

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA



**Detección de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*,
Streptococcus intermedius y *Bacteroides forsythus* mediante
PCR múltiple a partir de pacientes con periodontitis del adulto.**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO**

PRESENTA

ARTEMISA PEREA DE LA CERDA



TL
RK450
.P4
P4
1999
c.1

DE LOS GARZA, N. L.

DICIEMBRE DE 1999

UN

D

Detect

Stre

PCR

QU

TL

RK450

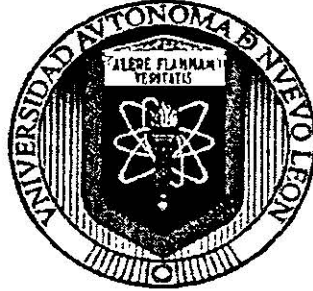
.P4

P4

1999

c.1

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA



**Detección de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*,
Streptococcus intermedius y *Bacteroides forsythus* mediante
PCR múltiple a partir de pacientes con periodontitis del adulto.**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO**

PRESENTA

ARTEMISA PEREA DE LA CERDA

TL
RK450
.P4
P4
1999



1080092548



INDICE

	Página
Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Lista de Abreviaturas	iii
Indice de Tablas	iv
Indice de Figuras	v
Resumen	1
Introducción	2
Hipótesis y Objetivos	4
Antecedentes	5
I. Importancia de la Periodontitis	5
II. Características de la Periodontitis	5
III. Técnicas tradicionales para la identificación de bacterias	9
IV. Nuevas técnicas para la identificación de anaerobios.	9
V. Interacciones bacterianas.	11
VI. Técnicas moleculares para la identificación de bacterias.	12
VII. Sensibilidad de las técnicas moleculares	13
VIII. Principio de la técnica de PCR.	14
IX. Es uso de secuencias 16S y 23S que codifican para el RNAr	15
Materiales y Métodos	17
I. Especificidad de los Iniciadores	17
II. Iniciadores	17
III. Criterios para la toma de muestra.	18
IV. Sensibilidad de la PCR a partir de cultivos puros.	20
Resultados	21
Discusión	27
Conclusiones	33
Apéndices	34

A. Electroforesis horizontal en geles de agarosa y poliacrilamida	35
B. Medios de cultivo y soluciones	37
Literatura Citada	39

DEDICATORIA

A mis padres:

Sra. Estela de la Cerda de Perea (†), porque siempre estas en mi mente y gracias a eso, hoy me realizo como tu querías ver a tus hijos. **Te quiero.**

Sr. Arturo Perea Benitez. Gracias por la confianza que depositaste en mí y espero que esto te llene de orgullo.

A mis hermanas:

Mónica, Danae y Xochitl: Gracias por acompañarme y guiarme en la realización de este sueño, ya que su amistad y cariño me permitió seguir adelante. Las quiero mucho, no cambien.

A mis hermanos:

Andros: Eres una gran persona y espero que esto te motive a seguir adelante, te prometo apoyarte, como tu lo hiciste en los grandes momentos que hemos compartido.

Arturo: Esperando que esto te motive en apoyar a tus hijos en sus realizaciones.

A mis cuñados: **Flor, Pedro** y sobre todo a **Jaime** que sin conocerme me apoyo en todo momento, gracias.

A **Ma. Cruz Garza Treviño (†)** por guiarme y acompañarme cuando mi madre hizo falta. gracias.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
dNTP's	Mezcla de desoxirribonucleotidos trifosfatos
EDTA	Acido etilen-diamino-tetracético
et al	Colaboradores
G	Gramo (s)
h	Hora (s)
Kpd	Kilopares de bases
l	Litro
lb/pulg ²	Libras por pulgada cuadrada
M	Concentración molar
mM	Concentración milimolar
mg	Miligramo
µg	Microgramo
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
µl	Microlitro
n	Nanogramo
pb	Pares de bases
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil-Sulfato de sodio
TBE	Tris-boratos
seg	Segundo
U	Unidades de actividad enzimatica
V	Voltios
X	Número de veces la conc. con respecto a la solución de trabajo

INDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Clasificación de la Periodontitis	6
2	Microorganismos usados para determinar la especificidad de los iniciadores diseñados para la detección de patógenos periodontales.	17
3	Secuencia, ubicación, tamaño y Tm de los iniciadores usados para la reacción de PCR.	18
4	Condiciones del ensayo de amplificación	19
5	Prevalencia de los microorganismos detectados por PCR	23
6	Pacientes positivos a más de una bacteria.	24
7	Proporción de bacterias asociadas en muestras directas.	25
8	Resultados del analisis de X^2 para la posible asociación entre bacterias causantes de periodontitis.	25
9	Comparación de la detección por PCR y los medios de cultivo.	26
10	Nivel de detección que posee la técnica de PCR y los medios de cultivo mediante el analisis de X^2	26

INDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Cavidad oral de un paciente mostrando la lesión característica de la periodontitis	7
2	Radiografía de primera y segunda molar	8
3	Esquema general de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	15
4	Esquema de las secuencias de las subunidades del RNAr.	16
5	Determinación de la especificidad de la PCR para la determinación de bacterias periodontales.	21
6	Determinación de la sensibilidad de la PCR para detección de bacterias periodontales.	22
7	Amplificación genética a partir de cultivos puros y muestras clínicas.	24

RESUMEN

La periodontitis del adulto es una de las enfermedades más comunes del ser humano. Entre los agentes causales de la periodontitis se encuentran las bacterias. El objetivo de este trabajo fue el detectar algunas de las bacterias comúnmente asociadas con la periodontitis del adulto, utilizando la amplificación genética por PCR. Para tal efecto, diseñamos una batería de iniciadores para detectar *Streptococcus intermedius*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* y *Bacteroides forsythus* mediante la amplificación de segmentos del gen que codifica para el rRNA 16S de las bacterias. Los iniciadores amplificaron específicamente las bacterias para las cuales fueron diseñados. La determinación de los niveles de sensibilidad demostró que la técnica puede detectar un mínimo de 27 células en el tubo de reacción y el producto de la amplificación teñido con bromuro de etidio. La detección de las bacterias indicadoras en muestras clínicas directas se realizó a partir de un universo de 52 pacientes diagnosticados con periodontitis del adulto en la consulta de Clínica 43 del IMSS. Los resultados mostraron que 15.3% fueron positivos para alguna de las bacterias. *P. gingivalis* y *P. intermedia* fueron las más frecuentes con 11.0% cada una, en cambio *B. forsythus* fue el menos frecuente, 3.0%. El número de bacterias detectadas varió en los pacientes, en el 3.84%, de los casos positivos detectamos 1 o 2. El caso más frecuente, 5.76%, con tres bacterias. Este es el primer trabajo donde se reporta la detección de 4 bacterias involucradas en la periodontitis del adulto.

Introducción

La gingivitis y la periodontitis del adulto son las dos formas más comunes de enfermedad periodontal humana y ambas son causadas por bacterias orales (Zambon *et al.*, 1995). Se ha estimado que en los Estados Unidos más de 49 millones de personas tienen algún tipo de periodontitis (Cutler *et al.*, 1995) y mundialmente, el 80% de la población padece o ha padecido periodontitis. Estos datos resaltan la importancia de la enfermedad periodontal inflamatoria ya que es la causa principal de la pérdida de piezas dentales en la población adulta (Nisengard *et al.*, 1992).

Es bien conocido que la cavidad oral es un nicho ecológico poblado por alrededor de 300 especies de microorganismos, pero solo algunas juegan un papel importante en la periodontitis (Ashimoto *et al.*, 1996). El surco periodontal provee un ambiente anaerobio que favorece el crecimiento de bacterias anaerobias, predominantemente Gram negativas, entre las que destacan *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Bacteroides forsythus* (Zambon *et al.*, 1995).

Existen ciertos factores que influyen en el desarrollo de la microflora periodontal, sobresaliendo algunas fluctuaciones hormonales, enfermedades sistémicas, infecciones virales, fármacos, alteraciones inmunológicas (Listgarten, 1992) que originan los diferentes tipos de periodontitis: la del adulto, juvenil, progresiva rápida, asociadas con enfermedades sistémicas, ulceronecrotizante y refractaria (Ranney, 1992).

En la actualidad existen algunos métodos para detectar e identificar estas bacterias, como aislamiento en medios de cultivo, ensayos enzimáticos, inmunológicos y moleculares. Los ensayos de aislamiento se usan cada vez menos porque consumen mucho tiempo y son caros; los enzimáticos e inmunológicos son más sensibles que el microbiológico, pero tienen la

desventaja de generar señales ambiguas y reacciones cruzadas. Por tal motivo, se ha optado por los métodos moleculares por su sensibilidad y especificidad (Ashimoto *et al.*, 1996). Entre los métodos moleculares mas utilizados se encuentran la hibridación ADN-ADN (Southern blot), determinación del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y la amplificación de ADN polimórfico (RAPD). Otra técnica la cual ofrece una alta sensibilidad y especificidad de detección es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que tiene la capacidad de amplificar segmentos específicos de ADN. Esto es posible por la amplificación específica de algunas secuencias nucleótidas del organismo blanco. Generalmente, las secuencias de elección se relacionan con genes muy conservados de poca variabilidad, como los que codifican para alguna toxina o para los ARNr 16S y 23S, así como las regiones espaciadoras entre los mismos. Sin embargo, la mayoría de los estudios de detección están basados en la amplificación de secuencias de los genes para los RNAr, especialmente el RNAr 16S (Amann *et al.*, 1994)

Existen varios reportes de la detección de algunas bacterias asociadas con periodontitis del adulto usando PCR (*B. forsythus*, *P. intermedia* y *Streptococcus intermedius*); sin embargo, la amplificación específica de regiones del ARNr 16S se realizó en reacciones por separado (Ashimoto *et al.*, 1996). Es importante resaltar que las reacciones de amplificación fueron realizadas a partir de cultivos puros.

En este trabajo, planteamos la posibilidad detectar *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *B. forsythus* y *S. intermedius* en una sola reacción, esto es, realizar una amplificación múltiple directamente a partir de muestras clínicas.

Hipótesis

La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es altamente sensible y específica, lo que nos permitiría detectar, en una sola reacción, algunas bacterias relacionadas con periodontitis del adulto.

Objetivo General

Detectar la presencia de *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *S. intermedius* y *B. forsythus* mediante la técnica de PCR, a partir de muestras provenientes del surco periodontal.

Objetivos Particulares

- ◆ Conocer la sensibilidad de detección de la técnica (PCR) mediante diluciones a partir de cultivos puros de las bacterias indicadoras.
- ◆ Amplificación génica múltiple para detectar la presencia de *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *S. intermedius* y *B. forsythus*, de muestras directas de pacientes clínicamente sanos y enfermos.
- ◆ Estudiar las asociaciones de las bacterias indicadoras en la enfermedad periodontal.
- ◆ Comparar la sensibilidad y rapidez de la técnica de PCR con el método común (medios de cultivos) para detectar bacterias anaerobias causantes de periodontitis.

