



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE ODONTOLÓGIA

MICROORGANISMOS
PERIODONTOPATÓGENOS

T E S I N A

Que para obtener el Título de:

CIRUJANA DENTISTA

Presenta:

YOMARIE SERRANO MENDOZA

DIRECTORA

DRA. SANTA PONCE BRAVO

MÉXICO, D.F.

2005

16/05
Santa Ponce Bravo

*Quiero agradecer a la vida la oportunidad de tener
a la gente que mas quiero a mi lado y que puedan
Compartir conmigo estos momentos.*

*A mis padres Maria y Eleazar
que han sido mi guía en todo momento, por su mano calida
que me ha enseñado a no desfaceller, por su cariño, paciencia,
y comprensión, por su apoyo incondicional.*

*Amis hermanos Sarai y Xiumel
por compartir momentos inolvidables,
por su compañía y amistad.*

*A Marcos I.
Por ser mi mejor amigo, por su apoyo,
Por confiar en mi ,por estar siempre
a mi lado, Por existir.*

A mis amigos

*Jose L, Victor G., Aline Q., Ulises T., Aciledy G.,
Sandra A., Perla, Marisol T., Alejandro N.,
Luis M. , Omar, Jorge, Sandra G. , Luz S.,
Elizabeth , Tita , Lupe , Rene G., Luis A. E.,
Perla E. , Fatima O., Victor G., Javier B. ,
Hugo P., Juan B., Marco A.V., Aurelio O.,
Blanca L., Iracema C., Carlos V., Alejandrina,
Adriana V., Gloaria C..*

*Me muestran que la vida es una oportunidad
para cumplir sueños , que nunca existen
limites para realizarlos .*

*Amis maestros
en especial al Mtro. Jose manuel Ornelas E. Ibáñez
y a la Dra. Santa Ponce Bravopor alejarme del camino
de la mediocridad y guiarme hacia la sabiduría.*

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEORICO.....	4
1. PERIODONTO.....	4
1.1. Periodonto.....	4
1.2. Cemento.....	4
1.3. Ligamento periodontal.....	5
1.3.1. Fibras gingivales.....	6
1.3.2. Fibras crestodentales.....	6
1.3.3. Fibras alveolodentales horizontales.....	6
1.3.4. Fibras alveolodentales oblicuas.....	6
1.3.5. Fibras apicales.....	6
1.3.6. Otras estructuras.....	6
1.4. Hueso alveolar.....	7
1.5. Encía.....	7
2. ENFERMEDAD PERIODONTAL.....	9
2.1. Enfermedad periodontal.....	9
2.2. Clasificación de la enfermedad periodontal.....	9
2.3. Factores etiológicos.....	9
3. MECANISMOS DE DEFENSA ESPECÍFICOS Y NO ESPECÍFICOS.....	11
3.1. Leucocitos polimorfonucleares.....	11
3.2. Anticuerpos.....	12

4. PROCESOS DE DEFENSA DEL HOSPEDERO.....	13
4.1, Meteloproteinasa de la matriz.....	14
4.2. Células involucradas en los procesos de defensa.....	14
4.2.1. Leucocitos polimorfonucleares.....	14
4.2.2. Macrófagos.....	15
4.2.3. Linfocitos.....	15
4.2.3.1. LinfocitosT.....	15
4.2.3.2. Linfocitos B.....	15
4.2.3.3. Células asesinas naturales.....	15
4.3. Citosina.....	16
4.3.1. Citocina proinflamatoria.....	16
4.2.2. Citosinas quimiotactica.....	17
5. MICROORGANISMOS EN LA PLACA SUBGINGIVAL.....	18
5.1. Placa dental o bacteriana.....	21
5.2. Formación de la placa.....	23
5.3. Inflamación gingival.....	24
5.3.1. Lesión gingival inicial.....	24
5.3.2. Lesión gingival temprana.....	24
5.3.3. Lesión gingival establecida.....	24
5.3.4. Lesión gingival/periodontal.....	24
5.3.5. La gingivitis ulcero necrotizante.....	26
5.3.6. Periodontitis del adulto.....	26
5.3.7. Periodontitis prepuberal.....	26

5.3.8.Periodontitis juvenil.....	27
5.3.9.Periodontitis rápidamente progresiva.....	27
5.3.10.Periodontitis refractaria.....	27
5.3.11.Periodontitis ulcerativa necrotizante.....	28
5.3.12.Periodontitis asociada a enfermedades sistémicas.....	28
5.4. Algunos determinantes microbianos de virulencia en la enfermedad periodontal.....	29
5.4.1. Adherencia y colonización.....	29
5.4.2. Destrucción del tejido.....	29
5.4.3. Evasión de la inmunidad del hospedero.....	29
5.5. Productos resultantes del deterioro tisular.....	29
5.5.1. Glucosaminoglucanos.....	29
5.5.2. Hidroxiprolina.....	29
5.5.3. Fibronectina.....	30
5.5.4. Proteínas del tejido conjuntivo.....	30
6. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL.....	33
6.1. Métodos de diagnóstico de la enfermedad periodontal.....	33
6.1.1. Diagnóstico etiológico.....	33
6.1.2. Diagnóstico bacteriológico.....	34
6.1.3. Diagnóstico clínico.....	34
6.1.4. Diagnóstico Radiográfico.....	35
6.2. Nuevos métodos.....	36
6.3. Métodos directos.....	36
6.3.1. Análisis de cultivo.....	36

6.4	Métodos Indirectos.....	38
6.4.1.	Análisis de restricción de endonucleasa.....	39
6.4.2.	Sondas ADN.....	39
6.5.	Métodos Inmunológicos.....	40
6.5.1.	Aglutinación del látex.....	40
6.5.2.	ELISA.....	40
6.5.3.	Inmunofluorescencia.....	41
6.6.	Problemas asociados con el uso de procedimientos microbiológicos como auxiliares de diagnóstico por la enfermedad periodontal.....	42
7.	AGENTES BACTERIANOS.....	44
7.1.	<i>P. gingivalis</i> y <i>A. actinomycetemcomitans</i>	44
7.2.	<i>Porphyromonas</i>	45
7.2.1.	<i>Porphyromona gingivalis</i>	45
7.2.2.	<i>Porphyromana endodontalis</i>	46
7.2.3.	<i>Porphyromana assccharolytica</i>	46
7.3.	<i>Prevotella</i>	46
7.3.1.	<i>Prevotella melaninogenica</i>	46
7.3.2.	<i>Prevotella denticola</i>	47
7.3.3.	<i>Prevotella loeschei</i>	47
7.3.4.	<i>Prevotella intermedia</i>	48
7.3.5.	<i>Prevotella oralis</i>	48
7.3.6.	<i>Prevotella buccalis</i>	48

7.4.	<i>Fusobacterium</i>	48
7.4.1.	<i>F. nucleatum</i> subespecie <i>nucleatum</i>	49
7.4.2.	<i>F. nucleatum</i> subespecie <i>vincentii</i>	49
7.4.3.	<i>F. nucleatum</i> subespecie <i>fusiforme</i>	49
7.5.	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	49
7.6.	Medios de cultivo.....	51
7.7.	Sistemas de incubación en anaerobiosis.....	54
7.8.	Tiempo de incubación.....	54
7.9.	Otros procedimientos.....	55
7.10.	Examen de los cultivos y aislamiento.....	57
7.11.	Identificación.....	58
7.11.1.	Identificación preliminar.....	58
7.11.2.	Identificación final.....	59
7.11.2.1.	Detección de la cantidad enzimática de una bacteria.....	61
7.11.2.2.	Detección de los productos finales del metabolismo bacteriano mediante cromatografía gas-líquido.....	62
7.12.	Recomendaciones.....	62
7.13.	Interpretación de los resultados contenidos con micrométodos comerciales.....	63
7.13.1.	Interpretación de los resultados de las pruebas individuales complementarias realizadas en casos concretos.....	65
8.	PRUEBAS DE DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD	68
8.1.	Indicaciones.....	68

8.2.	Métodos.....	68
8.2.1.	Dilución en agar.....	69
8.2.2.	Microdilución en caldo.....	70
8.2.3.	Sistemas comercializados.....	71
8.2.4.	Controles de calidad.....	72
8.2.5.	Detección de β -lactamasas.....	72
III.	CONCLUSIONES.....	74
IV.	BIBLIOGRAFÍA.....	75

I. INTRODUCCIÓN

Periodontitis se define como un proceso infeccioso relacionado con la acumulación de placa subgingival y cálculo dental, siendo los microorganismos anaerobios los actores principales. Cuando la placa formada sobre la superficie del diente no es removida, las bacterias presentes se acumulan e inician una reacción inflamatoria en la encía; el establecimiento de un proceso infeccioso provoca la disminución de la tensión de oxígeno molecular y en consecuencia del potencial redox; con lo cual se favorece la supervivencia y crecimiento de la flora bacteriana anaeróbica, prevaleciendo ésta sobre la flora aeróbica y anaerobia facultativa.

Las bacterias anaerobias son microorganismos que no pueden vivir en presencia de oxígeno, ya que les resulta tóxico. Poseen un alto poder de síntesis, de tal forma que su desarrollo en medios sintéticos depende del aporte de diversos factores de crecimiento, en especial de vitaminas, suelen estar dotadas por diversas enzimas que le permiten actuar sobre diferentes productos orgánicos.⁽¹⁾

Cierto número de bacterias anaerobias son patógenas para el hombre, en algunos casos originan procesos eminentemente tóxicos, mientras que en otros la acción patógena está ligada a su morfo-estructura y enzimas, y a reacciones inmunológicas, o a mecanismos que van a perturbar los mecanismos de defensa del hospedero. Cada día existe un mayor interés por este grupo de bacterias asociadas a la enfermedad periodontal.

El desarrollo de técnicas microbiológicas durante los últimos 20 años ha permitido aclarar considerablemente la etiología de la periodontitis, y se han establecido grupos de microorganismos específicos presentes en dicha enfermedad.

La microbiota periodontal es una comunidad de microorganismos, principalmente anaerobios, muchos de los cuales aún son difíciles de aislar en el laboratorio. ⁽²⁾

Durante años la flora bacteriana predominante en la periodontitis ha sido estudiada. De estos estudios, como agentes etiológicos, se ha dedicado particular atención a *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* y a especies de Bacterias anaerobias gramnegativas pigmentadas (BAGNP).

