

Con el objeto de presentar una visión general de los agentes microbianos en la enfermedad periodontal; se revisa la conceptualización etiológica, el listado de microorganismos relacionados y las Técnicas de diagnóstico, señalando las ventajas y limitaciones.

Palabras clave: Enfermedad periodontal, etiología, microorganismos, Técnicas diagnósticas.

In order to show a global vision of bacterial agents in periodontal disease, it is reviewed the etiologic factor of bacterial microorganisms in periodontal disease the related microorganisms and diagnostic techniques pointing out its advantages and limitations.

Key words: Periodontal disease, etiology, microorganisms, diagnostics technics.

1. INTRODUCCIÓN

Para enmarcar el artículo es conveniente presentar el siguiente marco conceptual: El término enfermedad periodontal (EP) alude a procesos patológicos de tipo reversible como es el caso de la gingivitis y los que ocasionan pérdidas de las estructuras del periodonto: ligamento y hueso alveolar en caso de periodontitis, siendo éstos de carácter irreversible. El factor etiológico esencial es la biopelícula de placa dental. (1)

Cuando se desarrolla una gingivitis o una periodontitis en realidad lo que se produce es un desequilibrio entre los microorganismos (MO) y los mecanismos de defensa (MD) del hospedero.

Acerca de rol de la placa dental en la etiología de la EP se han propuesto 3 teorías:

Placa no específica: que considera que el desarrollo de la EP es el resultado de la interacción de los MO con el hospedero. La remoción de los MO ha devenido en la prevención y control de la gingivitis y periodontitis. (2)

Placa ecológica: postula que los cambios en los factores ambientales en un sitio, es la clave para la predisposición de la EP. Un cambio en el ecosistema produce una alteración de la estabilidad. (3)

Placa específica: considera que sólo un determinado número de MO están relacionados con la EP. Sin embargo

se ha observado casos en que no se han encontrado los MO específicos, ó si los hay, no se ha presentado la enfermedad. (4)

Por tanto, la conceptualización de la etiología de la EP radicaría en una complementariedad de las tres teorías anotadas. (5)

También se ha introducido el concepto de que algunos tipos de EP pueden ser infecciones exógenas. En la actualidad estas infecciones exógenas han recibido el nombre de infecciones periodontales verdaderas, mientras que las endógenas se consideran infecciones periodontales por bacterias comensales.

El establecimiento y las proporciones relativas de MO subgingivales en estos sitios profundos están influidos por células epiteliales e inflamatorias y por los productos finales del metabolismo bacteriano. Esta área retentiva determina un medio en el cual pueden colonizar los MO que no pueden adherirse con facilidad a las superficies duras pero que si pueden adherirse a otras bacterias y al epitelio de la bolsa, la luz de la bolsa es un acceso directo a los nutrientes (principalmente proteínas) presentes en el exudado del surco y la placa subgingival (Psg) proporciona un ambiente físico con bajo nivel de óxido-reducción que permiten que lleguen a establecerse las bacterias anaerobias.

En estas condiciones locales los factores ambientales del hospedero facilitan una microbiota subgingival específica cuyo aumento genera un cambio patológico. Las observaciones realizadas han demostrado que las

¹ Profesor Principal de Microbiología, Jefe de Sección de C. Dinámicas, D. A. Ciencias Básicas., Miembro permanente del Instituto de Investigación Estomatológica, Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos E-mail: HMNBIO@hotmail.com.

bacterias y otros MO de la Psg vinculada con el epitelio pueden penetrar en el tejido conectivo gingival y colonizarlo. (6-8)

En los últimos tiempos se ha logrado avances en cuanto al conocimiento de la composición y estructura de la placa dental en especial de la Psg. Estos avances se deben sobre todo al empleo de colección de muestras, dispersión y cultivos bacterianos en anaerobiosis que permiten recuperar numerosas bacterias así como estudios experimentales y observaciones por microscopía electrónica.

