas gingivalis*-associated periodontitis: a Pilot study. *J. Clin. Periodontol.* 2010; 37: 1005-1015.
53. Ezzo PJ, Cutler CW. Microorganisms as risk indicator for periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2003; 32:24-35.