

Aislamiento de bacterias periodontopáticas desde hemocultivos y ateromas obtenidos de pacientes con aterosclerosis y periodontitis

Carlos Padilla E^{1c}, Olga Lobos G^{1b}, Gema Jure O^{2a}, Sergio Matus F^{2a}, Claudia Descouvrieres C^{2a}, Sandra Hasbún A³, Patricio Maragaño L⁴, Loreto Núñez F^{5a}.

Isolation of periodontal bacteria from blood samples and atheromas in patients with atherosclerosis and periodontitis

Background: Periodontitis is a common oral disease produced by bacterial species that reside in the subgingival plaque. These microorganisms have been associated to atherosclerosis and it is suggested that periodontitis is a cardiovascular risk factor. **Aim:** To isolate periodontal bacteria from blood and atheroma samples, from patients with atherosclerosis and periodontitis. **Material and methods:** Twelve patients with periodontitis and a clinical diagnosis of atherosclerosis and 12 patients with periodontitis but without atherosclerosis were studied. Blood samples were obtained immediately before and after scaling and root planing. The samples were incubated in aerobic and anaerobic conditions. One week after scaling, atheromatous plaques were obtained during endarterectomy in the 12 patients with atherosclerosis. These were homogenized and cultured for aerobic and anaerobic bacteria. Microorganisms were identified by means of PCR. **Results:** Five patients with and two without atherosclerosis, had bacteremia after scaling and root planing. Bacterial species isolated from blood samples were the same found in periodontic pockets. Four atheromatous plaques of patients with bacteremia yielded positive cultures. The isolated bacteria were the same found in blood samples and periodontal pockets. **Conclusions:** Bacteremia occurred in seven of 24 patients after scaling and root planing. In four patients, the same species found in periodontic pockets and blood cultures were detected in atherosclerotic plaques obtained one week after the dental procedure (Rev Méd Chile 2007; 135: -). **(Key words:** Atherosclerosis; Bacteremia; Periodontitis, Subgingival curettage).

Recibido el 28 de septiembre, 2006. Aceptado el 27 de marzo, 2007.

Trabajo financiado mediante el proyecto VAC 600-359 de la Dirección de Investigación y Asistencia Técnica de la Universidad de Talca (DIAT).

¹Laboratorio de Investigación Microbiológica, Universidad de Talca. ²Clínicas Odontológicas, Universidad de Talca. ³Servicio de Cirugía Vascular, Hospital Regional de Talca. ⁴Servicio de Cardiología, Hospital Regional de Talca. ⁵Departamento de Salud Pública, Universidad de Talca, Chile.

^aCirujano Dentista

^bLicenciado en Biología, Magíster en Ciencias Biomédicas

^cTecnólogo Médico, Magíster en Ciencias mención Microbiología

Correspondencia a: Carlos Padilla E. Laboratorio de Investigación Microbiológica, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Talca. Talca. Chile. Fono: 71-200492. Fax: 71-200439. E mail: cpadilla@utalca.cl.

La periodontitis es una enfermedad común que destruye el tejido de soporte periodontal, hueso y cemento, lo que puede conducir a la pérdida del diente. Se considera una infección crónica causada por un grupo de bacterias principalmente Gram negativas, anaerobias, estrictas y facultativas¹. La destrucción periodontal resulta de la acción de varios productos tóxicos liberados desde la placa subgingival específica, como también de la respuesta del huésped frente al ataque bacteriano². La forma más severa de enfermedad está presente en la población adulta³, aunque 35% de la población mundial puede exhibir moderados signos de esta enfermedad durante su vida⁴. Durante los últimos años, varios estudios han informado de asociaciones epidemiológicas entre periodontitis y aterosclerosis^{4,5}. Esta última enfermedad es la principal causa de morbilidad en países desarrollados, la cual se explica, en parte, mediante los factores de riesgo cardiovascular⁶. Sin embargo, estudios epidemiológicos y patológicos sugieren que sólo la mitad de los dos tercios de riesgo cardiovascular es explicado por los clásicos factores de riesgo⁷. Individuos con enfermedad periodontal severa y síndrome coronario agudo, pueden asociarse a un alto número de placas ateromatosas y a una mayor extensión de la enfermedad coronaria⁸. La inflamación crónica en la cavidad oral ocasionada por bacterias periodontopáticas, potencia la estimulación de mediadores celulares y humorales de la inflamación relacionada a la aterogénesis⁵. Se acepta que la acción directa del lipopolisacárido bacteriano sobre la placa ateromatosa madura, además de la actividad de metaloproteinasas de la matriz del ateroma, actuarían desprendiéndolo y acelerando el proceso trombogénico^{9,10}. El tropismo mediante el cual los microorganismos colonizan la placa ateromatosa es un mecanismo no conocido, pero se acepta que el acceso al sistema sanguíneo ocurriría posterior a una bacteriemia¹¹. En este contexto, existe creciente evidencia que la periodontitis aumentaría el riesgo de aterosclerosis. En este trabajo, el objetivo principal es aislar bacterias periodontopáticas desde hemocultivos y ateromas de pacientes con aterosclerosis y periodontitis, con el propósito de compararlos con un grupo de pacientes que presentan solamente enfermedad periodontal. En ambos grupos de pacientes se utilizará el procedimiento de destartraje como inductor de bacteriemia.