Antecedentes

I. Importancia de la periodontitis

Es generalmente aceptado que la microflora de la periodontitis está comprendida principalmente por anaerobios obligados Gram negativos. Además es importante distinguir cuál bacteria(s) predomina en el surco periodontal humano, la cuál se relaciona con la ecología y etiología de la periodontitis (Uematsu *et al.*, 1992).

Un estudio realizado en la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. reporta la incidencia de tres bacterias asociadas a periodontitis, partiendo de un total de 82 pacientes con periodontitis del adulto, encontrando a *P.intermedia* en un 29%, *S.intermedius* 21%, *P.gingivalis* 16% y combinaciones como *P. gingivalis* y *S.intermedius* en un 21% (De la Garza. 1998)

Se ha observado el desarrollo e incremento del uso de exámenes microbiológicos para diagnóstico en el manejo de pacientes con enfermedad periodontal. En años recientes, ha incrementado la evidencia de la asociación de diversos microorganismos colonizadores en las diversas condiciones de periodontitis (Listgarten. 1992).

II. Características de la Periodontitis

Este padecimiento ocurre en los tejidos blandos y duros, la encía es el tejido que se altera; más específicamente es la zona de union entre la encía y el diente donde suceden los cambios patológicos más importantes. Algunos investigadores ahora creen que los tipos específicos de bacterias son la causa de la destrucción del soporte periodontal y del aflojamiento final del diente en las diversas formas de enfermedad periodontal inflamatoria (Tabla 1)

Tabla 1. Clasificación de la periodontitis.

◆ Periodontitis del adulto
I. Periodontitis temprana
Periodontitis prepubertal
Generalizada
Localizada
Periodontitis juvenil
Generalizada
Localizada
Periodontitis rápida progresiva
II. Periodontitis asociada con enfermedades sistémicas
III. Periodontitis ulcerativa necrotizante
IV. Periodontitis refractaria

Los rasgos más importantes que caracterizan el desarrollo de la gingivitis y periodontitis son: La presencia de inflamación bastante intensa y segundo, una profundización del espacio que rodea al diente y que acaba en la formación de una bolsa periodontal (Nolte 1985) (Figura 1). La consiguiente formación de bolsa periodontal se inicia a partir de un depósito ya existente de placa subgingival. Así la composición microbiana de la placa subgingival está parcialmente influida por el depósito microbiano ya existente. El acceso a la cavidad bucal está limitado, lo cual favorece el desarrollo anaerobio (Crawford *et al* 1975).

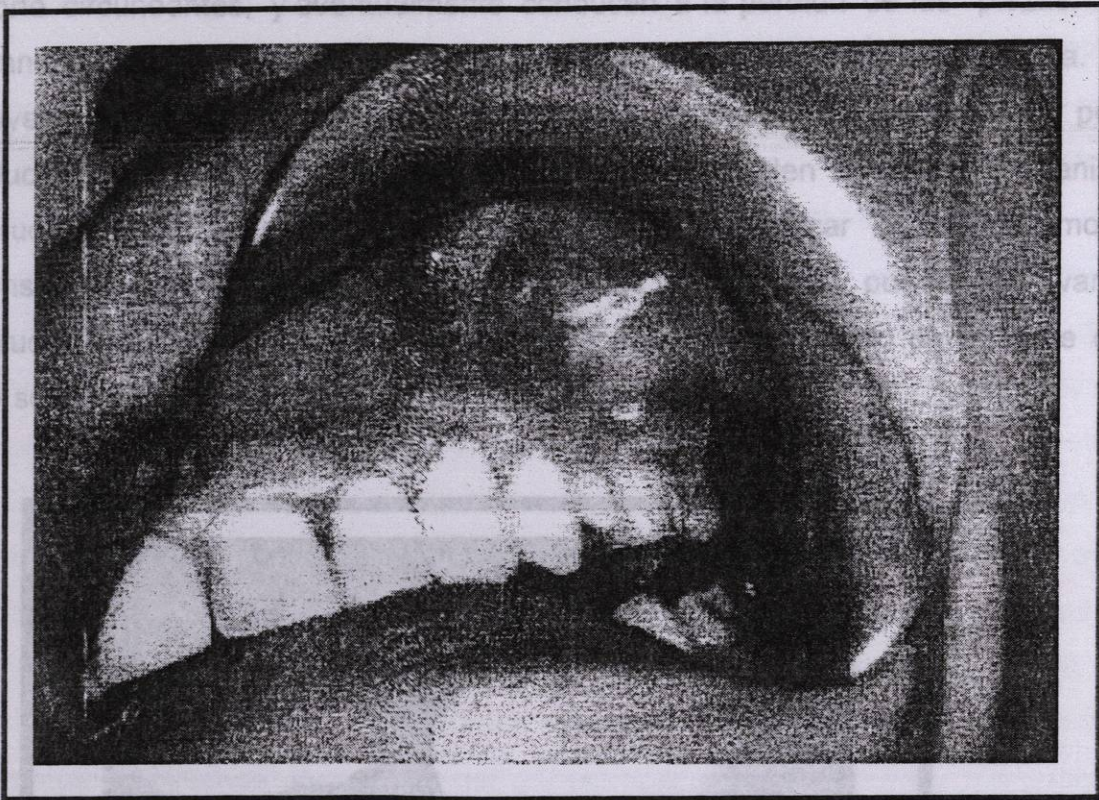


Figura 1. Cavidad oral de un paciente mostrando la lesión característica de la periodontitis. En este caso, la inflamación del periodonto se ha complicado con un absceso.

- ◆ La gingivitis: es definida con inflamación del tejido gingival y es causada por acumulación de placa, puede ser asociada por daño local, erupción de dientes, desórdenes dermatológicos, pubertad, embarazo medicamentos, herpes, enfermedades sistémicas y desordenes hormonales (Carranza 1993).
- ◆ La periodontitis: el desarrollo de la bolsa periodontal es un signo característico de la periodontitis. Desde el punto de vista clínico, se considera que la periodontitis es una profundización de la bolsa periodontal (2-5 mm aproximadamente) asociada con presencia de exudado y aumento paulatino de la movilidad de las piezas dentales (Nolte. 1985).

Las complicadas interacciones entre el huésped, microorganismos y la dieta, conducen a la alteración patológica de las piezas dentales y de sus estructuras de soporte circundantes, y eventualmente conducen a la pérdida de las piezas. Varias sustancias que poseen potencial patógeno han sido detectadas en la placa. Estas incluyen sustancias indicadoras de inflamación, productos bacterianos que pueden producir daños tisulares directos, y sustancias que pueden activar los mecanismos destructivos dentro de los tejidos del huésped o paralizar los mecanismos de defensa del mismo (Bascones 1985). En las radiografías puede observarse la destrucción del hueso del reborde alveolar y el volumen relativo de raíz que queda para sostener el diente (Nolte, 1985) (Figura 2).

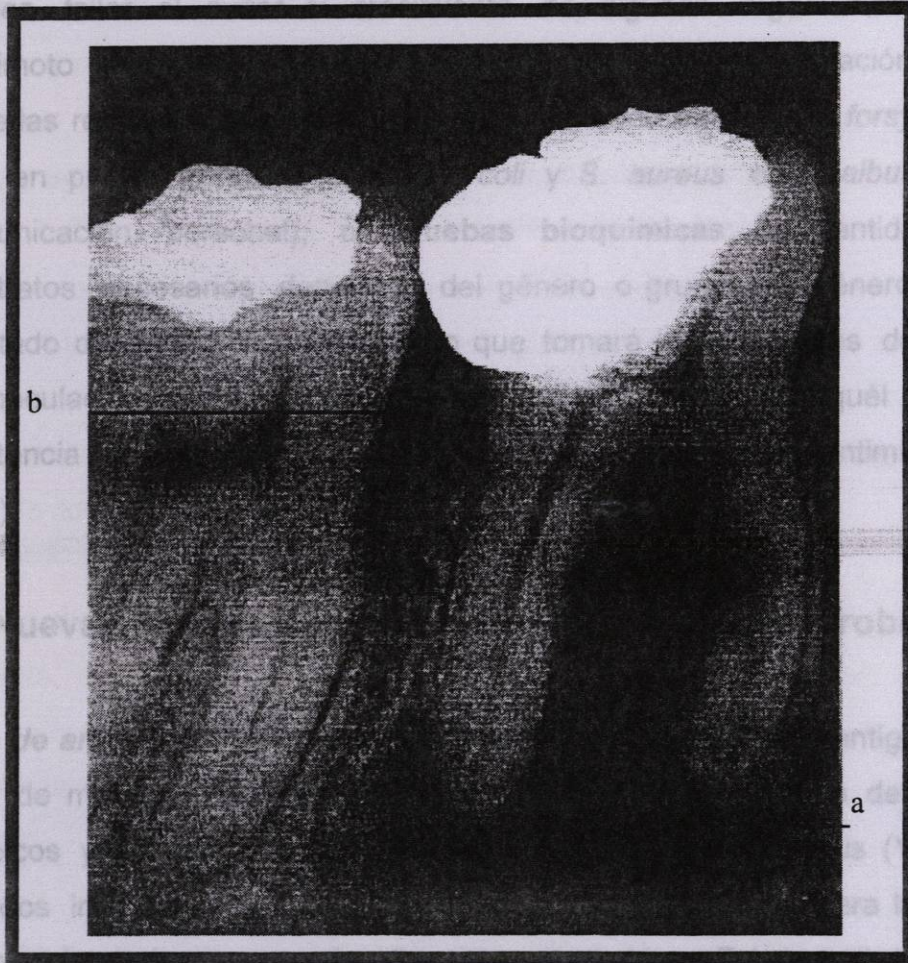


Figura 2. Radiografía de primera y segunda molar. (a) Pérdida ósea y (b) crestas evidentes.

III. Técnicas tradicionales para la identificación de bacterias

Dentro de las técnicas comunes para la identificación se encuentran: a) **Ensayos microscópicos**: el cual consiste en observar la morfología bacterial y reacción a la tinción de Gram (Listgarten. 1992); b) **Características coloniales**: Las técnicas de cultivo de microorganismos pueden ser especiales para obtener esquemas taxonómicos (Listgarten. 1992); sin embargo, el gran número de requerimientos nutricionales y estrictas condiciones de cultivo, hacen difícil el aislamiento e identificación de este tipo de microorganismos (Uematsu *et al.*, 1992), además de que consumen mucho tiempo para obtener un resultado, son costosos y pueden fallar al evitar el crecimiento de algunos organismos de importancia (Ashimoto *et al.*, 1996). Otro elemento asociado con esta situación, es que algunas bacterias requieren la presencia de otras, tal es el caso de *B. forsythus* el cual crece solo en presencia de *Escherichia coli* y *S. aureus* o *S. albus* (S. Holt. 1998. Comunicación personal); c) **Pruebas bioquímicas**: La cantidad de medios y substratos necesarios dependen del género o grupos de géneros a identificar. El resultado dependerá del aislamiento que tomará lugar después de un tiempo inicial de inoculación. Otro método de identificación puede ser aquél que determina la resistencia de una cepa aislada a un número de agentes antimicrobianos (Levett. 1991).

