

Artículo Original

Caracterización del tipo de sensibilidad dental de pacientes con periodontitis y su respuesta a los dentífricos

Characterization of the type of dental sensitivity of patients with periodontitis and their response to dentifrices

<https://doi.org/10.52808/bmsa.7e6.621.010>

Santiago Paul Jordán Morales ^{1,*}

<https://orcid.org/0000-0002-6427-9675>

Pamela Jeanneth Salinas Villacís ¹

<https://orcid.org/0000-0002-6727-3180>

Viviana González Aguilar ¹

<https://orcid.org/0000-0002-0990-6066>

Recibido: 11/11/2021

Aceptado: 17/01/2022

RESUMEN

La hipersensibilidad de la dentina surge ante la exposición de esta y en respuesta a estímulos de diverso tipo, fundamentalmente de origen térmico, evaporativo, táctil, osmótico o químico. Se realizó una investigación abocada a caracterizar la hipersensibilidad dental de pacientes atendidos en consulta de odontología y la respuesta a determinado dentífrico utilizado. En el análisis de estimulación dental se tomaron 308 mediciones de la sensibilidad dental para todos los participantes (n=22), con 7 factores de tiempo (T0 antes del uso del producto, T3 días, T5 días, T8 días, T22 días y T29 días después del uso del dentífrico). Se realizó la prueba paramétrica regresión lineal simple para identificar la tendencia y el ajuste de los datos, al considerar dichas variables como una serie temporal. Se utilizaron 22 tratamientos. Casi el 91,0% expreso que el dentífrico había cumplido sus expectativas, fundamentalmente por la reducción de la hipersensibilidad a corto plazo, mientras que aproximadamente 91,0% de los casos afirmó que compraría el dentífrico (20 casos, IC 95%: 72,2% y 97,5%), respectivamente.

Palabras clave: hipersensibilidad; dentina; respuesta a estímulos; dentífrico; hipersensibilidad dentaria.

ABSTRACT

Dentin hypersensitivity arises when exposed to it and in response to various types of stimuli, mainly of thermal, tactile evaporative, osmotic or chemical origin. An investigation was carried out aimed at characterizing the dental hypersensitivity of patients seen in the dental office and the response to a certain toothpaste used. In the dental stimulation analysis, 308 measurements of tooth sensitivity were taken for all participants (n = 22), with 7 time factors (T0 before use of the product, T3 days, T5 days, T8 days, T22 days and T29 days after using the toothpaste). The simple linear regression parametric test was performed to identify the trend and the fit of the data, considering these variables as a time series. 22 treatments were used. Almost 91.0% believed that the toothpaste had met their expectations, mainly due to the reduction in hypersensitivity in the short term, while approximately 91.0% of the cases stated that they would buy the toothpaste (20 cases, 95% CI: 72, 2% and 97.5%), respectively.

Keywords: hypersensitivity; dentine; response to stimuli; Toothpaste; dental hypersensitivity.

¹ Universidad Regional Autónoma de los Andes (UNIANDES).

*Autor de Correspondencia: ua.santiagojordan@uniandes.edu.ec

Introducción

La salud bucodental es primordial para mantener una salud general, sin embargo, existe múltiples factores que inciden en el deterioro de la primera, que van desde factores educacionales hasta factores bacteriológicos, generando así, un desequilibrio en el bienestar del paciente, provocando malestares o afectaciones no solo en la boca sino en el resto del cuerpo.

Uno de estos malestares o afectaciones bucodentales, es el referente a la hipersensibilidad de la dentina, la cual se ha definido como un dolor agudo corto, que surge de la dentina expuesta en respuesta a estímulos típicamente térmicos, evaporativos, táctiles, osmóticos o químicos y que no puede ser atribuida a cualquier otro defecto de forma o patología. (Holland *et al.*, 1997) Esta definición desafía a los odontólogos a precisar correctamente el diagnóstico diferencial para dilucidar las causas del dolor asociado con la sensibilidad dental. Muchas condiciones comparten los síntomas de hipersensibilidad dentinaria, por lo que es esencial establecer con rapidez el diagnóstico definitivo, pues esta condición afecta la calidad de vida de las personas que la padecen. (Josefa *et al.*, 2020)

Varios estudios (Jackson, 2000; Cárdenas y Vergara, 2020; Gómez *et al.*, 2020) informan que la prevalencia de hipersensibilidad a la dentina osciló entre el 8% y el 57% en la población generalmente y que las estrategias para el

manejo de la afección eran notablemente variadas. Además, exponen que las terapias eran diversas, por lo que podría ser un desafío para un practicante para seleccionar la adecuada.

El mecanismo de hipersensibilidad de la dentina, más aceptado es la teoría hidrodinámica propuesta por Brännström, (1963) mediante la cual el flujo de líquido dentro de los túbulos dentinales se altera (aumenta o cambia direccionalmente) por estímulos térmicos, táctiles o químicos cerca de la superficie expuesta de los túbulos. Esta alteración conduciría a la estimulación de las fibras A- δ que rodean a los odontoblastos. Este supuesto mecanismo requiere que los túbulos individuales estén abiertos en la superficie de la dentina, así como dentro de la pulpa.

Dos procesos son esenciales para el desarrollo de la hipersensibilidad de la dentina, uno de ellos es que la dentina debe exponerse (localización de la lesión), ya sea por pérdida de esmalte o por recesión gingival, y el otro es que los túbulos de la dentina deben estar abiertos tanto a la cavidad oral como a la pulpa (inicio de la lesión). La erosión, la abrasión (o sus co-efectos), las abfracciones y el desgaste pueden conducir a la exposición de los túbulos. Tanto la evidencia clínica como de laboratorio, sugieren que el esmalte en la región cervical bucal se pierde a través de una combinación de erosión y abrasión.

Además, de los factores fisiológicos, etiológicos y patológicos, es importante mencionar los factores bacteriológicos, ya que los mismos son de gran relevancia y se muestran como parte de la etiología multifactorial que desencadenan enfermedades periodontales. Las bacterias siempre se encuentran presentes en el ecosistema bucal, el cual está constituido por una amplia diversidad de tejidos, microorganismos y ambientes; el mismo al desequilibrarse, produce una serie de lesiones y enfermedades infecciosas, que van desde los niveles más leves a los más crónicos.

En el ecosistema bucal, prevalecen patógenos periodontales llamadas bacterias anaerobias muy relacionadas a los diferentes tipos de periodontitis, entre las cuales se puede mencionar a las siguientes: *Porphyromonas gingivalis* (Pg), asociada a dañar la barrera del tejido epitelial, asociada con enfermedades periodontales más comunes y menos crónicas, a la *Treponema denticola* (Td) considerada una bacteria peligrosa, teniendo cierta predominancia en lesiones como gingivitis ulcerosa necrotizante y abscesos apicales agudos. Se debe agregar, además, al *Fusobacterium nucleatum* (Fn) y al *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, como implicados en la patogénesis de las periodontitis, y en otros procesos infecciosos de origen endógeno y para finalizar, *Tannerella forsythia* (Tf), capaz de generar inflamación y con el tiempo dañar de manera progresiva el periodonto.