MATERIAL Y MÉTODO

Individuos estudiados. El presente estudio abarcó 2 grupos de pacientes con enfermedad periodontal severa (pérdida de inserción mayor o igual a 5 mm). Un grupo de 12 pacientes hospitalizados en el Servicio de Cirugía Vascular del Hospital Regional de Talca con diagnóstico clínico-radiológico de aterosclerosis ocluyente aorto-iliaca (n =3), ocluyente distal de arterias tibiales (n =4) y ocluyente de arterias fémoro-popliteas (n =5). El promedio de edad de estos pacientes fue de 73 años, correspondiendo a 5 mujeres y 7 varones. El otro grupo estudiado correspondió a 12 pacientes con promedio de edad de 54 años que asistían al Servicio de Periodoncia del Hospital Regional de Talca, con diagnóstico clínico-radiológico negativo de aterosclerosis, de los cuales 5 eran mujeres y 7 varones. Para incorporarse al estudio, todos los pacientes, además de presentar periodontitis severa, debían cumplir con los siguientes criterios: no ser diabéticos ni hipertensos, no haber recibido antibióticos o inmunosupresores dos meses previos al estudio, no presentar ningún tipo de heridas y no pertenecer a la categoría de alto riesgo de endocarditis, en concordancia a lo enunciado por Dajani¹². Los pacientes de ambos grupos recibieron información oral y escrita respecto del proceso investigativo, además de firmar un consentimiento informado. Durante todo el proceso investigativo se cumplieron con las normas éticas exigidas internacionalmente. El protocolo de trabajo fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Talca.

Toma de muestras del saco periodontal y cultivo bacteriológico. Un mismo periodoncista realizó la toma de muestras a partir de sacos periodontales, mediante la inserción de un cono de papel estéril en tres diferentes piezas dentarias. Las muestras fueron transportadas inmediatamente al Laboratorio de Investigación Microbiológica de la Universidad de Talca. En un gabinete de bioseguridad (Nuair, Class II, Estados Unidos de Norteamérica [USA]) y con el propósito de obtener desarrollo de bacterias anaerobias periodontopáticas, los conos de papel fueron sembrados sobre dos diferentes medios de cultivo: a) Agar Brucella (Difco, USA) adicionada de sangre de oveja desfibrada (5%), vitamina K (1 µg/ml) (Merck, Alemania), hemina

(5 µg/ml) (Merck, Alemania) y kanamicina (50 µg/ml) (Sigma, USA) y b) Agar Brucella adicionada de sangre de oveja desfibrinda (5%), vitamina K (1 µg/ml) y vancomicina (7,5 µg/ml) (Sigma, USA). Posteriormente, las placas de Petri fueron introducidas en sistemas anaeróbicos (bio-Merieux, Francia) e incubadas a 37°C durante 72 h. Los cultivos fueron observados diariamente.

