

Métodos de diagnóstico microbiológico en la enfermedad periodontal



Frías López, Mª Cruz

Odontóloga. Máster en Periodoncia y Osteointegración. Directora de la asignatura de Periodoncia y profesora de postgrado en Periodoncia. Universidad Europea de Madrid. Práctica privada en Madrid.

Uria Ovando, Valia

Laboratorio. Licenciada en química agrícola. Máster en Biotecnología. Diploma de estudios avanzados en biología molecular. Laboratorio ORIGEN.

Carasol Campillo, Miguel

Médico Estomatólogo. Máster en Periodoncia. Director de formación de grado y postgrado en Periodoncia. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Europea de Madrid. Práctica privada en Madrid.

Indexada en / Indexed in:

- IME.
- IBECES.
- LATINDEX.
- GOOGLE ACADÉMICO.

FRÍAS LÓPEZ, Mª CRUZ; URÍA OVANDO, VALIA; CARASOL CAMPILLO, MIGUEL. *Métodos de diagnóstico microbiológico en la enfermedad periodontal*. *Cient Dent* 2009;6;2:93-101.

RESUMEN

El inicio y progresión de la enfermedad periodontal se atribuye a la presencia de niveles elevados de bacterias periodontopatógenas que habitan en el surco gingival. Se estima que existen cientos de microorganismos en el surco gingival, y más aún que están por identificar, pero solamente un pequeño número de ellas juega un papel significativo en la etiología de la enfermedad periodontal.

El desarrollo de pruebas microbiológicas para la identificación de estas bacterias constituye una vía de información adicional que ayuda al clínico a establecer un diagnóstico más preciso de la situación periodontal del paciente y valorar la necesidad de establecer un tratamiento antibiótico coadyuvante al tratamiento periodontal. En este artículo se describen los diferentes métodos de diagnóstico microbiológico disponibles y su utilidad tanto para tratamiento de pacientes que no responden a la terapia habitual, como para monitorizar a pacientes en fases de mantenimiento.

PALABRAS CLAVE:

Diagnóstico periodontal; Microbiología; PCR; Cultivo bacteriano; Bacterias periodontopatógenas.

Microbiological diagnostic methods in periodontal disease

ABSTRACT

The commencement and progression of periodontal disease is attributed to the presence of high levels of periodontopathogen bacteria that inhabit the gingival groove. It is estimated that there are hundreds of microorganisms in the gingival groove, and even more that have not yet been identified, but only a small number of them play a significant role in the aetiology of periodontal disease.

Conducting microbiological tests in order to identify these bacteria is a channel of additional information that helps the clinician to make a more precise diagnosis of the patient's periodontal situation and to evaluate the need for establishing an antibiotic treatment in addition to the periodontal treatment.

This article describes the different available microbiological diagnostic methods and their utility in the treatment of patients that do not respond to the usual therapy as well as the monitoring of patients in maintenance phases.

KEYWORDS

Periodontal diagnosis; Microbiology; PCR; Bacterial culture; Periodontopathogen bacteria.

Correspondencia:

Clinica Perio.
C/ San Francisco de Sales nº 10, 1º 28003 Madrid.
Tlf: 91 441 96 56



MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO EN LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

Es bien conocido que las bacterias son esenciales para el desarrollo de la periodontitis, aunque sólo un pequeño número de estas, estará relacionada con la etiología y progresión de la infección periodontal.

El problema radica en que en el caso de la enfermedad periodontal no está demostrado una relación directa causa – efecto entre bacterias específicas y enfermedad periodontal; es decir, las bacterias son importantes, pero insuficientes para el desarrollo de la enfermedad periodontal, ya que en este proceso influyen otros factores que son los llamados factores modificadores de la enfermedad, los cuales podemos agruparlos en genéticos, ambientales y sistémicos y que pueden afectar tanto a la edad de comienzo de la enfermedad como al patrón de destrucción, tasa de progresión, respuesta al tratamiento, frecuencia y gravedad de la recurrencia.^{1,2}

Así pues, el hecho de utilizar métodos de diagnóstico microbiológicos no indica que al analizar bacterias periodontales estemos necesariamente analizando enfermedad periodontal, ya que existen bacterias periodontales presentes en bolsas sin que por ello exista una pérdida de inserción o pérdida ósea. De todas formas, sí existe evidencia suficiente, demostrando que la presencia de ciertas bacterias periodontales aumenta el riesgo de una posible pérdida de inserción. Bacterias como *P.gingivalis* o *T.forsytensis* aumentan el riesgo relativo de pérdida de inserción en un valor de 1,59 y 2,45 respectivamente.³

Así pues, aún teniendo en cuenta la importancia que posee en la etiología de la enfermedad los factores genéticos, inmunológicos y ambientales, las bacterias son necesarias para que el proceso de inflamación se inicie y se perpetúe, por lo que su identificación se hace necesaria para definir la etiología e instaurar el tratamiento adecuado.

MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS PERIODONTALES

Los métodos de diagnóstico actuales para la detección de patógenos tienen diversos orígenes:

1. Pruebas microbiológicas utilizadas para demostrar la correlación entre las bacterias y las modificaciones de los parámetros clínicos, fundamentalmente el nivel de inserción. En este grupo se incluyen los métodos de cultivo y los métodos inmunológicos.

2. Métodos desarrollados para la detección de bacterias en la medicina y modificados para la identificación de patógenos periodontales; en este grupo se incluyen las sondas de DNA y la PCR.

3. Pruebas desarrolladas específicamente para patógenos periodontales, basadas en alguna propiedad característica de los mismos, (test BANA).

MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE Y DE CAMPO OSCURO

Estas técnicas se han utilizado durante varias décadas para valorar la composición de la placa. Una vez tomada la muestra, las bacterias se identifican en base a su forma, tamaño y movilidad.

Este método a nivel diagnóstico se ha venido empleando para definir la distribución de los morfotipos bacterianos en la placa subgingival y así se ha establecido una correlación entre el número de bacilos móviles y el grado de inflamación gingival, así como entre el número de espiroquetas y la profundidad de bolsa.

La mayor limitación de este método es su incapacidad para identificar especies, no es posible dar nombre a una bacteria sólo por su morfología, así pues aunque con este método se pueden apreciar modificaciones en la estructura de la placa tras el tratamiento, su utilidad puede quedar limitada a la motivación del paciente para mejorar su higiene bucal, ya que su uso en consulta no justifica el gasto en tiempo y en dinero que hay que realizar frente al beneficio diagnóstico obtenido.^{4,5,6}

En cuanto a su utilización para monitorizar pacientes periodontales tratados, se sabe que con este método no se puede predecir la progresión de la enfermedad cuando se emplea para dicho fin.⁷

CULTIVO BACTERIANO

El cultivo bacteriano es el "gold standard" a partir del cual se comparan y se validan otras técnicas de análisis microbiológico.⁸

Consiste en coger una muestra de placa subgingival del paciente con puntas de papel o curetas y trasladarlas en un medio de transporte específico TSBV (tripsina, bacitracina, vancomicina), después se dispersa la muestra y se cultiva en agar bajo condiciones aerobias o anaerobias. Una vez hecho esto, se subcultivan las especies individuales y se identifican en función de una serie de propiedades como son la morfología, afinidad por las tinciones, reacciones bioquímicas, patrones de fermentación, productos metabólicos, etc. expresando el resultado en unidades absolutas o en proporciones de especies dentro del conjunto de la placa.^{7,9} (Fig. 1, Fig 2).

La sensibilidad de los métodos de cultivo frente a bacterias estudiadas es de 10^4 a 10^5 , cuando se utilizan medios no selectivos, y de 10^3 cuando se utilizan medios selectivos.⁴



Fig. 1. Punta de papel introducida en surco gingival para cultivo bacteriológico.



Fig. 2. Medio de transporte específico TSBV para cultivo bacteriológico.

Existe un consenso general en cuanto a que el análisis de la flora subgingival no adquiere un valor adicional en el tratamiento de pacientes con periodontitis crónica ya que estos usualmente responden bien a la terapia convencional.

El uso de técnicas de identificación de patógenos tiene más valor en el estudio de la progresión de la enfermedad en pacientes con periodontitis refractarias, aunque una de sus mayores ventajas es que permite determinar la susceptibilidad y resistencia a antibióticos, información que es de gran importancia para determinar el plan de tratamiento periodontal, y la identificación de patógenos inusuales en la flora subgingival.

Existen dos opciones a la hora de aplicar la asociación cultivo – antibiograma en la clínica:

1. Identificar mediante cultivo la mayoría de los gérmenes presentes y elegir un antibiótico que inhiba el mayor número de bacterias aisladas. Con ello se puede eliminar gran parte de la flora con el antibiótico de primera elección; conociendo además los antibióticos alternativos al elegido. Hoy en día no parece ser la opción ideal ya que implica el

empleo de antibióticos de amplio espectro con las modificaciones evidentes sobre la flora local y sistémica.

2. Identificar de la flora predominante y elegir un antibiótico que inhiba las bacterias aisladas con mayor poder patogénico.

En este caso las muestras obtenidas se procesan de forma que se eligen los patógenos con más influencia contrastada en la patogenia de la enfermedad enfrentándolos con antibióticos diferentes. El más específico para eliminar el grupo estudiado se elige como antibiótico de primera elección, de esta forma es más fácil elegir un antibiótico sin que la elección recaiga en alguno de amplio espectro. (Fig. 3)



Fig. 3. Placa agar sangre con crecimiento de bacterias periodontopatógenas.

Una de las limitaciones importantes de esta técnica la constituyen los organismos no detectables, bien por imposibilidad técnica (caso de algunas espiroquetas) o bien porque las bacterias hayan muerto durante alguna de las fases del cultivo o durante el transporte, lo cual puede conducir a resultados de falsos negativos.