IV. Nuevas técnicas para la identificación de anaerobios obligados.

Uso de antígenos: Las técnicas basadas en la detección de antígenos específicos a partir de muestras clínicas, compiten con las basadas en la detección de ácidos nucleicos y son ampliamente usadas en la detección de virus (Yolken. 1988). Los métodos inmunológicos han sido usados tradicionalmente para la identificación de algunas bacterias, pocas de ellas son anaerobias. Tabaqchali (1982), realizó una técnica con anticuerpos fluorescentes para la detección de *Bacteroides* sp. en especímenes clínicos. Poxton (1988), aportó una lista de candidatos a antígenos: el

ácido teicoico y lipoteicoico, proteínas de la pared celular para la identificación de anaerobios Gram-positivos; lipopolisacáridos, proteínas de la membrana celular, lipoproteínas, fimbrias y pilis de anaerobios Gram-negativos; cápsula, flagelos, y exotoxinas.

Determinación de inmunoglobulinas: Condrorelli y col. (1998) determinaron la prevalencia de *P. gingivalis* mediante la detección de inmunoglobulina A, específico del antígeno fimbrial de la bacteria, encontrando en los sitios activos una incidencia del 71.7%. En cambio, en los sitios sanos no se encontraba la inmunoglobulina, sugiriendo que la bacteria esta asociada con la producción específica de inmunoglobulina A.

Uso de Proteínas: La visualización del patrón de proteínas ha sido ampliamente estudiado en la taxonomía microbiana. Aunque los procedimientos electroforéticos pueden ser relativamente directos, la reproducibilidad de sus resultados es baja. Sin embargo Tabaqchali y col. (1987) simplificaron los procedimientos al adicionar un aminoácido radioactivo (Metionina con S^{35}), algunas de las proteínas de interés serían visualizadas en las autoradiografías teniendo, así, un resultado mas confiable. Borriello y col. (1987) sugirieron que la técnica de cromatografía líquida para proteínas también puede ser usada para examinar las proteínas de anaerobios evitando los problemas de reproducibilidad.

Peptidoglicanos: Shleifer y Kandler (1972), analizando el péptido glicano de diversas bacterias, demostraron que esta estructura de la pared celular, posee diferencias entre diferentes especies. Weiss (1981) y Huss y col. (1984) estudiaron los peptidoglicanos de cocos anaerobios, mostrando que ellos son específicos de especie.

Productos volátiles del metabolismo: Varias técnicas de cromatografía han sido aplicadas para la identificación de anaerobios. La cromatografía de Gas-líquida ha

sido usada ampliamente para detectar productos volátiles o derivados de producto del metabolismo en muestras clínicas o medios de cultivo.

Enzimas y sus productos: En la actualidad existen sistemas (kits) que simplifican las aplicaciones de las técnicas convencionales, como el API ZYM para la detección de enzimas específicas, que son ampliamente usados en los laboratorios de diagnóstico para la identificación de anaerobios.

V. Interacciones bacterianas:

En algunas situaciones de la periodontitis se han encontrado dos o más microorganismos involucrados directamente con la inflamación. Este hecho sugiere la existencia de relaciones microbianas (simbiosis, comensalismo, etc.) en el surco periodontal; ya que un patógeno puede colonizar un sitio ya ocupado por otro, el cual le abastece los factores para su establecimiento (Ashimoto *et al.*, 1996). Ejemplo de este tipo de relación, se puede observar en las especies β -hemolíticas causan daño o destruyen las células rojas u otras del tejido del hospedero. Este proceso favorece la colonización de los posibles patógenos periodontales como algunas especies de *Bacteroides* que resultan del daño tisular (Socransky *et al.*, 1992).

Kamma y col. (1994) describieron que uno de los requerimientos de las especies de *Porphyromonas* es el succinato y la naftoquinona, y dichos requerimientos pueden ser proporcionados por otras especies. Algunos cepas de *Prevotella intermedia* pueden hidrolizar proteínas del plasma e incrementar el crecimiento de las especies de *Porphyromonas* (Slots *et al.*, 1986), *Selomonas* y otros bacilos que se han correlacionado con el daño tisular o sangrado de la encía (Dzink *et al.*, 1985).

VI. Técnicas moleculares para la identificación de bacterias.

El método de PCR es de importancia para la identificación de organismos que exhiben un alto grado de similitud genética y fenotípica. Por ejemplo *P. intermedia* y *P. nigrescens* muestran un 94% de similitud y 6.6% de diferencia en los genes del RNAr 16S. Ambos organismos son habitantes del surco periodontal y son difíciles de distinguir por métodos convencionales de cultivo (Ashimoto *et al.*, 1996). Además permite distinguir entre cepas de diversos hospederos (gato, perro, humano y mono) como fue en *B. forsythus* el cual da un patrón de bandas diferente entre cepas, indicando que son similares pero no idénticas al del humano (Hudspeth *et al.*, 1999). Otro ensayo basado en la detección de *P. gingivalis*, es en base a su factor de virulencia el cual utiliza PCR que ha sido exitosamente aplicado para la identificación de genes (colagenasa) con potencial virulento (Bodinka *et al.*, 1994)

Para los estudios epidemiológicos de bacterias periodontales (*P. gingivalis*), el análisis de enzimas de restricción (REA) el cual permite observar un distinto patrón de ADN, indicando considerable heterogenidad entre las especies. obteniendo evidencia de las rutas de transmisión (Van Steenberg *et al.*, 1993).

El análisis de los fragmentos de restricción (REA) de los productos amplificados (PCR) obtenidos con iniciadores (primers), revelan entre las especies bacteriales polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y puede ser usado como marcador genético (Clayton *et al.*, 1993)

El uso de sondas de oligonucleótidos complementarias a la región hipervariable de RNAr 16S muestra una alta sensibilidad y especificidad para detectar a *B. forsythus* a partir de muestras que contienen una gran variedad y cantidad de organismos (Moncla *et al.*, 1991).

Otra estrategia para detectar variabilidad genética en los microorganismos, es el uso de la Amplificación de DNA Polimórfico (RAPD) la cual por el rápido diseño de

sondas específicas de DNA ha sido usado en varios microorganismos como hongos, bacterias y levaduras. La reacción puede generar marcadores específicos de especie o cepa. Estos productos, posteriormente pueden ser amplificados por PCR específica, seguido por la detección de ese determinado producto de PCR por hibridación dot blot con el fin de aumentar la especificidad (Guillot *et al.*, 1997)

Un estudio para identificar a *P.intermedia* y *P.nigrescens* fué llevada acabo por hibridación con sondas genéticas específicas marcadas radioactivamente, las cepas fueron confirmadas por un análisis de movilidad electroforética de las enzimas malato y glutamato deshidrogenasa (Matto *et al.*, 1996).

Prenaraj y col (1998) determinaron si el ensayo enzimático (lipasa) y las técnicas de electroforésis en geles de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS) permiten diferenciar a *P. intermedia sensu stricto* y *P. nigrescens*, encontrando que ambas técnicas no distinguen entre ellas, mientras que la técnica de PCR distingue entre ambas especies (Prenaraj *et al.*, 1998).

VII. Sensibilidad de las técnicas moleculares:

La identificación de bacterias en base a sondas de DNA requiere además de la especificidad, la sensibilidad de detección. Para determinar los límites de detección mediante sondas de oligonucleótidos que hibridizan cantidades conocidas de ácidos nucleicos y son reveladas por autoradiografía. Los niveles de detección para *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *Streptococcus intermedius* fue de 10^3 bacterias aproximadamente (Dix *et al.*, 1989).

Para determinar los límites de detección de ensayos de PCR, diluciones seriadas de los cultivos fueron sujetos a la amplificación. Bandas visibles fueron observadas con 10^2 bacterias, de igual forma cuando mezclas de bacterias con 107 organismos de diferentes especies bacteriales. De esta manera un gran número de bacterias no tiene efectos inhibidores en la PCR (Bodinka *et al.*, 1994).

Se ha reportado una sensibilidad de 5×10^6 a 5×10^8 UFC por muestra que poseen los métodos de cultivo, en cambio mediante el diseño de sondas del DNA complementarias a la región hipervariable 16S del ARN se detectaron 2×10^6 a 2×10^8 células (Moncla *et al.*, 1991).

Shetab y col (1998) detectaron el gen de una enterotoxina de *B. fragilis* por PCR y la amplificación de esta reacción fue sujeta de nuevo a una segunda amplificación obteniendo un tamaño de 290 pb el cual fue detectado por hibidación DNA-DNA (Southern blotting) usando sondas marcadas radioactivamente. La sensibilidad de su ensayo permitió detectar 1pg de DNA de la enterotoxina o bien 100 a 1000 células.

VIII. Principio de la técnica de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR):

El desarrollo de sistemas para identificar microorganismos es fundamental para el estudio de la historia natural, epidemiología y prevención de enfermedades infecciosas. Las limitaciones inherentes en los métodos tradicionales los cuales detectan características fenotípicas, han estimulado el desarrollo de técnicas que son basadas en la detección y análisis de ácidos nucleicos (Kerr. 1994).

La reacción en cadena de la polimerasa fue inventada por Kary Mullis y fue originalmente aplicada por un grupo de departamento de genética humana en Cetus para la identificación de la β -globina y para el diagnóstico de anemia prenatal. Inicialmente, la PCR usaba la DNA polimerasa I del fragmento Klenow de *E. coli* para extender los primers alineados, pero esta enzima era inactivada por las altas temperaturas requeridas para separar las dos cadenas de DNA en cada uno de los ciclos de la PCR son llevadas a cabo gracias a la introducción de la enzima termoestable DNA polimerasa (Taq polimerasa) aislada de *Thermus aquaticus* (Erlich 1985).

La PCR es un método *in vitro* por la síntesis enzimática de secuencias específicas de ADN, usando dos primers oligonucleotidos de aproximadamente 20 nucleotidos de largo que hibridizan opuestamente ambas hebras y flanquean la region de interes en el ADN blanco (figura 3). Una serie repetida de ciclos involucra la desnaturalización del ADN templado, alineamiento de los primers, y la extensión de los primers alineados por la DNA polimerasa, el resultado es una acumulación exponencial de un fragmento específico. Los productos sintetizados en el primer ciclo de la extensión de los primers sirven como un templado en el proximo ciclo.

