



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

MASTER OFICIAL EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA III

MICROFLORA ASOCIADA A HALITOSIS

MILENA MERCEDES ZURBRIGGEN

TUTOR: PROFESOR DR. MARIANO SANZ ALONSO

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	3
I.1 Definición.....	3
I.2 Clasificación.....	4
I.3 Patogenesis.....	8
I.4 Diagnóstico.....	11
I.5 Tratamiento.....	13
II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	17
II.1. JUSTIFICACIÓN.....	17
II.2. HIPÓTESIS.....	17
II.3. OBJETIVOS.....	17
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
Tipo de estudio.....	18
Población de estudio.....	18
Visitas del estudio.....	19
Variables respuesta relacionadas con la halitosis: evaluación organoléptica.....	20
Variables respuesta relacionadas con la halitosis: evaluación con cromatografía de gases.....	21
Variables respuesta demográficas y clínicas.....	22
Procedimientos microbiológicos: toma de muestras.....	22
Procedimientos microbiológicos: cultivo.....	23
Análisis de los datos.....	24
IV. RESULTADOS.....	26
DATOS DEMOGRÁFICOS.....	26
VARIABLES CLÍNICAS.....	26
DATOS DE ORAL CHROMA.....	27
DATOS MICROBIOLÓGICOS.....	28
Prevalencia (frecuencia de detección de patógenos).....	28
Logaritmo total de ufc.....	29
Proporciones promedio de los patógenos.....	30
Frecuencia de detección, log. de Ufc y proporciones promedio de patógenos.....	30

V. DISCUSIÓN	33
VI. CONCLUSIONES.....	37
ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS	37
DATOS DE ORAL CHROMA	37
ASPECTOS CLÍNICOS	37
PERSPECTIVAS FUTURAS DEL ESTUDIO	37
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	38

ÍNDICE DE LAS TABLAS

Tabla 1. Halitosis de causa Extra-oral.....	7
Tabla 2. Microorganismos principalmente relacionados con halitosis (en orden alfabético)...	8
Tabla 3. Componentes odoríferos que pueden provocar mal aliento	10
Tabla 4a. Tratamiento necesario (TN) para el mal aliento	15
Tabla 4b. Clasificación de Halitosis con tratamientos necesarios (TN).....	15
Tabla 5. Escala de valores organolépticos. (Adaptado de Yaegaki y Coli 2000)	20
Tabla 6. Datos demográficos	26
Tabla 7. Datos clínicos	27
Tabla 8. CSV totales en Oral Chroma.....	28
Tabla 9. CSV evaluados por el Oral Chroma	28
Tabla 10. Muestras subgingivales	30
Tabla 11. Muestras subgingivales.....	31
Tabla 12. Muestras de dorso de lengua	31
Tabla 13. Muestras de dorso de lengua	31
Tabla 14. Muestra de saliva	32
Tabla 15. Muestra de saliva	32

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Definición

La Halitosis (del latín: *halitus*-aliento) se define actualmente como la presencia de un olor fétido o desagradable que emana de la cavidad oral. A menudo, es percibido por el paciente como su principal preocupación de salud bucodental, ya que afecta a su vida social y emocional y además, se ha convertido en un importante mercado para la industria farmacológica y cosmética. Aunque hay falta de estudios de prevalencia bien diseñados, la gran mayoría de los estudios parecen indicar que la halitosis afecta a casi el 30% de la población, mientras otros estiman que más del 50% de la población tiene halitosis. De hecho, el 50-60% de la población de EE.UU. utiliza productos para refrescar el aliento. Por lo tanto, la evidencia disponible sugiere que la halitosis es común y puede afectar a todas las edades, pero principalmente a mayores de 60 años, siendo el riesgo 3 veces mayor en personas mayores de 20 años en comparación con los de 20 años o menores¹.

No existen datos claros en referencia a la demanda por parte de pacientes a solicitar un tratamiento especializado para tratar la halitosis. Mientras que algunos estudios señalan a la halitosis como la tercera causa de visita al dentista², otros dicen que solamente pocos pacientes acuden a las clínicas dentales en busca de tratamiento para esta condición patológica³. Este hecho se ha denominado la "Paradoja de mal aliento"⁴ ya que personas que sufren de mal aliento suelen ser totalmente inconscientes del hecho; sin embargo otras se quejan de halitosis incluso si no se observa una base objetiva. Por lo general, se observa alguna diferencia en la percepción de la halitosis debido a hábitos raciales y de género (las mujeres se quejan de halitosis más que los hombres)^{5,6}.

Debido a estas razones, así como a la falta de estudios de casos-controles y las dificultades en la evaluación de criterios comunes de diagnóstico, durante muchos años esta condición ha sido considerada fundamentalmente como un problema cosmético. En realidad se ha producido una importante mejora en la comprensión de la halitosis en los últimos 40 años, con el desarrollo de dispositivos que fueron capaces de detectar y medir el gas exalado de la cavidad oral.

I.2 Clasificación

Yaegaki y Coil, en 2000, propusieron una clasificación de la halitosis, que incluye las halitosis verdaderas y la halitosis no percibida objetivamente⁷.

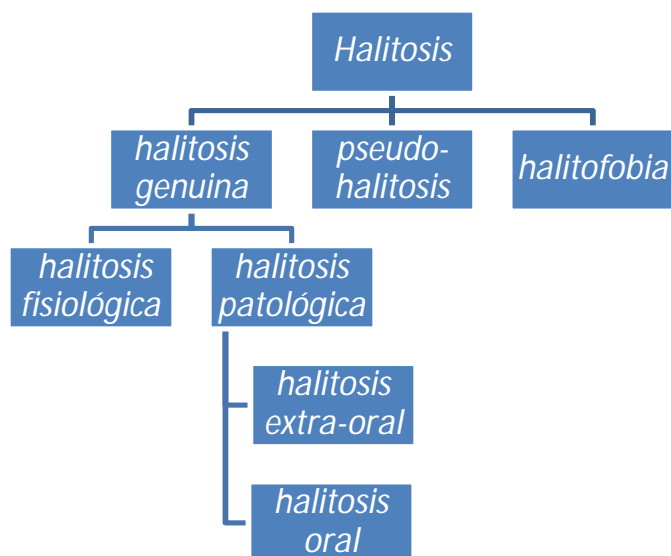


Figura 1. Clasificación de Halitosis propuesta por Yaegaki y Coil (2000).

Conforme a esta clasificación, la halitosis puede ser dividida en tres grupos: pseudo-halitosis, halitofobia y halitosis genuina. Tanto en la pseudo-halitosis como en la halitofobia, la halitosis no es clínicamente detectable. Sin embargo, en la halitosis genuina, ésta sí que está realmente presente y se puede detectar desde un punto de vista clínico, ya que la intensidad de su mal olor supera el nivel socialmente aceptable.

En pseudo-halitosis, el paciente se queja de halitosis en ausencia de una base objetiva. En este caso, la terapia consiste en instrucciones de higiene oral y en el asesoramiento profesional. La halitofobia, en cambio, ocurre cuando después del tratamiento de halitosis o pseudo-halitosis, el paciente sigue quejándose de su aliento. La halitofobia puede tener una profunda base psicológica y debe ser tratada junto con un psicólogo. Por otra parte, la halitofobia es uno de los factores que más influye en la baja fiabilidad de los datos de prevalencia de halitosis, siendo una fuente de inexactitud en los cuestionarios de mal aliento.

Por otro lado, la halitosis genuina comprende todas las situaciones en las que el mal aliento está realmente presente. Esta verdadera halitosis podría deberse a condiciones tanto fisiológicas como patológicas. Las formas fisiológicas se deben principalmente a:

- La ingesta de ciertas bebidas y alimentos con alto contenido en especias: ajo, cebolla, repollo, coliflor y rábano. Esto se previene evitando o reduciendo el consumo de dichos alimentos.
- Los hábitos tales como el tabaco y el alcohol suelen tener un efecto transitorio, a menudo causado por el azufre que contienen los compuestos sulfuros volátiles (CSV) y tienen un origen tanto intra-oral (restos de comida) como extra-oral (respiratorio). El humo del tabaco contiene CSV que son parcialmente responsables del mal aliento de los fumadores, pero los productos del tabaco también predisponen a la sequedad bucal y a la enfermedad periodontal. El consumo de alcohol puede ser un predictor del mal olor bucal. La mejor prevención consiste en evitar estos hábitos¹.
- La reducción del flujo salival durante el sueño. El estancamiento de la saliva, agravado por la respiración bucal, provoca lo que se conoce comúnmente como "aliento matinal". Este último desaparece con la bebida, ingesta de un buen desayuno o cepillado de dientes⁸. También podría contribuir la limpieza de la lengua con un raspador lingual, a pesar de que se encontró ineficaz en evitar el mal olor bucal matinal en pacientes periodontalmente sanos que no realizaron higiene oral¹.

Mientras que las formas fisiológicas son autolimitadas y no requieren de ningún tratamiento, la halitosis patológica es persistente y requiere de un enfoque médico. Esta última ocurre como resultado de causas intraorales, por lo general se origina en la parte posterior de la lengua y/o enfermedades orales o dentales incluyendo enfermedades periodontales, y puede ser lo suficientemente severa como para ser considerada inaceptable. Como factores predisponentes encontramos una mala higiene oral, las enfermedades gingivales y periodontales, trastornos de la mucosa oral, la reducción del flujo de saliva y el uso de aparatos dentales entre otros¹.

Pueden ser sub-clasificados en base a su origen en halitosis extra-oral y halitosis oral. La halitosis extra-oral en niños, se produce comunmente por la inserción de cuerpos extraños (juguetes u objetos pequeños) en la nariz y la posterior sepsis, mientras que en adultos, puede ser la manifestación de enfermedades que afectan el tracto respiratorio superior e inferior, sistema digestivo, aparato urinario y trastornos sistémicos (el hambre, el uso de drogas que causan sequedad bucal, etc)¹.

El aparato respiratorio es la primera fuente de halitosis extra-oral y las causas del mal aliento puede ser el estancamiento de la mucosa post-nasal, sepsis nasal, presencia de cuerpos extraños, infección de los senos paranasales, infección amigdalara, infección de las vías respiratorias y tumores infectados en el tracto respiratorio.

Otras causas sistémicas de la halitosis son la diabetes no controlada y enfermedades gastrointestinales como la cetosis, enfermedad por reflujo gastro esofágico, divertículos esofágicos, hernia de hiato, insuficiencia hepática e insuficiencia renal^{3,4}. También *Helicobacter pylori* se sugirió como una posible causa, ya que puede producir compuestos sulfurados volátiles¹.