La desventaja general de este método es la dificultad, lentitud y coste de los mismos, es por ello que hoy en día se empieza a dar más importancia a otras técnicas de biología molecular como la PCR, más rápida y específica para la identificación de bacterias.^{1,4}

PRUEBAS INMUNOLÓGICAS UTILIZADAS PARA EL DIAGNÓSTICO PERIODONTAL

1. Microscopia de inmunofluorescencia
2. Aglutinación por látex.
3. ELISA.
4. Inmunoensayo con fluorescencia de concentración de partículas.
 - 4.1. Con gránulos de poliestireno.
 - 4.2. Con células bacterianas.
5. Inmunoensayo de membranas.



6. Marcadores en sangre periférica de patógenos periodontales.

MICROSCOPIA DE INMUNOFLUORESCENCIA

Se trata de una prueba consistente en tomar una muestra de placa subgingival e incubarla con anticuerpos monoclonales, suero anti IgG y fluoresceína para la formación de complejos antígeno-anticuerpo, los cuales se detectan como positivos o negativos para las bacterias estudiadas mediante microscopía y un fluorómetro, cuantificando las especies individuales, consiguiendo niveles de detección bacteriana de 10^4 .^{10,11}

Mediante estas técnicas se ha estudiado la asociación entre bacterias como *P.gingivalis* y *B.forsythus* y su relación con la profundidad de bolsa.

Uno de los mayores problemas de esta técnica son las reacciones cruzadas entre bacterias específicas con bacterias no cultivables de las bolsas periodontales o con bacterias no orales.⁴

AGLUTINACIÓN POR LÁTEX

Esta técnica consiste en mezclar muestras de placa subgingivales en una suspensión de partículas de látex recubiertas con anticuerpos específicos. Esto provoca una reacción con los antígenos bacterianos que resulta en una aglutinación evaluada visualmente en 2-5 min. Un prototipo de este sistema es la detección de antígenos de *P. gingivalis*; *A. actinomycetemcomitans* y *B. forsythus* en muestras de placa bacteriana.¹

ELISA

Es una técnica que depende de la disponibilidad de anticuerpos específicos que reaccionan con los antígenos seleccionados y que serán detectados mediante un anticuerpo primario directamente con un marcador fluorescente, (inmunofluorescencia directa) o con un anticuerpo fluorescente secundario (inmunofluorescencia indirecta).

En esta técnica el anticuerpo primario se detecta a través de una reacción colorimétrica catalizada por una enzima que usualmente es la peroxidasa del rábano o la fosfatasa alcalina unida al anticuerpo secundario (Fig. 4).

Estas técnicas pueden ser muy específicas si se realizan los controles adecuados para evitar las reacciones colorimétricas o fluorescentes inespecíficas. El principal problema es que sólo pueden detectarse aquellas especies para las que existen anticuerpos disponibles.^{5,12}

El ELISA, según estudios de Offenbacher,¹³ parece ser válida para reflejar tanto exposiciones pasadas como niveles bacterianos presentes, pero tiene muy poco valor predictivo.



Fig 4. Placa de Elisa, con anticuerpos específicos para reacción colorimétrica con antígeno seleccionado.

INMUNOENSAYO A TRAVÉS DE FLUORESCENCIA DE CONCENTRACIÓN DE PARTÍCULAS

CON GRÁNULOS DE POLIESTIRENO:

Utiliza gránulos de poliestireno como sustrato, recubiertos por anticuerpos específicos y que reaccionan con la muestra de placa seleccionada. Mediante un fluorímetro se detecta una señal fluorescente que detecta el número relativo de bacterias presentes en la muestra.⁴

CON CÉLULAS BACTERIANAS:

Una modificación del método anterior consiste en usar células bacterianas. Los gránulos de poliestireno son sustituidos por células bacterianas unidas a los diferentes anticuerpos monoclonales específicos frente a los lipopolisacáridos de las especies periodontales en estudio.

Esta técnica presenta una sensibilidad del 97 –100% y una especificidad del 57 –92% dependiendo de la especie en estudio y un límite de detección de 104 en cultivos mixtos.¹⁴

INMUNOENSAYO DE MEMBRANAS

Es un método disponible de forma comercial, Evalusite[®],¹⁵ cuyo objetivo es la detección en clínica de tres patógenos periodontales: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*.

La muestra del paciente se enfrenta contra los anticuerpos específicos de estas 3 especies. Los complejos antígeno - anticuerpo formados sobre la membrana de un pocillo se detectan por adición de un segundo anticuerpo marcado enzimáticamente, junto con un sustrato enzimático coloreado.

Los punteados separados nos indican la presencia de las tres especies diferentes, mientras que la intensidad del color indica el número relativo de bacterias. El test nos indica



resultados positivos o negativos y se puede realizar en 10 minutos. El límite de detección para las tres especies varía entre 10⁴ y 10⁵ células bacterianas.¹⁶

MARCADORES DE SANGRE PERIFÉRICA DE PATÓGENOS PERIODONTALES

Son técnicas que intentan detectar la respuesta que producen las bacterias en el organismo. Tienen un valor tanto para implicar a ciertas especies de patógenos como para determinar clínicamente su estatus infeccioso.