Toma de muestras para hemocultivos. A cada paciente, un mismo periodoncista le realizó un procedimiento de destartraje supra y subgingival manual adicionado de ultrasonido. Previo a esta actividad, cada paciente se enjuagó la cavidad oral durante 30 seg con 15 ml de clorhexidina al 0,12%. Antes de proceder al destartraje, a cada paciente se le extrajo 10 ml de sangre y posterior a 5 min de concluido el destartraje, se obtuvieron otros 10 ml de sangre, los que fueron sembrados separadamente en frascos para hemocultivos anaerobios (Organo Teknika Corp., USA) e incubados a 37°C durante 5 semanas. Todo el procedimiento de toma de muestra para hemocultivo se realizó bajo estándares de asepsia clásicos y en concordancia a lo establecido por Wilson y Weinstein¹³. Los hemocultivos fueron observados diariamente. Todos los frascos con crecimiento bacteriano fueron resembrados sobre los medios sólidos antes descritos e incubados en las mismas condiciones fisicoquímicas.

Obtención y cultivo bacteriológico de ateromas. Mediante procedimientos quirúrgicos de endarterectomía fueron retirados los respectivos ateromas desde los 12 pacientes estudiados. Se utilizó anestesia peridural en los pacientes operados de extremidades inferiores y anestesia general para aquellos con ateroma carotídeo. Los ateromas fueron extraídos una semana posterior al procedimiento de

destartraje. Inmediatamente de extraídos, los ateromas fueron puestos en tubos estériles con solución salina isotónica, los cuales fueron rápidamente transportados al Laboratorio de Investigación Microbiológica de la Universidad de Talca. Cada ateroma fue homogenizado cuidadosamente en la misma solución de transporte y una alícuota de 100 µl fue sembrada en los medios de cultivo ya descritos e incubados aeróbica y anaeróbicamente. Los cultivos fueron observados diariamente y las colonias fueron identificadas mediante PCR.

Identificación de especies bacterianas mediante PCR. Las colonias que crecieron sobre los medios de cultivo sólidos fueron identificadas mediante PCR. El ADN genómico fue extraído desde una sola colonia de acuerdo a lo descrito en el *kit* Aqua Pure Genomic DNA Isolation (Bio-Rad, USA). La concentración del ADN genómico fue determinada espectrofotométricamente. Los *primers* utilizados fueron construidos de acuerdo a lo enunciado por Ashimoto y cols¹⁴ y sintetizados en Omega Bio-tek, USA. La amplificación por PCR fue realizada en un volumen de 25 µl que contenía 1X de *buffer*/PCR Mg⁺⁺, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 U Taq *DNA polymerase* (Gen Lab, USA), 0,4 µM de cada par de *primers* y 15 ng de templado. La amplificación fue realizada de acuerdo a lo descrito por Ávila y Velásquez¹⁵ en un termociclador (Thermo Hybaid, USA) programado para 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos a 94°C por 30 seg, una temperatura de anillamiento adecuada para cada par de *primers* por 30 seg, 72°C por 30 seg y finalmente 72°C por 5 min para permitir la completa extensión del ADN. Los siguientes son los *primers* utilizados, las respectivas secuencias oligonucleotídicas, temperatura para anillamiento de PCR y longitud del amplicón.

Especie bacteriana	<i>Primers</i> 5' → 3'	Temperatura (°C) para anillamiento PCR	Longitud del amplicón Kb
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	GCTAATACCGCGTAGAGTCGT ATTTACACCTCACTTAAAGGT	50	0,5
<i>B. forsythus</i>	GCGTATGTAACCTGCCCGCA TGCTTCAGTGTGAGTTATACCT	60	0,6
<i>P. gingivalis</i>	AGGCAGCTTGCCATACTGCG ACTGTTAGCAACTACCGATGT	60	0,4
<i>P. intermedia</i>	TTTGTTGGGGAGTAAAGCGGG TCAACATCTCTGTATCCTGCCGT	50	0,6

Un control negativo sin ADN fue incluido en cada procedimiento. Las cepas de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523, *P. gingivalis* ATCC 33277, *B. forsythus* ATCC 43037 y *P. intermedia* ATCC 25611 fueron usadas como control genómico de ADN. Los productos del PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y fotografiados bajo luz ultravioleta.