Una causa muy rara es la tri-metil-aminuria (TMAU o síndrome de mal olor de pescado) en la que una mutación enzimática hereditaria altera la oxidación de TMA. Al no producirse la oxidación de TMA, ésta es excretada en orina, sudor, secreciones vaginales, saliva y aliento⁹.

Además, con algunos trastornos metabólicos se pueden exhalar agentes odoríferos que circulan en el torrente sanguíneo, a través del intercambio de gases alveolares en el aliento y causar halitosis (también conocida como halitosis transmitidas por la sangre). Dentro de los CSV, el sulfuro de dimetilo es el principal contribuyente en la halitosis extra-oral¹.

La lista de alteraciones posibles causantes de la halitosis extraoral están representadas en la tabla 1.

Tabla 1. Halitosis de causa extra-oral¹.

Aparato respiratorio (etiología microbiana)	Sinusitis Neoplasia del antro Antral Paladar hendido Cuerpos extraños en la nariz Malignidades nasales Tonsilolitos Amigdalitis Malignidades faríngeas Infecciones pulmonares Bronquitis Bronquiectasias Malignidades pulmonares
Sistema digestivo	Divertículo esofágico Enfermedades por reflujo Gastro-esofágico Malignidades
Trastornos Metabólicos (transmitidas por sangre)	Similar olor a cetona Diabetes incontrolada Alineto urémico en la Insuficiencia renal Hedor hepático en la enfermedad hepática Trimethylaminuria (síndrome del olor a pescado) Hipermetioninemia Cistinosis
Drogas (transmitidas por la sangre)	Anfetaminas Hidrato cloral Agentes citotóxicos Dimetil sulfóxido Disulfiran Nitratos y nitritos Fenotiazinas Abuso de solventes
Causas psicogénicas	

Sin embargo se ha demostrado que la forma más frecuente de halitosis es la oral (entre el 80-90% del total), en la que las causas del malolor residen en la cavidad oral¹⁰.

I.3 Patogénesis

La halitosis oral (comunmente conocida simplemente como halitosis) es causada por la actividad de bacterias orales.

Existe una compleja interacción entre varias especies bacterianas de la boca (principalmente flora anaeróbica Gram-), porque no sólo se asoció una infección bacteriana específica con halitosis (tabla 2).

Tabla 2. Microorganismos principalmente relacionados con halitosis (en orden alfabético)¹.

<i>Centipeda periodontii</i>
<i>Eikenella corrodens</i>
<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Fusobacterium nucleatum subsp. Nucleatum</i>
<i>Fusobacterium nucleatum subsp. Polymorphum</i>
<i>Fusobacterium nucleatum subsp. Vincentii</i>
<i>Fusobacterium periodonticum</i>
<i>Porphyromonas endodontalis</i>
<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>Prevotella (Bacteroides) melaninogenica</i>
<i>Prevotella intermedia</i>
<i>Bacteroides (Bacteroides) loescheii</i>
<i>Solobacterium moorei</i>
<i>Tannerella forsythia (Bacteroides forsythus)</i>
<i>Treponema denticola</i>

Se propusieron dos teorías sobre la etiología microbiana:

1. Una teoría específica: indica que sólo algunas únicas especies son etiológicas y capaces de causar mal aliento, sólo su presencia explicaría el mal olor. *Solobacterium moorei* se encontró en todos los sujetos con halitosis, no así en controles, lo que sugiere que algunos sujetos presentan algunas especies bacterianas diferentes en el dorso de la lengua.

2. Otra teoría inespecífica: sugiere que muchas especies (mayoritariamente anaerobias estrictas) tienen la capacidad de bio-transformar sustratos fundamentalmente proteicos en compuestos volátiles o CSV y por lo tanto, un gran número de microorganismos puede realizar este proceso, no habiendo una única especie causante¹.

Realmente, los determinantes más importantes del mal olor son el sulfuro de hidrógeno (H₂S) y el metil-mercaptano (CH₃SH) (que se clasifican como compuestos sulfurados volátiles o CSV) y son catabolitos de la degradación bacteriana de cistina y metionina. La producción de CSV está fuertemente influenciada por la dieta del paciente y por las condiciones orales.

La disminución del flujo salival, lo que podría deberse a condiciones fisiológicas (sueño) o patológicas (xerostomía), ocasiona el estancamiento de la saliva por lo que contribuye a proporcionar sustratos proteicos a las bacterias. Esto se debe a que la saliva se compone de una mezcla compleja de secreciones de las glándulas salivales, junto con múltiples especies bacterianas, células epiteliales descamadas, leucocitos y restos de comida. La saliva normal es rica en proteínas y urea, mientras que es muy pobre en hidratos de carbono y glucosa libre, ya que la mayoría de ellos están asociados con las glicoproteínas. La fermentación de hidratos de carbono inhibe el metabolismo de proteínas¹¹ porque cambia el pH oral a un ambiente ácido mientras que el metabolismo de las proteínas requiere un pH neutro o alcalino. Estos datos parecen sugerir que, si bien una dieta baja en hidratos de carbono protege de la aparición de caries, podría ser causa de mal olor bucal. Sin embargo, estos hallazgos no han sido confirmados en estudios clínicos. Por último, el agotamiento de oxígeno (baja pO₂) parece contribuir al aumento de la producción de CSV^{12,13}.

Los CSV no están sólo involucrados en la patogénesis de halitosis, también parecen interferir con el ciclo patógeno de otras patologías orales, ya que inducen un incremento en la permeabilidad de la mucosa oral¹⁴. Se ha sugerido que el metil-mercaptano puede participar en la patogénesis de la enfermedad periodontal. De hecho, varios estudios demostraron que altas concentraciones de CH₃SH tienen efecto inhibitorio sobre el crecimiento y proliferación de células epiteliales, pero no así en los fibroblastos¹⁵.

Otros componentes volátiles que no contienen azufre están también involucrados en la génesis de halitosis. Podrían ser los componentes aromáticos (indol y skatol), ácidos grasos de cadena corta (acético y propiónico), y algunas poliaminas (cadaverina¹⁶ y putrecina¹³).

Indol y skatol son productos de la degradación del triptófano, normalmente se encuentran en heces en bajas concentraciones y también en esencia de flores. Sin embargo, mientras que su componente oloroso es muy fuerte, tienen una tasa de volatilidad baja. Incluso si no se observan las tasas de producción de indol y skatol en el entorno oral, muchas bacterias anaeróbicas orales tienen el potencial de producir compuestos aromáticos in vitro.

La contribución de los ácidos grasos al mal olor bucal se considera marginal: en realidad sus componentes olorosos no son muy fuertes y su volatilidad en el ambiente acuoso es bajo, sobre todo a valores de pH alto.

Al igual que los ácidos grasos, la cadaverina y putrescina tienen un componente oloroso bajo, pero son más volátiles a un pH alcalino (≥ 9.0), mientras que en un pH neutro están principalmente presentes en forma no volátil.

Como los determinantes más importantes del mal olor bucal son productos del metabolismo anaeróbico, los gérmenes anaerobios han sido identificados como los responsables de la patogénesis de la halitosis oral. En la tabla 3 se expone una síntesis de los compuestos sulfuros volátiles producidos por las bacterias anaerobias.

Tabla 3. Componentes odoríferos que pueden provocar mal aliento¹.

Componentes sulfuros volátiles	metil mercaptano sulfuro de hidrógeno sulfuro de dimetilo
Diaminas	putrescina cadaverina
Ácidos grasos de cadena corta	ácido butírico ácido valérico ácido propiónico
Indoles	indol metil-indol (skatol)

El dorso de la lengua representa un hábitat ideal para las bacterias anaeróbicas. La morfología de la superficie se caracteriza por la presencia de múltiples fisuras y papilas mucosas. Este micro-ambiente con bajo nivel de oxígeno protege a los microorganismos de la acción de lavado de la saliva y aumenta el crecimiento de bacterias anaerobias, especialmente Gram-, tales como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia*^{17,18}.

Muchos estudios encontraron una correlación entre la cobertura lingual y la halitosis oral, tanto en pacientes periodontalmente sanos como enfermos. Por otra parte, la producción de los CVS de la cobertura de la lengua en pacientes periodontalmente enfermos fue más de 4 veces mayor que en los controles¹⁸.

Parece que la carga microbiana de la lengua (es decir, el espesor o densidad de los biofilms expresados en ufc (unidades formadoras de colonias) por centímetro cuadrado es la característica más importante del mal olor bucal crónico, que la presencia o ausencia de agentes microbianos específicos. Sin embargo, como ya se ha mencionado está claro que las bacterias anaerobias y los ambientes anaerobios son una característica importante de la biogénesis¹.

En la enfermedad periodontal está presente un aumento de bacterias anaerobias Gram-, junto a un gran número de células descamadas y sustratos proteicos provenientes del sangrado gingival y fluido gingival crevicular²⁰. Sin embargo, los estudios no encontraron una fuerte asociación entre la presencia de bacterias anaeróbicas en las bolsas periodontales y la halitosis oral²¹.

Las bacterias Gram+ parecen contribuir a la génesis de halitosis por la degradación de glicoproteínas de las cadenas de azúcares, proporcionando así las proteínas de las bacterias Gram-²².

I.4 Diagnóstico

Aunque se han realizado muchos esfuerzos para identificar un método de diagnóstico instrumental para la halitosis oral, el método organoléptico no ha sido reemplazado todavía y se considera como el método de referencia ("*gold standard*"). Este método consiste en detectar el olor de la boca y de la nariz y la comparación de ambos. La intensidad del aire exhalado se representa en una escala numérica. Este método requiere una buena calibración y entrenamiento de los examinadores (por lo menos dos).

El diagnóstico instrumental se puede llevar a cabo con detectores de gases como detectores de sulfuros (p.e Halimeter, Interscan Corp., Chatsworth, CA, EE.UU.) o cromatografía de gases (p.e. OralChroma, Abimedical, Osaka, Japón).

El dispositivo más comúnmente usado para evaluar la halitosis ha sido Halimeter® (Interscan Corp., Chatsworth, CA, USA) que mide los CVS en el aire exhalado²³.

El Halimeter no mide otros olores importantes, tales como los ácidos grasos volátiles y la cadaverina, que están involucrados en la halitosis oral: esto podría dar lugar a falsos negativos cuando el mal olor puede ser detectado por el examinador, pero los niveles de compuestos volátiles de azufre están en un rango bajo según el Halimeter^{24,25}. Además, el Halimeter es más sensible al sulfuro de hidrógeno (H₂S) que al metil mercaptano (CH₃SH).