Mediante estas técnicas se detectan anticuerpos en suero frente a *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, revelando fluctuaciones en los niveles de anticuerpos en respuesta al tratamiento periodontal. Hoy en día parecen ser más fiables otras técnicas microbiológicas pero no se descarta la posibilidad de poder identificar mediante pruebas serológicas a individuos con susceptibilidad a padecer algún tipo de enfermedad periodontal.^{16,17}

MÉTODOS DE ANÁLISIS DEL ADN BACTERIANO

1. Sondas de ADN

Las sondas de ADN permiten identificar secuencias de nucleótidos específicos para especies bacterianas concretas. Son relativamente baratas y permiten detectar bacterias específicas de la placa subgingival en niveles de 10³⁻⁵.

Las muestras subgingivales son sometidas a la digestión enzimática del ADN bacteriano, estos fragmentos desconocidos son expuestos a sondas marcadas complementarias y bajo determinadas condiciones de temperatura e ionización, se permite su hibridación en un sustrato de nitrocelulosa. El ADN puede ser detectado por radiomarcado o reacción calorimétrica y los test detectan tanto la presencia como el número aproximado de bacterias.¹⁰

Existen distintos tipos de sondas en función de su empleo: de ADN de ARN,¹⁸ o secuencias de oligonucleótidos sintéticos que se hibridan con ácidos nucleicos de las bacterias diana.¹⁹ Comparado con el cultivo, es un método más simple, rápido, barato y a veces más sensible.

Entre las desventajas se encuentra la imposibilidad de este método para identificar determinados patógenos, ya que existe un número limitado de sondas disponibles y tampoco dan información sobre la susceptibilidad de las bacterias frente a los distintos antibióticos ya que se trabaja con bacterias no viables.²⁰

2. Reacción en cadena de la polimerasa

Esta técnica descrita por Mullis en 1985,²¹ se basa en sinte-

tizar grandes cantidades de ADN in vitro de manera similar a como la célula lo realiza in vivo.

La PCR es un método enzimático que utiliza 2 oligonucleótidos complementarios a secuencias específicas del ADN de las distintas bacterias como cebadores; estos nucleótidos se añaden a una solución que contiene ADN de doble cadena de la muestra del paciente; mediante calentamiento a 90-95° se desnaturaliza el ADN de la muestra y se obtienen cadenas sencillas. Al enfriar la mezcla disminuyendo la temperatura a 40-60°, las cadenas sencillas se hibridan con los cebadores. Al elevar de nuevo la temperatura a 70-75°, la polimerasa comienza a extender a los cebadores usando como molde la cadena sencilla de ADN original, obteniéndose al final una cadena complementaria a la inicial.^{21,6}

Al poder ser utilizados los productos de un ciclo como moldes para el ciclo siguiente, el número de copias de ADN se dobla en cada ciclo, lo cual le hace uno de los métodos con mayor sensibilidad además de ser relativamente simple y rápido, capaz de detectar un solo microorganismo, lo cual lo avala como uno de los métodos más eficaces hoy en día en cuanto a diagnóstico periodontal (Fig. 5).

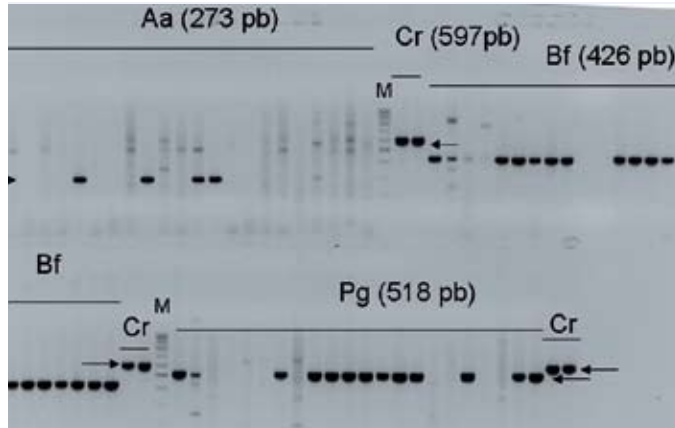


Fig 5. Programador de tiempos y temperaturas para realizar los ciclos de la amplificación por PCR.

Por todo ello la PCR ha demostrado ser superior al cultivo en términos de sensibilidad, especificidad y eficiencia, lo cual tiene un gran interés para la detección de microorganismos específicos en estudios epidemiológicos a gran escala.^{22,23}



Griffen,²⁴ aplicó la PCR para detectar *A. actinomycetemcomitans* usando primers entre las regiones 16S y 23S de los genes ribosomales. No sólo este método es capaz de detectar *A. actinomycetemcomitans* en proporciones muy pequeñas sino que mediante análisis de restricción de las regiones amplificadas podemos diferenciar cepas de este microorganismo para estudios epidemiológicos (Fig. 6).