La mayoría de las investigaciones realizadas reportan que la etiología de la periodontitis está asociada a la presencia de especies de bacterias anaerobias gramnegativas (BAGN). Muchos autores coinciden que entre los periodontopatógenos más comunes se encuentran *Porphyromona gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* y especies de *Capnocytophaga*. De los cuales algunas de sus características y localización son:

A. actinomycetemcomitans, se le ha relacionado principalmente con la Periodontitis Juvenil, el cual se ha encontrado colonizando la mucosa bucal, paladar, lengua, así como en placa supra y subgingival de individuos, tanto sanos como enfermos periodontalmente.

P. gingivalis y P. intermedia son las especies más virulentas dentro de las BAGNP y más comúnmente asociadas con la Periodontitis del Adulto; estas especies habitan en el surco gingival y en la bolsa periodontal de la cavidad bucal. Asimismo, *P. gingivalis* y *P. intermedia* han sido aisladas en jóvenes con Periodontitis Prepuberal junto con *Fusobacterium sp.*, *A. actinomycetemcomitans* y *Eikenella corrodens*, igualmente en individuos con Periodontitis Postjuvenil y Periodontitis de progresión rápida, asociadas a *Treponema denticola*.⁽¹⁾

Basándose en la revisión de algunos investigadores nos resulta obvio que la microbiota periodontal es una comunidad compleja de microorganismos. *P. gingivalis* y *P. intermedia*, actualmente se incluyen en el grupo de patógenos periodontales más importantes, conjuntamente con *A. actinomycetemcomitans*, *B. forsythus* y *Capnocytophaga sp.*, los cuales son aislados en muchos laboratorios con fines de investigación y manejo de la periodontitis. Muchas investigaciones aun se encaminan a describir los factores de virulencia de varios patógenos periodontales, lo que permitirá comprender aun más la patogénesis de la periodontitis. ⁽³⁾

II. MARCO TEÓRICO

1. PERIODONTO

El término enfermedad periodontal hace referencia a un conjunto de enfermedades inflamatorias que afectan los tejidos de soporte del diente, encía, hueso y ligamento periodontal (Fig. 1) ⁽³⁾

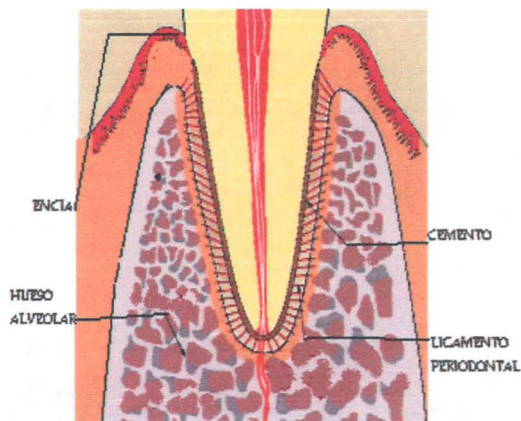


Figura 1. Tejidos que forman el periodonto
(Tomado de: <http://www.gogle.com.mx/periodonto>)

1.1. Periodonto. Está formado por el cemento, el ligamento periodontal, la encía y por el hueso alveolar. El ligamento periodontal y la encía son tejidos blandos. El cemento y el hueso alveolar son tejidos duros por estar mineralizados (Fig. 1;).⁽⁴⁾

1.2. Cemento: El cemento es un tejido mesenquimatoso calcificado que constituye la cubierta exterior de la raíz. Se puede encontrar dos tipos de cemento; cemento acelular (primario) y cemento celular (secundario).

Corresponde a un tejido óseo especial, sin irrigación ni inervación. Se compone en un 55% de hidroxipatita cálcica y en 45% de agua. Se distribuye a lo largo de la raíz del diente y en su región apical presenta los cementocitos, que lo elaboraron y que se encuentran en lagunas, similares a las de los osteocitos del hueso. Esta región del cemento se denomina cemento celular. La región coronal del cemento carece de cementocitos y se denomina cemento acelular. Ambos cementos presentan cementoblastos. Las fibras colágenas del ligamento periodontal (fibras de Sharpey) se encuentran embebidas en el cemento y se unen al alvéolo, fijando el diente al alvéolo.⁽⁴⁾

1.3. Ligamento periodontal. Está situado en la región situada entre el cemento de la raíz y el alvéolo óseo. Mide 0,5 mm de amplitud. Es un tejido conjuntivo denso ricamente vascular, caracterizado por grupos principales de fibras de colágeno I distribuidos en patrones predeterminados para resistir las fuerzas de la masticación. Los extremos de estas fibras se embeben en el alvéolo y el cemento a manera de fibras de Sharpey, que permiten al ligamento periodontal suspender a la pieza dentaria dentro de su alvéolo. Presenta fibras nerviosas vegetativas vasomotoras, de dolor y propioceptivas⁽²⁾. El periodonto o el ligamento periodontal que es un tejido conjuntivo interpuesto entre las raíces de los dientes y la pared interior del agujero alveolar. Este continúa con el tejido conectivo de la encía y se comunica con los espacios medulares a través de los conductos vasculares del hueso.

El ligamento periodontal vincula los dientes al hueso alveolar propio, dando apoyo, protección y le da un aporte sensitivo al sistema masticatorio.

Las fibras del periodonto mantienen suspendido al diente en el alvéolo. Su modo de acción puede representarse de manera que, cuando tenga lugar una presión sobre el diente, todas las fibras o una parte de ellas se ven sometidas a tensión; como resultado de ello, la presión ejercida sobre el

diente se transforma en una tracción aplicada al hueso alveolar, pero que actúa también naturalmente en forma de tracción sobre el cemento dentario.⁽⁵⁾

La disposición de las fibras periodontales se pueden clasificar así desde la porción cervical al ápice:

1.3.1. Fibras gingivales. Son aquellas cuya inserción inferior se realiza a nivel del cuello del diente.

1.3.2. Fibras crestodentales. Parten de la cresta alveolar y van a insertarse en el cemento, por debajo de la inserción de las fibras gingivales.

1.3.3. Fibras alveolodentales horizontales. Se dirigen horizontalmente desde la pared alveolar al cemento dentario. No ocupan más que una pequeña porción del periodonto.

1.3.4. Fibras alveolodentales oblicuas: Es el grupo más basto en el ligamento periodontal, estas fibras se extienden oblicuamente hacia el ápice radicular, desde el alveolo al cemento, ocupando la mayor parte del periodonto. Sirven para transformar las presiones que recibe el diente en tracciones sobre el alvéolo, lo cual resulta muy beneficioso para la inserción, ya que el hueso resiste siempre mucho mejor las tracciones que las presiones.

1.3.5. Fibras apicales: Abiertas en abanico, se irradian desde la vecindad del ápice a la pared alveolar.

1.3.6. Otras estructuras. En el periodonto también encontramos elementos celulares, vasos sanguíneos y nervios.⁽⁴⁾

Elementos celulares. Consisten en fibroblastos, cementoblastos, osteoblastos, osteoclastos, y los restos epiteliales de Malassez.

Nervios. Tienen su origen en los nervios del hueso y la encía.

Vasos sanguíneos. El periodonto está ricamente vascularizado, sus vasos provienen y desembocan en los vasos de las paredes alveolares y de la encía.⁽⁴⁾

1.4. Hueso alveolar. Es la prolongación del maxilar inferior y superior, que se divide en compartimentos llamados alvéolos, separados entre sí por un tabique interalveolar óseo. El alvéolo presenta tres regiones, la de las placas corticales, la esponjosa y la alveolar propiamente dicha. Las placas corticales se disponen en sentido lingual y labial, formando una repisa de sostén muy resistente de hueso compacto, revestida por hueso poroso, que constituye la capa esponjosa. Esta rodea a una capa delgada de hueso compacto, el hueso alveolar propiamente dicho, cuya morfología es reflejo de la forma de la raíz suspendida en su interior. En las tres porciones del hueso alveolar hay conductos por los cuales pasan las arterias nutricias, que luego llegaran también al ligamento periodontal.⁽⁵⁾

1.5. Encías. Son elementos de la mucosa, resistente. Consisten en un epitelio plano estratificado queratinizado o paraqueratinizado, y bajo el tejido conjuntivo denso con fibras de colágeno tipo I que constituyen grupos de fibras principales que se parecen a las del ligamento periodontal.

La encía es una combinación de tejidos epiteliales y conjuntivos que forman la mucosa masticatoria alrededor del diente. La encía recubre las apófisis alveolares de los maxilares y rodea el cuello de los dientes, dejando descubierta la corona clínica de los dientes. La encía se divide topográficamente en encía libre o marginal que es la que rodea los dientes en forma de collar, tiene forma festoneada, se delimita por el "surco

marginal". La encía adherida es la continuación de la marginal, recubre el periostio del hueso maxilar, es fija y laxa. La encía interdental es la que se encuentra en el espacio interproximal y esta apical al área del contacto dental. ⁽³⁾

2. ENFERMEDAD PERIODONTAL

2.1. Enfermedad periodontal. Es considerada como el resultado de un desequilibrio entre la interacción inmunológica del hospedero y la flora de la placa dental marginal que coloniza el surco gingival, en ella se produce una pérdida del ligamento periodontal y una reabsorción del alvéolo dentario que conducen, en último término, a la pérdida del diente. Es la causa más frecuente de pérdida de piezas dentarias en los adultos. La enfermedad periodontal puede ser ampliamente categorizada dentro de la gingivitis y periodontitis, esta clasificación a su vez se subdividen en numerosas categorías; debe notarse que no hay ninguna clasificación universal. La periodontitis puede ser activa o inactiva y la clasificación más aceptada se basa en el grupo de edad afectado y combina criterios de extensión de las lesiones y curso evolutivo (Tabla 1). ⁽²⁾

2.2. Clasificación de la enfermedad periodontal. Existen muchas clasificaciones al respecto, en la tabla 1 se presenta ésta.

2.3. Factores etiológicos. Los principales factores de la enfermedad periodontal son:

- Mecanismos de defensa específicos y no específicos
- Tejido del hospedero
- Microorganismos en la placa subgingival. ⁽⁶⁾

Tabla 1. Clasificación de la periodontitis

1) Periodontitis del adulto

- a) Crónica (Localizada ,Generalizada)
- b) Agresiva (Localizada, Generalizada)

2) Periodontitis precoz

- a) Prepuberal (generalizada/localizada)
- b) Juvenil (generalizada/localizada)
- c) Rápidamente progresiva

3) Periodontitis asociada a enfermedad sistémica.

Síndrome de Down

Diabetes tipo I.