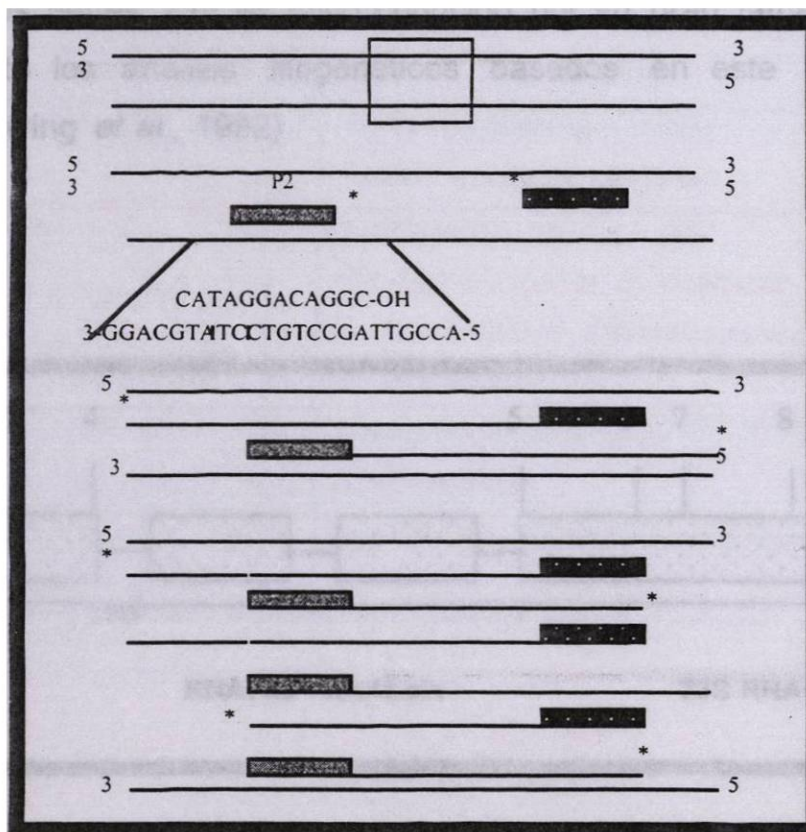


Figura 3. Esquema general de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

IX.- El uso de secuencias de los genes que codifican para el RNAr 16S y 23S:

Los ARNr son las macromoléculas más interesantes; ellas forman el núcleo (core) de los ribosomas, sus propiedades son la llave para los mecanismos de transducción, un proceso sin el cual las proteínas no se llevan a cabo (Gutell *et al.*,

1994) y por lo tanto esenciales para la supervivencia de todos los organismos y son altamente conservados en las bacterias y otros reinos (Gürtler *et al.*, 1996).

Los genes 16S son similares en longitud (cerca de 1.5 Kpb) en todas las bacterias y contienen regiones altamente conservadas. La figura 4. muestra la localización de las secuencias dentro de las regiones conservadas en cada uno de los genes 16S ARN. La región 2 es la secuencia más altamente conservada que esta presente en eubacterias, archaea y eucariotas; mientras que las regiones 3 y 4 esta presente en la mayoría de las eubacterias (Gürtler *et al.*, 1996). El número de secuencias de los genes 23S es poco conocido por su gran tamaño (cerca de 3.0 Kpb) por lo tanto los análisis filogenéticos basados en este gen permanecen incompletos (Ludwing *et al.*, 1992)

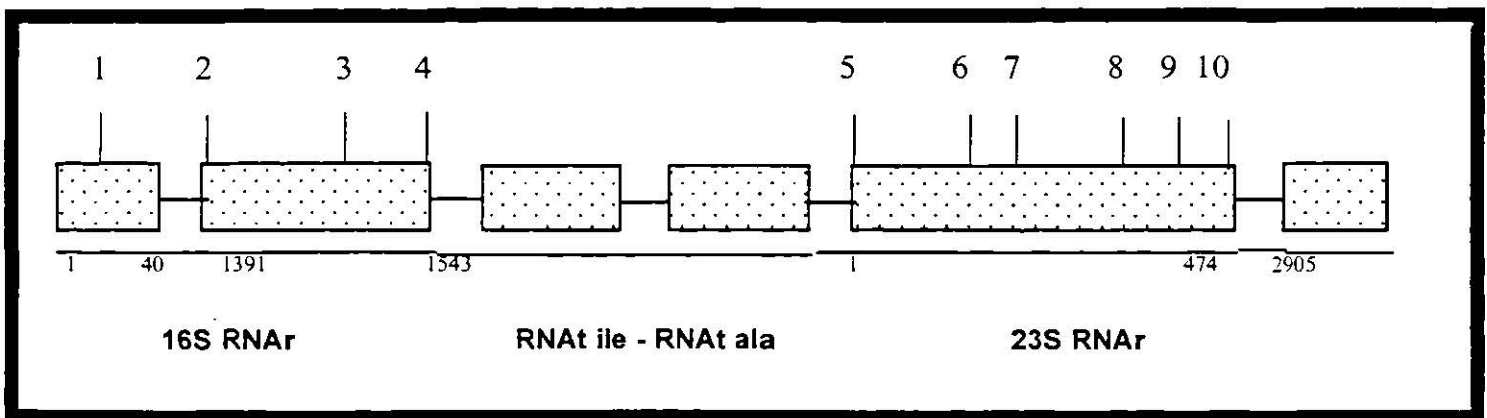


Figura 4. Esquema de secuencias de las subunidades del RNAr. Los cuadros representan los genes del operon para los RNAr. El sentido de la transcripción es de derecha a izquierda. Algunas bacterias tienen dos genes para RNAt o ninguno como se muestra en el esquema; las líneas representan las regiones espaciadoras que separan los distintos genes, las líneas punteadas representan genes que no han sido completamente secuenciados. Las líneas enumeradas muestran la numeración de nucleótidos en los genes 16S y 23S de *E.coli*. Los números 1-10 representa la siguiente secuencia de nucleótidos. de los genes 16S: 1, 8-27; 2, 1390-1407; 3, 1491-1506; 4, 1525-1541. genes 23S: 5, 21-38; 6, 115-132; 7, 188-208; 8, 422-437; 9, 441-460; 10, 456-474.

Materiales y Métodos

I.- ESPECIFICIDAD DE LOS INICIADORES: Los oligonucleótidos fueron diseñados en base al gen que codifica para el RNAr 16S por medio del programa Clustal W y FASTA (De la Garza, 1998), comparándolo con especies estrechamente relacionadas en su hábitat (Tabla 2.).

Tabla 2. Microorganismos usados para determinar la especificidad de los iniciadores diseñados para la detección de patógenos periodontales.

<i>A. actinocetemcomitanas</i>	<i>Mitsuokella dentalis</i>
<i>B. forsythus, B. heparinolyticus</i>	Especies de <i>Neisseria</i>
<i>Campylobacter rectus</i>	<i>Peptostreptococcus micros,</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Prevotella corporis, P. denticola</i> <i>P. intermedia, P. melaninogenica</i> <i>P. nigrescens,</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus,</i> <i>S. epidermidis</i>
<i>Fusobacterium mortiferum,</i> <i>F. nucleatum, F. paraphrophilus</i>	Especies de <i>Streptococcus</i> β -hemolítico
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	

II.- INICIADORES: En la tabla 3 se presentan las bacterias usadas como indicadoras y sus respectivos iniciadores que fueron utilizados en este trabajo. El diseño de los oligonucleótidos y sus características fueron previamente evaluados con los programas Oligo, Amplify, Primer, además del programa Sim PCR (De la Garza.1998).

Tabla 3. Secuencia, ubicación, tamaño y Tm de los iniciadores usados para la reacción de PCR.

Bacteria	Secuencia (5' —3')	Posición	Tamaño (pb)	Tm (°C)	Clave Genbank
Si	GTTAAGGAAGAACGAGTGTGAGAA	343		64	S116RNA
	TGCCGTCACCGGCTTGCGACTCGT	1176	833	80	
Pg	AAGGATTGTAAACTTCTTTTATAC	427		60	POYRR16SC
	ACTGTTAGCAACTACCGATGT	1132	705	60	
Pi	GCATTTACCCTTCGAATAAGGACC	449		70	PVORR16SD
	GAGTCAACATCTCTGTATCTCGCG	989	540	70	
Bf	GCGTATGTAACCTGCACCTGCCCGCA	121		84	BFORR16S
	GAAGGCAGCTTACTAAGG	470	350	54	

III.- CRITERIOS PARA LA TOMA DE MUESTRA. Un total de 52 muestras con las siguientes características:

- ◆ Pacientes con edad entre 35-45 años (hombres y mujeres)
- ◆ Presencia de bolsas periodontales con profundidad de 5mm o más.
- ◆ Clínicamente diagnosticados con periodontitis.
- ◆ Sin enfermedad sistémica.
- ◆ Que no hubiese ingerido ningún tipo de agente antimicrobiano por lo menos durante los últimos 6 meses.
- ◆ Ningún tipo de desorden hormonal (Embarazo).

Para la obtención de la muestra se limpio la zona afectada y se describieron las características que presentaba el paciente en su encía. Las piezas indicadoras de enfermedad periodontal son los primeros molares e incisivos (Nolte,1985), donde se introdujo el instrumento de detartraje. Posterior a esto, se deposito la muestra en dos tubos eppendorff de 0.5 ml, uno de los cuales contenia 200 µl de H₂O miliQ estéril, al que se procedio

realizarle agitación en vórtex y colocarlo en baño de agua hirviendo por 10 min y se centrifugo 10 seg a 10,000 rpm. El segundo tubo contenia caldo soya tripticasa, el cual fue incubado a 37° C durante 7 días en una atmósfera de anaerobiosis, después de incubar se sembro en cajas de agar soya tripticasa con sangre de carnero e incubo a 37°C durante 7 días en anaerobiosis.

Tabla 4.- Condiciones del ensayo de amplificación genética.

REACTIVO	CONC.INICIAL	VOLUMEN(50µl)	CONC.FINAL
BUFFER	10X	5µl	1X
dNTP's	10mM	1µl	0.2mM
INICIADOR 1	10µM	1µl	0.2µM
INICIADOR 2	10µM	1µl	0.2µM
INICIADOR 3	10µM	1µl	0.2µM
INICIADOR 4	10µM	1µl	0.2µM
Taq polimerasa		0.5µl	2.5U
Muestra		35.5µl	

INICIADOR 1: *S. intermedius*; **INICIADOR 2:** *P. intermedia*; **INICIADOR 3:** *P. gingivalis*;
INICIADOR 4: *B. forsythus*

La amplificación (PCR) se llevo acabo en un termociclador Perklin-Elmer con las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 94°C/5min. Posteriormente, se adiciono 0.5µl de Taq polimerasa (Boheringer Manheimm). Posterior a esto se llevaron acabo 25 ciclos de desnaturalización a 94°C/2min; alineamiento a 55°C/2min, y extensión a 72°C/2min y un paso final de extensión a 72°C/7min. El producto de la amplificación se conservo a 4°C para su posterior análisis, el cual consistio en separar dichas amplificaciones por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2.5% en buffer TAE 1X (Tris-Acido acético-EDTA pH 8.0), durante 1hr a 10V/cm y visualizadas las bandas con bromuro de etidio. Posteriormente los productos de PCR fueron también analizados en geles de poliacrilamida al 4% durante

1hr y 30min a 5V/cm el cual permite observar las bandas de amplificación más definidamente.

- ◆ **Sensibilidad de la PCR a partir de cultivos puros:** A partir de cepas puras como *P. gingivalis* ATCC33277, *P. intermedia* ATCC25611, *S. intermedius* ATCC27335 y *B. forsythus*, las cuales fueron proporcionadas por el Departamento de Microbiología y Periodoncia de la Universidad de Texas en San Antonio. Se tomo un cristal de las cepas puras y se depositó en 200µl de agua miliQ estéril, el cual se lavó 3 veces y se le realizaron diluciones que se procesaron para PCR.