Gel de agarosa 2% en TBE 2% en el que se observa el producto amplificado con los primers de *Agregatibacter actinomycetemcomitans* (273 pb) (Aa), *Campylobacter rectus* (597 pb) (Cr), *Tannerella forsythensis* (426 pb) (Bf), *Porphyromonas gingivalis* (518 pb) (Pg). M Marcador de pesos moleculares. (Laboratorio Origen 2009).

El mayor inconveniente de la PCR es su incapacidad para identificar serotipos y susceptibilidad frente a antibióticos, por lo que posiblemente no sea la técnica ideal para monitorizar clínicamente los resultados de la terapia periodontal.^{22,25}

3. PCR Cuantitativa o a Tiempo Real

Mediante la PCR convencional es difícil cuantificar adecuadamente el número de bacterias en una muestra puesto que el resultado es evaluable después de que la amplificación del gen ha sido completada. En la actualidad este inconveniente se ha solventado mediante la aplicación de la PCR cuantitativa o PCR a tiempo real.

A finales de 1990 se desarrolla la técnica de la PCR a tiempo real, demostrándose que es un método muy sensible y rápido para la detección y cuantificación de especies microbianas.^{26,27,28,29}

La PCR a tiempo real es una variante de la PCR convencional que se emplea para la cuantificación de ácidos nucleicos, tanto de ADN como de ARN mensajero en una muestra. De tal manera que se puede monitorizar el progreso de la PCR mientras ésta se sucede, de este modo los resultados son obtenidos a lo largo del proceso de la PCR mucho antes de que ésta termine, y no requiere de un análisis una vez finalizado el proceso.

La PCR cuantitativa lleva los mismos reactivos que la PCR a tiempo final, más una sonda marcada con un fluorocromo

que, en un termociclador equipado con sensores para detectar la fluorescencia emitida tras excitar el fluorocromo a la longitud de onda apropiada, permite ver la dinámica de las curvas de amplificación mediante un programa informático del propio termociclador de QPCR. La emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN que se va generando, permitiendo conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Así el análisis de los datos y cuantificación del producto se realiza en la fase exponencial de la PCR, donde exactamente el doble del producto se acumula en cada ciclo (precisamente cuando los componentes de la reacción aún no se han consumido).

La reacción de PCR en la fase exponencial es muy específica y precisa lo que la diferencia de lo que sucede en la fase lineal y de saturación, que es donde se analizan los productos de la PCR cualitativa en geles de agarosa con tinción de bromuro de etidio.

En la PCR a tiempo real se emplean dos tipos de sistemas de detección por fluorescencia: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos diseñadas de manera especial.

Los agentes intercalantes son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a una molécula de ADN de doble hélice. El más empleado es el SYBR Green I. La fluorescencia emitida se incrementa de forma proporcional al ADN que se forma en cada ciclo de PCR.

Este sistema tiene la ventaja de ser más barato que las sondas específicas. Sin embargo el principal inconveniente del SYBR Green es su baja especificidad, puesto que se unen de manera indistinta a productos que se pueden generar inespecíficamente o a dímeros de los propios oligonucleótidos de la reacción.

Las sondas de hibridación específicas son sondas (pequeños cebadores) marcadas con dos tipos de fluorocromos: uno donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas.

Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, también conocidas como sondas TaqMan.

Gracias a la alta especificidad de los cebadores y las sondas TaqMan es posible distinguir el patógeno de estudio de entre las especies filogenéticamente más relacionadas en la cavidad bucal, por lo que su uso es el más extendido en la cuantificación de bacterias.

Las sondas Taqman son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor o apantallador en el



extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Esto ocurre mientras las moléculas donadora y aceptora están próximas, debido a que el espectro de emisión del primero se solapa con el espectro de absorción del segundo.

Durante la amplificación del ADN diana la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador.³⁰ De este modo, al estar separados el fluorocromo del apantallador (quencher) se incrementa la señal fluorescente del primero, la cual es captada por el lector del termociclador.

¿Cómo se cuantifica?

En los termocicladores de QPCR el programa informático va registrando el incremento de fluorescencia, que es proporcional al incremento del ácido nucleico en cada ciclo, y esta información se refleja gráficamente en curvas de cinética de la reacción o de amplificación (Amplification Plot). Por tanto es posible registrar la amplificación en los primeros ciclos de la reacción. La detección en estos ciclos iniciales es importante porque la concentración de los reactivos todavía no es limitante y el efecto de la variabilidad en la eficiencia de amplificación es menos importante.³¹

El análisis cuantitativo de los datos se traduce en la evaluación de las curvas de cinética de la reacción, en las que se representa la fluorescencia detectada versus el número de ciclos de PCR (Fig. 7).



Fig. 7. Periscan. Test desarrollado para medir la actividad proteolítica de determinadas bacterias mediante reacción colorimétrica.