Dentro de este marco conceptual, el artículo revisa principalmente el aspecto de los microorganismos y su hallazgo a través de los diversos métodos diagnósticos someramente descritos. Se presenta igualmente, conceptos sobre biopelícula bacteriana y composición de la microflora periodontal

2. BIOPELÍCULA DE LA PLACA DENTAL

Está conformada por los microorganismos adheridos a la placa dental, a manera de depósito blando, denso; que contiene además polímeros salivales y productos extracelulares. Las investigaciones recientes la mencionan como una comunidad ecológica. (9). Se le considera también como agentes de la caries dental y EP, asociados a las formaciones supragingival y subgingival, respectivamente. La placa puede calcificar formando el sarro o cálculo dental.

COMPOSICIÓN DE LA MICROFLORA

Normalmente la microflora periodontal esta compuesta de una compleja asociación de especies bacterianas. (10) La mayoría de los estudios describen más de 300 especies bacterianas, o grupos, en la Psg. (11) En reunión de la Academia Americana de Periodontología en 1996, se arribó al consenso de que: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *B. forsythus*, *P. intermedia* y *T. denticola*, pueden ser consideradas como causantes verdaderos periopatógenos. De ellos: *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* están considerados como exógenos, invasores y transmisibles, mientras que *B. forsythus*, *P. intermedia* y *T. denticola* son endógenos y oportunistas. (12)

Las evidencias del rol bacteriano en la enfermedad periodontal implica lo siguiente:

- La existencia de diferentes perfiles bacteriales en: salud, gingivitis experimental, gingivitis crónica, y otras formas de EP. (13)
- La presencia de un incremento proporcional de algunas especies en lugares con evidencia de pérdida reciente de adherencia. (14)
- Caracterización de factores de virulencia. (15)
- Correlación entre bacterias periodontogénicas y

pérdida de adherencia. (16)

- Presencia de altos niveles de especies periodontopáticas é incrementos de riesgos. (17)

Sin embargo aún queda la interrogante respecto a la presencia de los microorganismo específicos como un factor de riesgo ó un indicador de riesgo para la EP.

En los cuadros 1 y 2 se muestran la distribución y composición de la flora microbiana periodontal, asociadas a grados de la enfermedad priodontal.

3. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

Existen diversos métodos y técnicas para el estudio y la identificación de patógenos periodontales, como los tradicionales: microscopía, cultivos, inmunología, hasta los más modernos como los de aplicación de la biotecnología: técnicas moleculares.

3.1 MICROSCOPÍA DIRECTA

Puede proporcionar datos útiles, mediante la microscopía de campo oscuro y contraste de fase, permite el monitoreo de la terapia periodontal no quirúrgica, con la evaluación de las proporciones relativas de las formas y motilidad de la flora subgingival. Los cambios son de importancia clínica, debido a la correlación que existe entre la proporción de formas móviles, en especial las espiroquetas y la profundidad de la bolsa periodontal. Sirve de tamiz y motivación de los pacientes. La microscopía electrónica permite estudiar la estructura, distribución y cambios comparativos de los MO en la placa. La desventaja de la microscopía es que sólo es posible establecer morfotipos y no géneros ni especies bacterianas.

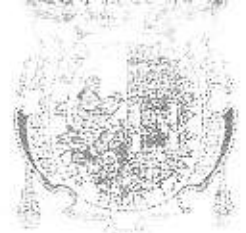
3.2 MÉTODOS DE CULTIVO:

Este método considerado el estandar de oro, permite realizar recuentos bacterianos para establecer proporciones relativas, mediante métodos cuantitativos haciendo uso de medios no selectivos, en este caso hay necesidad de considerar los errores en la aplicación de los métodos utilizados.

Cuando se utilizan los medios selectivos, es posible recuperar determinados microorganismos, aquí es importante igualmente la proporción y tener la certeza que todas las colonias consideradas realmente corresponden a la especie en estudio. Por otro lado hay que recordar que no todas las bacterias presentes en la muestra desarrollaran en un medio de cultivo. Algunas referencia puede ser G. Christopher, (19) y Moromi. (20,21)