Al producirse daños paulatinos en el periodonto, su sintomatología puede ir, desde niveles leves a crónicos, sino son atendidas a tiempo, lo que puede traer como consecuencia, la destrucción de las encías y el hueso que sujeta los dientes. Entre las enfermedades periodontales más comunes encontramos a la gingivitis y la periodontitis, siendo esta última, a la cual se presta mayor atención en este estudio, motivado a su relación con la sensibilidad dental.

La periodontitis es definida, por una pérdida de soporte de los tejidos periodontales debido a inflamación, se utiliza como umbral de observación, una pérdida de inserción clínica interproximal de ≥ 2 mm o ≥ 3 mm en dos o más dientes no adyacentes. (Herrera *et al.*, 2018), así pues, la inflamación de las encías y la acumulación a largo del tiempo de placa (una sustancia que forma una capa formada mayormente por bacterias, saliva, células muertas y residuos de alimentos que se depositan de manera continua sobre los dientes) y sarro (placa endurecida) entre los dientes y las encías (Ubertalli, 2020).

De lo anterior, es necesario, enfocarse en la placa bacteriana y el ecosistema bucal, los cuales crecen y se transforman debido a un ambiente con escaso oxígeno, la predisposición de un sistema inmunitario endeble, beneficiando el crecimiento de formas agresivas de bacterias. Por otro lado, es importante resaltar, que existen fundamentos científicos para determinar que el origen étnico y la genética juegan un papel muy importante en el desarrollo de la enfermedad periodontal y probablemente estén relacionados con la microbiota oral (Rylev y Kilian, 2008)

Los autores antes mencionados, consideran que de acuerdo al origen étnico, pueden encontrarse periodontos patógenos con mayor frecuencia, como es el caso del *A. actinomycetemcomitans* del cual se han aislado varias cepas en distintas regiones geográficas, al mismo tiempo, se ha relacionado a *P. gingivalis* y *Peptostreptococcus anaerobius* en pacientes afroamericanos. En el caso de los caucásicos, existe una aparición frecuente del *F. nucleatum*, al mismo tiempo en los latinos, los asiáticos y los americanos se han encontrado más de una bacteria como lo son: la *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola*.

Ahora bien, la *P. gingivalis* pertenece al Género *Porphyromonas*, la cual se caracteriza por generar un pigmento negro en sus colonias, característica que se observa en medios de cultivo que contienen sangre lisada, hemina y vitamina K. Esta coloración es motivada a la composición de hemina y protoporfirina. La hemina es la consecuencia de la descomposición de la hemoglobina, la cual representa un ingrediente importante, en el crecimiento de estas bacterias tanto in vivo como in vitro. (Guillarte y Perrone, 2005). Esta bacteria, se la ha asociado con la progresión de la periodontitis crónica en el adulto y la cual se presenta por no tener una buena salud periodontal.

Asimismo, *F. nucleatum* corresponde al Género de *Fusobacterium*, se caracterizan por ser bacilos largos fusiformes, inmóviles, no esporulados y generalmente no fermentativos. (Guillarte y Perrone, 2005). Considerada una

de las bacterias que se encuentran con mayor frecuencia en el surco gingival y es asociada significativamente con la periodontitis. Moore (1991) y Kamma (1995), discurren en el hecho de que este periodonto patógeno puede producir irritación de los tejidos, sangramiento y exudado y al mismo tiempo, estimula el crecimiento de especies de *Porphyromonas*, *Prevotella* y de otros microorganismos asociados con la destrucción del tejido, ratificando que este ecosistema bacteria genera el desarrollo de la enfermedad periodontal.

Por otro lado, se encuentra a la *Treponema denticola*, la cual corresponde al Género de Phylum Spirochaetes, en donde se incluye la familia Spirochaetaceae, evidenciada como una espiroqueta con múltiples factores de virulencia, lo que la hacen darle el calificativo de peligrosa, siendo identificada con presencia significativa en lesiones como gingivitis ulcerosa necrotizante y abscesos apicales agudos. Existe varias especies de *Treponema*, pero siendo esta la más frecuente, encontrada en estudios microscópicos y que su acción combinada con la *Tannerella forsythia* y *Phyromonas gingivalis* ha sido considerada una bacteria colonizadora terciaria, formando así, el complejo rojo de Socransky, predominante en cuadros de Periodontitis crónica. (Ramos *et al.*, 2012).

Ahora bien, la *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* género llamado *Aggregatibacter*, perteneciente a la familia Pasteurellaceae. La misma reside principalmente en el surco gingival y produce un daño rápido, más aún si se acompaña de abundante biofilm alrededor del diente, llegando a menoscabar el periodonto con formación de bolsa periodontal, pérdida de inserción, amplia movilidad del diente y con el tiempo pérdida de este. (Ramos *et al.*, 2010). Se le considera, una de los periodontos patógenos de mayor relevancia en la Periodontitis Agresiva Localizada

Y por último, se encuentra a la *Tannerella forsythia*, perteneciente al género llamado *Tannerella*, la cual se asienta de manera progresiva en la profundidad del surco crevicular su capacidad de actuar simultáneamente con otras bacterias como: *P. gingivalis* y *T. denticola*, formarían un mayor daño al periodonto. Este proceso al ir progresando paulatinamente va a producir un daño progresivo del tejido gingival, ligamento periodontal y hueso alveolar principalmente, produciendo los signos clásicos de la periodontitis como; sangrado, pérdida de inserción, bolsa periodontal, movilidad dental principalmente, características que podrían agravarse generando la pérdida de la pieza dentaria (Ramos, 2020).

En otro orden de ideas, es necesario, recordar que, el esmalte es resistente a la abrasión con el cepillado dental, con o sin pasta de dientes, pero es particularmente sensible a los efectos del ácido; por lo tanto, el cepillado de esmalte ácido (erosionado) tiene un marcado efecto abrasivo.

Muchos profesionales asumen que los dentífricos (pasta dental) "abrasivos" son responsables del desarrollo de la lesión. Si bien es posible que la pasta de dientes pueda erosionar la dentina en cierta medida, la abrasividad también puede producir una capa de frotis, lo que reduce la sensibilidad.

Curiosamente, los abrasivos en dentífricos pueden, en combinación con detergentes, eliminar la capa de frotis y abrir los túbulos. De hecho, si los factores predisponentes no se eliminan, el cepillado casi que con cualquier dentífrico puede abrir los túbulos. Ocasionalmente, algunos depósitos del abrasivo de las pastas dentales se adhieren a los túbulos, pero luego se desprenden fácilmente.