Para cada muestra, el número de ciclos necesarios para interceptar el valor umbral se llama "ciclo umbral" o "threshold cycle" (Ct). El Ct es inversamente proporcional al número de copias iniciales del ADN muestra. Por tanto,

cuando realizamos una cuantificación absoluta y representamos gráficamente el logaritmo de la cantidad inicial de ADN de estándares de concentración conocida versus el Ct, el resultado es una línea recta. Se pueden analizar diferentes diluciones decimales del mismo estándar, preferentemente en triplicado, de esta manera construiremos una recta patrón para luego determinar la cantidad de ADN de cualquier muestra problema.

Otro método de cuantificación es la cuantificación relativa, que nos permite determinar cuantas veces (más o menos) de ácido nucleico de una muestra hay con respecto a un tejido o muestra de referencia así los resultados son expresados de manera relativa y no se necesita de una curva de calibración.

¿Por qué cuantificar las especies microbianas subgingivales?

La presencia o ausencia de la bacteria puede no ser suficiente para evaluar los efectos terapéuticos de algún tratamiento por lo que la cuantificación de los niveles o proporciones de las especies en el biofilm proporciona un mejor resultado. La ventaja de cuantificar las concentraciones de las especies sobre la información acerca de su presencia o ausencia, ha sido evidenciada por autores como Haffajee y Socransky.³² Estos autores describieron el impacto de las concentraciones de los agentes patógenos periodontales, tales como Pg y Aa, concluyendo que el riesgo de progresión de la enfermedad aumentaba notablemente en zonas donde la concentración de estas bacterias era mayor de 10^5 ó 10^6 .

Con el empleo de la PCR a tiempo real y utilizando una sola copia de los genes por célula se puede medir una buena correlación entre la señal fluorescente y el número de células. Morillo et al.,³³ realizaron un ensayo de QPCR basado en un gen de una sola copia para cuantificar Aa y Pg en muestras subgingivales. Estos experimentos demostraron un alto grado de especificidad, reproducibilidad y consistencia del método para cuantificar estas especies bacterianas.

Cabe señalar que uno de los principales inconvenientes de la QPCR es el coste que conlleva, sobre todo cuando se utilizan sondas Taqman, ya que requiere la sintetización de diferentes sondas para las distintas secuencias, lo que encarece el coste del análisis.

TESTS DESARROLLADOS ESPECIFICAMENTE PARA PATÓGENOS PERIODONTALES

En adición a los métodos de análisis del ADN también existen otros métodos enzimáticos para la detección de patóge-



nos. En general estos métodos no detectan especies específicas de bacterias sino que indican la presencia de enzimas con potencial destructivo del tejido periodontal producidas por un grupo de bacterias periodontopatógenas.

Las enzimas utilizadas incluyen colagenasas, peptidasas, enzimas tripsínicas, proteasas y elastasas. Las colagenasas por ejemplo las producen una gran variedad de bacterias además del huésped. En aplicación periodontal, las colagenasas bacterianas pueden diferenciarse de las colagenasas originadas por las células del huésped mediante electroforesis, aunque su aplicación clínica es limitada.

Para la detección de la actividad de enzimas tripsínicas se comercializó un test, el Perioscan[®] con capacidad para medir la actividad proteolítica de enzimas similares a la tripsina para degradar un sustrato sintético conocido como BANA (N- benzoil -DL-arginina - 2 naftilamida), actividad aparentemente específica para tres microorganismos: P.gingivalis, B. forsythus y T. denticola^{5,13} (Fig. 8).

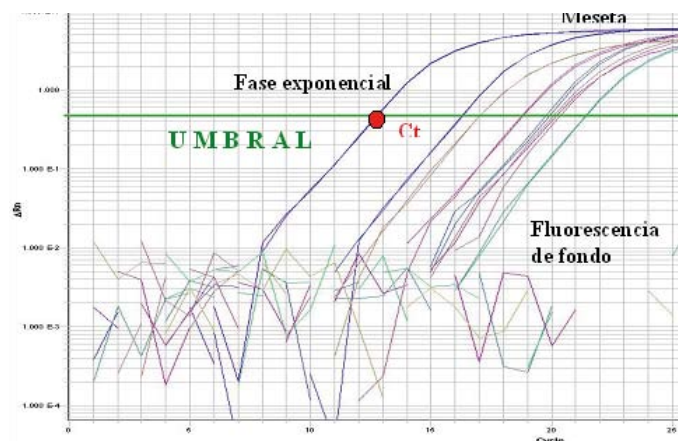


Fig. 8. Curvas de Amplificación por PCR Cuantitativa
Curvas de amplificación de diluciones seriadas ADN
- LíneaBase o Baseline: Ciclos iniciales de PCR, donde no hay cambios significativos en la señal de fluorescencia. Determina la fluorescencia basal.
- Umbral o Threshold: Nivel determinado automáticamente o manualmente y fijado en la región exponencial de la gráfica de amplificación, por encima de la línea base, determina el nivel de fluorescencia significativamente superior a la fluorescencia basal. Se emplea para la determinación del Ciclo umbral o Ct.
- Ct: Ciclo umbral, ciclo en el que la fluorescencia de la muestra supera el umbral. Se calcula en escala logarítmica.