RESULTADOS

El grupo de pacientes con aterosclerosis presentó un promedio de profundidad de sondaje mayor a 8,0 mm, respecto del grupo sin aterosclerosis, cuyo promedio fue de 5,8 mm. El número de dientes presentes fue mayor en el grupo de pacientes sin aterosclerosis, con un promedio de 11,5 respecto de 4,5 en los pacientes con aterosclerosis. Solamente se observaron hemocultivos positivos posterior al destartraje. Cinco (41,6%) de los 12 pacientes con aterosclerosis y periodontitis presentaron hemocultivos positivos, mientras que 2 (16,6%) hemocultivos positivos fueron obtenidos desde pacientes sin aterosclerosis (Tabla 1). Todos los hemocultivos obtenidos de pacientes con aterosclerosis presentaron un franco crecimiento bacteriano antes de las 36 h de incubación, en contraste con los hemocultivos obtenidos de pacientes sin aterosclerosis, cuyo crecimiento se evidenció entre los 6 y 8 días de incubación. La totalidad de los hemocultivos correspondientes al proceso predestartraje fueron negativos después de 1 mes de incubación. La identificación mediante PCR fue un proceso eficiente, cuyos resultados permitieron una confiable identificación de las especies bacterianas. En la Tabla 2 se observa que en tres de los cinco pacientes con aterosclerosis y bacteriemia positiva, se aisló *A. actinomycetemco-*

mitans y en los otros dos *P. gingivalis* y *B. forsythus*; en 2 pacientes sin aterosclerosis se aisló *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, respectivamente. Además, se observa que en ambos grupos de pacientes, los microorganismos fueron aislados a partir de los sacos periodónticos más profundos, siendo *P. gingivalis* el microorganismo más frecuentemente aislado desde periodontitis y *A. actinomycetemcomitans* de hemocultivos. En la misma Tabla 2, se evidencia que en los siete hemocultivos positivos, la misma especie bacteriana identificada forma parte de la flora microbiana del respectivo tejido periodóntico de los pacientes estudiados. Asimismo, se observa que a partir de cuatro placas ateromatosas se obtiene crecimiento bacteriano y que las mismas especies bacterianas fueron aisladas desde hemocultivos y periodonto de los respectivos pacientes con aterosclerosis. No se observó crecimiento bacteriano en los cultivos aeróbicos. Finalmente, se determinó que solamente a partir de pacientes de sexo masculino se obtuvo crecimiento bacteriano a partir de placas ateromatosas (Tabla 2).

DISCUSIÓN

Se han efectuado numerosos estudios para establecer una conexión entre enfermedad periodontal y aterosclerosis sin que, hasta el momento, existan evidencias científicas concretas entre ambas enfermedades¹⁶⁻¹⁹. Según Haraszthy y cols²⁰, es posible que el incremento del riesgo para enfermedades sistémicas en sujetos con enfermedad periodontal, se deba a un aumento en la prevalencia y severidad de la bacteriemia con microorganismos orales. La fundamentación científica que explica el paso de bacterias periodontopáticas a la sangre ha sido un elemento controversial. Se piensa que situaciones cotidia-

Tabla 1. Bacteriemia post destartraje en pacientes con enfermedad periodontal con y sin aterosclerosis

Pacientes con:	Bacteriemia				Total pacientes
	positiva		negativa		
	nº	%	nº	%	
Periodontitis sin aterosclerosis	2	16,6	10	83,0	12
Periodontitis con aterosclerosis	5	41,6	7	58,3	12

Tabla 2. Bacterias periodontopáticas aisladas desde el saco periodontal, hemocultivos y ateromas de pacientes con y sin aterosclerosis

Pacientes	sexo	Profundidad de saco	Periodonto	Bacterias aisladas de	
				Hemocultivo	Ateroma
Con aterosclerosis					
1*	F	7,4	Pg-Pi	-	-
2	M	9,8	Pi-Aa-Pg	Aa	Aa
3	M	7,5	Bf-Aa-Pg	Bf	-
4	F	7,6	Pi-Pg	-	-
5	M	10,8	Aa-Pg-Pi	Aa	Aa
6	F	6,3	Aa-Pg	-	-
7	M	6,8	Pg	-	-
8	M	6,6	Bf-Pi	-	-
9	F	5,9	Pg-Pi	-	-
10	M	9,7	Pg-Aa-Pi	Pg	Pg
11	F	7,5	Pg-Pi	-	-
12	M	10,3	Pg-Aa	Aa	Aa
Sin aterosclerosis					
1	M	5,1	Pi-Pg	-	nc
2	M	5,0	Pi	-	nc
3	M	5,2	Aa-Pi	-nc	
4	F	7,3	Bf-Pg	-	nc
5	F	5,5	Pi-Pg	-	nc
6	M	6,6	Pi-Aa	Aa	nc
7	F	6,8	Pi-Pg	-	nc
8	M	6,7	Pg-Pi	Pg	nc
9	F	5,4	Pg-Aa	-	nc
10	M	5,6	Aa	-	nc
11	F	6,3	Pg-Pi	-	nc
12	M	5,0	Pg	-	nc