3.3 INMUNOENSAYOS

Las reacciones inmunológicas pueden ser



Cuadro 1. Microorganismos asociados a varias formas de periodontitis

ESPECIES	Periodontitis agresiva localizada	Periodontitis agresiva	Periodontitis crónica	Periodontitis refractaria	Fracaso en regeneración tisular guiada
<i>Fusobacterium</i> sp	+	++	+++	++	+++
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	+++	++	++	++	++
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	±	+++	+++	++	++
<i>Prevotella intermedia / P nigrescens</i>	++	+++	+++	+++	+++
<i>Bacteroides forsythus</i>	±	++	+++	++	++
<i>Campylobacter rectus</i>	+	++	++	+	+++
<i>Peptostreptococcus micros</i>	±	++	+++	++	+++
<i>Eubacterium</i> sp	-	+	++	+	+
<i>Treponema</i> sp	++	+++	+++	++	++
Enterobacterias y <i>Pseudomonas</i>	-	-	±	+	±
<i>Streptococcus</i> ã hemolíticos	?	++	++	++	+
<i>Candida</i> sp	-	-	-	±	-

Fuente: Mombelli. (18) - = No elevado en comparación a salud. ± = aislamiento ocasional. + = Menos del 10 % de pacientes positivos. ++ = Menos del 50 % de pacientes positivos. +++ = Más del 50 % de pacientes positivos. ? = Desconocido

Cuadro 2. Especies microbianas asociadas con la salud y enfermedad periodontal

<p>Salud:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Streptococcus sanguis</i> • <i>Streptococcus mitis</i> • <i>Veillonella parvula</i> • <i>Actinomyces naeslundii</i> • <i>Actinomyces viscosus</i> • <i>Rothia dentocariosus</i> <p>Gingivitis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Actinomyces</i> sp • <i>Streptococcus</i> sp • <i>Veillonella</i> sp • <i>Fusobacterium</i> sp • <i>Treponema</i> sp • <i>Prevotella intermedia</i> <p>Periodontitis crónica:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Treponema</i> sp • <i>Prevotella intermedia</i> • <i>Porphyromonas gingivalis</i> • <i>Bacteroides forsythus</i> • <i>Peptostreptococcus micros</i> • <i>Campylobacter rectus</i> • <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Eikenella corrodens</i> • <i>Fusobacterium</i> sp • <i>Selenomonas</i> sp • <i>Eubacterium</i> sp <p>Periodontitis agresiva en niños:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> • Otras especies desconocidas <p>Periodontitis agresiva en adultos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> • <i>Porphyromonas gingivalis</i> • <i>Bacteroides forsythus</i> • <i>Campylobacter rectus</i> • <i>Eikenella corrodens</i> <p>Periodontitis refractaria:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> • <i>Porphyromonas gingivalis</i> • <i>Prevotella intermedia</i> • <i>Bacteroides forsythus</i> • <i>Campylobacter rectus</i> • <i>Peptostreptococcus micros</i> • Bacilos entéricos • <i>Candida albicans</i>
--	---

Fuente: Listgarden. (7)

clasificadas como primarias (interacción directa Ag-Ac), secundarias (reacciones observables como precipitación, aglutinación y fijación de complemento).

Las terciarias se refieren a efectos biológicos como opsonización, fagocitosis y quimiotaxis. (22-23)

En general en los inmunoenzayos, existen técnicas

de inmunomarcado, que mediante procedimientos diversos, permiten detectar y cuantificar tanto anticuerpos como antígenos. Dependiendo de la sustancia utilizada como marcador se pueden clasificar en inmuno fluorescencia (IF, con conjugado fluorescente), inmunoensayo enzimático (ELISA, con marcador enzimático) y radioinmunoanálisis (RIA, con isótopo radiactivo). Se requiere de anticuerpos monoclonales o policlonales. Las ventajas son su sensibilidad, sencillez y rapidez. Permite la confirmación de pruebas positivas mediante inmuno fluorescencia por ejemplo. Desventajas de estos procedimientos es que la especificidad puede dificultarse si hay reactivos que se cruzan con especies no incluidas en la batería o con bacterias no cultivables, se identifican generalmente determinadas especies o grupos relacionados. El costo elevado es otra desventaja especialmente en RIA. Algunas referencias de inmunoensayos: (24-26)

En la práctica clínica es útil la prueba de aglutinación en látex, no requiere de instrumentos y demora aproximadamente 30 minutos, se puede detectar patógenos en determinados sitios como conductos radiculares infectados o la distribución de ellos.