Esta degradación se puede medir por un método colorimétrico mediante la reacción de la β naftilamida con el negro de Evans, los diferentes tonos de azul indican la presencia bacteriana en la muestra. La intensidad de la reacción colorimétrica es proporcional a la concentración de esas especies bacterianas en la muestra.³⁴

Este método ha demostrado una concordancia en 55-73% con el ELISA para P. gingivalis y T. denticola y el 51-70% de concordancia con mediciones clínicas de enfermedad periodontal tales como sangrado al sondaje o profundidad de sondaje.⁴

Entre las ventajas de este test figura el ser una prueba rápida, sencilla y barata. Como inconveniente destaca el que no se puede hacer un diagnóstico microbiológico específico.

Por otra parte cabe la posibilidad de que el test de positivo en localizaciones sanas si estas albergan alguna especie BANA positiva en número suficiente, además sólo detecta un número limitado de patógenos periodontales y no da información acerca de la sensibilidad de la flora frente a antibióticos. Este test resulta más interesante para detectar la presencia de bacterias más que para interpretar marcadores de virulencia.

CONCLUSIONES

La aplicación de métodos de laboratorio para la identificación de patógenos periodontales, siempre en estrecha relación con otros métodos empleados para el diagnóstico de la enfermedad periodontal, posibilita un mejor manejo y seguimiento de los pacientes.

Los continuos progresos en el campo de la microbiología periodontal y métodos de diagnóstico por laboratorio, permiten un mejor entendimiento de la compleja ecología microbiana que existe a nivel subgingival y ayuda a definir las interacciones existentes entre las bacterias y el huésped con enfermedad periodontal activa.

El diagnóstico microbiológico de la enfermedad periodontal es una valiosa herramienta en el tratamiento de la periodontitis, la composición de la flora subgingival y los niveles de especies patógenas difieren entre individuos así como de un sitio a otro. Ningún tratamiento único será eficaz para todos los individuos, y las directrices para un tratamiento adecuado deberían optimizar los aspectos relacionados con el pronóstico y la eficacia terapéutica para cada individuo.