La recesión gingival, otro factor en la exposición de la dentina, se ha descrito como un enigma (Smith, 1997) y sus causas no se conocen bien, sin embargo, el cepillado excesivo, la gingivitis ulcerativa necrotizante aguda, las lesiones autoinfligidas y los procedimientos periodontales son los principales factores predisponentes.

La hipersensibilidad dentina, por definición, es un diagnóstico de exclusión, es decir, que antes de proceder al tratamiento deben descartarse las afecciones que se presentan con síntomas que imitan la hipersensibilidad de la dentina. (Dowell, Addy & Dummer, 1985). Los pacientes con hipersensibilidad a la dentina, generalmente experimentan un dolor corto y agudo en respuesta al frío (el desencadenante más común), el tacto, la evaporación, la ósmosis o los estímulos químicos.

Es difícil, cuantificar la hipersensibilidad de la dentina en un entorno clínico, por lo tanto, los médicos deben confiar en la historia informada por el paciente. En este sentido, un paciente puede indicar que experimenta dolor pero que no le afecta su calidad de vida (y que no está buscando tratamiento). Otros pueden solicitar la intervención para obtener algún alivio del dolor que experimentan. Dadas las numerosas variaciones en la presentación, juntas de odontólogos (Canadian Advisory Board on Dentin Hypersensitivity, 2003) han acordado que las medidas objetivas de dolor por estallido de aire o estímulos térmicos, como se emplean comúnmente en los ensayos clínicos, podrían no ser capaces de replicar todos los tipos de hipersensibilidad a la dentina, lo que reduciría la confiabilidad.

Dados estos problemas, se considera que es más apropiado confiar en la percepción del dolor de los pacientes después del tratamiento y que es de gran utilidad contar con un índice universal del dolor. Dicho índice constituiría un juicio de transición global, lo que significa que el paciente indicaría que él o ella siente una mejoría, se siente igual o se siente aún peor después de la intervención. Además, el paciente puede indicar que no desea más tratamiento; en esta situación, y si el problema se ha reducido o resuelto, un tratamiento adicional sería inadecuado. Además, siempre que sea posible, los factores predisponentes primero deben eliminarse o modificarse. De lo contrario, es probable que el tratamiento brinde solo un éxito a corto plazo.

Por todo lo anteriormente descrito, este estudio tiene por objetivo, caracterizar la hipersensibilidad dental de pacientes atendidos en consulta de odontología y la respuesta a determinado dentífrico utilizado.

Materiales y métodos

Se realizó una investigación observacional y longitudinal entre septiembre y octubre de 2017, con un seguimiento de 4 semanas. Se seleccionaron 22 pacientes con enfermedad periodontal crónica e hipersensibilidad dental que acudieron de forma secuencial a una consulta odontológica.

Toma de Muestra Microbiológica

Las muestras fueron recolectadas desde la placa subgingival de pacientes con periodontitis crónica, con profundidades de sondaje superior o iguales a 6 mm. La obtención de la muestra se realizó según Gajardo *et al.*, (2005) con algunas modificaciones. Brevemente se insertaron 2 conos de papel estériles estandarizados N° 30 durante 20 segs. Desde cada paciente se tomaron muestras desde los 3 sitios más profundos. Las muestras de cada paciente fueron transportadas a - 20°C y procesadas dentro de las primeras 24 hrs de almacenamiento.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para realizar el análisis por PCR cada cono de papel se lavó con 100 µL de agua destilada estéril, con el fin de desprender las bacterias. Para la liberación del material genético, la suspensión bacteriana se lisó por denaturación a 100°C durante 10 min. En cada muestra, se analizó por separado, en donde se buscó la presencia de los patógenos periodontales *F. nucleatum* (Fn), *P. gingivalis* (Pg), *T. denticola* (Td), *T. forsythia* (Tf) y *A. actinomycetemcomitans* (Aa).

Para la identificación de cada bacteria se amplificó un fragmento del gen 16S rDNA utilizando los partidores descritos por Tran *et al.*, (1999), Okada *et al.*, (2001) y Boutaga *et al.*, (2005). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl. Las concentraciones de cada componente fueron: 0.5 U de GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, USA), 1.5 mM MgCl₂, 2 mM de cada dioxinucleosido trifosfato (dNTP), 1 µM de cada partidor y 0.5 µg de DNA.

Todas las reacciones de PCR fueron realizadas en un Termociclador Multigene (Labnet Inc.). El programa de PCR utilizado fue: denaturación inicial por 10 min a 94°C; 35 ciclos de 94°C por 30 segs, 55°C por 30 segs y 72°C por 30 segs; y una extensión final a 72°C durante 10 min. Los productos fueron separados por electroforesis en g

Por otra parte, el dentífrico analizado se encuentra autorizado para su uso frente a la hiperestesia dentinaria en humanos por el Ministerio de Sanidad español con los códigos C.N. 174984.0 (125 mL) y C.N. 174983.3 (75 mL) desde diciembre de 2014. Se aplicó el dentífrico durante 28 días, con una frecuencia de 3 veces al día, como parte de la limpieza dental rutinaria. Se proveyó a los pacientes de un cepillo dental con filamentos suaves. El producto, una vez cepillados los dientes, se mantuvo en la boca durante 1-2 min, y durante los 30 min posteriores los pacientes no pudieron beber ni ingerir ninguna sustancia.

Se informó a los pacientes de forma oral y escrita, sobre los objetivos y procedimientos del estudio. Firmaron el consentimiento de participación y recibieron una copia de este, quedando otra archivada en el centro. Este estudio se realizó bajo los principios de Buena Práctica Clínica.

Como criterios de inclusión, para la realización del estudio, se tomó en cuenta: el tener entre 18 y 70 años, una buena condición física e hipersensibilidad en al menos un diente anterior a los molares, con erosión/abrazión cervical o recesión gingival. Los criterios de exclusión fueron: antecedentes de alergia a los ingredientes del producto, dientes con prótesis parciales o que hubieran sufrido grandes reconstrucciones o reconstrucciones anómalas, caries, fracturas, movilidad excesiva o sospecha de patologías de la pulpa; presencia de extensiones ortodónticas, tumores, enfermedad periodontal moderada o avanzada o más de una caries; sobrecarga o ajuste oclusivo realizado recientemente en los dientes objeto del estudio, cirugía periodontal durante los 3 meses previos, toma concomitante de medicación (incluidos analgésicos), uso de productos de higiene bucodental con componentes frente a la hipersensibilidad dentinaria en los 30 días previos al estudio o durante este; embarazo o lactancia.

Técnicas y procedimiento de obtención de la información:

Se realizaron tres tipos de evaluación: sensitiva, de tolerancia y subjetiva. La primera evaluación fue la sensitiva: la cual se llevó a cabo en la consulta odontológica mediante técnica táctil y por chorro de aire. Se realizó el día 1 (antes de la aplicación del producto y sin haberse cepillado los dientes); y a los 30 min de la aplicación los días 3 (48 horas), 5 (96 horas) 8, 15, 22 y 29 del estudio.