RESULTADOS

La técnica de amplificación del material genético usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha permitido incrementar las investigaciones sobre la organización y presencia de determinadas secuencias nucleotídicas (firmas o motivos) en el genoma de los organismos. Por dicha razón hemos realizado una amplificación previa de las cepas puras mediante primers específicos para *B. forsythus*, *P. gingivalis* y *S. intermedius*, con la finalidad de evitar falsos positivos o bien reacciones cruzadas, determinando así la especificidad de la técnica (Figura 5).

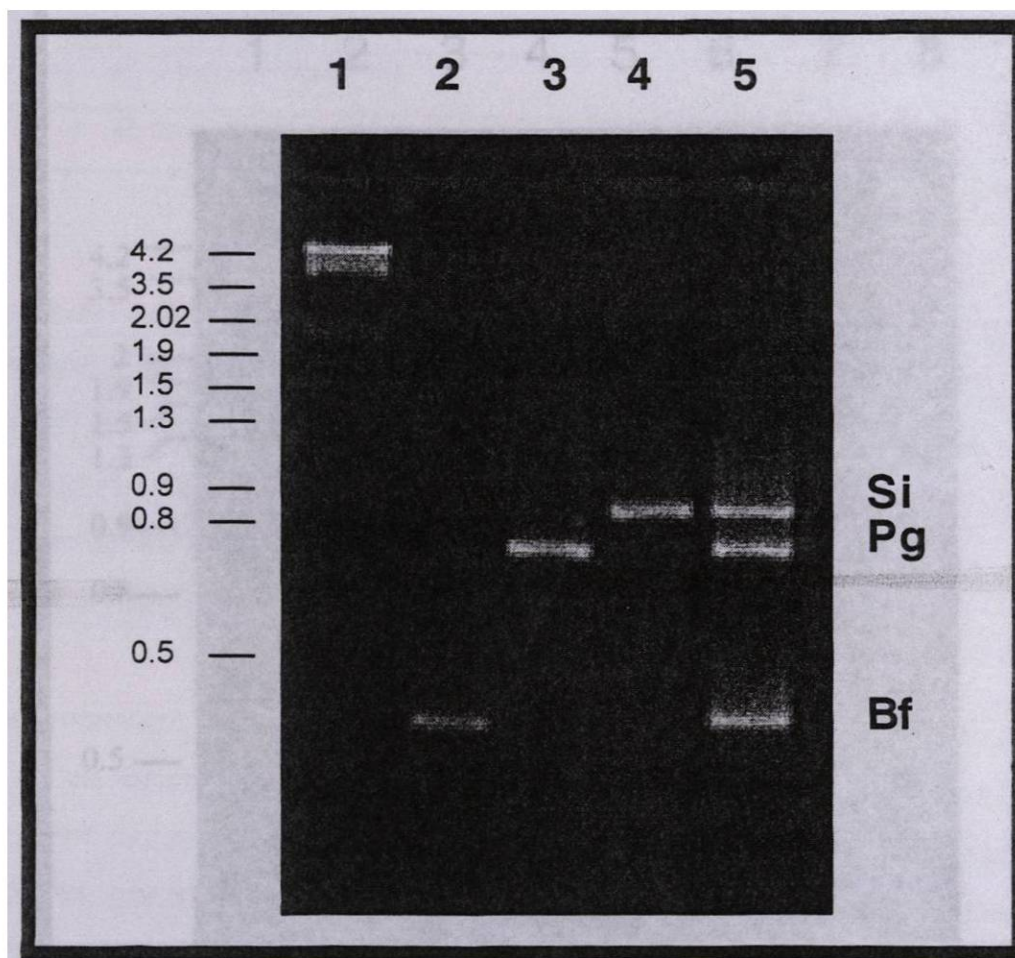


Figura 5. Determinación de la especificidad de la PCR para la determinación de bacterias periodontales. Carril 1, Marcador de talla molecular (λ -HindIII-EcoRI); 2-4, amplificaciones individuales a partir de las cepas puras de Bf, Pg, y Si; Carril 5, Productos de PCR a partir de una mezcla cepas puras de Si (833 pb), Pg (705 pb), y Bf (350 pb).

La amplificación génica vía PCR tiene un sin fin de aplicaciones en muchas ramas, entre las que se encuentran la biotecnología, detección de secuencias específicas de DNA o RNA, genética humana, microbiología médica y medicina forense. En este sentido, se puede detectar la presencia de cantidades tan pequeñas de material genético o células presentes en una muestra determinada. Por tal motivo, en este trabajo se realizaron diluciones de las cepas puras para determinar la sensibilidad de la PCR, encontrando banda visible aún en la dilución 10^0 (28 células) (Fig. 6).

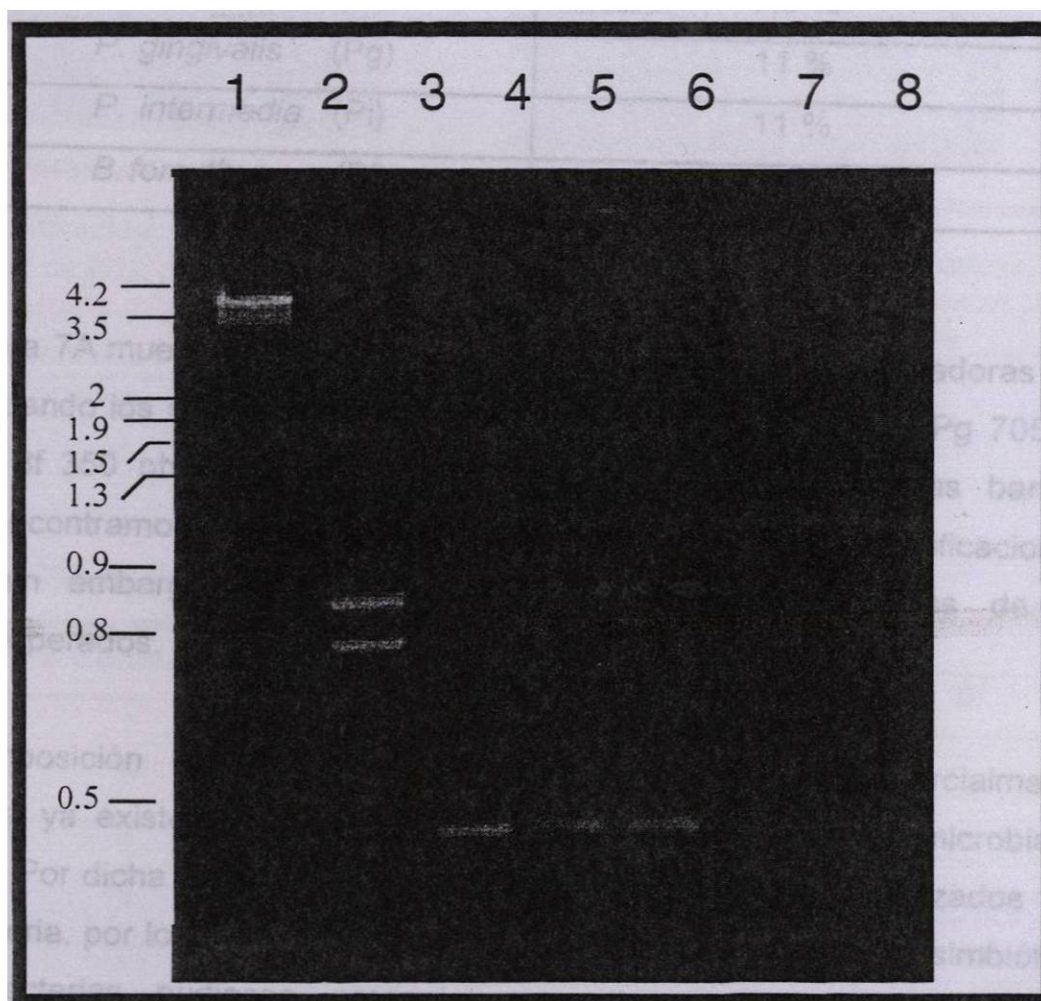


Figura 6. Determinación de la sensibilidad de la PCR para la detección de bacterias periodontales. Carriles: 1, Marcador de talla molecular (λ -HindIII-EcoRI); 2, marcador de bacterias periodontales; 3-8, diluciones en base 10 a partir de 2.7×10^4 células.

Existen estudios realizados en otras regiones geográficas que han determinado la prevalencia de estos microorganismos causantes de la periodontitis mediante diversos análisis. En el presente trabajo presentaremos la prevalencia de algunos patógenos asociados con la enfermedad en una pequeña población (Tabla 5).

Tabla 5. Prevalencia de los microorganismos detectados por PCR.

Bacteria	Prevalencia
<i>S. intermedius</i> (Si)	7.6 %
<i>P. gingivalis</i> (Pg)	11 %
<i>P. intermedia</i> (Pi)	11 %
<i>B. forsythus</i> (Bf)	3 %

La figura 7A muestra las amplificaciones de las bacterias indicadoras por PCR, encontrando los siguientes tamaños de amplificación: Si 833 pb, Pg 705 pb, Pi 540 pb y Bf 350 pb, y en la figura 7B además de presentar las bandas esperadas encontramos bandas inespecíficas cerca de las amplificaciones esperadas; sin embargo las bandas de mayor intensidad son las de los fragmentos esperados.

La composición microbiana de la placa subgingival está parcialmente influida por la ya existente en la porción adyacente de depósito microbiano supragingival. Por dicha razón algunos pacientes se encuentran colonizados por más de 1 bacteria, por lo tanto nos enfocamos a estudiar la asociación simbiótica que estas bacterias pudiesen presentar para llevar a cabo la enfermedad periodontal (Tablas 6 y 7)