Infección por VIH

4) Periodontitis ulcerativa-necotrizante

5) Periodontitis refractaria

Tomada de: <http://www.ecuaodontologos.com>

3. MECANISMOS DE DEFENSA ESPECÍFICOS Y NO ESPECÍFICOS

Uno de los más importantes componentes del hospedero es el fluido crevicular gingival, que contiene ambos factores de defensa específicos y no específicos. Ambas respuestas inmunes: la específica y no específica del hospedero sobre la placa subgingival se consideran que juegan un papel crítico en la iniciación, progreso y recuperación de la enfermedad periodontal (Tabla 2).⁽⁷⁾

Tabla 2. Factores de defensa específicos y no específicos en el fluido crevicular gingival	
Específicos	No específico
Linfocitos B y T	Polimorfos Macrófagos
Anticuerpos : IgG , IgA , IgM	Sistemas de complemento Proteasas Lisozima Lactoferrina

Tomada de: Samaranayake 2002⁽⁷⁾ pp 226

3.1. Leucocitos polimorfonucleares. La encía clínicamente sana contiene pequeños números de leucocitos polimorfonucleares (LPMNs). Su incremento en el numero se registran durante el ataque de gingivitis y periodontitis los LPMN migran desde las venulas y entran a las células del surco continuo del epitelio de unión.

Cuando los LPMNs encuentran bacterias, la fagocitosis sucede, y los organismos ingeridos son destruidos con una combinación de enzimas proteolíticas, otras enzimas hidrolíticas derivan de agentes tales como peróxido y ácido láctico, aunque la fagocitosis puede ocurrir en la ausencia de anticuerpo, la presencia de inmunoglobulinas y complemento elevan el proceso. La interacción entre LPMNs y la placa bacteriana puede dar como resultado:

- Muerte de microorganismos
- Muerte de leucocitos
- Autólisis de neutrófilos y liberación de enzimas lisosomales tales como Hialuronidasa, colagenasa, elastasa y ácido hidrolasa.

Así los LPMNs pueden tener una protección y un efecto fagocítico en los tejidos. La fagocitosis suele ocurrir dentro de los tejidos y posiblemente interfiere con la placa subgingival, es importante prevenir el ingreso microbiano en los tejidos. ⁽⁸⁾

3.2. Anticuerpos

Los anticuerpos específicos (IgM, IgG e IgA) locales se dirigen a la placa subgingival, son establecidos en FCG. Un elevado número de anticuerpos específicos muchos de ellos periodontopatógenos suelen verse involucrados en algunas reacciones tales como:

- Protección
- Hipersensibilidad de las reacciones del hospedero del tejido.
- No específico, no relacionado.

4. PROCESOS DE DEFENSA DEL HOSPEDERO

El hospedero posee mecanismos de defensa que son básicamente defensivos pero pueden ser responsables indirectamente del daño a los tejidos periodontales. Los mecanismos del proceso de defensa pueden ser específicos e inespecíficos (Fig. 2).

Mecanismos inespecíficos. Son las barreras físicas del hospedero como las superficies epiteliales cutáneas y mucosas.

Mecanismos específicos. Son resultado de la interacción entre el hospedero y el agente atacante (respuesta inmunológica del organismo).

La principal actividad enzimática proviene del hospedero. Es importante señalar que existe una relación entre las proteinasas y los moduladores de las funciones de las proteinasas (inhibidores). La liberación de proteasas en las encías y el área de la hendidura promueven reacciones inflamatorias y contribuye al daño del tejido conjuntivo por distintas vías. Por el contrario, los inhibidores de proteasa sirven como moduladores de la función proteasa en el área y dificultan el proceso inflamatorio. Todas las endopeptidasas provenientes del hospedero, de las cuales se sabe que se liberan en la hendidura, pueden ser inhibidas por la función combinada de la alfa-2-macroglobulina (α 2-M) y la alfa-1-antitripsina (α 1-AT). De hecho, se ha demostrado la inhibición de la collagenasa gingival por la α 2-M y la collagenasa leucocitaria polimorfonuclear (PMN) es además inhibida por la α 1-AT.

Las collagenasas bacterianas también pueden ser inhibidas por proteinasas humanas, pero también hay posibilidades de que potentes proteinasas como la que posee *P. gingivalis* (gingivalina) son capaces de degradar a estos inhibidores ⁽⁹⁾.

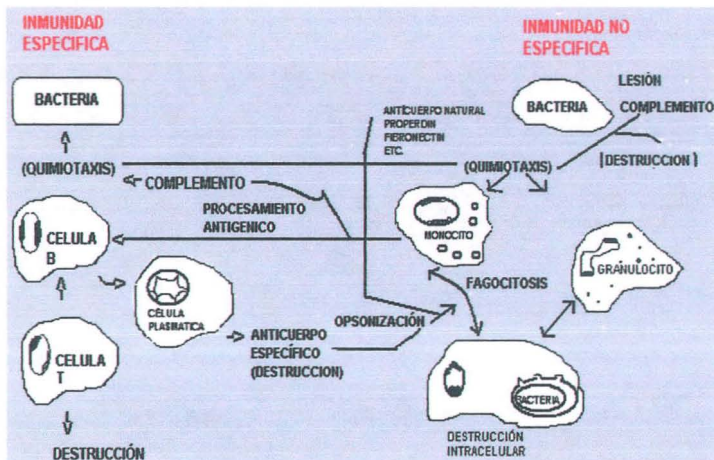


Figura 2. Procesos de defensa del hospedero, se observa la actividad fagocítica e inmunológica de los LPMN
[\(http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/odontologia/2005/\)](http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/odontologia/2005/)

4.1. Metaloproteinasas de la matriz .Se ha demostrado que tanto las células epiteliales como el tejido conjuntivo gingival inflamado son capaces de producir colagenasa en cultivos de tejidos. Una de las metaloproteinasas de la matriz (MMP) que fueron la colagenasa neutrófila y la colagenasa fibroblástica tienen la singular capacidad, no compartida por los otros miembros de la familia, de dividir la triple hélice de los colágenos de tipo I, II y III, iniciando así la degradación de la matriz extracelular. Se piensa que la colagenasa de las MMP llega a la hendidura en los PMN que migran ⁽¹⁰⁾.

4.2. Células involucradas en los procesos de defensa del hospedero

4.2.1. Leucocitos Polimorfonucleares (PMN). Los PMN del surco gingival constituyen la primera línea de defensa contra los patógenos periodontales. La elastasa, una proteasa de serina, que es un constituyente granular

primario de los PMN que causa degradación tisular y está presente con mayor actividad en sitios de inflamación gingival.

4.2.2. *Macrófagos*: Tienen una función directa importante en la inmunidad celular. Estas células grandes notablemente fagocíticas forman parte del sistema reticulo-endotelial depurador. Su actividad fagocítica mejora por receptores de superficie para la porción Fc de la inmunoglobulina G (IgG), que provee mayor contacto de los antígenos con el macrófago luego de la interacción antígeno-anticuerpo, participan con los linfocitos T al favorecer la respuesta de los linfocitos B ante muchos inmunógenos.

Se considera que los macrófagos procesan el antígeno para el linfocito B, en las lesiones inflamatorias, los macrófagos se forman por la diferenciación de monocitos transportados a la lesión por la sangre. Dichas células actúan de modo no específico con los antígenos que les aportan la capacidad para destruir a grupos diversos de bacterias, sin nexo antigénico.⁽¹¹⁾

4.2.3. *Linfocitos*: Incluyen tres tipos de células:

4.2.3.1. Linfocitos T, o células T. derivados del timo y con una función en la inmunidad celular:

4.2.3.2. Linfocitos B. o células B. derivados del hígado, el bazo y la médula ósea. Precursores de las células plasmáticas que intervienen en la inmunidad humoral.

4.2.3.3. Células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés natural killer) y asesina. Se reconoce que las células T están compuestas por varios subconjuntos que modulan la reacción humoral, Estos incluyen células T cooperadoras-inductoras (células TH) (CD4 positivas), que ayudan en la reacción celular de las células B para que se diferencien en células plasmáticas y produzcan anticuerpos y células T supresoras-citotóxicas

(células Ts; CD8 positivas), que estimulan la actividad citotóxica y microbici da de las células inmunitarias. Las células TH liberan IL-2 e IFN- γ . en tanto que las células Ts liberan IL-4 e IL-5. Las células Tu se subdividen aún más en tres subgrupos (TH1, TH2, TH0), que se distinguen por sus perfiles de producción de citocina. En la periodontitis del adulto las células TH aumentan y las células TS decrecen con el incremento de la inflamación gingival. Las células B se reconocen por la producción de inmunoglobulina. de superficie celular, a menudo inmunoglobulina M (IgM) o (IgD). ⁽¹²⁾

Sin embargo, algunas células B secretan IgG, IgA o IgE. Estas inmunoglobulinas de superficie sirven como receptores para antígenos. Las células NK se caracterizan por su falta de receptores para células T (TCR. por sus siglas en inglés T-cell receptors) e inmunoglobulina de superficie. La interacción entre antígenos y macrófagos conocida como procesamiento de antígenos conduce a la activación de las células NK. ⁽¹³⁾

4.3. Citosina. Las citocinas son proteínas solubles, segregadas por células, que actúan como moléculas mensajeras que transmiten señales a las otras células. Las interleucinas son miembros importantes del grupo de las citocinas y están involucradas primariamente en la comunicación entre los leucocitos y las otras células implicadas en los procesos inmunitarios e inflamatorios. El control de la liberación y acción de la citocina es complejo y depende de inhibidores y receptores. Muchas citocinas son capaces de actuar sobre la célula que las produjo, de manera que autoestiman su propia producción y la producción de otras citocinas. ⁽¹⁴⁾

4.3.1. Citocina proinflamatoria: Las interleucinas-1 (IL), IL-6 y factor de necrosis tumoral (TNF) estimulan la reabsorción ósea *in vitro* e *in vivo*. Tanto el *A. actinomycetemcomitans* como *P. gingivalis* e inducen la liberación de IL-1 de los macrófagos la cual juega un papel importante en la reabsorción del hueso. ⁽¹⁵⁾

4.3.2. *Citocinas quimiotácticas*. Han sido identificadas una serie de más de 20 moléculas entre las cuales la más famosa y mejor caracterizada es la interleucina 8 (IL-8).