Para la segunda evaluación, la táctil, el dentista procedió y eligió el diente que tuviese la puntuación más alta según una escala de calificación verbal (Verbal Rating Scale, VRS) tras el estímulo (0= ausencia de dolor, 1= dolor leve, 2= dolor moderado, 3= dolor intenso). Se valoró la sensación percibida por el paciente al tocar ligeramente la superficie de la raíz dental con una sonda periodontal de acuerdo con la siguiente escala de calificación verbal: 0:

ausencia de dolor, pero se percibe el estímulo; 1: dolor leve; 2: dolor durante la aplicación del estímulo; 3: dolor durante la aplicación del estímulo e inmediatamente después.

La sensibilidad por chorro de aire, se evaluó aplicando aire a la superficie expuesta de la raíz del diente sensible, desde una distancia de 1 cm, con una jeringa dental de aire y agua. El aire se aplicó durante 1 segundo (protegiendo los dientes adyacentes con los dedos) con una presión de 60 psi (± 5 psi) y a una temperatura de 20 °C (± 2 °C). La sensibilidad se recogió de acuerdo con la escala de Schiff (0: la sensibilidad del diente/sujeto no responde al estímulo; 1: el diente/sujeto responde al estímulo, pero no se pide interrumpirlo; 2: el diente/sujeto responde al estímulo y se pide interrumpirlo o se mueve durante su aplicación; 3: el diente/sujeto responde al estímulo, que considera doloroso y se pide interrumpirlo).

Para la última evaluación como lo es: la tolerancia, el odontólogo valoró el día 0 los siguientes parámetros: sangrado de encías, irritación gingival, alteraciones del esmalte dental, xerostomía y caries. Además, en cada visita se llevó a cabo una evaluación clínica para determinar posibles alteraciones relacionadas con el uso del dentífrico. La evaluación se realizó el día 1 (antes de la aplicación del producto) y a los 30 min de la aplicación, los días 3 (48 horas), 5 (96 horas) 8, 15, 22 y 29 del estudio.

En cuanto a la evaluación subjetiva, los pacientes valoraron la intensidad de los episodios sufridos mediante una escala de 0 a 5 puntos (0: ausencia de sensibilidad y 5: el máximo de sensibilidad). Esta autoevaluación se realizó a los 30 min de haber utilizado el producto en todos los momentos en los que este se aplicó.

Asimismo, al final del tratamiento se realizó un cuestionario que incluyó preguntas sobre las cualidades organolépticas, la eficacia, la tolerancia y el grado de satisfacción por parte de los pacientes. Se trató de un cuestionario de evaluación subjetiva validado por Zurko BioResearch, centro especializado en la evaluación clínica y preclínica de la seguridad y eficacia de productos cosméticos, cosmeceúticos y sanitarios, perteneciente a la Asociación Española de Bioempresas (ASEBIO).

Procesamiento estadístico

Las variables cuantitativas se resumieron a través de la media y la desviación estándar (DE), previa comprobación de la distribución normal de los datos mediante la prueba Kolmogorov-Smirnov. Los resultados individuales, se expresaron como valores absolutos para cada tiempo experimental y como porcentajes de variación respecto a los valores basales; en estas variables se aplicó la prueba no paramétrica Rangos con signo de Wilcoxon para comparar los valores obtenidos antes y después del tratamiento. Como nivel de significación se fijó el 5%.

Se calcularon, además, intervalos de confianza para los porcentajes en el caso de la calificación global y de las propiedades organolépticas del dentífrico. Se utilizó el método de Wilson y un nivel de confianza del 95%.

En el análisis de estimulación dental se tomaron 308 mediciones de la sensibilidad dental para todos los participantes (n=22), con 7 factores de tiempo (T0 antes del uso del producto, T3 días, T5 días, T8 días, T22 días y T29 días después del uso del dentífrico). Se realizó la prueba paramétrica regresión lineal simple para identificar la tendencia y el ajuste de los datos, al considerar dichas variables como una serie temporal. Se utilizaron 22 tratamientos.

Resultados

Mediante el uso de reacciones individuales de PCR, se detectó la presencia de los principales patógenos periodontales presentes en el surco periodontal de pacientes con periodontitis crónica. Utilizando el gen 16S rDNA como un marcador genético para las bacterias en estudio se observaron fragmentos especie-específicos para: *P. gingivalis* (*Pg*), *T. denticola* (*Td*), *F. nucleatum* (*Fn*), *T. forsythia* (*Tf*) y *A. actinomycetemcomitans* (*Aa*). De las 22 muestras de pacientes analizadas, 18 pacientes correspondientes al (81,81%), de ellas fueron positivas para *T. denticola* (*Td*), 15 pacientes con un (68,18%) para *T. forsythia* (*Tf*), 13 pacientes con un (59,90%), para *P. gingivalis* (*Pg*), 21 pacientes con porcentaje del (95,45%) para *F. nucleatum* y 10 pacientes para *A. actinomycetemcomitans* (*Aa*) con un porcentaje de (45,45%). En 3 muestras, no se detectó ninguna de las bacterias analizadas.

Al analizar la co-detección entre las distintas bacterias, se observa: que *F. nucleatum* (*Fn*) está presente en más de un 80% de los casos estudiados, cuando se detecta cualquiera de las cuatro bacterias restantes. Diferente es el caso de la *A. actinomycetemcomitans* (*Aa*), donde se observa que no se detecta en más de un 20% de los pacientes bajo estudio, al amplificar cualquiera de las bacterias restantes (Tabla 3). Al analizar la incidencia de los patógenos periodontales por género, se observaron diferencias significativas en la detección de *T. forsythia* (*Tf*), *F. nucleatum* (*Fn*) y *A. actinomycetemcomitans* (*Aa*), siendo mayor la incidencia en mujeres (Figura 2).

Es importante resaltar, el alto porcentaje de pacientes con la presencia de periodonto patógenos del Complejo rojo o Complejo de Socransky, (*T. denticola* (*Td*), *T. forsythia* (*Tf*), *P. gingivalis* (*Pg*), (Tomas *et al.*, 2021), en donde se evidencia, una Periodontitis Crónica bastante avanzada y de un grupo de pacientes en consideración y observación por presentar *A. actinomycetemcomitans* (*Aa*), la cual puede de manera progresiva generar una Periodontitis Agresiva

Localizada sino se toman medidas preventivas y de tratamiento adecuados para los mismos, generando la posible pérdida de tejido y de piezas dentales.