La cromatografía de gases fue desarrollada por primera vez por Tonzetich²⁶ a finales de los años 1970. A pesar de su alta precisión no era adecuada para su uso en el sillón dental y tenía que ser considerada como una técnica de investigación debido a su elevado coste, tamaño y la necesidad de un operador hábil. Los nuevos modelos de cromatografía de gases, tales como OralChroma, son más simples, más pequeños y más sensibles que el Halimeter para cada uno de los tres CVS (H₂S: sulfuro de hidrógeno- CH₃SH: metil mercaptano- (CH₃)₂S: sulfuro de dimetilo-). Sin embargo, incluso el OralChroma no detecta otros olores, solo los CVS.

El test BANA y la microscopía de campo oscuro se podrían utilizar para evaluar la calidad de la microflora oral. El test BANA®(Oratec, Manassas, VA, EE.UU) evalúa las bacterias (*P. gingivalis*, *T. forsythiae* *Treponema denticola*) que producen la enzima que degrada benzoil-DL-arginina-anaphthylamide (BANA), un sustrato de tripsina sintética que forma un compuesto con color. Esta prueba parece ser altamente sensible a los ácidos grasos producidos por bacterias²¹.

Para excluir la rara situación de trimetilaminuria, se puede realizar análisis de la excreción urinaria de trimetilamina y trimetilamina-N-óxido generalmente por cromatografía de gases o por espectrometría de resonancia magnética nuclear directa de protones.

Existen algunos métodos, aún no demostrados, como la actividad de cuantificación de la beta-galactosidasa (que deglicosila mucinas orales para su posterior proteólisis y putrefacción), sensores químicos, la prueba de incubación de la saliva, el control de amoníaco, el método de la ninhidrina y la reacción en cadena de la polimerasa entre otros¹.

I.5 Tratamiento

Yaegaki y Coil (2000), clasificaron las necesidades de tratamiento para la halitosis en la práctica odontológica en cinco categorías, enumeradas desde **TN1 hasta TN5**, para proporcionar una orientación a los clínicos en el tratamiento de este problema.

Según esta clasificación, el tratamiento de la halitosis fisiológica (**TN1**), la halitosis patológica (**TN1 y TN2**) y la pseudohalitosis (**TN1 y TN4**) es responsabilidad de los odontólogos, mientras que la halitosis extraoral (**TN3**) será tratada por un médico especialista y la halitofobia (**TN5**) estará a cargo de un psicólogo o psiquiatra. Esto queda reflejado en las tablas 4a y 4b.

Como ya hemos mencionado anteriormente, el origen de la halitosis fisiológica se ocasiona en el dorso posterior de la lengua, desprendiéndose el mal olor de la cobertura lingual. Por lo tanto, en el **TN1**, la limpieza de la lengua es más importante que los enjuagues bucales y se debe llevar a cabo por la noche, ya que el hacerlo por la mañana podría provocar náuseas¹. Es preferible utilizar un raspador o cepillo de cerdas duras, sin añadirle dentífrico y utilizando agua fría. Si bien existe poca evidencia, parece que los limpiadores linguales serían más eficaces que los cepillos duros, produciendo una mayor reducción de los CVS. Aunque se ha visto que los beneficios se obtienen sólo a corto plazo. También se recomienda instruir al paciente para evitar posibles daños en la superficie de la lengua, ya que estudios en animales sugieren que la estimulación mecánica podría aumentar la carcinogénesis de la misma.

TN 1 incluye también una correcta técnica de higiene oral, que comprende el cepillado de dientes con cepillo dental y la limpieza interproximal con hilo dental o cepillos interproximales, así como la utilización de productos químicos. Respecto a estos últimos, se evaluaron numerosos productos en diferentes estudios, señalándose a continuación los resultados más relevantes:

1. Pastas dentífricas con:

- Triclosán y copolímero (Colgate Total, Palmolive España S.A) proporcionan un control efectivo del aliento hasta 12 horas después del cepillado¹.
- Hexametáfosfato sódico estabilizado con SnF₂ produce un significativo e inmediato efecto contra el mal olor.

2. Enjuagues bucales que contienen:

- Digluconato de clorexidina, cloruro de cetylpiridinio o triclosán: pueden ser beneficiosos, habiéndose descrito buenos resultados a corto plazo¹.
- Metales iónicos y agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno, dióxido de cloro y cloruro de iminio, que pueden neutralizar CVS¹.
- Una combinación de bajas concentraciones de sales de Zinc y clorhexidina: eliminan los compuestos sulfuros volátiles que causan halitosis¹.
- Actualmente existen otros compuestos que contienen dióxido de cloro y ionana alfa pero no demuestran eficacia suficiente¹.

Existen otros métodos cosméticos no farmacológicos como chicles, pastillas de menta, aerosoles con sabor, perejil, clavo de olor o semillas de hinojo y algunos enjuagues bucales.

Además es importante evitar el tabaco y el consumo de drogas o alimentos que puedan ser responsables de la halitosis.

(TN2): la halitosis patológica intraoral causada principalmente por enfermedades gingivales y periodontales, y el control se basa en el tratamiento de las mismas. Además, puede ser necesaria la corrección de las restauraciones defectuosas que podrían contribuir a la retención de placa y a la mala salud oral, que es otro de los factores predisponentes, al igual que el uso de aparatos dentales.

En la halitosis patológica extraoral, los pacientes presentan mal olor bucal pero sin evidenciar causas de halitosis oral, por lo que deben ser referidos a médicos especialistas **(TN-3)**.

Los pacientes con pseudo-halitosis deben ser asesorados con el apoyo de la literatura, la educación y la explicación de los resultados del examen **(TN-4)**, ya que la intensidad de su mal olor no supera el nivel socialmente aceptable. Este paso en el manejo del paciente es lo más importante en la diferenciación con la halitofobia.

En la pseudohalitosis, los pacientes suelen responder favorablemente a **TN-4**, aceptando los consejos, a diferencia de los halitofóbicos, quienes incluso pueden necesitar un tratamiento psicológico **(TN-5)**. Además, los pacientes con halitosis verdadera que se someten a una reducción exitosa de la halitosis por **TN-2 ó 3** y aún creen que tienen la afección, también deben ser referidos a un psicólogo **(TN-5)**.

Los pacientes halitofóbicos suelen negarse a acudir a un psicólogo, porque no pueden reconocer su condición psicósomática. Nunca dudan de que tienen un mal olor bucal ofensivo. Por lo tanto, están disconformes con el dentista que niega su condición y en muchos casos comienzan a visitar a numerosos profesionales en busca de ayuda.

El manejo de los pacientes con halitosis puede resultar de gran utilidad para los profesionales en general, especialmente en lo que respecta a los pacientes con pseudo-halitosis que pueden acudir a psicólogos. En general, los tratamientos de halitosis tienen éxito en los casos de halitosis fisiológica o patológica, pero desafortunadamente no ocurre lo mismo en los casos de halitofobia. La evaluación de la condición psicológica de estos pacientes es muy importante y un cuestionario puede ser útil para identificar a pacientes con un trastorno psicológico.

Tabla 4a. Tratamiento necesario (TN) para el mal aliento.

Categoría	Descripción
TN1	Explicación de halitosis e instrucciones de Higiene oral (HO). Soporte y refuerzo de las técnicas de cuidado por parte de los pacientes para mejorar su HO.
TN2	Profilaxis profesional, limpieza profesional y tratamiento de las enfermedades orales, como puedan ser las enfermedades periodontales.
TN3	Referido a un médico o médico especialista.
TN4	Explicación de los datos, instrucciones profesionales, educación y seguridad.
TN5	La derivación a un psicólogo, psiquiatra.

TN1 es aplicable a todos los casos que requieran TN2 a través de TN5.

Tabla 4b. Clasificación de halitosis con tratamientos necesarios (TN).

CLASIFICACIÓN	TN	DESCRIPCIÓN
1) HALITOSIS GENUINA		Se percibe un mal olor objetivo, con una intensidad que supera el nivel socialmente aceptable.
FISIOLÓGICA	TN1	<ol style="list-style-type: none"> 1. El mal olor se presenta debido al proceso de putrefacción dentro de la cavidad oral. No se hallan condiciones específicas de la enfermedad ni patógenos que puedan causar halitosis. 2. Se origina principalmente en la región del dorso posterior de la lengua. 3. Se debe excluir la halitosis temporal debido a factores de la dieta como por ejemplo el ajo u otros alimentos.
PATOLÓGICA EXTRAORAL	TN1-TN3	<p>Halitosis:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Originada en regiones nasales, paranasales y/o laringeas. 2. Generada en tracto pulmonar y/o tracto digestivo superior. 3. Proveniente de trastornos en cualquier parte del cuerpo donde el olor es transmitido por la sangre y se emite a través de los pulmones (diabetes mellitus, cirrosis hepática, uremia etc).
PATOLÓGICA ORAL	TN1-TN2	<p>Halitosis:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Causada por enfermedades, condiciones patológicas o una función de los tejidos orales alterada. 2. Derivada de la cobertura lingual, modificada por condiciones patológicas (periodontitis, xerostomía etc).
3) PSEUDO-HALITOSIS	TN1-TN4	<ol style="list-style-type: none"> 1. El mal olor obvio no es percibido por otras personas, a pesar de que el paciente se queja obstinadamente de su existencia. 2. Se mejora su condición por consejo profesional y medidas de HO (higiene oral).
2) HALITOFOBIA	TN1-TN5	<ol style="list-style-type: none"> 1. Después del tratamiento de halitosis genuina o pseudo-halitosis, el paciente persiste en creer que tiene mal aliento. 2. No hay evidencia suficiente para sugerir que la halitosis es persistente.

TN: tratamiento necesario, tto: tratamiento.

II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II.1. JUSTIFICACIÓN

La realización de este estudio tiene como punto de partida, el concepto de la halitosis como una entidad causada por la actividad de bacterias orales.

Como los determinantes más importantes del mal olor bucal son productos del metabolismo anaeróbico, los microorganismos anaerobios han sido identificados como los responsables de la patogénesis de la halitosis oral.

La técnica de cultivo ha sido y sigue siendo el método de referencia del diagnóstico microbiológico, siendo el "gold standard". Esta técnica junto con diversos tests bioquímicos y tests de enzimas específicas nos permitirán identificar las distintas especies involucradas.

Por estas razones, es de nuestro interés investigar la microflora oral en pacientes con halitosis.

II.2. HIPÓTESIS

La halitosis oral se produce por una microflora oral inespecífica, compuesta principalmente por microorganismos anaerobios Gram-, pero también podrían detectarse especies específicas que permitieran tratamientos más dirigidos y efectivos.