El objetivo de las pruebas microbiológicas debe ir encaminado a desarrollar el tratamiento más adecuado para el perfil microbiano específico del paciente. Las reducciones en el complejo patógeno del individuo serán de esta forma, mayores y más fáciles de mantener, lo que llevará a una estabilidad clínica prolongada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Armitage, G.C.: "Periodontal diseases: Diagnosis." *Annals of Periodontology* 1996;1(1):37-53.
2. Carasol, M.; Alánde, F.J.; Herrera, J.I.; Sanz, M.: "El diagnóstico microbiológico de las enfermedades periodontales I. Relación con la etiopatogenia." *Periodoncia* 1997;7(4):215-26
3. Grossi, S.G.; Zambon, J.J.: "Assessment of risk for periodontal disease I. Risk indicator for attachment loss." *J Periodontol* 1994;65:260-67.
4. Zambon, J.J.; Haraszthy, V.: "The laboratory diagnosis of periodontal infections." *Periodontology* 2000,1995;7:69-82.
5. Listgarten, M.A.: "Microbiological testing in the diagnosis of periodontal disease." *J Periodontol* 1992;63:332-37.
6. Erick, S.; Pfister, W.: "Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples." *J Clin Periodontol* 2003;29:638-40.
7. Carasol, M.; Herrera, J.I.; Alánde, F.J.; Sanz, M.: "El diagnóstico microbiológico de las enfermedades periodontales II. Métodos "clásicos" utilizados para la detección de patógenos." *Periodoncia* 1998;8(1):3-10.
8. Listgarten, M.A.; Lai, C.H.; Young, U.: "Microbial composition and pattern of antibiotic resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis." *J Periodontol* 1993; 64:155-61.
9. Mombelli, A.: "Microbiological monitoring". *J Clin Periodontol* 1996;23:251-57.
10. Carasol, M.; Alánde, F.J.; Herrera, J.I.; Sanz, M.: "El diagnóstico microbiológico de las enfermedades periodontales III. Nuevas tecnologías para la detección de patógenos." *Periodoncia* 1998;8(2):12-8.
11. Zambon, J.J.; Reynolds, H.S.; Chen, L.; Genco, R.L.: "Rapid identification of periodontal pathogen in subgingival dental plaque. Comparison of indirect immunofluorescence microscopy with bacterial culture for detection of bacteroides gingivalis." *J Periodontol* 1985,Suppl:32-40.
12. Di Mauro, J.J.; Paolantonio, M.; Pedrazzoli, V.; Lopatin, E.; Caltabriga, M.: "Occurrence of porphyromonas gingivalis, bacteroides forsythus and treponema denticola in periodontally healthy and diseased subject as determined an ELISA technique." *J Periodontol* 1997;68:18-23.
13. Offenbacher, S.; Colling, J.C.; Arnold, R.R.: "New clinical diagnostic strategies based on pathogenesis of disease." *J Periodon Res* 1993;28:523-35.
14. Wolf, L.F.; Anderson, L.; Sandberg, G.P.: "Bacterial concentration fluorescence immunoassay (BCFIA) for the detection of periodontal pathogens in plaque." *J Periodontol* 1991;63:1093-1101.
15. Snyder, B.; Zambon, J.J.; Reynolds, H.: "Clinical significance of EVALUSITE TM periodontal test sensitivity in adult periodontitis." *J Dent Res* 1994;73:305-12.
16. Tew, J.G.; Marshall, D.R.; Moore, W.; Best, A.M.; Palkanis, K.G.; Ranney, R.R.: "Serum antibody reactive with predominant microorganisms in the subgingival flora of young adults with generalized severe periodontitis." *Infect Immun* 1985;48:303-34.
17. Schenk, K.: "IgA, IgG and IgM serum antibodies against lipopolysaccharide from bacteroides gingivalis in periodontal health and disease." *J Periodontol Res* 1985;20:368-77.
18. Di Rienzo, J.M.; Slots, J.; Sixon, M.; Sol, M.A.; Harmon, R.; Mc Koy, T.L.: "Specific antigenic variants of actinobacillus actinomycetemcomitans correlate with disease and health in a regional population of families with localized juvenile periodontitis." *Infect Immun* 1994;62:3058-65.
19. Shah, H.N.; Garbic, S.E.; Senlhy, C.; Finegold, S.M.: "Oligonucleotide probes to the 16 S ribosomal RNA: implications of sequence homology and secondary structure with particular reference to the oral species prevotella intermedia and prevotella nigrescence." *Oral Diseases* 1995;1:32-6.
20. Fine, D.H.: "Incorporating new technologies in periodontal diagnosis into training programs and patient care: A critical assessment and a plan for the future." *J Periodontol* 1992;63:383-93.
21. Izquierdo, M.: "Transferencia génica a organismos enteros. En: Izquierdo M. Ed. Ingeniería genética y transferencia génica. 1ª Edición. Madrid. Pirámide. 1999:239-280. Ingeniería genética y transferencia génica." Ed Pirámides S.A. 1999;85-99.
22. Yuan, K.; Hsu, P.; Tseng, Ch.C.; Kiang, D.; Wang, J.: "Detection rate of actinobacillus actinomycetemcomitans on the permanent first molars of primary school children in Taiwan by polymerase chain reaction." *J Clin Periodontol* 2001;28:348-352.
23. Conrads, G.; Mutters, R.; Fischer, J.; Brauner, A.; Lülticken, R.; Lampert, F.: "PCR detection and Dot-Blot Hybridization to monitor the distribution of oral pathogens within plaque samples of periodontally healthy individuals." *J Periodontol* 1996;67:994-1003.
24. Griffen, A.L.; Leys, E.S.; Fuerst, P.A.: "Strains identification of actinobacillus actinomycetemcomitans using the polimerasa chain reaction." *Oral microbial Immunol* 1997;7:240-43.
25. Loomer, P.: "Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases." *Periodontology* 2000. 2004;34:49-56.
26. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. "Real time quantitative PCR". *Genome Res* 1996; 6: 986-994.
27. Lyons SR, Griffen AL, Leys EL. "Quantitative real time PCR for porphyromonas gingivalis and total bacteria". *J Clin. Microbiol* 2000. 38: 2362-2365
28. Martin FE, NAdkani MA, Jacques Na, Hunter N. "Quantitative microbiologicals study of human carious dentine by culture and real time PCR: association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis". *J Clin Microbiol* 2002: 40: 1698-1704.
29. Nadkani MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. "Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers". *Microbiology* 2002: 148: 257-266.
30. Holland PM, AAbanson RD, Watson R, Gelfand DH. "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonucleasa activity of Thermus aquaticus DNA polymerase". *Proceeding of The National Academy of Science USA* 1991; 88:7276-80.
31. Costa, Joseph. "Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real". *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2004; 22 (5): 299-305
32. Microbiological goal of periodontal therapy. *Teles.RP; Haffajee, A D.; Socransky S. Periodontology* 2000; 2006;42:180-216
33. Morillo, J. M., Lau, L., Sanz, M., Herrera, D. & Silva, A. "Quantitative real-time PCR based on single copy gene sequence for detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis". *Journal of Periodontal Research*. 2003; 38: 518-524.
34. Loesche, N.J.; Lopatin, D.E.; Giordano, J.; Alcororado, G.; Hujoel, P.: "Comparison of the benzoin-DL-arginine naphthyl lamide (BANA) test, DNA probes and immunological reagents for ability to detect anaerobic periodontal infections due to porphyromonas gingivalis, bacteroides forsythus and treponema denticola." *J Clin Periodontol* 1992;30:427-33.