La presencia de anticuerpos implica a las células T (ayudante y supresor) y con las células B se presentan interacciones en el tejido periodontal. Las células requieren para ampliar su rango de reacciones inmunes, estar presentes en el tejido gingival de pacientes con periodontitis y poseer antígenos específicos para la placa bacteriana. Cuando es estimulado cualquier anticuerpo (de linfocitos B) o linfocinas (de linfocitos T) son producidos ⁽¹⁶⁾

5. MICROORGANISMOS EN LA PLACA SUBGINGIVAL

Los anticuerpos y los complementos presentes en el tejido periodontal interactúan, producen reacciones de hipersensibilidad, el tejido puede reaccionar o también contribuir con la enfermedad periodontal. La microbiota periodontal es una comunidad de microorganismos, principalmente anaerobios, muchos de los cuales aún son difíciles de aislar en el laboratorio (Fig. 3).⁽¹⁷⁾

El surco gingival sano es el entorno ideal donde los microorganismos anaerobios pueden alojarse y alimentarse constantemente por el fluido crevicular gingival (GCF). Dramáticos cambios se dan durante la transición del surco dentro de la bolsa periodontal, resulta obvio que la microbiota periodontal es una comunidad compleja de microorganismos. *P. gingivalis* y *P. intermedia*, actualmente se incluyen en el grupo de patógenos periodontales más importantes, conjuntamente con *A. actinomycetemcomitans*, *B. forsythus* y *Capnocytophaga sp.*, los cuales son aislados en muchos laboratorios con fines de investigación y manejo de la periodontitis. Muchas investigaciones aun se encaminan a describir los factores de virulencia de varios patógenos periodontales, lo que permitirá comprender aun más la patogénesis de la periodontitis.⁽¹⁸⁾

Los microorganismos implicados son numerosos. Recientemente se han descrito nuevas especies (*Lactobacillus uli*, *Prevotella nigrescens*) y géneros (*Atopobium*) en los sacos periodontales, aunque su significación clínica es incierta. Otras especies como *Streptococcus oralis*, *Actinomyces sp.* y *Veillonella parvula* se han aislado de zonas inactivas y quizás desempeñan un papel protector. De todas ellas, *P. gingivalis* es la implicada de una forma más clara, ya que cumple todos los criterios de determinación.⁽¹⁹⁾

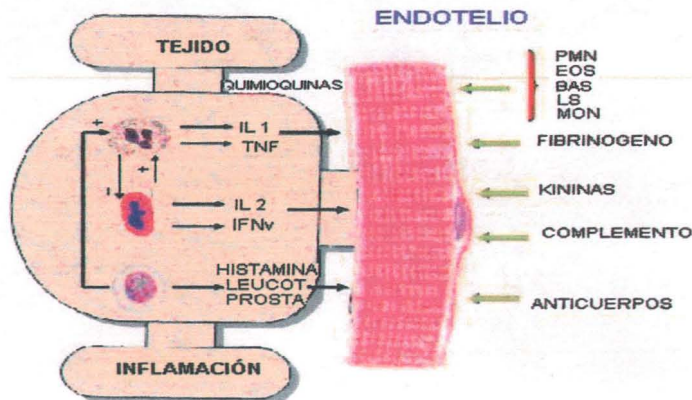


Fig.3.Respuesta inflamatoria

(<http://www.virtual.unal.edu.co/mecanismosdeadherencia>)

Existen cerca de 500 especies bacterianas identificadas en la cavidad bucal del hombre, aproximadamente 150 a 200 diferentes se pueden encontrar en la boca de cualquier individuo, en la bolsa periodontal pueden encontrarse de 30 a 100 diversos tipos de microflora. De las 500 especies detectadas en la cavidad bucal, relativamente pocos se correlacionan con enfermedades de tipo periodontal. ^(7,16)

Otros 33 microorganismos enumerados son considerados de fuerte a moderadamente asociados con enfermedades periodontales. Sin embargo, la presencia *per se* de bacterias no se puede utilizar para predecir la progresión de la enfermedad en los pacientes (Tabla 3) ⁽⁹⁾

Tres bacterias son muy fuertemente asociadas con periodontitis: Las *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. ⁽²⁰⁾

Tabla 3. Especies de bacterias presentes en los diferentes tipos de enfermedad periodontal.

1) Periodontitis del adulto:	4) Periodontitis rápidamente progresiva:
<i>P. gingivalis</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>P. gingivalis</i>
<i>C. rectus</i>	<i>P. intermedia</i>
<i>B. forsythus</i>	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	
<i>Eubacterium sp.</i>	5) Periodontitis refractaria:
<i>Capnocytophaga sp.</i>	<i>B. forsythus</i>
<i>Mycoplasma sp.</i>	<i>P. melaninogenica</i>
<i>Fusobacterium sp.</i>	<i>C. rectus</i>
<i>Treponema sp.</i>	<i>S. intermedius</i>
<i>Peptostreptococcus sp.</i>	<i>P. intermedia</i>
<i>S. sputigena</i>	<i>P. gingivalis</i>
<i>E. corrodens</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i>
2) Periodontitis prepuberal:	6) Periodontitis ulcerativa:
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	necrotizante:
<i>P. gingivalis</i>	<i>P. intermedia</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>Treponema sp.</i>
<i>S. sputigena</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>E. corrodens</i>	<i>Leptotrichia buccalis</i>
3) Periodontitis juvenil:	<i>Selenomonas sp.</i>
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>P. melaninogenica</i>
<i>P. gingivalis</i>	
<i>Eubacterium sp.</i>	
<i>Fusobacterium sp.</i>	

(Tomada de: http://www.seq.es/seq/html/revista_seq/0397/rev2.html)

Sin embargo existe una amplia variedad de bacterias y moderadamente asociadas como representativas en general de la enfermedad y se enlistan en la tabla 4.

Tabla 4. Especies bacterianas asociadas a la periodontitis

Ampliamente asociadas	Moderadamente asociadas
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>
<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Bacteroides forsythus</i>	<i>Peptostreptococcus micros</i>
<i>Treponema denticola</i>	<i>Eikenella corrodens</i>
<i>Campylobacter rectus</i>	<i>Eubacterium sp</i>
<i>Capnocytophaga sp.</i>	

Fuente: Nakagawa & col. (1990); Kamma & col. (1995); Slotwinska, S. (2000)

5.1. Placa dental o bacteriana. Se define como una película transparente e incolora, compuesta por diversas bacterias y células descamadas, leucocitos y macrófagos dentro de una matriz de proteínas y polisacáridos estos depósitos se adhieren a la superficie dentaria y a otras superficies duras de la boca y forman una biopelícula. La placa dental puede ser clasificada en: **supragingival** la cual se encuentra localizada por arriba del margen de la encía, y placa **subgingival** que se ubica por debajo del margen de la encía entre el diente y tejido del surco. Aproximadamente las tres cuartas partes de la placa están constituidos por bacterias vivas y en proliferación las cuales corresponden a más de 200 especies bacterianas. ^(1,2) Así mismo, estudios

morfológicos indican que dentro de la composición de la placa ubicada en una misma zona, existe diferenciación entre sus regiones. Tal es el caso de la placa subgingival en la cual se observan diferencias claras entre las regiones vinculadas con el diente y aquellas relacionadas con el tejido. La placa dental está compuesta sobretodo por microorganismos. Actualmente se acepta que la placa dental con su componente microbiológico es el factor etiológico primario de la enfermedad periodontal. Pero la placa por si sola no produce daño, existe un equilibrio entre el hospedero y la microbiota pero la falta de control microbiano podría conducir a un desequilibrio entre la microbiota y el hospedero debido a un incremento de la masa microbial y/o virulencia de los microorganismos presentes. ⁽¹⁴⁾

5.2. Formación de la Placa Dental: Lo primero que se forma es la película adquirida de glicoproteínas que altera la energía superficial del diente y aumenta la eficiencia de la adhesión bacteriana. Esta película posee 10 micrones de espesor. Cuando se forma la película adquirida en el diente que se encuentra en un medio líquido, se produce polarización de la estructura dental y de las bacterias también. Cuando las bacterias se acercan al diente se produce una interacción conocida con el nombre de mínimo secundario y todavía se considera que esta etapa es reversible porque aún las bacterias no están unidas al diente. Pueden adherirse a esta capa de células por co-agregación. Otros, tal como *Peptococcus* micros pueden adherirse al epitelio crevicular. Las bacterias se unen al diente por mecanismos específicos (adhesinas). Se han realizado estudios que demuestran que existe una especificidad en los mecanismos de adhesión de las bacterias a la superficie dentaria. Se establece entonces una relación de cooperatividad positiva entre la película adquirida y las bacterias en la cual se produce unión entre ambas en un punto específico. ⁽¹⁴⁾

Un ejemplo de esto es el caso del *Actinomyces viscosus* que posee estructuras proteínicas fibrosas llamadas fimbrias que se extienden a partir de la superficie de la célula bacteriana y reaccionan con los receptores específicos del diente que son residuos galactosílicos, residuos del ácido siálico, proteínas ricas en prolina o estearina. Luego que se forma la película adquirida, ésta es colonizada (colonización inicial) por especies como el *Streptococcus sanguis* y *Actinomyces viscosus* que son bacterias grampositivas. A ésta llegan otros microorganismos y se adhieren a las primeras especies de bacterias en colonizar por un fenómeno llamado co-agregación. Se ha demostrado que existe una especificidad de adhesión entre una especie y otra, más aún, el mecanismo de adhesión de un determinado par de especies parece ser mediado por un receptor específico: interacciones adhesinicas. Muchas de estas interacciones son de tipo lectina ya que están basadas en la adhesión de una proteína específica en la superficie de una especie a hidratos de carbono específicos en la superficie de la otra; un ejemplo de esto lo constituye la relación entre *Streptococcus sanguis* –*Actinomyces viscosus*.⁽²⁰⁾

La encía normal, libre de acumulaciones significativas de células inflamatorias se denomina *encía pristina*, e histológicamente se pueden observar rasgos de infiltrado inflamatorio. El infiltrado en la encía clínicamente sana puede llegar a un 5% de volumen y está constituido principalmente por neutrófilos estos son atraídos hacia el surco por acciones quimiopositivas del hospedero (IL 8, C5A, Leucotrieno B4). En esta etapa se inducen a los LPMNs a adherirse a las venulas y capilares a través de las moléculas de adhesión (ICAM-1 y ELAM-1) y comienzan a migrar a través del vaso quimiotácticamente hacia el surco gingival.⁽¹⁸⁾

5.3. Inflamación gingival.

Ocurre entre los diez y veinte días de acumulación de placa. Aún en esta etapa los signos clínicos son reversibles después de la eliminación de placa bacteriana con medidas de control eficaces. Las alteraciones clínicas pueden parecer sutiles pero histológicamente se presentan bastantes cambios. El infiltrado celular inflamatorio comprende principalmente linfocitos, macrófagos y neutrófilos y como existe un aumento en la infiltración celular, existe un cambio en la composición de los tejidos (Fig. 3).⁽¹⁾