La técnica de cultivo nos proporcionará información acerca de los diferentes microorganismos que podrían estar involucrados en la patogénesis de la halitosis oral.

II.3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio es evaluar la presencia de especies bacterianas que podrían estar involucradas en la patogénesis de la halitosis oral mediante la técnica de cultivo. Para ello, se comparará la microbiota oral de pacientes con halitosis con la de aquellos sin halitosis.

Como objetivo secundario, se tratará de relacionar los resultados obtenidos en nuestro estudio con los referidos por otras publicaciones en la literatura científica.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de estudio

Se trata de un estudio transversal, de casos (pacientes con halitosis, evidenciado en la evaluación organoléptica o en los niveles de gases medidos con OralChroma) y controles (pacientes sin halitosis).

Población de estudio

Se reclutaron para el estudio pacientes entre 18 y 65 años, que asistieron a las clínicas de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid, España.

Antes de la visita, los pacientes rellenaron un cuestionario, que incluía la historia médica general y dental, así como los hábitos y la auto-percepción de los diferentes problemas de la boca (halitosis percibida por él mismo o por otras personas y calificación de 1= débil a 5=problemático, presencia de boca seca, respiración bucal, tabaco, frecuencia diaria de la ingesta de líquidos, consumo de café y alcohol, percepción de mal sabor de boca, ingesta de comidas con gran cantidad de ajo, cebolla o especias, presencia de mucosidades en la boca, tratamiento previo de su mal aliento, tratamientos previos de encías, frecuencia en la realización de limpiezas de boca, técnica de higiene oral y utilización de cepillos interdentales, seda dental, colutorios y limpiador lingual).

Los pacientes fueron evaluados teniendo en cuenta los siguientes criterios de inclusión y exclusión.

Criterios de inclusión:

- quejas sobre la halitosis extraída de un cuestionario o
- halitosis objetivamente comprobada por el clínico.

Criterios de exclusión:

- una mala higiene oral $IP \geq 50\%$ (índice de placa de boca completa);
- presencia de prótesis removible y/o lesiones de caries avanzadas y/o otros factores retentivos de placa;
- periodontitis moderada a severa no tratada $NIC \geq 3\text{mm}$ (nivel de inserción clínico) y $PB > 4\text{ mm}$ (profundidad de sondaje) en al menos 3 dientes en cada cuadrante);
- tratamiento periodontal previo (profilaxis, raspado y alisado radicular) en el último mes.
- patología de la mucosa oral o encía queratinizada (gingivitis necrosante, liquen plano);
- enfermedades sistémicas que puedan provocar halitosis (p.e., enfermedades del tracto respiratorio, diabetes mellitus, trastornos renales, del hígado o del estómago);
- síndrome de Sjögren;
- VIH positivos;
- toma de antibióticos en las 4 semanas previas;
- edéntulos;
- fumadores (definido como fumador de más de 10 cigarrillos diarios);
- embarazadas.

Después de la visita de selección, los pacientes que cumplieron los criterios descritos fueron informados sobre el objetivo del estudio, y se obtuvo un consentimiento informado. Posteriormente los pacientes fueron citados para la visita del estudio y se explicaron las instrucciones para la misma.

Visitas del estudio

Como se ha explicado, se realizó una visita de selección, y en ella se programó la visita de estudio, para la que se dieron las siguientes instrucciones: Durante las 48 horas previas a la evaluación, se les pidió a los sujetos evitar:

- comer alimentos que contuvieran ajo, cebolla y especias fuertes,
- consumir alcohol,

- utilizar enjuagues bucales,

Durante la mañana de evaluación se les pidió a los pacientes:

- abstenerse de tomar café,
- no utilizar productos que contengan menta y/o muy perfumados,
- tomar un ligero desayuno, al menos 2 horas antes de la evaluación,
- cepillarse los dientes sin pasta dentífrica (con agua), para eliminar los depósitos de placa y restos de comida.

En esta visita se registraron todas las variables clínicas y organolépticas, además de realizarse la toma de muestras microbiológicas.

Variables respuesta relacionadas con la halitosis: evaluación organoléptica

La halitosis fue evaluada por mediciones organolépticas⁷. La metodología usual en la práctica clínica diaria para medir el grado de halitosis consistió en que, el operador olfateó el aire exhalado por el paciente otorgándole una puntuación organoléptica. Se utilizó una escala de 0-5 puntos²³. La diferenciación entre halitosis intrabucal y extrabucal puede realizarse fácilmente comparando el aliento con el aire exhalado por la nariz.

Para la evaluación organoléptica, se le indicó a los participantes que cerraran la boca durante 1 minuto, para después solicitarles que exhalaran lentamente aire por su boca (a una distancia de aproximadamente 10 cm de la nariz del examinador).

Tabla 5. Escala de valores organolépticos (Adaptado de Yaegaki y Coil 2000).

Puntuación	Categoría	Descripción
0	Ausencia de halitosis	El olor no puede determinarse.
1	Halitosis cuestionable	El olor se puede determinar aunque el examinador no puede reconocerlo como halitosis.
2	Halitosis leve	Se considera que el olor trascendió el umbral del reconocimiento de la halitosis.
3	Halitosis moderada	La halitosis se detecta de forma definida.
4	Halitosis fuerte	Si bien se detecta una halitosis intensa, ésta puede ser tolerada por el examinador.
5	Halitosis grave	Se detecta una halitosis grave que no puede ser tolerada por el examinador (el examinador aleja la nariz de forma instintiva).

Variables respuesta relacionadas con la halitosis: evaluación con cromatografía de gases

Se realizó un análisis usando cromatografía de gases mediante OralChroma (Abimedical, Osaka, Japan). El OralChroma™ es un dispositivo diseñado para medir en forma digital los niveles moleculares de CVS en la respiración oral.

Se basa en principios de cromatografía. La cromatografía es una técnica desarrollada por el bioquímico ruso M. Cvet en 1906 con la finalidad de separar mezclas de líquidos. La muestra se suspendía en una fase líquida o gaseosa (móvil) y pasaba por una fase estacionaria (sólida o líquida) a un flujo constante. Debido a la diferente afinidad con la fase estacionaria, los componentes de la mezcla cruzaban la columna a diferentes velocidades, y esto permitía hacer una distinción entre todos los componentes. La mayor o menor resolución de la cromatografía dependía de tres factores: tiempo de resolución, selectividad y eficacia.

En cromatografía de gases la fase móvil es un gas, por lo general inerte, como helio argón o nitrógeno. El OralChroma no utiliza un portador de gases.

Puede ser utilizado para detectar las causas del mal olor bucal y/o para controlar el estado de salud oral.

El aparato detecta los CVS, que son los principales componentes en el mal olor oral. Estos gases son: sulfuro de hidrógeno (H_2S), metil-mercaptano (CH_3SH) y sulfuro de dimetilo ($(CH_3)_2S$) midiendo la concentración de los mismos en unidades de ppb y ng/10 ml. Sólo requiere 0.5 cl de la muestra y 8 minutos para el análisis.

Dicho aparato utiliza una columna que está específicamente diseñada para la detección de los CVS en la halitosis. El dispositivo permite el almacenamiento de 99 muestras ordenadas por números de manera secuencial. Los datos almacenados en el OralChroma, pueden ser transferidos a un ordenador, suministrado con un software adecuado, a través de un cable de serie o un cable USB.

Para el examen, se insertó la mitad de la jeringa plástica de 1 ml en la cavidad bucal y se le solicitó al paciente que sostuviera la jeringa entre los labios y no tocara la punta de la misma con la lengua ni el paladar. Se esperó un minuto y después se tiró del vástago, se empujó nuevamente y se tiró de él por segunda vez antes de sacar la jeringa de la cavidad bucal. Para eliminar posibles restos de saliva que pudieran afectar el correcto funcionamiento del dispositivo, se secó la punta de la jeringa con una servilleta de papel, se inyectó el aire hasta 0.5 ml y se colocó la aguja. A continuación, la muestra se inyectó en el puerto de inyección del cromatógrafo de gas y en 8 min se procesó.

Variables respuesta demográficas y clínicas

Para ambos grupos, se recogieron las siguientes variables clínicas: edad, sexo, PB, NIC, IP e IS de la boca completa.

Se midieron las PB en milímetros con una sonda periodontal UNC-15 (Hu-friedy) en 6 localizaciones por cada diente, como la distancia del margen gingival al fondo del surco, mientras que los NIC representaron la distancia desde la unión cemento-adamantino al fondo del surco.

La presencia de placa y sangrado, dentro de los 10 segundos desde el sondaje, fue evaluada en 6 localizaciones, diente por diente, y se dio un registro por cada sitio (0=negativo, 1=positivo). Después, los IP e IS fueron calculados dividiendo el total de registros por el número total de sitios evaluados.

Además, se realizó una evaluación del estado oral, poniendo un énfasis particular en factores retentivos de placa, tales como lesiones avanzadas de caries, prótesis removible y en la salud de la mucosa. Los niveles de cobertura lingual fueron evaluados utilizando el Índice de Cobertura lingual de Winkel²⁹.

Procedimientos microbiológicos: toma de muestras

Se tomaron tres muestras microbiológicas de tres nichos orales diferentes.

Se tomó una muestra del dorso de las papilas linguales, por delante a las papilas circunvaladas, mediante un raspador lingual con un bucle estándar³⁰.

Luego fueron transferidas para su análisis en un vial conteniendo 1.5 ml de medio de transporte pre-reducido (RTF)³¹. Otra muestra de saliva no-estimulada fue obtenida tras pedirle al paciente que escupa en un tubo graduado durante 1 min.

Una tercera muestra fue recogida con 8 puntas de papel (medium, Maillefer, Ballaigues, Switzerland), 2 por cuadrante. Por cada cuadrante, se seleccionó el sitio más accesible con la mayor profundidad de sondaje y sangrado; en ausencia de inflamación, se seleccionaron las superficies mesiales de los primeros molares. Antes de tomar la muestra, se retiró toda la palca y depósitos supragingivales, los sitios seleccionados fueron aislados de la saliva aplicando rollos de algodón, posteriormente secados con aire a presión, para evitar la contaminación. Las puntas de papel se mantuvieron en el sitio durante 10 seg y después se transfirieron para su análisis en un vial con 1.5 ml de RTF.

Todas las muestras fueron transferidas al laboratorio de microbiología dentro de las 2 horas posteriores a su recogida.