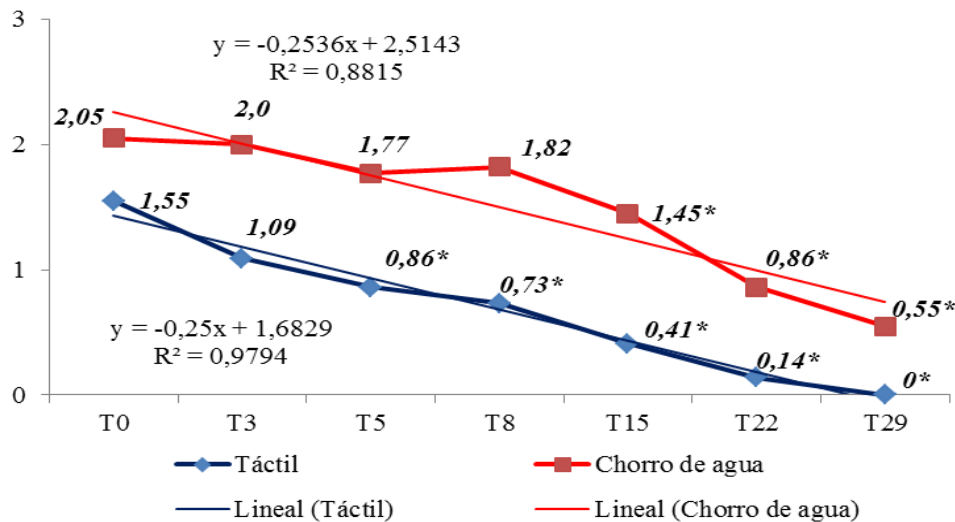
La edad media de los pacientes de 42 años (DE= 7,4 años e IC 95%: 38,5 años y 46,5 años). Del total de pacientes, 16 tuvieron alteraciones odontológicas para un 72,7% (IC 95%: 51,9% y 86,9%). Dichas alteraciones, en orden de frecuencia, fueron las siguientes: sangrado de encías con 8 casos para un 50% (IC 95%: 28,0% y 72,0%), irritación gingival con 4 casos para un 25% (IC 95%: 10,2% y 49,5%), alteraciones en el esmalte dental con 3 casos para un 18,8% (IC 95%: 6,6% y 43,0%), xerostomía y caries, con 2 casos para un 12,5% (IC 95%: 3,5% y 36,0%), respectivamente.

Acerca de los estímulos que desencadenaban la sensibilidad el más frecuente fue el frío con 10 casos, para un 45,4% (IC 95%: 26,9% y 65,3%), el calor con 6 casos para un 27,3% (IC 95%: 13,1% y 48,1%), los dulces, con 3 casos para un 13,6% (IC 95%: 4,8% y 33,3%) y el tacto y los ácidos, ambos con 2 casos para un 9,1% (IC 95%: 2,5% y 27,8%).

Hubo 17 pacientes acudieron regularmente al dentista (77,3%; IC 95%: 56,6% y 89,9%). El 45,4% tenía prótesis, implantes o algún tipo de ortodoncia (10 pacientes; IC 95%: 26,9% y 65,3%). El 68,2% (15 casos; IC 95%: 47,3% y 83,6%) había utilizado previamente otros productos para tratar la hipersensibilidad dental.

La cantidad promedio de dentífrico utilizada en el estudio (n=19) fue de 70,5 g (DE= 15,3 g, y la cantidad promedio usada en cada aplicación fue de 0,84 g (DE= 0,2 g). Con la aplicación repetida del dentífrico no se observó por el dentista ningún tipo de reacción adversa.

En relación con la variación en la hipersensibilidad dental, medida por sensibilidad táctil, puede verse en la figura 1 que se obtuvo reducción en todos los tiempos frente al valor basal al ser significativa desde el punto de vista estadístico (p= 0,000) excepto en el tiempo T3. Hay suficiente evidencia para afirmar que el dentífrico produjo una reducción de la hipersensibilidad en los días 5, 8, 15, 22 y 29, con un nivel de significación del 5%. El día 29 la hipersensibilidad se redujo en el 95% de los pacientes y en un valor del 100% respecto al basal.



Nota: puntuaciones medias de las técnicas táctil y chorro de aire,
 *: p< 0,05 vs. basal

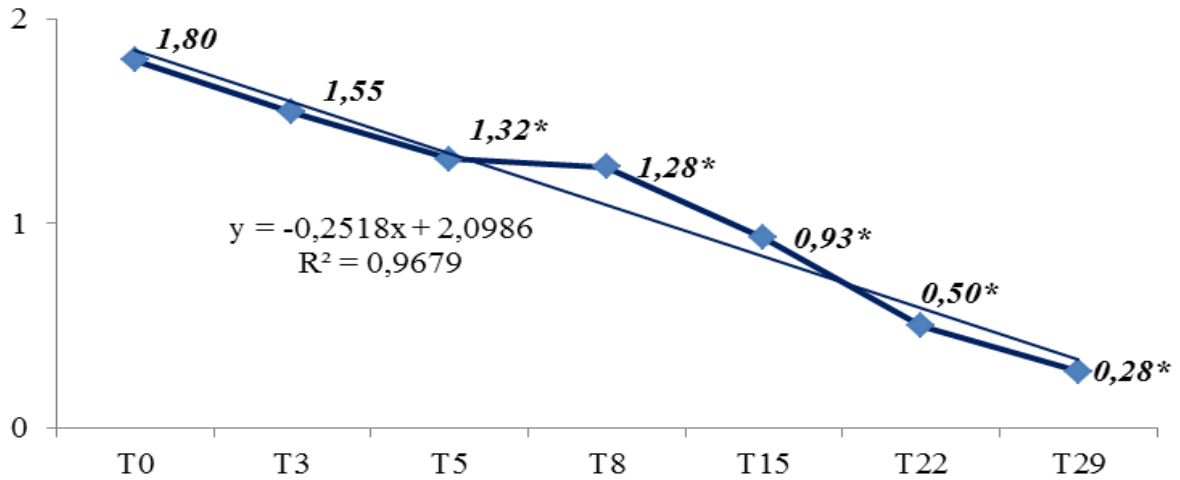
Figura 1. Reducción de hipersensibilidad dentaria

Para la hipersensibilidad determinada mediante chorro de aire se obtuvo reducción en todos los tiempos frente al valor basal, siendo significativa a partir del T15. El día 29 había disminuido en todos los pacientes y en un valor del 73 % respecto al valor basal.

La evaluación sensitiva táctil mostró una mayor reducción de la hipersensibilidad que la de chorro de aire en todos los puntos de medición.

Tanto para la sensibilidad táctil como por chorro de aire se obtuvo regresión, con un buen ajuste de las rectas de ambas. Puede afirmarse que el 97,9% de los casos de los cambios que ocurrieron en la hipersensibilidad dental táctil fueron debidos al uso del dentífrico; así igualmente el 88,1% de los cambios ocurridos en la hipersensibilidad dental por chorro de aire fueron debidos al uso del dentífrico.