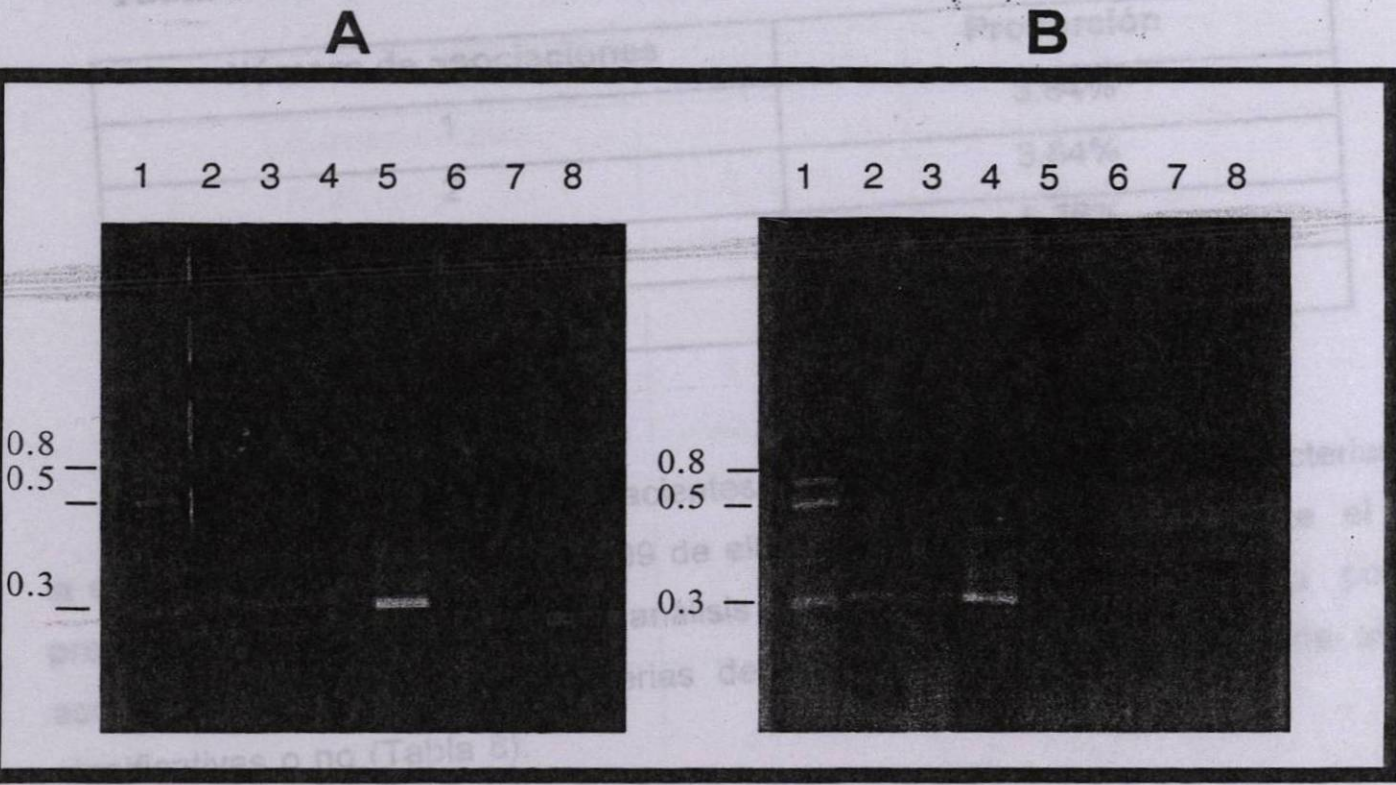


Figura 7. Amplificación genética a partir de cultivos puros y muestras clínicas. (A) Carril 1, producto de PCR a partir de cepas puras de Si (833 pb), Pi (705 pb), Pg (540 pb) y Bf (350 pb). Carriles 3-8, muestras de pacientes. **(B).** Carril 1, igual que en A; 2, paciente positivo a Bf; 3 positivo a Pg, Pi y Bf; 4, Positivo a Bf ; 7 y 8 positivo a Pg y Pi.

Tabla 6. Pacientes positivos a más de una bacteria.

Paciente	# Bacterias	Si	Pg	Pi	Bf
1	1	-	-	-	+
2	2	-	+	+	-
3	2	-	+	+	-
4	3	+	+	+	-
5	1	-	-	+	-
6	3	-	+	+	+
7	3	-	+	+	+
8	4	+	+	+	+

Tabla 7. Proporción de bacterias asociadas en muestras directas.

Número de asociaciones	Proporción
1	3.84%
2	3.84%
3	5.76%
4	1.92%

Por lo tanto el 1.99 de los pacientes están colonizados por 1 y 2 bacterias en la enfermedad periodontal y el 2.99 de ellos por 3 bacterias, y solamente el 0.99 presentan cuatro bacterias. El análisis estadístico de X^2 revela la posible asociación entre las cuatro bacterias determinadas por PCR y determina si son significativas o no (Tabla 8).

Las técnicas comunes para identificar bacterias anaerobias como lo son los medios de cultivo, poseen la desventaja de requerir mucho tiempo para obtener los resultados, además de no abastecer las condiciones necesarias para el crecimiento de estas bacterias, por eso mostramos las discrepancias entre los medios de cultivo y el análisis de PCR (Tabla 9).

Tabla 8. Muestra los resultados del análisis de X^2 para la posible asociación entre bacterias causantes de periodontitis.

Asociación	X^2	Significancia
<i>B.forsythus/P.gingivalis</i>	0.433	N.S
<i>B.forsythus/P.intermedia</i>	0.433	N.S.
<i>P.intermedia/P.gingivalis</i>	0.001	N.S.
<i>B.forsythus/S.intermedius</i>	0.707	N.S.

N.S. Asociación no significativa.

Tabla 9. Comparación de la detección por PCR y los medios de cultivo

	Cultivable-	Total
<i>S.intermedius</i>		
PCR (+)	2 (3.84)	52
PCR (-)	50 (96.15)	
<i>P.gingivalis</i>		
PCR (+)	6 (11.53)	52
PCR (-)	44 (84.61)	
<i>P. intermedia</i>		
PCR (+)	7 (13.46)	52
PCR (-)	45 (86.53)	
<i>B. forsythus</i>		
PCR (+)	4 (7.69)	52
PCR (-)	48 (92.30)	

NOTA: De las 52 muestras analizadas solamente una presentó crecimiento en el agar sangre y se determinó su identificación por PCR pero fue negativo, por lo tanto no fue necesario agregar en la tabla una columna cuando el resultado en el medio de cultivo fuese positivo para alguna de las bacterias analizadas.

Los resultados de la amplificación por PCR y los obtenidos en los medios de cultivo, fueron analizados mediante el método estadístico X^2 para observar la especificidad de cada método al detectar estas bacterias (Tabla 10).

Tabla 10. Muestra el nivel de detección que posee la técnica de PCR y los medios de cultivo mediante el análisis de X^2 .

Grupos	PCR	Medio de Cultivo
Pacientes positivos	11*	1**
Pacientes negativos	41*	51

* Grado de detección altamente significativa en $\alpha=0.01$

**Identificada después por PCR y fue negativo

DISCUSION

La periodontitis del adulto es la enfermedad periodontal mas común en el humano y, comúnmente es causada por bacterias de la propia cavidad oral (Zambon *et al.*, 1995). Se ha demostrado que la cavidad oral es un nicho ecológico de alrededor de 300 especies de microorganismos, pero solo algunas juegan un papel importante en la periodontitis (Ashimoto *et al.*, 1996). El surco periodontal provee un ambiente anaerobio que favorece el crecimiento de bacterias anaerobias, predominantemente Gram negativas, entre las que destacan *A. actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *B. forsythus* (Uematsu *et al.*, 1992; Zambon *et al.*, 1995), por lo que su oportuna detección, será de gran provecho para el tratamiento adecuado.

El desarrollo de métodos específicos de detección de DNA, son considerados como la mejor alternativa de diagnóstico. La detección de DNA o RNA han sido frecuentemente aplicadas en el diagnóstico de virus (Yolken 1988); sin embargo, otro de los blancos de gran importancia son los microorganismos difíciles de cultivar, como las bacterias anaerobias. Uno de los mayores problemas de estos sistemas de detección es que son poco usados en laboratorios clínicos, pero sus principios son importantes como precursores de técnicas de diagnóstico. Por ejemplo sondas marcadas con P³² de diferentes especies de *Bacteroides* han sido exitosamente usadas en la identificación de dicho microorganismo (Morotomi *et al.*, 1988), a lo igual como las sondas diseñadas mediante la digestión del DNA con *Hind* III de *Bacteroides fragilis* (Kuritza *et al.*, 1986). Algunos reportes previos, han señalado la importancia del uso de la PCR en lugar de las hibridaciones DNA-DNA o RNA-DNA, ya que no se requiere de tener al agente en forma de cultivo puro.

Determinación de la especificidad de los iniciadores: La intención inicial del presente trabajo, consistió de conocer la especificidad de los iniciadores utilizados, para ello, la mezcla de iniciadores fue probada usando cultivos puros de

tres de las bacterias elegidas como indicadores (*S. intermedius*, *P. gingivalis* y *B. forsythus*). De esta manera, pudimos demostrar que los iniciadores son muy específicos ya que no se presentaron amplificaciones inespecíficas (amplificación cruzada) entre las bacterias indicadoras, cuando se usaron mezclas de ellas, aún a concentraciones de 10^5 células en el tubo de reacción (Fig. 5). Este resultado demostró que los datos de amplificación podrían ser confiables.

Determinación del grado de sensibilidad: De particular interés fue conocer el nivel de sensibilidad de los iniciadores y programa, ya que se ha sugerido que *P. intermedia* y *P. gingivalis* también se podrían encontrar en pacientes clínicamente sanos, y la diferencia podría ser la carga microbiana en la bolsa periodontal (Holt, 1998. Comunicación personal). Otro motivo de conocer la sensibilidad de la técnica es el conocer la colonización temprana del patógeno periodontal en el hospedero o bien la supresión del patógeno mediante el seguimiento de un tratamiento (Fujise *et al.*, 1995).

En este trabajo realizamos diluciones a partir de una solución que contenía 27×10^3 células realizado a partir de un cultivo puro de *B. forsythus*, lográndose detectar 27 células (Figura 6). Este resultado concuerda con los obtenidos por Ashimoto y col (1996) de 25-100 células a partir de cultivos puros, y resultó ser ligeramente más sensible que los obtenidos por Shetab (1998), quien detectó 1pg de ADN o 100-1000 células, Conrads y col. (1999) su nivel de sensibilidad fue de 50-500 UFC sembrando antes en cajas de agar Colombia. La diferencia con los trabajos mencionados, es que nosotros partimos de células mantenidas a -70°C (no viables) y el resto lo realizó a partir de cultivos recientes.

Si comparamos nuestros resultados con trabajos previos encontramos una alta sensibilidad en nuestros resultados, pero de acuerdo a Erlich (1989) que menciona que la sensibilidad está ligada a la concentración MgCl_2 , temperatura

de alineamiento y concentración de enzima, es decir podremos incrementar la sensibilidad pero nuestra especificidad se podría ver comprometida.

En la actualidad existen otros métodos con alta sensibilidad como son la sondas de oligonucleotidos marcadas radioactivamente y sus niveles de detección son de 10^3 células aprox. (Dix. 1989). Otra técnica que ha permitido estimar la cantidad de parásitos intracelulares como *Borrelia burgdorferi* en base a los principios de la PCR, ya que se marcan sondas con fluorescencia, detectándose en pocos ciclos de la reacción, siendo proporcional la fluorescencia a la cantidad de producto amplificado y por lo tanto del parásito (Pahl *et al.*, 1999).

Detección de bacterias en pacientes clínicamente enfermos: Algunos de los organismos detectados en esta investigación, han sido reportados previamente como los agentes causales de periodontitis. Las bacterias anaerobias formadoras de colonias negras, generalmente pertenecientes al género *Bacteroides* sp., han sido ampliamente asociadas con enfermedades periodontales. Estas especies poseen un alto potencial patogénico produciendo muchos factores de virulencia que pueden jugar un rol en el daño periodontal (Mendell. 1992).