Procedimientos microbiológicos: cultivo

En el laboratorio, las muestras se homogeneizaron utilizando vórtex durante 45 segundos, luego se diluyeron 10 veces en una solución amortiguadora de buffer de fosfato sódico (PBS) y a continuación las alíquotas de 100 µl se plaquearon en dos medios diferentes: **medio de agar sangre** (No. 2 of Oxoid; Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra), con 5% de sangre de caballo, y hemina (5 mg/l) y menadiona (1 mg/l) y **medio Dentaïd-1**, selectivo para *A. actinomycetemcomitans*³².

Las placas de agar sangre fueron estudiadas después de 7 y 14 días de incubación anaeróbica (80% N₂, 10% H₂; 10% CO₂ at 37°C) para la identificación de *P. gingivalis*, *P. intermedia/nigrescens*, *T. forsythia*, *Campylobacter rectus*, *F. nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Eikenella corrodens* y otras colonias predominantes en cultivo, basadas en la morfología de la colonia. Se realizó el recuento de colonias de cada especie bacteriana, como también del número total de colonias en placas representativas (entre 30 y 300 colonias). Las placas de Dentaïd-1, utilizadas para el aislamiento y crecimiento selectivo de *A. actinomycetemcomitans* fueron incubadas durante 3-5 días a 37°C en un ambiente rico en CO₂ (5% de CO₂)³².

Después de este período, las placas fueron cuidadosamente examinadas para determinar la presencia de *A. actinomycetemcomitans*. La selección de colonias de *A. actinomycetemcomitans*, se basó en tres rasgos característicos: la morfología de las colonias, la respuesta positiva al test de catalasa y los resultados de una serie de enzimas específicas (*RapID NH system*, Innovative Diagnostics Systems, Inc., Decatur, GA – EE.UU).

Análisis de los datos

Todos los registros fueron realizados por un solo examinador, excepto los valores de las mediciones organolépticas, que fueron comprobados por un segundo examinador, previa calibración. Las discrepancias entre ambos se resolvieron a través de discusión y acuerdo inmediato. Por razones técnicas se perdieron dos muestras, una de la saliva y otra de la lengua de diferentes pacientes.

La distribución de casos y controles se hizo en relación a dos parámetros, definiendo halitosis (casos) como: (1) los pacientes con valores organolépticos de 2 a 5; (2) los pacientes con niveles de CVS ≥ 200 ppb. El resto de pacientes fueron considerados como controles³³.

Primero se hizo una descripción general de toda la población, mediante parámetros de estadística descriptiva; posteriormente, se compararon, mediante t test no pareado, las variables respuesta más relevantes entre casos y controles, primero según el criterio organoléptico al cual por razones prácticas lo denominamos grupo 1 y después según el criterio de OralChroma al cual denominamos grupo 2.

Las variables evaluadas y comparadas fueron las siguientes:

- Demográficas: edad, sexo, consumo de tabaco, números de cigarrillos al día, estrés, alergias, medicaciones y enfermedades sistémicas tales como hipotiroidismo, hipertensión arterial, prolapso de la válvula mitral, artrosis.
- Clínicas: promedio de PB, NIC, IP, IS, recesión, número de dientes, índice de winkel (posterior y total).
- Microbiológicas: logaritmo de los recuentos totales y de los recuentos de cada patógeno periodontal, proporciones promedio de cada especie bacteriana estudiada y prevalencia (frecuencia de detección).

- Instrumentales: mediante oral chroma la medición en ppb y ng/ml de CSV totales, H₂S, CH₃SH y (CH₃)₂S.

Como hemos descrito previamente dividiremos a la población en dos grupos, primero según el criterio organoléptico, al cual por razones prácticas lo denominamos grupo 1, y después según el criterio de OralChroma, al cual denominamos grupo 2.

Para el análisis de los datos clínicos y microbiológicos se utilizará la prueba de t-test no pareado para comparar las variables cuantitativas normales. Las diferencias intergrupos se aceptarán como estadísticamente significativas cuando la $p < 0.05$. Todos los resultados serán evaluados a un intervalo de confianza del 95%. Se utilizará el SPSS software estadístico para el análisis.

IV. RESULTADOS

DATOS DEMOGRÁFICOS

Los datos demográficos se muestran en la tabla 6. En el grupo 1 se observaron diferencias estadísticamente significativas en la edad ($p=0,031$), en pacientes con halitosis (Hal) en personas entre $47,4\pm 14,8$ años en relación a pacientes sin halitosis (NHal) con una edad entre $37,6\pm 12,4$ años. En el grupo 2 no hubo diferencias estadísticamente significativas en relación a la edad ($p=0,06$).

Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos en relación al tabaco, sexo, enfermedades sistémicas, medicaciones, estrés y alergias.

Tabla 6. Datos demográficos.

Grupo		Edad	Sexo	Tabaco	Nº cig./día	*Enf. sistémicas	Medic.	Estrés	Alergias
1	Hal. (n=31)	$47,4\pm 14,8$	15h/ 16m	7s/24n (22,6%)	$0,98\pm 2,30$ ($4,36\pm 3,04$)	4s/27n (12,9%)	7s/24n (22,6%)	10s/21n (32,3%)	7s/24n (22,6%)
	NHal. (n=10)	$37,6\pm 12,4$	3h/ 7m	5s/5n (50%)	$1,90\pm 3,11$ ($3,80\pm 3,56$)	2s/8n (20,0%)	2s/8n (20,0%)	3s/7n (30,0%)	1s/9n (10,0%)
2	Hal. (n=12)	$50,83\pm 10,98$	8h/ 4m	0s/12n (0%)	0 ± 0 (0 ± 0)	2s/10n (16,7%)	4s/8n (33,3%)	4s/8n (33,3%)	4s/8n (33,3%)
	NHal. (n=29)	$42,39\pm 15,52$	10h/ 19m	12s/17n (41,4%)	$1,71\pm 2,85$ ($4,13\pm 3,12$)	4s/25n (13,8%)	5s/24n (17,2%)	9s/20n (31,0%)	4s/25n (13,8%)

*hipotiroidismo, hipertensión arterial, prolapso de la válvula mitral y artrosis. h: hombre; m: mujer; Hal: halitosis; NHal: no halitosis; cig: cigarros; Medic: medicación.

VARIABLES CLÍNICAS

En la tabla 7 se representan los datos de las variables clínicas. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos en los pacientes con Hal en relación a controles tanto en el %IP (grupo 1: $p>0,0001$ y grupo 2: $p>0,024$) como en el %IS (grupo 1: $p=0,02$ y grupo 2: $p=0,045$).

También la suma total del índice de Winkel mostró ser estadísticamente significativa en Hal ($p=0,023$), a diferencia de la suma del sector posterior del mismo donde hubo sólo una ligera tendencia a la significancia ($p=0,054$) en el grupo 1. En el grupo 2 no se pudieron detectar diferencias estadísticamente significativas.

En ninguno de los grupos se encontraron diferencias estadísticamente significativas en pacientes con Hal respecto a controles en REC ($p=0,932$; $p=0,668$), NIC ($p=0,244$; $p=0,186$), PB ($p=0,081$; $p=0,067$).

Se observó una diferencia estadísticamente significativa en el grupo 2 de pacientes NHal en la variable número total de dientes presentes ($p=0,029$) a diferencia del grupo 1 donde no se pudo detectar.

Tabla 7. Datos clínicos.

Grupo		Índice de Winkel		N° de dientes	% IP	% IS	PB	REC	NIC
		total	posterior						
1	Hal. (n=31)	6,90±2,18	4,97±1,43	25,7±2,4	30±10	25±12	1,8±0,2	0,5±0,4	2,3±0,5
	NHal. (n=10)	5,30±2,26	4,20±1,32	27,5±0,7	19±7	14±10	1,7±0,2	0,4±0,6	2,1±0,7
t. test		0,023	0,054	0,839	>0,0001	0,002	0,081	0,932	0,244
2	Hal. (n=12)	7,17±2,59	5,17±1,27	24,7±2,8	34±13	29±12	1,9±0,3	0,5±0,3	2,4±0,4
	NHal. (n=29)	6,24±2,13	4,62±1,47	26,8±1,6	24±9	20±12	1,7±0,2	0,2±0,1	2,2±0,6
t. test		0,289	0,244	0,029	0,024	0,045	0,067	0,668	0,186
Total (n=41)		6,51±2,28	4,78±1,42	26,2±2,2	27±11	22±12	1,8±0,2	0,5±0,4	2,2±0,6

%IP: porcentaje de índice de placa; %IS: porcentaje de índice de sangrado; Hal: halitosis; NHal: no halitosis; PB: profundidad de sondaje; REC: recesión; NIC: nivel de inserción clínico.

DATOS DE ORAL CHROMA

En ambos grupos se observaron diferencias estadísticas significativas en pacientes con Hal en relación a controles en los valores totales de CSV ($p=0,0001$), CH_3SH ($p=0,004$) ya sea en ppb como en ng/ml y H_2S en ppb ($p=0,0001$) y ng/ml ($p=0,001$). No se pudieron detectar diferencias estadísticamente significativas en $(\text{CH}_3)_2\text{S}$, si bien el grupo 1 en los pacientes con Hal mostró una ligera tendencia a la significancia ($p=0,06$). Los datos explicados se muestran en la tabla 8 y 9.

Tabla 8. CSV totales en oral chroma.

Grupo		CSV totales	
		ng/ml	ppb
1	Hal. (n=31)	4,08±3,35	253,45±215,42
	NHal. (n=10)	0,80±0,49	43,50±21,85
t. test		>0,0001	>0,0001
2	Hal. (n=12)	6,73±3,46	428,33±214,77
	NHal. (n=29)	1,85±1,74	108,69±112,62
t. test		>0,0001	>0,0001
Total (n=41)		3,28±3,24	202,24±207,95

Ng/ml: nanogramo por mililitro; ppb: parte por billón; CSV: compuestos sulfuros volátiles; Hal: halitosis; NHal: no halitosis

Tabla 9. CSV evaluados por el oral chroma.

Grupo		H ₂ S		CH ₃ SH		(CH ₃) ₂ S	
		ng/ml	ppb	ng/ml	ppb	ng/ml	ppb
1	Hal. (n=31)	2,18±2,35	159,65±166,18	1,27±1,08	67,94±57,12	0,63±0,57	25,87±23,11
	NHal. (n=10)	0,20±0,21	14,80±15,70	0,29±0,16	15,40±8,36	0,32±0,44	13,30±17,76
t. test		>0,0001	>0,0001	>0,0001	>0,0001	0,06	0,06
2	Hal. (n=12)	4,06±2,48	295,00±168,22	1,99±1,27	105,33±66,94	0,68±0,79	28,00±32,21
	NHal. (n=29)	0,71±1,09	53,69±81,01	0,64±0,58	34,34±31,23	0,50±0,42	20,66±17,09
t. test		0,001	>0,0001	0,004	0,004	0,469	0,467
Total (n=41)		1,69±2,21	124,32±157,27	1,03±1,03	55,12±54,63	0,55±0,55	22,80±22,39

Ng/ml: nanogramo por mililitro; ppb: parte por billón; CSV: compuestos sulfuros volátiles; Hal: halitosis; NHal: no halitosis; H₂S: sulfuro de hidrógeno; CH₃SH: metil mercaptano; (CH₃)₂S: sulfuro de dimetilo.