* Identificación de los pacientes:

Pg: *Porphyromonas gingivalis*; Aa: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*; Pi: *Prevotella intermedia*; Bf: *Bacteroides forsythus*. nc: no corresponde.

M: sexo masculino ; F: sexo femenino.

nas, como el cepillado dental o la masticación, podrían ser causa de bacteriemia espontánea en pacientes con periodontitis. Estudios recientes indican que el cepillado de dientes induciría aproximadamente a 3% de bacteriemias espontáneas²¹ y que la masticación de goma de mascar no sería causal de bacteriemias²² en pacientes con periodontitis. En la presente investigación se confirmó que el destartraje supra y subgingival es capaz de inducir procesos bacteriémicos de modo similar a lo descrito en otros estudios^{23,24}. Lo

anterior podría también explicar la ulterior llegada y ubicación de diversas especies periodontopáticas directamente sobre el ateroma desde donde han sido aisladas e identificadas, pero sin conocer aún su verdadero rol patogénico^{20,25}. En este estudio se observó que la profundidad de los sacos periodontales analizados fue mayor en los pacientes ateroscleróticos. Esto puede deberse a un proceso infeccioso más prolongado o a una mayor capacidad virulenta de los microorganismos involucrados, lo que sumado a un mayor

promedio de edad de los pacientes, inhibiría la natural respuesta inmune, contribuyendo al desarrollo de una periodontitis más severa. Los hemocultivos positivos en ambos grupos de pacientes correspondieron a los que presentaban mayor profundidad de saco periodontal. Esto permitiría argumentar que sacos más profundos establecerían una mayor superficie de contacto con el sistema sanguíneo, facilitando el acceso de estos microorganismos al flujo sanguíneo. Por otra parte, cualquiera sea el mecanismo de ingreso de estos microorganismos al sistema sanguíneo, es posible que en alguna etapa de la periodontitis, los elementos ultraestructurales de estas bacterias, tales como el lipopolisacárido⁸ u otros elementos no conocidos, puedan acelerar el desprendimiento de la placa ateromatosa con el consiguiente riesgo de infarto. En cuatro de los cinco pacientes ateroscleróticos con hemocultivos positivos se obtuvo crecimiento bacteriano a partir de los ateromas. Fue interesante determinar que las mismas especies se aislaron del periodonto y hemocultivos de los respectivos pacientes.

Aun cuando se evidenció bacteriemia en individuos con y sin aterosclerosis, no se efectuó un estudio estadístico debido al pequeño tamaño de la muestra. Esta no pudo ampliarse debido a los criterios de exclusión que se utilizaron en este estudio, en el que se descartaron a pacientes cuyas patologías concomitantes como diabetes, hipertensión, pie diabético, úlceras varicosas o ingesta de antibióticos, pudiesen haber alterado los resultados de este estudio.

Proponemos que las lesiones periodónticas más severas, con mayor profundidad de saco, detectadas en pacientes ateroscleróticos de edad avanzada, serían peligrosas en caso de remoción o traumatismo de la placa subgingival, pudiendo constituirse en un importante factor de riesgo cardiovascular.

Investigaciones con mayor fundamento en procesos moleculares, son necesarias para comprender e involucrar con mayor base científica a las bacterias periodontopáticas en el proceso aterogénico y trombogénico.