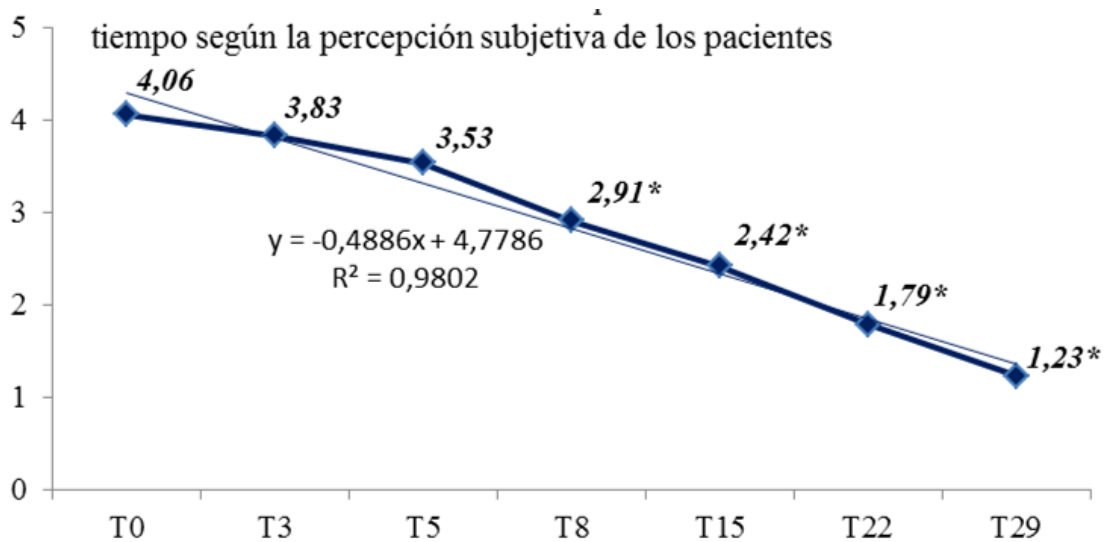
En la figura 2 se visualiza la media de los valores de hipersensibilidad obtenidos con la combinación de ambos métodos en los distintos puntos de tiempo del estudio. Se observó reducción de la hipersensibilidad en todos los tiempos frente al valor basal, siendo significativa ($p=0,000$) a partir del T5. El día 29 la hipersensibilidad descendió en todos los pacientes y en el 85% respecto al valor basal.



Nota: *: $p < 0,05$ vs. basal

Figura 2. Reducción media de hipersensibilidad dentaria en el tiempo con la combinación de los métodos táctil y por chorro de aire

Puede verse en la figura 3 la evaluación subjetiva de la eficacia por los pacientes, donde se obtuvo reducción de la hipersensibilidad en todos los puntos temporales del estudio, que fue significativa ($p=0,000$) excepto el T3 y el T5. Puede plantearse que hubo suficiente evidencia para afirmar, con un 5% de nivel de significación que el dentífrico redujo la percepción de sensibilidad en los días 8, 15, 22 y 29. En este último día la reducción fue de un 70% respecto al valor basal.



Nota: *: $p < 0,05$ vs. basal

Figura 3. Reducción media de hipersensibilidad dentaria en el tiempo según la percepción subjetiva de los pacientes

Se obtuvo regresión y la recta tuvo buen ajuste, por tanto se puede decir que el 98,0% de los cambios ocurridos en la hipersensibilidad evaluada de forma subjetiva por los pacientes fueron debidos al uso del dentífrico.

Después de 29 días de uso, se redujo la sensibilidad de forma importante para 6 casos, lo que representó el 27,3% de los pacientes (IC 95%: 13,1% y 48,1%), moderada para 14 casos, para un 63,4% (IC 95%: 42,9% y 80,3%) y leve para 2 casos, para un 9,1% (IC 95%: 2,53% y 27,8%). La rapidez de acción del dentífrico fue notable para 4

casos, para un 18,2% (IC 95%: 7,31% y 38,5%), moderada en 11 casos, para un 50,0% (IC 95%: 30,7% y 69,3%) y discreta en para el 31,8% (IC 95%: 16,3% y 52,7%).

Como importante, fue calificado el grado de mantenimiento de la eficacia por 5 pacientes, para un 22,7% (IC 95%: 10,1% y 43,4%) en tanto que como moderado lo calificaron 11 casos, para un 50,0% (IC 95%: 30,7% y 69,3%).

La reducción de la hipersensibilidad a largo plazo fue importante para 8 pacientes, lo cual representó el 36,3% (IC 95%: 19,7% y 57,0%) y moderada para otros 8 pacientes 36,3% (IC 95%: 19,7% y 57,0%).

Los resultados del tratamiento fueron superiores a otros productos similares y parecidos para 10 casos respectivamente lo que constituyó un 45% (IC 95%: 26,9% y 65,3%), respectivamente.

Casi el 91,0% de los pacientes expresó, que el dentífrico había cumplido sus expectativas, fundamentalmente por la reducción de la hipersensibilidad a corto plazo, mientras que aproximadamente 91,0% de los casos afirmó que compraría el dentífrico (20 casos, IC 95%: 72,2% y 97,5%), respectivamente.

Los resultados de la evaluación subjetiva del producto, mostraron que luego de los 29 días de tratamiento hubo 6 casos, para un 27,3% (IC 95%: 13,1% y 48,1%) que manifestaron estar muy satisfechos, mientras que 13 pacientes estuvieron satisfechos, para un 59,1% (IC 95%: 38,7% y 76,7%) y tres se sintieron indiferentes, para un 13,6% (IC 95%: 4,75% y 33,3%). Hubo aproximadamente un 91,0% (20 casos, IC 95%: 72,2% y 97,5%) que se mostró satisfecho con la reducción de la hipersensibilidad a corto plazo, el 68,2% con la rapidez de acción (15 casos, IC 95%: 47,3% y 83,6%), el 72,7% con el mantenimiento de la eficacia, en tanto un 72,7% con la reducción de la hipersensibilidad a largo plazo (16 casos, IC 95%: 51,9% y 86,9%, respectivamente).

La tabla 1 muestra la calificación global y de las propiedades organolépticas del dentífrico. El aspecto del producto se calificó como muy bueno por el 13,6% de los pacientes (3 casos, IC 95%: 4,7% y 33,3%) y bueno por el 72,7% (16 casos, IC 95%: 51,9% y 86,9%). El olor se consideró muy agradable por 3 casos, para un 13,6% (IC 95%: 4,7% y 33,3%) y agradable por 12 casos, para un 54,5% (IC 95%: 34,7% y 73,1%). El 5% de los pacientes (1 caso, IC 95%: 0,8% y 21,8%) opinó que el color del producto era muy agradable y el 77,3% agradable (17 casos, IC 95%: 56,6% y 89,9%). Sobre la textura del producto, el 18,2% de los pacientes (4 casos, IC 95%: 7,31% y 38,5%) manifestó estar muy satisfecho y el 77 % satisfecho. El sabor del producto fue calificado como muy agradable por el 18 % de los pacientes y como agradable por el 64 %. Finalmente, el 22,7% (5 casos, IC 95%: 10,1% y 43,4%) y el 77,3% (17 casos, IC 95%: 56,6% y 89,9%) consideró que el dentífrico era muy fácil o fácil de aplicar, respectivamente. Todos los casos refirieron que el envase era perfecto.