DATOS MICROBIOLÓGICOS

Prevalencia (frecuencia de detección de patógenos).

En el grupo 1, en las muestras subgingivales en pacientes con Hal el número total de bacterias fue significativamente más elevado en relación a los pacientes sin halitosis (NHal), mostrando diferencias estadísticamente significativas (P=0,039).

Las especies bacterianas cuya presencia mostró diferencias estadísticamente significativas en pacientes con Hal a diferencia de aquellos NHal fueron *P. gingivalis* (p=0,011), *P. intermedia* (p=0,041), *F. nucleatum* (p=0,034) y *E. corrodens* (0,025). En los restantes microorganismos analizados no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con Hal y controles.

En el grupo 2, en las muestras subgingivales en pacientes con Hal se encontraron diferencias estadísticamente significativas en *P. gingivalis* (P=0,034) en relación a los pacientes sin Halitosis (NHal). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los restantes microorganismos.

En las muestras de dorso de lengua se encontraron diferencias estadísticamente significativas sólo en el número total de bacterias en el grupo 1. En el grupo 2 *F. nucleatum* mostró diferencias estadísticamente significativas en aquellos pacientes con Hal (P=0,007).

En muestras de saliva en el grupo 1, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el número total de bacterias (p=0,036), hecho que no se detectó con ninguno de los patógenos estudiados.

En el grupo 2, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en pacientes con Hal de *P. gingivalis* (P=0,02) y una ligera tendencia a la significancia de *F. nucleatum* (P=0,076).

Logaritmo total de ufc.

Las muestras subgingivales indicaron diferencias estadísticamente significativas de *P. gingivalis* en ambos grupos en pacientes con Hal (grupo 1: p=0,039 y grupo 2: p=0,034). Sólo en el grupo 1 de Hal se mostraron diferencias estadísticamente significativas de *P. intermedia* (p=0,041), *F. nucleatum* (p=0,034) y *E. corrodens* (0,025). También se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el número total de patógenos (p=0,039).

Las muestras del dorso de la lengua sólo mostraron un aumento significativo de *F. nucleatum* en el grupo 2 (p=0,007), a diferencia del grupo 1 donde no se manifestó el mismo resultado. También se encontró un incremento en el número total de patógenos únicamente en el grupo 1 (p=0,036).

En las muestras de saliva, en ambos grupos no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de los microorganismos, excepto en el grupo 2 de Hal se observó un aumento de *P. gingivalis* (p=0,020).

El grupo 1 mostró un incremento en el número total de patógenos (p=0,036) a diferencia del grupo 2.

Proporciones promedio de los patógenos.

En nuestro estudio, hubo un aumento significativo de *P. gingivalis* en los dos grupos en pacientes con Hal. También se observaron diferencias estadísticamente significativas en el grupo 1 de pacientes con Hal de *P. intermedia* ($p=0,041$), *F. nucleatum* ($p=0,034$), *E. corrodens* ($P=0,025$) e incluso en el recuento total de patógenos ($p=0,039$).

En las muestras de dorso de lengua se mostraron diferencias estadísticamente significativas de *F. nucleatum* ($p=0,007$) en el grupo 2 y en el grupo 1 hubo un incremento en el número total de patógenos ($p=0,036$).

En saliva, en ninguno de los grupos se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de las variables estudiadas; sólo el grupo 1 de pacientes con Hal que manifestó un incremento en el número total de patógenos ($p=0,036$) y el grupo 2 que detectó un aumento significativo de *P. gingivalis* ($p=0,020$) en aquellos con Hal. En las tablas 10-15 se muestran los resultados explicados anteriormente.

Frecuencia de detección, log. de Ufc y proporciones promedio de patógenos.

Tabla 10. Muestras subgingivales.

Grupo		Total	Aa	Pg	Pi	Pm	Fn	
Total (n: 41)		Sub	5,96±0,66	0,19±0,85	2,73±2,76	3,24±2,36	1,19±2,13	4,25±0,84
1	Hal. (n=31)	Sub	6,10±0,58	0,25±0,97	3,29±2,73	3,75±2,05	1,12±2,12	4,45±0,69
	NHal. (n=10)	Sub	5,52±0,72	0,00±0,00	0,98±2,11	1,65±2,68	1,40±2,27	3,64±0,99
	t. test		0,039	0,161	0,011	0,041	0,728	0,034
2	Hal. (n=12)	Sub	6,11±0,71	0,31±1,07	4,19±2,67	3,95±2,09	0,85±1,99	4,58±0,79
	NHal. (n=29)	Sub	5,90±0,63	0,14±0,75	2,12±2,60	2,94±2,44	1,33±2,21	4,11±0,83
	t. test		0,375	0,625	0,034	0,193	0,506	0,103

Aa: *A. actinomycetemcomitans*; Pg: *P. gingivalis*; Pi: *P. intermedia*; Pm: *P. micra*; Fn: *F. nucleatum*; sub: muestras subgingivales; Hal: halitosis; NHal: no halitosis.

Tabla 11. Muestras subgingivales.

Grupo			<i>Cr</i>	<i>Ec</i>	<i>Tf</i>	<i>Capno</i>	<i>Eu</i>	Otros
Total (n= 41)		Sub	0,16±0,73	0,46±1,29	0,58±1,58	0,92±1,65	0,00±0,00	0,00±0,00
1	Hal. (n=31)	Sub	0,21±0,84	0,61±1,45	0,61±1,62	1,10±1,75	0,00±0,00	0,00±0,00
	NHal. (n=10)	Sub	0,00±0,00	0,00±0,00	0,49±1,55	0,38±1,21	0,00±0,00	0,00±0,00
	t.test			0,166	0,025	0,834	0,163	ND
2	Hal. (n=12)	Sub	0,55±1,31	0,68±1,61	0,80±1,86	0,85±1,55	0,00±0,00	0,00±0,00
	NHal. (n=29)	Sub	0,00±0,00	0,38±1,15	0,49±1,48	0,95±1,72	0,00±0,00	0,00±0,00
	t.test			0,171	0,567	0,623	0,848	ND

Cr: C. rectus; Ec: E. corrodens; Tf: T. forsythia; Capno: Capnocytophaga; Eu: Eubacterium; ; sub: muestras subgingivales; Hal: halitosis; NHal: no halitosis

Tabla 12. Muestras de dorso de lengua.

Grupo			Total	<i>Aa</i>	<i>Pg</i>	<i>Pi</i>	<i>Pm</i>	<i>Fn</i>
Total (n= 41)		Len	6,24±0,51	0,16±0,70	0,92±1,89	2,63±2,14	0,10±0,60	4,41±1,28
1	Hal. (n=31)	Len	6,32±0,49	0,20±0,79	1,04±1,99	2,83±2,10	0,12±0,69	4,66±1,11
	NHal. (n=10)	Len	5,97±0,51	0,00±0,00	0,51±1,53	1,94±2,25	0,00±0,00	3,55±1,50
	t.test			0,036	0,162	0,438	0,142	0,325
2	Hal. (n=12)	Len	6,50±0,60	0,25±0,86	2,05±2,58	3,38±2,25	0,00±0,00	5,08±0,72
	NHal. (n=29)	Len	6,13±0,44	0,12±0,64	0,44±1,29	2,30±2,04	0,14±0,72	4,12±1,37
	t.test			0,076	0,648	0,060	0,168	0,326

Aa: A. actinomycetemcomitans; Pg: P. gingivalis; Pi: P. intermedia; Pm: P. micra; Fn: F. nucleatum; len: muestras de dorso de lengua; Hal: halitosis; NHal: no halitosis.

Tabla 13. Muestras de dorso de lengua.

Grupo			<i>Cr</i>	<i>Ec</i>	<i>Tf</i>	<i>Capno</i>	<i>Eu</i>	Otros
Total (n= 41)		Len	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,32±1,14	0,00±0,00	0,10±0,66
1	Hal. (n=31)	Len	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,28±1,09	0,00±0,00	0,13±0,75
	NHal. (n=10)	Len	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	5,30±2,26	0,00±0,00	0,00±0,00
	t.test			ND	ND	ND	0,726	ND
2	Hal. (n=12)	Len	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,72±1,69	0,00±0,00	0,35±1,21
	NHal. (n=29)	Len	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,15±0,78	0,00±0,00	0,00±0,00
	t.test			ND	ND	ND	0,282	ND

Cr: C. rectus; Ec: E. corrodens; Tf: T. forsythia; Capno: Capnocytophaga; Eu: Eubacterium; len: muestras dorso de lengua; Hal: halitosis; NHal: no halitosis.

Tabla 14. Muestra de saliva.

Grupo		Total	Aa	Pg	Pi	Pm	Fn	
Total (n= 41)		Sal	7,26±0,59	0,15±0,66	1,45±2,51	3,43±2,77	0,13±0,81	5,55±1,12
1	Hal. (n=31)	Sal	7,36±0,58	0,19±0,74	1,59±2,66	3,79±2,74	0,17±0,92	5,80±0,66
	NHal. (n=10)	Sal	5,30±2,26	0,00±0,00	0,96±1,92	2,21±2,65	0,00±0,00	4,66±1,84
	t.test			0,036	0,162	0,438	0,142	0,325
2	Hal. (n=12)	Sal	7,37±0,66	0,27±0,93	3,23±3,15	4,02±3,04	0,43±1,48	5,93±0,63
	NHal. (n=29)	Sal	7,21±0,56	0,10±0,51	0,69±1,74	3,18±2,66	0,00±0,00	5,38±1,25
	t. test			0,468	0,558	0,020	0,422	0,339

Aa: *A. actinomycetemcomitans*;Pg: *P. gingivalis*; Pi: *P. intermedia*; Pm: *P. micra*; Fn: *F. nucleatum*; sal: muestras de saliva; Hal: halitosis; NHal :no halitosis.

Tabla 15. Muestra de saliva.