5.3.1. Lesión gingival inicial. Histopatológicamente es evidente la dilatación de arteriolas, capilares y venulas. La presión hidrostática dentro de la microcirculación crece y se forman brechas intercelulares entre las células endoteliales capilares adyacentes. El resultado es un incremento de la permeabilidad del lecho microvascular, de modo que se exudan líquidos, células de defensa (leucocitos) y proteínas (anticuerpos) hacia los tejidos. Los leucocitos migran por un gradiente quimiotáctico hacia el surco gingival.
(14)

5.3.2. Lesión gingival temprana. Se produce aproximadamente siete días después de la acumulación de placa. Los vasos por debajo del epitelio de unión permanecen dilatados, pero su cantidad aumenta debido a la apertura de lechos capilares previamente inactivos. Linfocitos y neutrófilos constituyen la infiltración leucocitaria predominante en esta etapa y se observan muy pocos plasmocitos en la lesión. El infiltrado celular inflamatorio, en esta etapa, puede responder hasta del 15% del volumen del tejido conjuntivo. Dentro de la lesión, los fibroblastos degeneran; probablemente se produce esto por apoptosis y sirve para eliminar los fibroblastos del área, lo cual permite una mayor infiltración leucocitaria y esto permite la entrada de leucocitos y polimorfonucleares.⁽¹⁴⁾

5.3.3. Lesión gingival establecida. Esta se presenta por la continua exposición a la placa durante más de tres semanas. Hay un incremento del exudado líquido y migración de leucocitos hacia los tejidos y al surco gingival. La pérdida de colágeno continúa en ambas direcciones, lateral y apical, al expandirse el infiltrado celular inflamatorio. El epitelio dento-gingival continúa proliferando y se hace más permeable. ^(1, 13,16)

5.3.4. Lesión gingival / periodontal avanzada. Este problema periodontal también se identifica como lesión avanzada. Se presenta profundización del epitelio y el nicho ecológico se hace anaeróbico. La lesión avanzada tiene todas las características de la lesión establecida, pero difiere en forma importante en cuanto existe pérdida de hueso alveolar, el daño a las fibras es amplio, el epitelio de unión migra apicalmente desde el límite cemento-adamantino y hay amplias manifestaciones de lesión tisular inflamatoria e inmunopatológica. ^(1, 14,16)

Estas manifestaciones de lesión que se producen a lo largo de todo el proceso de la enfermedad periodontal son dadas por ciertos mecanismos de daño tisular. Se conoce que la destrucción puede ser directa microbiana o indirecta a través del hospedero. La destrucción directa se debe a la elaboración de diversas sustancias por parte de las bacterias.

Su etiología es similar a la de las periodontitis, aunque hay diferencias que dependen de la asociación o no de los dos cuadros. En los casos de gingivitis y ausencia de periodontitis las especies implicadas con mayor frecuencia son *Streptococcus anginosus*, *Campylobacter concisus*, *Treponema socranskii*, *Actinomyces naeslundii* y *S. sanguis*. Cuando coexisten ambos procesos se aíslan *Eubacterium sp.*, *Fusobacterium sp.*, *Peptostreptococcus sp.*, *Prevotella intermedia*, *Selenomonas sputigena*, *Campylobacter rectus* y *Treponema sp.* ^(1,16)

5.3.5. Gingivitis ulcerativa necrotizante aguda. Es la forma más agresiva y dolorosa, cursa con destrucción de las papilas interdentes y del borde gingival, siendo *P. intermedia* y los *Treponemas* bucales los agentes causales habituales.

En los estudios realizados sobre las zonas afectadas y adyacentes (sin alteraciones) se comprueba que en las primeras existe un predominio de gramnegativos anaerobios o facultativos y en las zonas sanas la flora predominante es grampositiva (*Actinomyces sp.*, *Streptococcus sp.*). Sólo unas pocas especies son capaces de producir enfermedad y además muchos de estos microorganismos se encuentran en personas sanas, aunque en menores cantidades. Desde el punto de vista microbiológico, en la enfermedad periodontal activa se detecta una alteración del equilibrio de la flora con incremento de patógenos potenciales y disminución de especies "protectoras". Se ha demostrado la existencia de transmisión familiar en *A. actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *C. rectus*, *P. gingivalis* y *P. intermedia*.^(13,14)

5.3.6. Periodontitis del adulto. Los microorganismos implicados son numerosos. Recientemente se han descrito nuevas especies (*Lactobacillus uli*, *Prevotella nigrescens*) y géneros (*Atopobium*) en los sacos periodontales, aunque su significancia clínica es incierta. Otras especies como *Streptococcus oralis*, *Actinomyces sp.* y *Veillonella parvula* se han aislado de zonas inactivas y quizás desempeñan un papel protector. De todas ellas, *P. gingivalis* es la implicada de una forma más clara, ya que cumple todos los criterios de determinación etiológica específica.^(6,9)

5.3.7. Periodontitis prepuberal. Aparece después de la erupción de la primera dentición. Es una forma agresiva que conduce a la destrucción rápida de las estructuras del periodonto. El agente etiológico más importante es *A. actinomycetemcomitans*, aunque también están implicados *P.*

intermedia, *P. gingivalis*, *S. sputigena* y *Eikenella corrodens*. En su patogenia es importante la aparición de una disfunción leucocitaria atribuida inicialmente a una alteración genética. Sin embargo, la eliminación de *A. actinomycetemcomitans* reduce el defecto leucocitario, hecho que sugiere que la infección puede ser la desencadenante de dicha disfunción. Recientemente se ha demostrado que *A. actinomycetemcomitans* produce una leucotoxina. ⁽⁶⁾

5.3.8. Periodontitis juvenil. La periodontitis juvenil, al igual que la prepuberal, es una forma agresiva y destructiva que conduce rápidamente a la pérdida del hueso alveolar. La implicación de *A. actinomycetemcomitans* es clara. Los pacientes presentan tasas muy elevadas de anticuerpos y se ha demostrado la transmisión familiar. Otras especies implicadas, pero con mucha menor frecuencia, son *P. gingivalis*, *Eubacterium sp.* y *Fusobacterium sp.* Aunque se ha descrito un componente genético que parece incluir un defecto en la función quimiotáctica de los LPMNs, está por determinarse la participación de *A. actinomycetemcomitans* en la disfunción leucocitaria. La forma más común es la localizada, que afecta fundamentalmente a los primeros molares y/o incisivos. La forma generalizada afecta a la mayor parte de los dientes ⁽⁹⁾

5.3.9. Periodontitis rápidamente progresiva: La edad de comienzo se extiende desde la pubertad hasta aproximadamente los 30 años. Se caracteriza por un avance rápido de las lesiones y un elevado componente de destrucción tisular. Los agentes etiológicos implicados son *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *P. intermedia*. ⁽⁹⁾

5.3.10. Periodontitis refractaria. Se caracteriza por una ausencia de respuesta al tratamiento. Las especies asociadas son *B. forsythus*, *P. melaninogenica*, *C. rectus*, *Streptococcus intermedius*, *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *E. corrodens*. ⁽⁹⁾

5.3.11. Periodontitis ulcerativa necrotizante. Se produce como consecuencia de brotes recidivantes de gingivitis ulcerativa necrotizante. Los agentes etiológicos más destacados son *P. intermedia* y *Treponema sp.* ^(9,16)

5.3.12. Periodontitis asociada a enfermedades sistémicas. La etiología de las infecciones de la cavidad bucal en pacientes inmunodeprimidos presenta algunas características específicas, pero en conjunto es similar a la de los sujetos inmunocompetentes. Sin embargo, frecuentemente se complican por sobreinfección con enterobacterias (*Klebsiella sp.*), *Enterococcus sp.*, *Clostridium sp.*, *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium sp.* y *Candida sp.* El papel de estos microorganismos y de *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus oralis* y *Fusobacterium sp.* no está totalmente aclarado. En pacientes con SIDA es frecuente aislar *C. rectus* y parece ser un importante patógeno o un indicador de enfermedad periodontal. ⁽⁹⁾

En la destrucción de los tejidos periodontales intervienen varios factores y mecanismos, como el acumulo de productos bacterianos [enzimas histolíticas (colagenasa, hialuronidasa, condroitinsulfatasa, fosfolipasas), endotoxinas, exotoxinas (leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans*), iones, ácidos grasos de cadena corta.]. El daño tisular también puede producirse de forma indirecta, a través de los mecanismos defensivos del hospedero. Algunos microorganismos como *A. actinomycetemcomitans* y *Capnocytophaga sp.* poseen factores que inhiben la proliferación de los fibroblastos y por tanto impiden la reparación tisular. ^(9,11, 19)

5.4. Algunos determinantes microbianos de virulencia en la enfermedad periodontal son:

5.4.1. Adherencia y colonización

- Fimbrias
- Cápsulas
- Antagonismo y del sinergismo microbial
- Formación de cicatriz

5.4.2. Destrucción del tejido

- Hialuronidasa
- Colagenasa
- Acido fosfatasa
- Toxina de la célula epitelial

5.4.3. Evasión de la inmunidad del hospedero

- Proteasas
- Citotoxinas
- Sideroporos ⁽⁹⁾

5.5. PRODUCTOS RESULTANTES DEL DETERIORO TISULAR

5.5.1. Glucosaminoglucanos (GAGs): Varios estudios han demostrado la presencia de altas cantidades de GAGs en muestras de fluidos gingivo-crevicular (CGF) en sitios con periodontitis.

5.5.2. Hidroxiprolina (aminoácido del colágeno). Los niveles de hidroxiprolina en CGF no son distinguibles entre los sitios de gingivitis y periodontitis ya que la destrucción de colágeno es un factor prominente en

ambas. Por esto no es un buen candidato como marcador potencial de la progresión de periodontitis.

5.5.3. Fibronectina. Es un grupo heterogéneo de proteínas presentes en sangre y tejido conjuntivo. Prestan una importante función durante la cicatrización, fagocitosis y migración celular. Varios estudios indican que la fibronectina no es un marcador de diagnóstico certero.

5.5.4. Proteínas del tejido conjuntivo. Los niveles de osteocalcina y osteonectina no han sido evaluados sistemáticamente como marcadores diagnósticos.