Es importante mencionar que el hecho de aislar o detectar una bacteria de las comúnmente asociadas a periodontitis, no significa que ésta posea un factor o gen de virulencia, por ejemplo Bodinka A. (1994) menciona que de 21 muestras clínicas con *P. gingivalis* solamente 16 poseen el gen *prtC* que codifica para la colagenasa, en contraste con otras cepas que carecen de este gen y por lo tanto revela diferente actividad biológica y especificidad enzimática.

Dentro de la periodontitis, se ha sugerido que un cierto número de especies están asociadas con la enfermedad, pero es claro mencionar que no es suficiente la presencia del patógeno, ya que si la presencia de éste fuera suficiente la sola detección podría ser sinónimo de la actividad de la enfermedad,

haciendo sus exámenes de diagnóstico e interpretación muy simples (Socransky *et al.*, 1992).

En el presente estudio determinamos la presencia de cuatro bacterias, *S. intermedius*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *B. forsythus* (Fig. 7), las cuales fueron seleccionadas en base a la referencia y prevalencia en cuadros patológicos de periodontitis del adulto (Moore *et al.*, 1991). Es importante resaltar que algunos pacientes diagnosticados clínicamente con periodontitis, fueron negativos en la reacción de PCR (Fig. 7). En este momento no podemos conocer el motivo exacto de la falta de amplificación, pero quizás podría deberse a la presencia de otros factores que influyen en el inicio, progresión y remisión de la enfermedad periodontal. Entre estos factores se encuentran inmunológicos, hormonales, enfermedades sistémicas, etc. (Listgarten. 1992).

En estudios similares al nuestro, la detección por PCR, ha logrado detectar algunas de las bacterias involucradas en periodontitis, solo que en estos reportes han usado iniciadores específicos dirigidos hacia las subunidades 16S y 23S del DNAr. Algunos de estos, han reportado diferentes porcentajes de prevalencia, de esta manera, 86% para Bf; 70% Pg y el 58% para Pi (Ashimoto *et al.*, 1996); Conrad y col. (1999) encontraron 28% de Bf y 2.6% para Pi; Griffen y col. (1998) 79% Pg y Mätto *et al.* (1998) 63.3% Pg. En cambio la prevalencia de este trabajo es de 3% para *S. intermedius*, 11% *P. gingivalis*, 11% *P. intermedia*, y 7.6% para *B. forsythus* (Tabla 5).

La variación de los resultados obtenidos con los de otros trabajos, podría ser debido a las diferencias en la composición microbiana entre sujetos de diversa región geográfica (razas), dado a sus costumbres, hábitos y al medio en el cual se han criado (Listgarten. 1992). Para evaluar la epidemiología de los patógenos periodontales, así como su diagnóstico y tratamiento oportuno de la enfermedad, es importante el desarrollo de técnicas para minimizar el tiempo de identificación (Conrada *et al.*, 1996), Por lo tanto el diseño de sondas de oligonucleótidos

dirigidos hacia las subunidades 16S y 23S del DNA y amplificados por PCR (Amann *et al.*, 1993) permite detectar determinada especie bacterial evitando reacciones cruzadas con otras especies estrecha y ampliamente relacionadas (Figura 5). Durante la visualización de los geles encontramos algunas bandas entre la amplificación de 833 pb de Si y 705 pb de Pg y arriba de la amplificación de Bf de 350 pb (Figura 7B), esto puede ser por varias razones:(i) Si la temperatura de alineamiento es baja y la concentración de cloruro de magnesio es alta, se incrementa la sensibilidad de detección pero pueden presentarse amplificaciones inespecíficas (Ashimoto *et al.*, 1996); (ii) La especificidad de los iniciadores es baja y podrían generar amplificación de DNA de otras especies relacionadas a las buscadas, por dicha razón algunos trabajos han complementado el estudio con el tratamiento de los productos de PCR con endonucleasas e inspeccionar el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) (Loos *et al.*,1990). Para confirmar la especificidad de la amplificación y a su vez determinar la heterogeneidad en una misma especie (Clayton *et al.*, 1993), o (iii) también se podría tratar con la procedencia de la enzima y su procesibilidad. En ciertas situaciones la presencia de una especie puede facilitar la colonización de otra especie patogénica al actuar en asociación con otros microorganismos para causar la enfermedad (sinergismo, comensalismo, etc.). Las posibles combinaciones de las bacterias determinadas aquí fue evaluada mediante X^2 encontrando que en estas asociaciones no depende una de la otra para causar la enfermedad (Tabla 7).

Por otro lado Ashimoto y col. (1996) indica una significancia ($P < 0.01$) en algunas simbiosis entre las especies de *B. forsythus* / *P. gingivalis*, *P. gingivalis* / *P. intermedia*, *B. forsythus* / *P. intermedia*, pero es importante mencionar que en dicho trabajo manejan una $n=150$ y en el presente trabajo es de $n=52$., es decir debimos usar una n más grande para disminuir el margen de error.

Desafortunadamente, la mayoría de los métodos para identificar bacterias anaerobias consumen mucho tiempo y no son colocados con facilidad dentro de

los métodos de rutina en los laboratorios de diagnóstico. Por dicha razón se han diseñado técnicas que puedan ser de utilidad a un bajo costo y tratar de adoptarlas dentro de los métodos de identificación convencional (Levett, 1991).

En este trabajo hemos comparado el nivel de detección que poseen los medios de cultivo y la técnica de PCR, encontrando que en los medios de cultivo no fue posible detectar ninguna de las bacterias buscadas, en cambio por PCR se tubo una significancia de $X^2 = 9.420$, es decir que el número de pacientes positivos depende de la técnica empleada, en este caso la PCR fue altamente sensitiva que los medios de cultivo, ya que este último probablemente no le proporciona las condiciones adecuadas para su crecimiento (Roberts *et al* 1987), o bien la población de bacterias que contenia la muestra es muy baja para formar una colonia.

Algunas referencias coinciden con los resultados que se obtubieron en este trabajo como es el de Moncia y col. (1991) el cual utiliza sondas de oligonucleotidos detectando a Bf mediante autoradiografía en cinco pacientes, pero no logró detectarlos en lo medios de cultivo. Por otra parte, Ashimoto y col. (1996) encontraron en un 69% a Bf por PCR y solamente el 1% en medios de cultivos.

Es claro que los resultados de especificidad y sensibilidad pueden variar dependiendo de las necesidades de cada método y microorganismo. En nuestro caso era muy importante realizarlo por medio de PCR múltiple para detectar los microorganismos en un solo paso.

Es importante remarcar que nuestro resultados es el primer reporte de detección de tres o mas bacterias asociadas a periodontitis del adulto, ya que todos los previos, realizaban PCR para cada bacteria en tubo por separado.

CONCLUSIONES

1. Demostramos que nuestros iniciadores poseen alta especificidad.
- 2.- La sensibilidad de nuestro sistema nos permitió detectar 27 células.
- 3.- La técnica de PCR nos permitió detectar, en una sola reacción, a 4 bacterias involucradas en la periodontitis del adulto.
4. Determinamos que la PCR posee mayor sensibilidad para detectar a bacterias que no fueron posibles de determinar por medios de cultivo.
5. El análisis de X^2 nos permitió demostrar gran sensibilidad y especificidad de la técnica de amplificación génica.
6. Mediante el número de muestras analizadas no fue posible demostrar la correlación entre especies.

Apéndice A

Electroforésis horizontal en geles de agarosa

- 1.- Preparar agarosa al 2.5% en buffer TAE 1X, disolver y vasiar un volúmen adecuado para formar un grosor de 5mm en el molde, el cual ya deberá poseer el peine para formar los pozos donde se colocará la muestra. Dejar gelificar completamente la agarosa (alrededor de 20 min). Retirar el peine y lavar los pozos con buffer TAE para eliminar restos de agarosa no gelificada.
- 2.- Montar el gel en la cámara de electroforésis horizontal (Hoefler), y vaciar un volúmen necesario de buffer TAE 1X para cubrir el gel aproximadamente 1 o 2 mm por encima del mismo.
- 3.- Mezclar la cantidad deseada de DNA amplificado con 0.2 volúmenes de buffer de carga.
- 4.- Una vez mezclado depositar el volumen de DNA amplificado en cada pozo, usando una micropipeta Pipetman.
- 5.- Conectar los cables de los electrodos de la camara de tal manera que el negativo quede en el mismo extremo a las muestras y el positivo en el extremo opuesto. Conectar los cables a la fuente de poder y dejar correr el gel a 100V hasta que el indicador azul de bromofenol llegue a $\frac{3}{4}$ del gel en un tiempo aproximado de 45-60 min.
- 6.- Una vez terminado el corrimiento depositar el gel en una charola de plástico y agregar suficiente volúmen de bromuro de etidio para cubrirlo completamente, el gel debe de manejarse con guantes ya que el bromuro de etidio es carcinógeno. Dejar teñir por 5min.
- 7.- Devolver el bromuro de etidio a su contenedor.
- 8.- Colocar el gel en el transiluminador de luz ultravioleta para observar la amplificación de DNA que aparece como bandas color naranja fosforescente. El DNA se desplaza más lejos del polo negativo conforme sea más pequeño o bien compacto.

Electroforésis en geles de poliacrilamida

- 1.- Preparar la acrilamida al 4%.
- 2.- Depositar la acrilamida sin polimerizar al molde, colocar rápidamente el peine de 1mm. de grosor para formar los pozos y esperar a que polimerice alrededor de 20 min.
- 3.- Enjuagar el gel con agua bidestilada para eliminar el exceso de acrilamida que halla quedado sin polimerizar.
- 4.- Montar el molde con los geles en la cámara de electroforesis, previamente llenada con buffer TAE 1X.
- 5.- Mezclar la cantidad deseada de DNA amplificado con 0.2 volúmenes de buffer de carga.
- 6.- Una vez mezclado depositar el volúmen de DNA amplificado en los pozos del gel.
- 7.- Adicionar buffer TAE 1X en el depósito superior de la cámara y conectar los cables a la fuente de poder.
- 8.- Correr la electroforésis a 50V hasta que colorante de referencia llegue al borde inferior del gel, aproximadamente 2 h.
- 9.- Sacar el gel del molde y colocarlo en una charola de plástico y agregar un volumen adecuado de bromuro de etidio para curirlo completamente. El gel debe de manejarse con guantes ya que el bromuro de etidio es carcinógeno. Dejar teñir por 5 min.
- 10.- Devolver el bromuro de etidio a su contenedor.
- 11.- Colocar el gel en el transiluminador de luz ultravioleta para observar el DNA que aparece como bandas color naranja fosforescente. El DNA se desplaza más lejos del polo negativo conforme sea más pequeño o bien compacto.

Apéndice B

Medios de cultivo y soluciones

B.1. Medios de cultivo

Nota: Los medios se preparan con agua bidestiladas y se esterilizan en autoclave a 15 lb/pulg² durante 20 min.