Tabla 1. Pacientes satisfechos según calificación global y de las propiedades organolépticas del dentífrico

Calificación	No.	%	IC 95% ¹	
			Límite inferior	Límite superior
Global	19	86,4	66,7	95,2
De las propiedades organolépticas:				
Aspecto	19	86,4	66,7	95,2
Olor	15	68,2	47,3	83,6
Color	18	81,8	61,5	92,7
Textura	21	95,4	78,2	99,2
Sabor	18	81,8	61,5	92,7
Envase	22	100	-	-

Nota: 1: intervalo de confianza al 95% para el porcentaje

Discusión

En la investigación objeto de este análisis, se seleccionaron 22 pacientes con hipersensibilidad dental que acudieron de forma secuencial a una consulta odontológica y no fue objeto de indagación la diferencia entre los dientes sensibles y los no sensibles, no obstante, resultan interesantes los resultados comentados en relación con esto por Absi y otros (Absi, Addy y Adams, 1987) los que informaron que los dientes no sensibles no respondían a ningún estímulo y tenían muy pocos túbulos expuestos. Por el contrario, los dientes sensibles tenían un número mucho mayor de túbulos abiertos por unidad de área (8 veces más que en la superficie de la raíz que en los no sensibles).

Con relación a la edad, los resultados de nuestro estudio mostraron que la edad media de los pacientes fue de 42 años, lo que es aproximado a un estudio de investigación independiente realizado por The Chapman Group Limited, en el cual el 70% de los odontólogos encuestados indicaron que la mayoría de sus pacientes con hipersensibilidad a la dentina tenían entre 35 y 50 años de edad. (Canadian Advisory Board on Dentin Hypersensitivity, 2003)

Al evaluarse por los resultados de esta investigación en cuanto a los factores desencadenantes de la hiperestesia (Pons *et al.*, 2012), se constató que el 45,4% de los pacientes identificaron al frío como tal, sin embargo, una mirada desde otra óptica es la de un estudio realizado en Cuba en el que se señala que la retracción gingival fue la causa fundamental de esta afección y lo justifican argumentando el aumento en el número de pacientes con esta patología odontológica, sus efectos estéticos desfavorables y su condición como favorecedora de retención de placa, sarro o de hiperestesia dentinal (Sotres *et al.*, 2004), al igual que en otras publicaciones.(García *et al.*, 2015; Richman, 2011)

En un estudio sobre el envejecimiento y las enfermedades odontológicas se hace referencia también a la retracción gingival y la hipersensibilidad dental, explicando que por el avance de la edad las modificaciones alcanzan la encía, la membrana periodontal, el cemento y el hueso alveolar, con las consiguientes recesiones gingivales y la pérdida de inserción, muy frecuentes en los sujetos ancianos, así como el desgaste interproximal. Señala que funcionalmente, el desgaste dental puede causar la interrupción de la masticación, la deglución y la fonación. Para el periodonto, las principales consecuencias son una disminución de la capacidad de curación y el malestar funcional, como la hipersensibilidad (Touzi, 2014).

Sobre el empleo del dentífrico en nuestro estudio se obtuvo que casi el 91,0% de las personas que se encuestaron, expresaron que la pasta dental había cumplido sus expectativas, fundamentalmente por la reducción de la hipersensibilidad a corto plazo y también la mayoría señaló que mantendría su uso por los beneficios causados. En una publicación de actualidades farmacéuticas, se comenta que estos productos contienen en su fórmula lauril sulfato de sodio (LSS) que es irritante para las membranas mucosas y con frecuencia causa alergias bucales, pero también señala que los dentífricos deben tener un buen poder de limpieza, una abrasividad suave adaptada al esmalte y la dentina, una buena estabilidad durante el tiempo de su empleo, una consistencia adecuada para su uso en un cepillo y un uso agradable (aspecto y el gusto). Además, no deben irritar las encías ni colorear los dientes y pueden ser usados para la prevención de caries, reducción del sangrado e inflamaciones de las encías y para la disminución de la sensibilidad de los dientes.

Aunque hay poca evidencia para determinar la superioridad de un agente desensibilizador sobre otro, existe evidencia de que las pastas dentales desensibilizantes brindan un beneficio importante. (Achachao & Tay, 2019; Angulo, Núñez & Otárola, 2021)

La alta prevalencia de la hipersensibilidad dental, su sub-diagnóstico y la amplia disponibilidad de tratamientos no invasivos, eficaces y de bajo costo junto al establecimiento de medidas preventivas, teniendo siempre como centro de la discusión la sintomatología del paciente, ha permitido efectuar recomendaciones sobre el diagnóstico y manejo de la hipersensibilidad dental. Los mecanismos subyacentes a la hipersensibilidad de la dentina deben explorarse más a fondo; entonces se podrán desarrollar terapias más efectivas.

Conflicto de intereses

Ninguno.

Agradecimientos

A nuestra UNIANDES.

Referencias

- Absi, E. G., Addy, M., & Adams, D. (1987). Dentine hypersensitivity. A study of the patency of dentinal tubules in sensitive and non-sensitive cervical dentine. *Journal of clinical periodontology*, 14(5), 280–284. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1987.tb01533.x>
- Achachao Almerco, K., & Tay Chu Jon, L. Y. (2019). Terapias para disminuir la sensibilidad por blanqueamiento dental. *Revista Estomatológica Herediana*, 29(4), 297-305. <http://dx.doi.org/10.20453/reh.v29i4.3639>
- Angulo, F. I. M., Núñez, G. M. C., & Otárola, W. G. E. (2021). Hipersensibilidad dentinaria: un desafío en la práctica odontológica. *Revista Odontológica Basadrina*, 5(1), 51-58. <https://doi.org/10.33326/26644649.2021.5.1.1087>
- Boutaga, K., van Winkelhoff, A. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., & Savelkoul, P. H. (2005). Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS immunology and medical microbiology*, 45(2), 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.femsim.2005.03.011>
- Brännström, M. (1963). A hydrodynamic mechanism in the transmission of pain producing stimuli through the dentine. In: Anderson DJ, editor. *Sensory mechanisms in dentine*. Oxford: Pergamon Press, p. 73–9. Disponible en: <https://www.oxfordreference.com/view/10.1093/oi/authority.20110803095524708> (Acceso octubre 2020).