La cavidad bucal está formada por un conjunto de tejidos y estructuras complejas que dan lugar a la existencia de diferentes ecosistemas (mucosa bucal, dorso de la lengua, superficies dentales, surco gingival, encías, saliva) con características físicas, químicas y nutricionales específicas que condicionan la colonización por diferentes microorganismos (Tabla 5). Además es, en conjunto, un sistema abierto y dinámico sometido a diversos factores que van a dar lugar a una gran variabilidad cuantitativa y cualitativa de las especies microbianas encontradas, tanto entre diferentes individuos como en el mismo, a lo largo del tiempo. También existe una serie de determinantes específicos de la colonización, dependientes tanto del hospedero (receptores) como de los microorganismos (capacidad de adhesión y agregación, sinergismo). .⁽⁹⁾

Tabla 5. Factores que influyen en la colonización de la cavidad bucal.

Locales:

Hábitos higiénico- dietéticos

Tabaquismo

Ambiente físico-químico (humedad, pH, temperatura, potencial de óxido-reducción, concentración de lisozima, lactoferrina)

Presencia de alteraciones anatómicas

Generales:

Edad

Estado nutricional

Tratamientos con antibacterianos previamente y concomitantes

Hospitalización

Inmunodepresión

Embarazo y otras alteraciones hormonales

Factores genéticos y raciales

Tomado de: China meneses. 2000⁽⁹⁾

En conjunto, la boca es un ecosistema complejo y denso (microorganismos/gramo) compuesto fundamentalmente por *Streptococcus* del grupo *viridans* y bacterias anaerobias. Los microorganismos preponderantes son *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Peptostreptococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Neisseria* sp., *Veillonella* sp., *Actinomyces* sp., *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp., *Corynebacterium* sp., *Prevotella* sp., *Porphyromonas* sp., *Fusobacterium* sp., *Capnocytophaga* sp., *Actinobacillus* sp., *Selenomonas* sp., *Eikenella* sp., *Campylobacter* sp., *Treponema* sp. Aunque pueden aislarse en toda la cavidad bucal, presentan una marcada predilección por determinados nichos. Así, *S. sanguis*, *S.*

mutans, *S. mitis* y *Actinomyces viscosus* colonizan fundamentalmente la superficie del diente; *S. salivarius* y *Veillonella sp.* la lengua y la mucosa bucal y *Fusobacterium sp.*, *Prevotella sp.*, *Porphyromonas sp.* y espiroquetas anaerobias la cresta gingival. .^(1,2)

Actualmente está claro que no hay que erradicar los microorganismos de la flora, hecho materialmente imposible y que conduciría a la aparición de sobreinfecciones, para lograr una efectividad máxima del control y tratamiento de los procesos odontógenos, sino actuar específicamente frente a los agentes causales y restaurar el equilibrio ecológico

6. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

Al haber ciertas limitaciones para el diagnostico actual, como es el no poder identificar diferentes patologías periodontales, no determinar la evolución ni el pronóstico, y el tener una relativa predecibilidad, es decir, se diagnostica una enfermedad ya instalada, no antes para poder prevenirla o detectarla en forma subclínica. ⁽²²⁾

Se han realizado estudios para ver si el hospedero será poseedor de una enfermedad periodontal, descubriendo bacterias o elaborando métodos indirectos para valorar la salud sistémica del paciente, si es que no están disminuidos los mecanismos de defensa. Para detectar la enfermedad sin su aparición clínica aparecieron nuevos métodos de diagnóstico periodontal.

Para esto debemos definir la sensibilidad que es la cantidad de sitios o sujetos con verdadera presencia de enfermedad.

6.1. Métodos de diagnóstico de la enfermedad periodontal

Existen nuevos métodos de diagnostico, divididos en cuatro fases como son:

6.1.1. Diagnóstico etiológico. Es justamente de iniciación de la causa de Enfermedad Periodontal, se refiere a la placa bacteriana, aunque se ha comprobado que la especificidad bacteriana es necesaria pero no suficiente para la formación de enfermedad periodontal y que existen algunos otros factores que no necesitan gran cantidad de acumulo de placa bacteriana, sino simplemente la presencia de estas patógenas anaerobias, espiraladas y móviles. Existen diferentes maneras de detectarlas, con respecto a la detección de placa con índices de tinciones como el Green y Berbellón que tipifica a la placa en 0,1,2,3 de acuerdo a la cantidad de pigmentos ocupando

hasta el tercio, o medio o completa superficie de esmalte dentario. Otro es el de O'leary que da un porcentaje de placa ya que se realiza caras con placa por 100, sobre cantidad total de dientes con placa y da un porcentaje de 20 o 40% de placa .^(19,20)

El de Loe y Silnes que es netamente subjetivo sin colorantes y tipifica según el grado de inflamación, a la vista.

6.1.2 Diagnostico bacteriológico. Por cultivos de anaerobiosis o campo oscuro, se tipifican las bacterias y demuestra la presencia de anaerobios lesivos como *Porphyromonas gingivales*, *Prevotella intermedia*, o *Actinomyces actinomycetancomitans* en las bolsas periodontales (Fig. 4; .⁽⁹⁾)

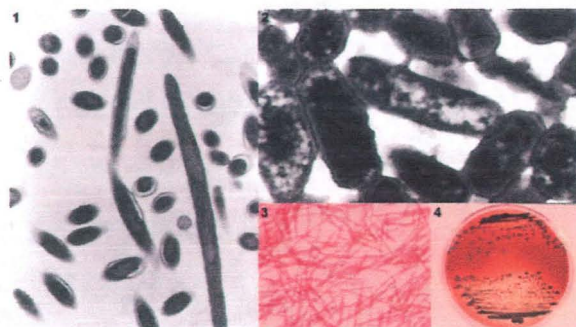


Fig. 4. Bactérias anaeróbias, son organismos que sobreviven en ausencia de oxígeno, y pueden producir procesos infecciosos de origen endógeno. 1. *Fusobacterium nucleatum*, microscopia eletrônica de transmissão (MET); 2. *Bacteroides fragilis*. MET; 3. *Fusobacterium nucleatum*, tinción de Gram; 4. Bactérias produtoras de pigmento negro *Porphyromonas* y *Prevotellas*. (Tomado de: <http://www.icb.usp.br/~mariojac/>)

6.1.3. Diagnóstico clínico. Todo lo que sea labor del odontólogo como inspección, sondeo, color, aspecto, consistencia, sangrado y supuración; lo más importante se realiza con el sondeo, ya que se detecta no solo

profundidad de inserción de la encía, sino también el límite amelocementario (Fig. 5; (9, 17,22))



Fig. 5. En la fotografía se muestra recesión gingival y cambio de color del tejido gingival (Tomado de: <http://www.gogle.com.m/dentrsty.com>)

6.1.4. Diagnostico Radiográfico. Sirve como una guía, para el pronóstico, control y comparación, con RX posteriores al tratamiento (Fig. 6; (9, 17,22))

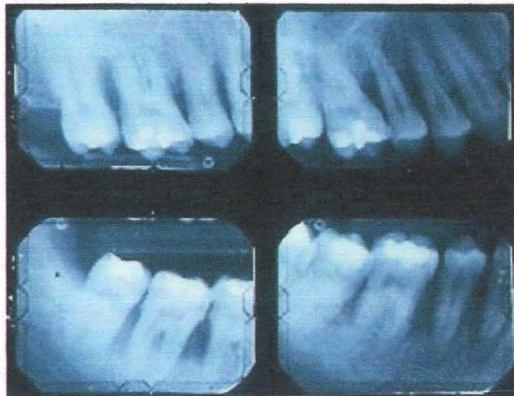


Fig. 6. En la radiografía se muestra la pérdida ósea tanto vertical como horizontal (Tomada de: <http://www.gogle.com.m/dentrsty.com>)

6.2. Nuevos métodos

- Estudio de la composición de la flora bacteriana. Cultivos y campo oscuro.
- Medición del fluido gingival y su composición: 1ra manifestación subclínica de enfermedad periodontal
- Determinación de actividad de LPMN: defensa del hospedero, se extrae suero, glóbulos blancos y se comprueba la quimiotaxia, locomoción, adhesión y fagocitosis.
- Detección de anticuerpos, mediante un análisis de sangre.
- Medición de la temperatura de la bolsa. Si aumenta mas de 37°C parámetro sublingual = inflamación periodontal.
- Guaiac, determinación de sangre oculta en heces, con un 70% de sensibilidad.
- Virus en bolsas y presencia de *Helicobacter pylori*, bacteria causante de la ulcera gastroduodenal, al estar en bolsas periodontales y disminuir las defensas, la puede contagiar y desarrollar.

6.3. Métodos directos. Cultivos y campo oscuro (Tabla 3)

6.3.1. Análisis de cultivo. Es la colección de muestra de placa subgingival con tiras de papel (Fig. 7), las cuales son colocadas inmediatamente en un medio de transporte y se manda a un laboratorio para identificar la bacteria anaerobia y su sensibilidad antibiótica. Hay bacterias que son miembros inusuales en una población mientras en otras son un hallazgo común, por esto las pruebas microbiológicas no dan una absoluta certeza de que las bacterias cultivadas de una bolsa periodontal son los patógenos responsables de la enfermedad periodontal de todos los pacientes.

Con síntomas clínicos de periodontitis algunos hallazgos bacteriológicos compatibles muestran la presencia de:

- Bacterias espiraladas
- *Prevotella intermedia*
- *Porphyromonas gingivalis*
- *Fusobacterium nucleatum*

Entre las bacterias anaerobias, en forma individual o conjunta de algunos de ellos.

El orden de incidencia hallado fue:

- Bacterias espiraladas 35%
- *Prevotella intermedia* 18%
- *Porphyromonas gingivalis* 35%
- *Fusobacterium nucleatum* 74%

La asociación más frecuente fue: 20% de (*Porphyromonas gingivalis* + *Fusobacterium nucleatum*) y un 7% (espiraladas + *P. gingivalis* + *Fusobacterium nucleatum*).

Las bacterias espiraladas pueden ser observadas por la tinción de Gram-Nicolle, mientras que otros microorganismos pueden ser tipificados bioquímicamente según algunos esquemas mínimos presuntivos.

Tabla 5. Se presentan las diferencias entre ambos métodos.

	CAMPO OSCURO	CULTIVO
Equipo	Costoso	Lo tiene el laboratorio
Personal	Entrenado	Sin personal
Velocidad	Rápida	Se envía a laboratorio
Recuento células	Rápidamente	No sirve
Totales		
Distribución proporcional de los microorganismos	Lo da	No lo da
Habilidad para detectar bacterias	No sirve	Si
Habilidad para indicar antibioticos	No sirve	Si
Aplicación clínica	No	No

(Tabla tomada de: <http://www.sergiohiskin.com.ar/>)

6.4. Métodos indirectos

DETECCIÓN	PERIOSCAN
ENZIMÁTICA	EVALUSITE

Así como se pueden cultivar las bacterias, se puede desarrollar su metabolismo, ver cuales son sus productos bacterianos, distinguirlos y visualizarlos. Utilizando este medio para encontrar productos bacterianos, podemos detectar la presencia de la bacteria determinada, por ejemplo la ureasa, que viene preelaborada en un papel dentro del avio del evalusite.