Caldo soya tripticasa

Peptona de caseína	17.0g
Peptona de soya	3.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Fosfato dipotásico	2.5g
Dextrosa	2.5g

Agar soya tripticasa con sangre de carnero

Peptona de caseína	15.0g
Peptona de soya	5.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Sangre de carnero	50.0g
Agar	15.0g

Jarra de Brewer

Sobre GasPak	Generador de H ₂ + CO ₂
Catalisador GasPak	Paladio + Aluminio

B.2 Soluciones

Nota: Todas las soluciones se preparan con agua bidestilada. Los buffers Tris se ajustan a pH 8.0 (si así se indica) y se filtran en membranas millipore de 0.45µm al igual que las soluciones marcadas con asterisco.

Buffer TAE 10X

Tris-base	48.4 g/l
Acido acético Glacial	57.1 ml
EDTA 0.5 M (pH 8.0)	100ml

Buffer de Carga

Azul de Bromofenol	0.25%
Xilencianol	0.25%
Glicerol en agua	30%

Persulfato de amonio al 10%

Persulfato de Amonio	10 g
Agua bidestilada	100 ml

Acilamida - Bisacrilamida 4 %*

Acrilamida	29 g
Bisacrilamida	1 g
Agua bidestilada	100 ml

Agarosa al 2.5 %

Agarosa	2.5 g
Buffer TAE 1X	100 ml

Tris - Boratos (TBE)

Tris-base	54 g
Acido borico	27.5 g
EDTA 0.5 M (pH 8.0)	20 ml

Literatura Citada

- Ashimoto, A., C. Chen, I. Bakker, y J. Slots.** 1996. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol. Immunol.* **11**:266-273.
- Amann, R., W. Ludwig, y K. L. Schleifer.** 1994. Identification of uncultured bacteria: A challenging task for molecular taxonomists. *ASM News.* **60**: 360-365.
- Amann, R.J., W. Ludwig, y K. H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169
- Bascones, A.** 1985. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad periodontal. Editorial Avances. pp.160-186.
- Bodinka, A., H. Schmidt., B. Henkel., T. F. Flemmig, y B.Karch.** 1994. Polymerase chain reaction for the identification of *Porphyromonas gingivalis* collagenase genes. *Oral Microbiol. Immunol.* **9**:161-165
- Borriello, S. P., P. J. Reed, y F. E. Barclay.** 1987. The use of fast protein liquid chromatography for the identification of anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev.* **36**: 407-77.
- Carranza, F. A.** 1993. Periodoncia clínica. 7a. Edición. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana, México, D.F.

- Clayton, C. L., H. Kleanthous, D. D. Morgan, L. Puckey, y S. Tabaqchali.** 1993. Rapid fingerprinting of *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 1420-1425.
- Condrorelli, F., G. Scalia, C. Giuditta, B. Rossetti, G. Nicoletti, y A. M. Bue.** 1998. Isolation of *Porphyromonas gingivalis* and detection of immunoglobulin A specific to fimbrial antigen in gingival crevicular fluid. *J. Clin Microbiol.* **36**: 2322-2325.
- Conrads, G., F. F. Thomas, I. Seyfarth, F. Lampert, y R. Lütticken.** 1999. Simultaneous detection of *Bacteroides forsythus* and *Prevotella intermedia* by 16S rRNA Gene-Direct multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1621-1624.
- Conrads, G.R., R. Mutter, J. Fischer, A. Brauner, R. Luetticken, y F. Lampert.** 1996. PCR reaction and dot blot hybridization to monitor the distribution of oral pathogens within plaque samples of periodontally healthy individuals. *J. Periodontol.* **67**: 994-1003.
- Crawford, A., S. S. Socransky, y D. Bratthal.** 1975. Predominant cultivable microbiota of advanced periodontitis. *J. Dent. Res.* **54**: 97.
- Cutler, C. W., J. R. Kalmar, y C. A. Genco.** 1995. Pathogenic strategies of the oral anaerobe, *Porphyromonas gingivalis*. *Trends Microbiol.* **3**: 45-51C.
- De la Garza, R. M. A.** 1998. Detección molecular de bacterias asociadas a periodontitis del adulto. Tesis de Maestría. Fac. de Ciencias Biológicas, UANL. México.

- Dzink, J. L., A. C. R. Tanner, A. D. Haffajee, y S. S. Socransky.** 1985. Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. *J. Clin. Periodontol.* **12**: 648-659.
- Dix, K., M. S. Watanabe, S. McArdle, D. I. Lee, C. Randolph, B. Moncla, y D. E. Schwartz.** 1989. Species-specific oligodeoxynucleotide probes for the identification of periodontal bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 319-323.
- Fujise, O. T., T. Hamachi, T. Hirofuji, y K. Maeda.** 1995. Colorimetric microtiter plate based assay for detección and quantification of amplified *Actinobacillus actinomycetecomitans* DNA. *Oral Microbiol. Inmunol.* **10**: 372-377.
- Griffen, A. L., M. R. Becker, S. R. Lyons, M. L. Moeschberger, y E. J. Leys.** 1998. Prevalencia of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 3239-3242.
- Gutell, R.R., N. Larsen, y C. R. Woese** 1994. Lessons from an Evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structure from a comparative perspective. *Microbiol. Rev.* **58**: 10-26
- Guillot, E., y C. Mouton.** 1997. PCR-DNA Probe Assays for Identification and detection of *Prevotella intermedia* sensu stricto and *Prevotella nigrescens*. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 1876-1882.
- Huss, V. A. R., H. Festl, y K. H. Schleifer.,** 1984. Nucleic acid hybridizations studies and deoxyribonucleic acid base compositions of anaerobic gram-positive cocci. *International J. Systematic. Bacteriol.* **34**: 95-101

- Kamma, J. J., N. Nakaou, y F. A. Mani.** 1994. Microbiota of rapidly progressive periodontitis lesions in association with clinical parameters. *J. Periodontol.* **65**: 1073-1078.
- Kuritz, A.P., C. E. Getty, P. Shaughnessy, R. Hesse, y A. A. Salyers.** 1986 DNA probes for identification of clinically important *Bacteroides* species. *J. Clin. Microbiol.* **23**: 343-349
- Levett, P. N.** 1991. Anaerobic microbiology. A Practical Approach. 1a.Ed. Editorial IRL PRESS. University of Oxford. pp.29-36.
- Listgarten, A. M.** 1992. Microbiological testing in the diagnosis of periodontal disease. *J. Periodontol.* **63**: 332-337.
- Loos, B. G., A. J. Van Winkelhoff, R. G. Dunford, R. J. Genco, J. Graaff, y D. P. Dickenson.** 1992. A sististical approach to the ecology Porphyromonas gingivalis. *J. Dent. Res.* **69**, 1488-1493
- Ludwing, W., G. Kirchof, G. Klugbauer, N. Weizenegger, N. Betzl, M. Ehrmann, C. Hertel, S. Tatzel, H. Zitzelsberger, S. Liebl, M. Hochbergen, J. Shah., D. Lane, y P. R. Walinoef.** 1992. Complete 23S ribosomal RNA sequences of bacteria gram positive with allow DNA G+C content. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**: 487-501
- Matto, J., M. Saarela, B. Von-Troil-Linden, E. Kononen, H. S. Jousimies, H. Torkko, S. Alaluusua, y S. Asikainen.** 1996. Distribution and genetic analysis of oral *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol. Inmunol.* **11**: 96-102.

- Moncla, B. J., S. T. Motley, P. Braham, L. Ewing, T. H. Adams, y M. J. Vermeulen.** 1991. Use of synthetic oligonucleotide DNA probe for identification and direct detection of *Bacteroides forsythus* in plaque samples. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 2158-2152.
- Moore, W., L. H. Moore, R. R. Ranney, J. A. Burmeister, y H. A. Schenkein.** 1991. The microflora of periodontal sites showing active destructive progression. *J. Clin. Microbiol.* **18**: 729-739
- Morotomi, M., T. Ohno, y M. Mutai.,** 1988. Rapid and correct identification of intestinal *Bacteroides spp.* with chromosomal DNA probes by whole-cell dot blot hybridization. *Appl. Environ Microbiol.* **54**: 1158-62.
- Nisengard, R. J., M. G. Newman, y J. J. Zambon.** 1992. Periodontal Disease. En oral microbiology and immunology. 2a. Ed. Editorial W.B.Sauders Company. Filadelfia. E.U.A.pp 360-384.
- Nolte, W.** 1985. Microbiología Odontológica. 4a. Ed. Nueva Editorial Interamericana. México. pp.619-641.
- Pahl, A., U. Kühlbrand, K. Brune, M. Röllinghoff, y A. Gessner.** 1999. Quantitative detection of *Borrelia burgdorferi* by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1958-1963.
- Poxton, I. R.** 1988. Methods for the immunological analysis of anaerobes. In: *Borriella sp.* Eds. Anaerobes today. Chichester: pp. 151-8
- Ranney, R. R.** 1992. Differential diagnosis in clinical trials of therapy for periodontitis. *J. Periodontol.* **63**: 1052-1057.

Shetab, R., S. H. Cohen, T. Prindiville, J. Y. Tang, M. Cantrell, D. Rahmani, y J. Silva. 1998. Detection of *Bacteroides fragilis* enteroxigen gene by PCR. J. Clin. Microbiol. **36**: 1729-1732.

Shleifer, K. H., y O. Kandler. 1972. Peptidoglycan types or bacterial cell walls and their taxonomic implications. Bacteriol Rev. **36**: 407-77

Slots, J. 1986. Virulence factors of the bacterial that cause periodontol disease. Compendium Cont Educ Dent. **7**: 665-671.

Socransky, S. S., y D. A. Haffajee. 1992. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: Current concepts. J. Periodontol. **63**: 322-331.

Tabaqchali, S., R. Silman, y D.Holland., 1987. Automation in clinical microbiology: a new approach to identifying microorganisms by automated pattern matching of proteins labeled with [35S] methionine. J. Clin Pathol. **40**: 1070-87

Tabaqchali, S. 1982. Rapid techniques for the identification of anaerobic bacteria and presumptive diagnosis. Scand J. Infect Dis. **35**: 23-30

Uematsu, H., y E. Hoshino. 1992. Predominant obligate anaerobes in human periodontal pockets. J. Periodont Res. **27**: 15-19.

Van Steenberg, T. J. M., M. D. A. Petit, L. H. M. Scholte, U. Velden, y J.Graaff. 1993. Transmission of *Porphyromonas gingivalis* between spouses. J. Clin Periodontol. **20**: 340-345.

White, J.T., R. Madej, y D. H. Persingt. 1992. The polymerase chain reaction: Clinical applications. Adv. Clin. Chemistry. **29**. 161-196.

Weiss, N. 1981. Cell wall structure of anaerobic cocci. *Revue del' Institute Pasteur The Lyon.* **14:** 53-9

Yolken, R. H. 1988. Nucleic acids or immunoglobulins; Which are the molecular probes or the future? *Mol. Cell. Probes.* **2:** 87 - 96

Zambon, J. J., H. S. Reynolds, R. G. DeVizio, W. Volpe, R. Berta, J. P. Tempro, y Y. Bonta. 1995. Microbial alterations in supragingival dental plaque in response to a triclosan-containing dentrifice. *Oral Microbiol. Immunol.* **10:** 247-255