Grupo		Cr	Ec	Tf	Capno	Eu	Otros	
Total (n= 41)		Sal	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,40±1,43	0,00±0,00	0,03±0,22
1	Hal. (n=31)	Sal	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,52±1,61	0,00±0,00	0,05±0,25
	NHal. (n=10)	Sal	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	t.test			ND	ND	ND	0,084	ND
2	Hal. (n=12)	Sal	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,94±2,19	0,00±0,00	0,12±0,
	NHal. (n=29)	Sal	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,17±0,91	0,00±0,00	0,00±0,00
	t. test			ND	ND	ND	0,265	ND

Cr: *C. rectus*; Ec: *E. corrodens*; Tf: *T. forsythia*; Capno: *Capnocytophaga*; Eu: *Eubacterium*; sal: muestras de saliva; Hal: halitosis; NHal: no halitosis.

V. DISCUSIÓN

La relevancia y complejidad de los hallazgos obtenidos en nuestro estudio radican en la amplia información que se presenta tanto sobre las variables clínicas e instrumentales de la halitosis oral, como fundamentalmente sobre las variables microbiológicas de esta entidad de etiología bacteriana.

En relación a la microflora asociada a pacientes con halitosis, hasta la actualidad, nuestra investigación es pionera en la evaluación de tres nichos diferentes de la cavidad bucal como son: el dorso de la lengua, el fluido gingival y la saliva. Otros autores, en cambio, sólo analizan muestras de saliva^{33,34} o, como observamos en la mayoría de los trabajos, la evaluación se realizó sólo del dorso de lengua^{35,36,37,38,39}, por ser la localización más significativa para el alojamiento de los patógenos. Sólo un menor número de grupos de investigación estudiaron dos tipos de muestras diferentes⁴⁰.

La capacidad de formar CSV como H₂S y CH₃SH por bacterias orales ya comprobada por algunos autores^{41,42,43} se confirmó en nuestro trabajo, tras obtener un aumento significativo de *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* en muestras subgingivales de pacientes con halitosis. Sin embargo nosotros, a diferencia de otros autores, también detectamos *E. corrodens*^{41,42}.

En cuanto al **número total de patógenos**, también se manifestó una diferencia estadísticamente significativa en pacientes con Hal con respecto a aquellos NHal tanto en fluido como en saliva. Nuestros resultados en muestras de saliva son similares a los obtenidos en un estudio realizado en niños, donde aquellos que presentaron Hal se caracterizaban por un mayor porcentaje total de recuento viable de microorganismos y mayores niveles de CSV al compararlos con niños que no padecían el problema³³. Si bien en ambos estudios se utilizó cultivo, las especies bacterianas encontradas fueron diversas, pudiendo atribuirse esa diferencia a la edad de los pacientes.

La detección de *P. gingivalis* en nuestra investigación corrobora la actividad proteolítica de bacterias periodontales que están estrechamente relacionadas con este proceso y coincide con los resultados encontrados por otros autores³⁴ que asimismo identificaron *P. intermedia* y *T. forsythia* por PCR.

Estos tres microorganismos favorecieron la producción de CSV, específicamente el último se correlacionó fuertemente con la presencia de altos niveles de CSV en el aire de la boca en sujetos con periodontitis³⁴.

Gran parte de las investigaciones previas sobre la halitosis oral se han centrado en el estudio de la lengua, ya que se considera una fuente importante del mal olor.

El dorso de la lengua posee una microbiota única: alrededor de un tercio de la población bacteriana se encuentra sólo en la lengua y no en las superficies de otras localizaciones dentro de la cavidad bucal. La composición bacteriana de la lengua no está aún bien definida y para su caracterización se han empleado numerosas técnicas. Dentro de ellas tenemos desde los métodos convencionales de cultivo microbiológico hasta las complejas técnicas que nos ofrece la biología molecular.

En nuestro estudio, mediante cultivo pudimos detectar diferencias significativas en el recuento total de patógenos y sólo pudimos hallar un incremento de *F. nucleatum*, a diferencia de las otras especies estudiadas. A pesar de los resultados observamos diferencias estadísticamente significativas en el índice de Winkel.

La escasa detección de otros patógenos en las muestras de lengua podría haberse debido a algunas limitaciones de la técnica como son: las dificultades de crecimiento de algunas bacterias in vitro, el bajo porcentaje de recuperación de los microorganismos totales o una inadecuada identificación microbiana, aunque esto último se intentó evitar mediante el uso de test bioquímicos y enzimáticos o tinciones de Gram entre otros métodos.

En contraposición a nuestros resultados, algunos autores sí tuvieron éxito en la detección de otros microorganismos utilizando la misma técnica. Por ejemplo, se encontraron bacilos Gram- y Gram+, cocobacilos Gram- y los géneros más frecuentemente detectados fueron *Veillonella*, *Prevotella* y *Fusobacterium*³⁸, que coincidieron con los hallazgos de otro estudio que empleó técnicas de biología molecular³⁷. Otros autores, a pesar de las limitaciones ya mencionadas, lograron identificar *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *T. forsythia*^{44,39} y *Rothia mucilaginosa*⁴⁵.

En un estudio más actual fallaron al detectar la mayoría de los periodontopatógenos empleando PCR y sólo tuvieron éxito con *T. Denticola* y *Fusobacteria*⁴⁰. También por RT-PCR se determinó la presencia de *T. forsythia*, *P. intermedia/nigrescens* y *P. gingivalis*⁴⁸.

Sin embargo, se ha estimado que aproximadamente el 50% de la microflora oral no es cultivable⁴⁶, por lo que se requiere de nuevos métodos para la identificación de patógenos, ya que algunas de las especies no cultivables o quizás nuevas especies también podrían contribuir al desarrollo de la halitosis oral. De hecho, numerosos microorganismos han sido descubiertos por amplificación de los ácidos nucleicos y esas técnicas han duplicado el número de especies bacterianas de 400 a 800 especies distintas existentes en la actualidad.

Otros investigadores, mediante métodos de biología molecular tales como PCR y posterior secuenciación del DNA detectaron un mayor recuento total de microorganismos y asimismo mayor cantidad de CSV en pacientes con halitosis. Observaron también como especies predominantes en ambos grupos ***Veillonella*, *Actinomyces* y *Prevotella***⁴⁷.

Con técnicas de checkerboard hybridization DNA-DNA se produjo un aumento de algunas especies bacterianas como ***Prevotella melaninogenica*, *Veillonella parvula*** y de algunos patógenos periodontales como ***P. Intermedia/nigrescens*, *Streptococcus constellatus*, *T. Forsythia*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, and *P. melaninogenica***⁴⁹.

También con técnicas más complejas y costosas de biología molecular como clonación se aportaron nuevas especies implicadas en halitosis por diferentes autores. Según un estudio realizado en el 2003³⁵, la microbiota hallada fue diversa en pacientes sin halitosis y con halitosis, y las especies asociadas a esta última fueron: ***Atopobium parvulum*, a phylotype (clon BS095) de *Dialister*, *Eubacterium sulci*, a phylotype (clon DR034) incultivable de phylum TM7, un phylotype (clon BW009) de *Streptococcus*, *fusobacterium periodonticum* y *Solobacterium moorei***.

Más tarde, otro autor además de aportar otras nuevas especies a la halitosis también encontró ***P. pallens***³⁷ como una de las especies más prevalentes. De la misma manera en otro trabajo se evidenció ***S. moorei***³⁶ sólo en pacientes con halitosis, no así en controles, reforzando la posible teoría específica propuesta de halitosis.

Algunos estudios sugieren que los sujetos infectados con especies específicas capaces de producir altos niveles de CSV tóxicos para los tejidos, juegan un rol importante en la patogénesis de condiciones inflamatorias y no debe ser entendida como un problema estético. Se ha demostrado que la halitosis se asocia a bacterias específicas, por lo que pueden ser susceptibles a tratamientos antimicrobianos específicos e inespecíficos³⁶.

Los resultados que evaluaron la utilización del test Bana en un estudio realizado en el año 1994²⁷ no se pudieron confirmar en estudios posteriores^{35,44}.

El aumento en la diversidad de especies demostró también que la halitosis es el resultado de complejas interacciones entre múltiples especies bacterianas, corroborando la etiología microbiana de la misma.

Otro hallazgo importante fue la existencia de una correlación entre el incremento de la microflora oral patogénica y un aumento significativo en los valores de CVS totales, H₂S y CH₃SH en pacientes con halitosis. La diferencia no pudo ser detectada con el (CH₃)₂S.

Nuevos estudios son necesarios para mejorar nuestro conocimiento acerca de las posibles nuevas especies bacterianas involucradas en la halitosis oral y así identificar diversas estrategias de diagnóstico y tratamiento.

VI. CONCLUSIONES

ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS

- Se observó una diferencia estadísticamente significativa de *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *E. corrodens* y en el **número total de patógenos** en pacientes con Hal en fluido gingival.
- Se encontraron diferencias estadísticamente significativas de *P. gingivalis* y en el **número total de patógenos** en pacientes con Hal en saliva.
- En el dorso de la lengua se detectó un aumento significativo en el **recuento total de patógenos** y un incremento de *F. nucleatum*.

DATOS DE ORAL CHROMA

- En ambos grupos se observaron diferencias estadísticas significativas en pacientes con Hal en los valores de **CVS totales**, H_2S , CH_3S , a diferencia de $(CH_3)_2S$.

ASPECTOS CLÍNICOS

- En ambos grupos se detectaron diferencias estadísticamente significativas tanto en el **%IP** como en el **%IS** en pacientes con HAL.
- Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el **índice de Winkel** en pacientes con Hal y en el **número total de dientes presentes** en pacientes NHal.