Tomamos una muestra de placa, la colocamos sobre la ureasa preelaborada que viene en el avio y si encuentra la urea de la bacteria determinada cambia

el pH, cambia de color. Por lo tanto si está la enzima de la bacteria, está la bacteria. Sirve para clasificar determinados patógenos de placa específica, como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

Un pequeño número de bacterias (*T. denticola*, *P. gingivalis*, *B. forsythus*) producen cierta enzima capaz de hidrolizar N benzoil DL arginina 2 naphthylamide (BANA). En los sitios BANA positivos habrá presencia de estos patógenos. Las desventajas de esta prueba son que detecta un número limitado de patógenos y no provee información acerca de la sensibilidad antibiótica. ^(1,5)

6.4.1. Análisis de restricción de endonucleasa. Este análisis es una herramienta muy útil para investigaciones epidemiológicas porque puede determinar la distribución y transmisión de los rasgos de una bacteria específica a toda una población. También es utilizado en el estudio de la transmisión de los patógenos periodontales entre los miembros de una familia.

6.4.2. Sondas ADN (Hibridación de ácidos nucleicos): el ADN transmite información genética de las células, tiene forma helicoidal, dos hileras que se entrecruzan. Por intermedio de calor se desdobra la cadena de ADN, se marca con isótopo radiactivo, se toma una muestra de placa y si encuentra su par se entrecruza y cambia de color si reacciona entrecruzándose con esta cadena de ADN, está el gen de la bacteria, está la bacteria. Detecta la presencia de bacterias específicas en minutos (Fig. 8). ⁽⁹⁾

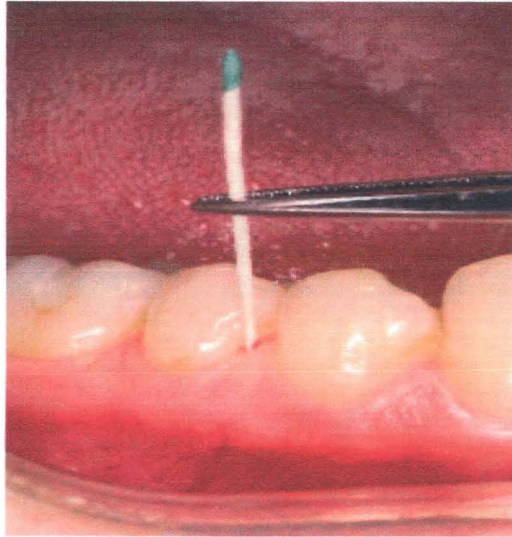


Fig. 7. Toma de la muestra con una punta, el tiempo suficiente para que se absorba el fluido crevicular con todas las bacterias presentes en el surco (Tomada de: <http://metodosdediagnosticolab/inmunofluorescencia>)

6.5. Métodos Inmunológicos.

6.5.1. Aglutinación del látex. Son soportes de látex con antígeno prefabricado, se le extrae sangre al paciente, si tiene anticuerpo contra ese antígeno, aglutina. ^(9,22)

6.5.2. ELISA. Es una prueba sensible a la presencia de antígenos, son pozos con antígenos, se coloca suero del paciente, se hace una serie de lavados y si tiene anticuerpos contra ese antígeno se aglutina. Luego de otra serie de lavados se agrega una enzima, si cambia de color, hay anticuerpos ante ese antígeno.

6.5.3. Inmunofluorescencia. Reacción antígeno-anticuerpo, se tiñe con fluoresceína principalmente.

De esta manera podemos diagnosticar diferentes patologías periodontales, en un comienzo cultivando bacterias que por su especificidad bacteriana se creyó que como toda enfermedad infecciosa, detectando la bacteria, descubriendo su antibiótico específico, se solucionaba la enfermedad. Pero al ser multifactorial se deben realizar trabajos hacia el hospedero, como resistencia y disminución de las defensas por esto se realizan estos estudios inmunológicos debido a que todo paciente con enfermedad periodontal no es una persona sana, tiene una enfermedad infecciosa y una eritrosedimentación alta. ^(4, 9,22)

Con este trabajo vemos que no solo con un correcto diagnóstico clínico, bacteriológico, radiográfico y etiológico es suficiente, sino también el estudio cultivo e identificación de bacterias patógenas específicas y analizando la respuesta inmunológica del hospedero, para predecir un avance de la enfermedad.

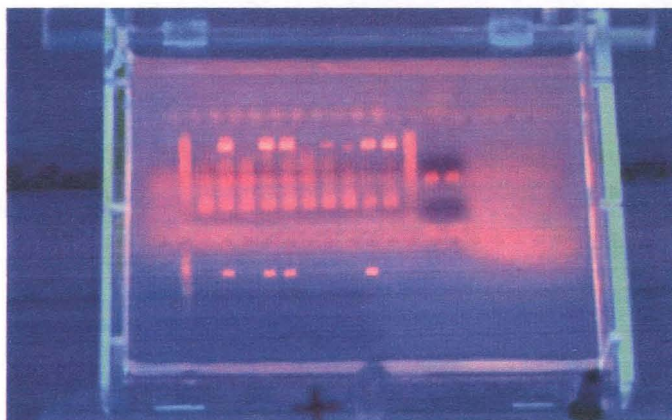


Fig. 8. Electroforesis en gel de agarosa, se pueden identificar los distintos tipos de ADN correspondiente a las bacterias presentes en las bolsas periodontales del paciente o se pueden distinguir los tipos de polimorfismos de un determinado gen perteneciente a un individuo (Tomado de: <http://metodosdediagnosticolab/inmunofluorescencia> .)

6.6. Problemas asociados con el uso de procedimientos microbiológicos como auxiliares de diagnóstico por la enfermedad periodontal.

La presencia o ausencia de los patógenos periodontales en la placa dental no puede ser usada como factor discriminante entre sitios con salud y enfermedad ya que se han aislado estas bacterias en ambos sitios como así también en sitios de gingivitis; aunque en niveles y frecuencias menores que en sitios con destrucción periodontal. Los niveles de bacteria patógenas en relación con la destrucción periodontal no están identificados ya que

dependen del hospedero. Como así tampoco la asociación de estas bacterias con la progresión de la periodontitis; tanto en estudios prospectivos como retrospectivos no se llegó a ninguna conclusión definitiva que pueda considerar a ningún organismo "indicador" para predecir la progresión de la enfermedad. En cuanto a la utilización de las pruebas microbiológicas no ofrecen un valor predictivo para la progresión de periodontitis, cuando es aplicado en pacientes periodontales tratados con terapia de mantenimiento contra los que no la han recibido.

Atendiendo a su morfología, las bacterias anaerobias de interés clínico odontológico se clasifican en dos grandes grupos: Esporulados, conformados por bacilos grampositivos, generalmente móviles. Dentro de este grupo se encuentran los clostridios periodontopatógenos, que forman parte, excepcionalmente de la microbiota de la cavidad bucal y se han relacionado con la agresividad de periodontitis en individuos inmunodeprimidos. Otro grupo de anaerobios son los No Esporulados, que engloban cocos y bacilos, tanto grampositivos como gramnegativos, y espiroquetas. Estos microorganismos actúan generalmente como oportunistas, tanto a nivel de su hábitat (mucosas y cavidades) como en tejidos y órganos distantes; es así como la mayoría de las infecciones por este grupo de bacterias anaerobias no esporuladas, son de origen endógeno.

7. AGENTES BACTERIANOS

La microbiota periodontal es una comunidad compleja de microbios. En la actualidad, se han descubierto alrededor de 500 microorganismos colonizando su flora bacteriana. Sin embargo, hoy en día se conoce que sólo un grupo limitado de bacterias tiene real efecto patógeno en la enfermedad periodontal. Entre los agentes etiológicos con mayores factores de virulencia se encontramos periodontopatógenos anaerobios y con mayor presencia ***Porphyromonas gingivalis***, ***Actinobacillus actinomycetemcomitans***, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola*, ***fusobacterias***, ***Prevotella intermedia***, *Prevotella nigrescens*, *Campylobacter rectus* y algunas espiroquetas. . (4, 9,22)

De este grupo, *Porphyromonas gingivalis* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* son dos de las bacterias que han sido objeto de mayores investigaciones debido a su capacidad de colonización e invasión de los tejidos periodontales, a la forma de evadir las defensas del hospedero y al daño tisular que producen en el periodonto . (4, 9, 19,23)

7.1. *P. gingivalis* y *A. actinomicetemcomitans*. Son considerados microorganismos exógenos que se transmiten por la saliva y pueden causar enfermedades en hospedadores susceptibles cuando exceden los niveles de normalidad. Penetran los tejidos periodontales a través de ulceraciones en la pared de la bolsa periodontal o por perforación de los espacios intercelulares del epitelio. (19, 23,24)

Algunas características de dichos personajes presentes en el surco gingival no móviles y anaerobios son:

7.2. *Porphyromonas*

Este género es un bacilo anaerobio no fermentativo, no móvil, de pigmentación negra.

Se subdivide en tres especies:

- *P. asaccharolytica*
- *P. gingivalis*
- *P. endodontalis*

7.2.1. *Porphyromona gingivalis*

Son bacilos cortos , no móviles miden 0.5 micrómetros , con un rango de 1-2 micrómetros , presente en formas pleomorficas , lo encontramos en colonias pigmentadas de color negro(en medios de cultivos con sangre lisada)en colonias jóvenes en agar sangre dan colonias no pigmentadas , los serotipos son identificados con sondas de DNA ,los métodos rápidos de cultivo para identificación son la fluorescencia de colonias y actividad positiva a la tripsina(BANA). Excreta proteasas destructivas tales como collagenazas y tripsinas, esta bacteria, junto con algunas especies de *Prevotella*, constituye el grupo de microorganismos predominantes en la etiología de la Periodontitis del Adulto ⁽¹⁹⁾

Coloniza el surco gingival y es considerado como patógeno periodontal agresivo.

7.2.2. *Porphyromana endodontalis*

Presentes como bacilos cortos, no móviles miden de 0.4-0.6 X 1-2 micrómetros, en colonias en medio de agar gelosa sangre son: suaves, convexas, circulares con pigmento negro o café se hacen visible de 7 o 14 días.