REFERENCIAS

1. SOCRANSKY SS, SMITH C, HAJFARAJEE AD. Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 260-8.
2. LI X, KOLLTVEIT KM, TRONSTAD L, OLSEN I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev* 2000; 547-58.
3. PAPAPANOS P. Periodontal diseases: Epidemiology. *Ann Periodontol* 1996; 1: 1-36.
4. BUHLIN K, GUSTAFSSON A, POCKLEY AG, FROSTEGÅRD, KLINGE B. Risk factors for cardiovascular disease in patients with periodontitis. *Eur Heart J* 2003; 24: 2099-107.
5. HAYNES WG, STANFORD C. Periodontal disease and atherosclerosis. From dental to arterial plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1309-11.
6. WILSON PW, CASTELL WP, KANNEL WB. Coronary risk prediction in adults: the Framingham heart study. *Am J Cardiol* 1987; 59: 91-4.
7. WILSON PW, D'AGOSTINO RB, LEVY D, BELANGER AM, SILBERSCHATZ H, KANNEL WB. Prediction of coronary heart disease using risk factors categories. *Circulation* 1998; 97: 1837-47.
8. LIM J, PÉREZ L, GUARDA E, FAJURI A, MARCHANT E, MARTÍNEZ A, LAZEN R ET AL. Enfermedad periodontal en pacientes con síndrome coronario agudo. *Rev Méd Chile* 2005; 133: 183-9.
9. LINDSBERG PJ, GRAU AJ. Inflammation and infections as risk factors for ischemic stroke. *Stroke* 2003; 34: 2518-32.
10. KURAMITSU H, KANG I, QI M. Interactions of Porphyromonas gingivalis with host cells: implications for cardiovascular diseases. *J Periodontol* 2003; 74: 85-9.
11. GLURICH I. Systemic inflammation in cardiovascular and periodontal disease: comparative study. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 425-32.
12. DAJANI AS, TAUBERT KA, WILSON W, BOLGER AF, BAYER A, FERRIERI P, GEWITZ MH ET AL. Prevention of bacterial endocarditis. Recommendations by the American Heart Association. *Circulation* 1997; 96: 358-66.
13. WILSON ML, WEINSTEIN MP. General principles in the laboratory detection of bacteremia and fungemia. *Clin Lab Med* 1994; 14: 69-82.
14. ASHIMOTO A, CHEN C, BAKKER I, SLOTS, J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal

- pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1996; 11: 266-73.
15. AVILA-CAMPOS M, VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in Sao Paulo, SP, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2002; 44: 1-5.
 16. CHUN YP, CHUN KJ, OLGUIN D, WANG H. Biological foundation for periodontitis as a potential risk factor for atherosclerosis. *J Periodont Res* 2005; 40:87-95.
 17. D'AIUTO F, PARKAR M, ANDREOU G, BRETT PM, READY D, TONETTI MS. Periodontitis and atherogenesis: causal association or simple coincidence? *J Clin Periodontol* 2004; 31: 402-11.
 18. HAYNES WG, STANDFORD C. Periodontal disease and atherosclerosis. From dental to arterial plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1309-11.
 19. KURATMISU, HK, QI M, KANG I, CHEN W. Role for periodontal bacteria in cardiovascular diseases. *Ann Periodontol* 2001; 6: 41-7.
 20. HARASZTHY VI, ZAMBON JJ, TREVISAN M, ZEID M, GENCO RJ. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol* 2000; 71: 1554-60.
 21. KINANED D, RIGGIO M, WALKER K, MAC KENZIE D, SHEARER B. Bacteremia following periodontal procedures. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 708-13.
 22. MURPHY A, DALY C, MITCHELL D, STEWART D, CURTIS B. Chewing fails to induce oral bacteremia in patients with periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2006; 33: 730-6.
 23. REINHARDT R, BOLTON R, HLAVA G. Effect of nonsterile versus sterile irrigation with ultrasonic scaling on postoperative bacteremia. *J Periodontol* 1982; 53: 96-9.
 24. DALY GC, MIRCHELL, DH, HIGHFIELD JE, GROSSBERG DE, STEWART D. Bacteremia due to periodontal probing: A clinical and microbiological investigation. *J Periodontol* 2001; 72: 210-4.
 25. MARQUES DA SILVA R, CAUGANT DA, LINGAAS PS, GEIRAN O, TRONSTAD L, OLSEN I. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* but not bacteria of the red complex in aortic aneurysms by multiplex polymerase chain reaction. *J Periodontol* 2005; 76: 590-4.