PERSPECTIVAS FUTURAS DEL ESTUDIO

- Evaluar la presencia de especies bacterianas específicas como *Solobacterium moorei*^{35,36} y *Prevotella pallens*³⁷ involucradas en la patogénesis de la halitosis oral mediante técnicas de biología molecular como PCR.
- En casos de lograr la identificación de *S. moorei*^{35,36} y *P. pallens*³⁷ cuantificar mediante RT-PCR.
- Evaluar la presencia de especies bacterianas no identificadas e incultivables que podrían estar involucradas en la patogénesis de la halitosis oral mediante amplificación por PCR, clonación y secuenciación del gen 16S rRNA³⁷.
- Reproducir el biofilm del dorso de la lengua mediante modelos in-vitros⁵⁰.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- ¹Scully Cristian & Greenman. (2008) Halitosis (breath odor).*Periodontology* 2000**48**, 66–75.
- ²Loesche WJ, Kazor C. (2000)Microbiology and treatment of halitosis.*Periodontology* 2000**28**, 56–79.
- ³Sanz M, Roldán S, Herrera D. (2001)Fundamentals of breath malodour.*J Contemp Dent Pract.* **2**(4),1-17.
- ⁴ Rosenberg M. (1996)Clinical assessment of bad breath: current concepts.*J Am Dent Assoc.* **127** (4), 75-82.
- ⁵Iwakura M, Yasuno Y, Shimura M, et. al. (1994)Clinical characteristics of halitosis: differences in two patient groups with primary and secondary complaints of halitosis.*J Dent Res.* **73**, 68-74.
- ⁶Rayman S, Almas K. (2008)Halitosis among racially diverse populations: an update.*Int J Dent Hygiene* **6**, 2–7.
- ⁷ Yaegaki K, Coil JM.(2000)Examination, classification, and treatment of halitosis; clinical perspectives.*J Can Dent Assoc.***66**, 57-61.
- ⁸Van den Broek AM, Feenstra L, de Baat C. (2008)A review of the current literature on management of halitosis. *Oral Dis.* **14**,30-9.
- ⁹ Whittle CL, Fakharzadeh S, Eades J, Preti G.(2007)Human breath odors and their use in diagnosis.*Ann N Y Acad Sci.* **1098**, 52-66.
- ¹⁰ Delanghe G, Ghyselen J, Bollen C.(1999)An inventory of patients' response to treatment at a multidisciplinary breath odour clinic.*Quintessence Int.* **30**,7-10.
- ¹¹ Kleinberg I, Codipilly M.(1999)Modelling of the oral malodour system and methods of analysis. *Quintessence Int.* **30**, 57–69.

¹²Van Steenberghe D, Rosenberg M. (1996)Bad Breath: A multidisciplinary approach.Leuven: Leuven University Press.

¹³ Greenman J, El-Maaytah M, Duffield J, Spencer P, Rosenberg M, Corry D, Saad S, Lenton P, Majerus G, Nachnani S.(2005)Assessing the relationship between concentrations of malodour compounds and odour scores from judges. J Am Dent Assoc. **136**, 49-57.

¹⁴Ng W, Tonzetich J.(1984)Effect of hydrogen sulphide and methyl mercaptan on the permeability of oral mucosa.J Dent Res. **63**, 94-7.

¹⁵ Setoguchi T, Machigashira M, Yamamoto M, Yotsumoto Y, Yoshimori M, Izumi Y, Yaegaki K. (2002)The effects of methyl mercaptan on epithelial cell growth and proliferation.Int Dent J. **52**(3), 41-6.

¹⁶ Goldberg S, Kozlovsky A, Gordon D.(1994)Cadaverine as a putative component of oral malodour.J Dent Res. **73**(6), 68-72.

¹⁷ Rosenberg M.(1997)Bad breath: research perspectives.Ramat Aviv: Ramot Publishing–Tel Aviv University.

¹⁸Goldberg S, Cardash H, Browning H.(1997)Isolation of Enterobacteriaceae from the mouth and potential association with malodour.J Dent Res.**76**(11), 70-5.

¹⁹ Yaegaki K, Sanada K.(1992)Volatile sulphur compounds in mouth air from clinically healthy subjects and patients with periodontal disease.J Periodontal Res. **27**, 33-8.

²⁰ Tsai CC, Chou HH, Wu TL, Yang YH, Ho KY, Wu YM, Ho YP.(2008)The levels of volatile sulphur compounds in mouth air from patients with chronic periodontitis.J Periodontal Res. **43**, 86-93.

²¹ Morita M, Wang HL.(2001)Association between oral malodour and adult periodontitis: a review.J Clin Periodontol.**28**, 13-9.

- ²² Donaldson AC, McKenzie D, Riggio MP, Hodge PJ, Rolph H, Flanagan A, Bagg J.(2005)Microbiological culture analysis of the tongue anaerobic microflora in subjects with and without halitosis.Oral Dis.**11**(1),61-3.
- ²³Rosenberg Rosenberg M, Septon I, Eli I, Bar-Ness R, Gelernter I, Brenner S, Gabbay J.(1991)Halitosis measurement by an industrial sulphide monitor.J Periodontol.**62**, 87–89.
- ²⁴ Bosy A, Kulkarni GV, Rosenberg M, McCulloch CA.(1994)Relationship of oral malodour to periodontitis: evidence of independence in discrete subpopulations.J Periodontol.**65**, 37–46.
- ²⁵ Schmidt NF, Missan SR, Tarbet WJ.(1978)The correlation between organoleptic mouth-odour ratings and levels of volatile sulphur compounds.Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**45**, 60–67.
- ²⁶ Tonzetich J.(1977)Production and origin of oral malodour: a review of mechanisms and methods of analysis.J Periodontol.**48**, 13–20.
- ²⁷ Kozlovsky A, Gordon D, Gelernter I, Loesche WJ, Rosenberg M.(1994)Correlation between the BANA test and oral malodour parameters.J Dent Res. **73** (5), 36-42.
- ²⁸ Donaldson AC, Riggio MP, Rolph HJ, Bagg J, Hodge PJ.(2007)Clinical examination of subjects with halitosis.Oral Dis. **13** (1), 63-70.
- ²⁹ Winkel EG, Roldán S, Van Winkelhoff AJ, Herrera D, Sanz M. (2003)Clinical effects of a new mouth rinse containing chlorhexidine, cetylpyridinium chloride and zinc-lactate on oral halitosis. J Clin Periodontol. **30**, 0–6.
- ³⁰Roldán S, Winkel EG, Herrera D, Sanz M, Van Winkelhoff AJ. (2003)The effects of a new mouth rinse containing chlorhexidine, cetylpyridinium chloride and zinc lactate on the microflora of oral halitosis patients: a dual-centre, double-blind placebo-controlled study. J Clin Periodontol. **30**(5), 27-34.
- ³¹ Loesche WJ, Hockett, R, Syed S.(1972)The predominant cultivable flora of tooth surface plaque removed from institutionalized subjects.Oral Biol. **17** (9), 11-25.

- ³² Alsina, M, Olle, E & Frias J. (2001)Improved, low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.J. Clin. Microbiol. **39**, 09-13.
- ³³Paryavi-Gholami F, Minah GE, Turng BF. (1999)Oral malodor in children and volatile sulfur compound-producing bacteria in saliva: preliminary microbiological investigation.Pediatr Dent.**21**(6), 20-4.
- ³⁴ Awano S, Gohara K, Kurihara E, Ansai T, Takehara T.(2002)The relationship between the presence of periodontopathogenic bacteria in saliva and halitosis.Int Dent J.**52** (3), 12-6.
- ³⁵ Kazor CE, Mitchell PM, Lee AM, Stokes LN, Loesche WJ, Dewhirst FE, Paster BJ. (2003)Diversity of Bacterial Populations on the Tongue Dorsa of Patients with Halitosis and Healthy Patients. J Clin Microbiol. **41**(2), 58–63.
- ³⁶Haraszthy, Violet I, Zambon Joseph J, Sreenivasan Prem K, Zambon Margaret M, Doralee Gerber, Rego Rodrigo, Parker Carol. (2007)Identification of oral bacterial species associated with halitosis.J Am Dental Assoc. **138**(8), 13-20.
- ³⁷Riggio MP, Lennon A 1, Rolph HJ, Hodge PJ, Donaldson A, Maxwell AJ, Bagg J. (2008)Molecular identification of bacteria on the tongue dorsum of subjects with and without halitosis. Oral Diseases **14**, 51–58.
- ³⁸Donaldson AC, McKenzie D, Riggio MP, Hodge PJ, Rolph, Flanagan A, Bagg J. (2005)Microbiological culture analysis of the tongue anaerobic microflora in subjects with and without halitosis.Oral Dis.**11** (1), 61-3.
- ³⁹ Quirynen M, Van Eldere J, Pauwels M, Bollen CM, van Steenberghe D.(1999)In vitro volatile sulfur compound production of oral bacteria in different culture media.Quintessence Int.**30**(5), 51-6.
- ⁴⁰ Yasukawa T, Ohmori M, Sato S. (2010)The relationship between physiologic halitosis and periodontopathic bacteria of the tongue and gingival sulcus.Odontology**98**(1), 44-51.

- ⁴¹ Claesson R, Edlund MB, Persson S, Carlsson J. (1990) Production of volatile sulfur compounds by various *Fusobacterium* species. *Oral Microbiol Immunol.* **5**(3), 37-42.
- ⁴² Persson S, Claesson R, Carlsson J. (1989) The capacity of sub gingival microbiotas to produce volatile sulfur compounds in human serum. *Oral Microbiol Immunol.* **4**(3), 69-72.
- ⁴³ Persson S, Edlund MB, Claesson R, Carlsson J. (1990) The formation of hydrogen sulfide and methyl mercaptan by oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* **5**(4), 195-201.
- ⁴⁴ EH De Boever and WJ Loesche. (1995) Assessing the contribution of anaerobic microflora of the tongue to oral malodor. *J Am Dent Assoc.* **126**, 384-393.
- ⁴⁵ Hartley MG, El-Maaytah MA, Mc. Kenize C, Greenman. (1996) The tongue microbiota of low odour and malodorous individuals. *Microb. Ecol. Health Dis.* **9**, 215–223.
- ⁴⁶ Socransky SS, Gibbons RJ, Dale AC, Bortnick L, Rosenthal E, Macdonal JB. (1963) The microbiota of the gingival crevice area of man. Total microscopic and viable counts and counts of specific organisms. *Arch Oral Biol.* **8**, 75-80.
- ⁴⁷ Washio J, Sato T, Koseki T and Takahashi N. (2005) Hydrogen sulfide-producing bacteria in tongue biofilm and their relationship with oral malodour *Journal of Medical Microbiology.* **54**, 89–95.
- ⁴⁸ Tanaka M, Yamamoto Y, Kuboniwa M, Nonaka A, Nishida N, Maeda K, Kataoka K, Nagata H, Shizukuishi S. (2004) Contribution of periodontal pathogens on tongue dorsa analyzed with real-time PCR to oral malodor. *Microbes Infect.* **6**(12), 78-83.
- ⁴⁹ Faveri M, Feres M, Shibli JA, Hayacibara RF, Hayacibara MM, de Figueiredo LC. (2006) Microbiota of the dorsum of the tongue after plaque accumulation: an experimental study in humans. *J Periodontol.* **77**(9), 39-46.
- ⁵⁰ Spencer P., Greenman J., McKenzie C., Gafan G., Spratt D., Flanagan A. In vitro biofilm model for studying tongue flora and malodour. *Journal of Applied Microbiology* **103** (4), 85-2. ISSN 1364-5072.