- Canadian Advisory Board on Dentin Hypersensitivity. (2003). Consensus-Based Recommendations for the Diagnosis and Management of Dentin Hypersensitivity. *J Can Dent Assoc.*, 69(4), 221–6. Disponible en: <http://www.cda-adc.ca/jcda/vol-69/issue-4/221.html> (Acceso octubre 2020).
- Dowell, P., Addy, M., & Dummer, P. (1985). Dentine hypersensitivity: aetiology, differential diagnosis and management. *British dental journal*, 158(3), 92–96. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4805542>
- Gajardo, M., Silva, N., Gómez, L., León, R., Parra, B., Contreras, A., & Gamonal, J. (2005). Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *Journal of periodontology*, 76(2), 289–294. <https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.2.289>
- García, A., Bujaldón, A.L. y Rodríguez, A. (2015). Recesión gingival. Diagnóstico y tratamiento. *Av Periodon Implantol.*, 27, 1, 19-24. Disponible en: <https://scielo.isciii.es/pdf/peri/v27n1/original2.pdf> (Acceso octubre 2020).
- Gómez-Gómez, L. M., Mejía-Roldán, J. D., Santos-Pinto, L., & Restrepo, M. (2020). Uso de Biodentine para restaurar un molar permanente severamente afectado por la Hipomineralización de Molares e Incisivos. *CES Odontología*, 33(2), 187-199. <https://doi.org/10.21615/cesodon.33.2.16>
- Guillarte, C. y Perrone, M. (2005). Bacterias Periodontopatógenas: Bacilos Anaerobios gran negativos como agentes Etiológicos de la Enfermedad Periodontal. *Acta Odontológica Venezolana*. 43(2), 198-204. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652005000200017&lng=es&tlng=es. (Acceso octubre 2020).
- Herrera, D., Figuero, E., Shapira, L., Jin, L., Sanz, M. (2018). Periodoncia clínica. Diagnóstico y tratamiento periodontal. Disponible en: http://www.sepa.es/web_update/wp-content/uploads/2018/09/Revista-Periodoncia-Cli%CC%81nica-N%C2%BA-11-Definitivo.pdf (Acceso octubre 2020).
- Holland, G. R., Narhi, M. N., Addy, M., Gangarosa, L., & Orchardson, R. (1997). Guidelines for the design and conduct of clinical trials on dentine hypersensitivity. *Journal of clinical periodontology*, 24(11), 808–813. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1997.tb01194.x>
- Hurtado, A., Bojorquez, Y., Montaña, M., Lopez, J. (2016). Bacterias asociadas a enfermedades periodontales. *Oral* 2016; 17(54): 1374-1378. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/oral/ora-2016/ora1654f.pdf> (Acceso octubre 2020).
- Jackson, R. (2000). Potential treatment modalities for dentine hypersensitivity: home use products. In: Addy M, Embery G, Edgar WM, Orchardson R, editors. *Tooth wear and sensitivity. Clinical advances in restorative dentistry*. London: Martin Dunitz., p. 326–38.
- Josefa, N. N., Josefa, N. N., Walkyria, G. R. & Wendy, R. M. (2020). Congreso Virtual de Estomatología 2020 Efectividad del Dentofar para la hipersensibilidad dentinaria. La Habana, Cuba. Facultad de Estomatología. Disponible en: <http://www.estomatologia2020.sld.cu/index.php/estomatologia/2020/paper/view/103> (Acceso octubre 2020).
- Kamma, J. J., Nakou, M., & Manti, F. A. (1995). Predominant microflora of severe, moderate and minimal periodontal lesions in young adults with rapidly progressive periodontitis. *Journal of periodontal research*, 30(1), 66–72. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1995.tb01254.x>
- Moore, W. E., Moore, L. H., Ranney, R. R., Smibert, R. M., Burmeister, J. A., & Schenkein, H. A. (1991). The microflora of periodontal sites showing active destructive progression. *Journal of clinical periodontology*, 18(10), 729–739. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1991.tb00064.x>
- Okada, M., Hayashi, F., & Nagasaka, N. (2001). PCR detection of 5 putative periodontal pathogens in dental plaque samples from children 2 to 12 years of age. *Journal of clinical periodontology*, 28(6), 576–582. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2001.028006576.x>
- Pons, Y., Sánchez, D., Sexto, N., Señaris, A. & Ferrer, D. (2012). Prevalence of Risk Factors for Dentin Hypersensitivity in Patients from 20 to 40 Years Old. *Medisur* 10(4), 286-289. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1727-897X2012000400003&script=sci_abstract&tlng=en (Acceso octubre 2020).
- Ramos, D. (2020). *Tannerella forsythia*: patógeno importante en la periodontitis, integrante del complejo rojo. *Odontol. Sanmarquina* 2020; 23(3): 253-259. <https://doi.org/10.15381/os.v23i3.18400>
- Ramos, D., Avila, M., Levano, V. (2012). *Treponema denticola*: patógeno en procesos periodontales y pulpares. *Odontol. Sanmarquina* 2012; 15(2): 38-41. <https://doi.org/10.15381/os.v15i2.2046>

- Ramos, D., Moromi, H., Martínez, E., Mendoza, A. (2010). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: Patógeno importante en la periodontitis. *Odontol. Sanmarquina* 2010; 13(2): 42-45. Disponible en: https://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/odontologia/2010_n2/pdf/a10v13n2.pdf Acceso octubre 2020).
- Richman C. (2011). Is gingival recession a consequence of an orthodontic tooth size and/or tooth position discrepancy? "A paradigm shift". *Compendium of continuing education in dentistry* (Jamesburg, N.J. 32(1), 62–69. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21462624/> (Acceso octubre 2020).
- Rylev, M., & Kilian, M. (2008). Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. *Journal of clinical periodontology*, 35(8 Suppl), 346–361. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01280.x>
- Smith R. G. (1997). Gingival recession. Reappraisal of an enigmatic condition and a new index for monitoring. *Journal of clinical periodontology*, 24(3), 201–205. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1997.tb00492.x>
- Sotres, J., García López, E., Blanco Ruiz, A. O., Rodríguez García, L. O., & Medina Rubio, A. C. (2004). Retracción gingival e hiperestesia dentinal: Causas y prevención. *Revista Cubana de Estomatología*, 41(2) Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072004000200008&lng=es&tlng=es. (Acceso octubre 2020).
- Touzi, S. Cavelier, C. Chantreau, B. & Tavernier, B. (2014). Vieillesse des structures dentaires et périodontaires. *EMC - Chirurgie orale et maxillo-faciale*, 9(4), 1-10. Disponible en: <https://www.em-consulte.com/article/935610/vieillesse-des-structures-dentaires-et-peridon> (Acceso octubre 2020).
- Tran, S. D., & Rudney, J. D. (1999). Improved multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, and *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of clinical microbiology*, 37(11), 3504–3508. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.11.3504-3508.1999>