3.4 PRUEBAS ENZIMÁTICAS

Estas pruebas no detectan especies bacterianas específicas, sino que indican la presencia de enzimas relacionadas con destrucción de tejidos periodontales y proceden principalmente de bacterias patógenas periodontales, aunque no exclusivamente. La colagenasa, por ejemplo es de origen bacteriano (*B. forsythus*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *Capnocytophaga*) así como de las células del hospedero, y puede ser detectado por la degradación de un sustrato sintético (BANA), mediante la presencia del color azul-negruzco. Esta enzima se relaciona con parámetros clínicos: sangrado, profundidad de la bolsa periodontal y presentación clínica. Otras enzimas importantes: peptidasas, proteasas, enzimas semejante a la tripsina etc. (27)

3.5 PRUEBAS CON TÉCNICAS MOLECULARES.

Con el nombre de Diagnóstico Molecular se engloban una serie de técnicas basadas en el análisis del DNA o ácido desoxirribonucleico, que es la molécula que recoge toda la información genética, gracias a la ingeniería genética. Dicho análisis puede tener dos objetivos: la detección de microorganismos de forma rápida y eficaz, así como el estudio de variaciones en los genes humanos que pueden condicionar la aparición de enfermedades. La identificación mediante técnicas de hibridación se realiza con el uso de sondas (segmento con secuencia complementaria a una de las hebras de DNA), que son marcadas con un isótopo radiactivo o enzima,

cuya lectura es por autorradiografía y colorimetría respectivamente. Algunas técnicas son el Southern blotting, PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y «Checkerboard». Esta última desarrollada por Socransky para la microflora oral, se aplican para especies como *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *B. forsythus*, *P. intermedia*, y *T. denticola* relacionadas con procesos periodontales. Desde 1995 se evalúan para ser aplicados como standards para 18 especies periopatógenas, así como el análisis de saliva y sensibilidad antibiótica. Algunas referencias de técnicas moleculares: (28-31)

Estas técnicas moleculares, sirve para estudios epidemiológicos, a nivel general para determinación algunas enterotoxinas, identificación de genes de resistencia, identificación de especies difícil de cultivar o no cultivables, clonación de secuencias de genes etc. Las desventajas es el tiempo, costo, duración de los reactivos y disminución de la sensibilidad y especificidad para uso en muestras en forma directa.

4. VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LA PRUEBAS DIAGNÓSTICAS MICROBIANAS EN LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL.

Las técnicas de cultivo presenta la ventaja de detectar especies insospechadas, aunque hay dificultad para la obtención de una muestra significativa en muchos casos, a diferencia de las otras técnicas como inmunoensayos, DNA etc. En esta última es notoria el aumento de la sensibilidad y especificidad.

La aplicación de estas pruebas para detección de patógenos periodontales no son indicados en todos los casos, se recomienda en pacientes con periodontitis agresiva, con enfermedad refractaria, con tratamientos protésicos, implantes, terapia regenerativa o los que padezcan o tengan riesgo de enfermedad cardiovascular.

5. CONCLUSIONES

Los diversos métodos y técnicas que se ofrecen para el estudio y la determinación de las diferentes especies relacionadas con la enfermedades periodontal, permite seleccionarlas de acuerdo al objetivo del estudio, ya que cada una de ellos tienen ventajas y limitaciones que es necesario evaluar para obtener la mejor información en beneficio de los pacientes y la comunidad.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Efraim Sueldo y a la Srta. CD Rocío Jerí, por facilitar parte de la bibliografía citada en la presente publicación.



6. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Costerton JW, Lewandowsky Z, Caldwell D, Korber D, Lappin-Scott H. Microbial biofilms. *Ann Rev Microbiol.* 1995;49:711-45.
2. Theilade E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1986;13:905-911.
3. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv. Dent Res.* 1994;8:263-271.
4. Loesche WJ. Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sci Rev.* 1976;9:65-107.
5. Axelsson P. Diagnosis and Risk Prediction of Periodontal Diseases. Quintessence Publishing Co. Inc Slovakia. 2002;3.
6. Frank RM, Vogel J. Bacterial bone resorption in advanced cases of human periodontitis. *J Periodont Res.* 1978;13:251-61.
7. Listgarten MA. Structure of microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. *J Periodontol.* 1976;47:1-18.
8. Saglie FR, Marfany A, Camargo P. Intra-gingival occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* in active destructive periodontal lesions. *J Periodontol.* 1988;59:265.
9. Costerton JW, Lewandowsky Z, Caldwell D, Korber D, Lappin-Scott H. Microbial biofilm. *Ann Rev Microbiol.* 1995;49:711-745.
10. Listgarten MA, Helldén L. Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans. *J Clin Periodontol.* 1978;5:115-32.
11. Moore W, Moore L. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 1994;5:66-77.
12. American Academy of Periodontology. Consensus report. Periodontal diseases: Pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol.* 1996;1:926-32.
13. Listgarten MA. The structure of dental plaque. *Periodontol 2000.* 1994;5:52-65.
14. Dzink J, Socransky S, Haffajee A. The predominance of cultivable microbiota of active or inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1988;15:316-23.
15. Socransky SS, Haffajee. Microbial mechanism in the pathogenesis of destructive periodontal diseases a critical assessment. *J Periodontal Res.* 1991;26:195-212.
16. Mattei EE, Dunford R, Hausmann E, et al. Longitudinal study of prognostic factors in established periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 1977;24:102-109.
17. Haffajee AD, Socransky S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 1994;5: 78-111.
18. Mombelli A. The role of dental plaque in the initiation and progression of periodontal diseases. In: Lang NP. Ed. Proceedings of the European Workshop on the Mechanical Plaque Control. Berlin: Quintessence. 1998:85-97.
19. Christopher GD, David HM, y cols. Bacteremia Due to Periodontal Probing: A Clinical and Microbiological Investigation. *J Periodontol.* 2001;72:210-214.
20. Moroni NH, Dávila NJ. Morfotipo de colonias de cepas de *Candida* de pacientes atendidos en la Clínica Odontológica. *Odontol Sanmarquina (Lima).* 1998;1(1):11-13.
21. Moroni NH, Calle ES, Zambrano De la PS. Prevalencia de *Helicobacter pylori* en pacientes con gingivitis y enfermedad periodontal. *Odontol Sanmarquina.* 2001;1(7):23-26.
22. Koneman E, et al. Diagnóstico Microbiológico. Mexico: Ed. Medica Panamericana. 1997:862-877.
23. Negroni M. Microbiología estomatológica. Editorial medica panamericana 1999:507-525.
24. Eggert F-M, Flowerdew G, y cols. Diagnostic utility of specific microbiological markers for periodontal diseases. *J Periodontol.* 1998;69:1373-81.
25. Eggert F-M, McLeod MH, y cols. Periodontitis-associated marker bacteria in an urban North American population: Application of a commercial immunoassay. *J Periodontol.* 1998;69:1382-91.
26. Eggert F-M, McLeod MH, Flowerdew G. Performance of commercial immunoassay for detection and differentiation of periodontal marker bacteria: Analysis of immunochemical performance with clinical samples. *J Periodontol.* 2001;72:1201-1209.
27. Axelsson P. Diagnosis and risk prediction of periodontal diseases. Chicago: Quintessence Publ Inc. 2002:87.
28. French CK, Savitt ED, y cols. DNA probe detection of periodontal pathogens. *Oral Microb Immunol.* 1986; 1:58-62.
29. Savitt ED, Strzempko MN, Vaccaro KK, Peros WJ, French CK. Comparison of cultural methods and DNA probe analyses for the detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius*. *Bacteroides intermedius* in subgingival plaque samples. *J Periodontol.* 1988;59:431-438.
30. Zappa U, Reinking-ZM, Graf H, y cols. Comparison of serological and DNA probe analyses for detection of suspected periodontal pathogens in subgingival plaque samples. *Arch Oral Biol.* 1990;35 (Suppl):161S-164S.
31. Allundar JM, Olsen I, Gjermo P. Associations between six DNA probe-detected periodontal bacteria and alveolar bone loss and other clinical signs of periodontitis. *Acta Odontol Scand.* 1990;48:415-423.