Estos microorganismos no fermentan carbohidratos, deshidrogenasas de malato y glutamato. respuesta negativa a la tripsina ya que no aglutina eritrocitos.

Crece en medios con menadiona (vitamina k). Existen tres serotipos que se alisan de conductos radiculares y bolsas periodontales. ^(19, 23,24)

7.2.3. *Porphyromana assccharolytica*

Es un bacilo que mide de 0.8 a 1.5 X 1.6 a 2.5 micrómetros presenta colonias negras mucoides de 1 ó 2 mm de diámetro, estas son redondas, convexas, y opacas después de 6 días de incubación en anaerobiosis podemos observarlas. Esta especie no aglutina eritrocitos. Tripsina negativa y es positiva a alfa fucosidasa. No asimila azúcar.

7.3. *Prevotella* Descrito por Prevot

Son bacilos anaerobios y gramnegativos, dentro de este género encontramos tres especies:

- *prevotella melaninogenica*
- *prevotella denticola*
- *prevotella loeschli*

7.3.1. *Prevotella melaninogenica*

Es un bacilos gramnegativos anaerobio, mide de 0.5 a 0.8 X 0.9 a 2.5 micrómetros, ocasionalmente llegan a medir 10 micrómetros, posee un

metabolismo fermentativo, produce celobiosa. Su Beta –galactosidasa es positiva. Se desarrollan en agar gelosa sangre, las colonias miden aproximadamente 0.5 a 2.0 mm de diámetro son circulares, convexas y brillantes, las colonias son más oscuras en el centro, con bordes gris o café claro.

En sangre de caballo no se pigmentan las colonias y en la de conejo son beta hemolíticos anteriormente se pensaba que el pigmento negro era melanina y en realidad es causado por la hidrólisis de esculina, se aísla e bolsa periodontal. ⁽²⁴⁾

7.3.2. *Prevotella denticola*

Es un cocobacilos que mide aproximadamente 0.5 a 0.7 X 0.6 a 0.7 micrómetros. En cultivos líquidos se observa en cadenas cortas o pares, Forma colonias pequeñas, circulares, convexas, bajas, con anillos concéntricos y claros son de color negras o cafés posee un metabolismo fermentativo. MUG positiva, hidrólisis de esculina, con fermentación de celobiosa, es habitante del diente pero lo logramos localizar subgingivalmente.

7.3.3. *Prevotella loescheii*

Es un bacilos, mide de 0.4 a 0.6 X 0.8 a 1.5 micrómetros, lo podemos observar en medios líquidos en pares y cadenas cortas, sus colonias pequeñas miden de 1 a 2 mm de diámetro, son circulares, convexas bajas, translúcidas, brillantes y suaves. ^(19, 23,24)

Posee un metabolismo fermentativo, con un pH terminal en caldo de glucosa de 4.9 a 5.4, localizado en surco gingival.

7.3.4. *Prevotella intermedia*

Bacilos cortos o filamentosos de 0.4 a 0.7 X 1.5 a 2.0 micrómetros es un anaerobio estricto, fermenta glucosa con un pH de 4.9 a 5.4, maltosa, sacarosa y fructosa, glicógeno e inulina, asimila gelatinaza y produce indol. La Menadiona es esencial para la fermentación de carbohidratos. MUG negativa. Se localiza en el surco gingival y bolsa periodontales.

7.3.5. *Prevotella oralis*

Es un bacilo Gram. negativo fermentadores, no producen pigmentos, miden de 0.5 a 0.8 X 1.0 a 5.0 micrómetros, se presenta arreglados en pares y cadenas cortas, colonias suaves y semiopacas de color crema, no hemolisan sangre, no requieren hemina ni menadiona para su crecimiento, se encuentra en encía cervical, tracto respiratorio y genital. En condiciones de salud se encuentra en boca y sitios extraorales.

7.3.6. *Prevotella buccalis*

Estas células miden de 1 X 2 a 8 micrómetros, las colonias al tercer día en agar sangre son menores a 1 mm de diámetro, de color blanco, opacas y convexas.

7.4. *Fusobacterium*

Bacilos pequeños anaerobios de forma fusiforme patógenos aislados de infecciones, purulentas de diferentes órganos del cuerpo. no forman esporas, no móviles, no o ligeramente fermentativa. produce ácido butírico como producto final del metabolismo. contiene lantionina en su pared de peptidoglucano. Se subdividen en las sig. Especies:

Fusobacterium

- *F. nucleatum subespecie nucleatum*
- *F. nucleatum subespecie polymorphum*

- *F. nucleatum subespecie vincentii*
- *F. nucleatum subespecie fusiforme*

7.4.1. *F. nucleatum subespecie nucleatum*

Produce H_2S e indol, se identifican en muestras de placa dentobacteriana y surco gingival. Medio de cultivo selectivo de cristal violeta eritromicina (CVE)

Colonias púrpuras con dos morfologías diferentes.. ^(19, 23,24)

7.4.2. *F. nucleatum subespecie vincentii*

En colonias en forma de cono bajo, con superficie radiada y ligeramente coloreada.

7.4.3. *F. nucleatum subespecie fusiforme*

- *F. alocis*
- *F. sulci*

Estas células de 0.4 a 0.7 X 1.5 a 1.7, producen abundante hidrógeno y gas, produce butirato y acetato de glucosa. en medio líquido. Se aíslan del surco gingival.

7.4.4. *F. nucleatum subespecie nucleatum*

Colonias redondas convexas y suaves, colonias en forma de molar anaerobia pero relativamente aerotolerante, su energía deriva del metabolismo de los aminoácidos crecen en sangre y en soya triptícase.

7.5. *A. actinomicetemcomitans.*

Libera toxinas como leucotoxinas, endotoxinas y citotoxinas, frecuentemente está relacionado con periodontitis agresivas en pacientes jóvenes como son la periodontitis prepuberal y en la periodontitis juvenil. Alrededor de los 21 a 40 años la presencia de esta bacteria relativamente disminuye, mientras que aumenta la cantidad de otros anaerobios gramnegativos como *P. gingivalis*,

Bacteroides forsythus, *Treponema denticola*, *Fusobacterias*, *Prevotella intermedia* y *Prevotella nigrescens* ⁽¹⁹⁾

Actinobacillus actinomycetemcomitans. El termino significa" con actinomycetos " y refleja su relación con especies de *Actinomyces*, no requiere de CO₂ para crecer, tampoco de hemina(factor X) a NAD (factor V), su estructura interna es en forma de estrella. Estas células pequeñas, cortas que miden de 0.4 a 1µm son bacilos cortos o rectos con vesículas membranosas, sus colonias rugosas cuyas células presentan fimbrias .Las colonias en agar gelosa sangre son pequeñas de color gris a blanco, translúcidas, suaves y no hemolíticas. ^(19, 23,24)

Se estimula su crecimiento con CO₂ y las especies crecen en medio aerobio con 5 o 10 % de CO₂ Las células crecen en medio de cultivo líquido fresco con bicarbonato de sodio incubado crecen bien en medio de agar chocolate (sangre caliente) .Fermenta azúcares como glucosa y fructosa , pero no sacarosa o lactosa . Produce ácido como lactato, succinato, acetato y propionato, 8 de diez biotipos se han descrito en base a la fermentación de dextranos , maltosa . manitol y xilosa. Existen 3 serotipos: a, b producen leucotoxinas , fermentan xilosa. c , pocas cepas fermentan xilosa.

En medios de cultivo agar e tritona-soya suero bacitracina incubada en una atmósfera con 10 % de CO₂ colonias en forma de estrella translúcida blancas que se adhieren al agar ,los medios de cultivo contienen sangre bacitracina y verde malaquita, MUG, descomposición del peróxido de hidrógeno .Se aíslan de la bolsa periodontal placa dentobacteriana.

Después de dos días de incubación en medio anaerobio las colonias son blancas de color crema en incubación larga inician de color café claro a

oscura y esto se debe a la sangre –lisada , es Beta hemolítico en sangre de conejo , posee un metabolismo fermentativo

Sin duda alguna los anaerobios gramnegativos constituyen los microorganismos con mayor agresividad en la enfermedad periodontal. (2, 9, 19,22)

Para establecer un diagnóstico presuntivo de una infección por anaerobios es importante que el microbiólogo correlacione el origen de la muestra con los morfotipos observados en la tinción de Gram. Además, la presencia de tipos morfológicos múltiples en la tinción de Gram sugiere específicamente este diagnóstico puesto que la mayoría de las infecciones en las que están implicados los anaerobios son polimicrobianas (Tabla 7).

7.6. Medios de cultivo. Para conseguir una recuperación óptima de bacterias anaerobias es fundamental elegir correctamente los medios de cultivo primarios. La mayoría de estas bacterias requieren para su crecimiento vitamina K₁ y hemina. Para su aislamiento e identificación presuntiva se aconseja utilizar una combinación de medios enriquecidos no selectivos, selectivos y diferenciales, entre los que se incluyen:

- **Agar sangre para anaerobios** como agar *Brucella* o agar Schaedler con un 5% de sangre de carnero, a los que se añaden vitamina K₁ (1 µg/ml) y hemina (5 µg/ml). En estos medios crecen tanto las bacterias anaerobias facultativas como las anaerobias obligadas.

Tabla 7. Sistemas de transporte de muestras para anaerobios

Muestra	Sistema de transporte	Tiempo óptimo de transporte al Laboratorio
Material obtenido por aspiración	Viales con atmósfera anaerobia	2 – 3 h (hasta 8-24 h)
Tejido o biopsia	Contenedores estériles	30 min
	Frascos con atmósfera anaerobia	2 – 3 h
	Contenedores en bolsas de anaerobiosis	2 – 3 h
Torundas	Tubos con atmósfera anaerobia	2 – 3 h

- Agar *Bacteroides* bilis esculina con amicacina (BBE).** Es un medio selectivo para *Bacteroides* del grupo *fragilis* y *Bilophila spp.* Contiene amicacina (100 µg/ml) que inhibe la mayoría de facultativos, bilis (20%) que con casi exclusividad sólo permite el crecimiento de las especies citadas y esculina que al ser hidrolizada en presencia de un indicador (citrato férrico) vira el medio a color negro. Permite una fácil detección de las especies de *Bacteroides* del grupo *fragilis* al ser esculinas positivas. A veces, pueden crecer otras especies, como *Fusobacterium mortiferum*, *Fusobacterium varium*, algunas enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, enterococos, levaduras, etc., aunque se distinguen de los *Bacteroides* del grupo *fragilis* por el tamaño de sus colonias, que normalmente es inferior a 1 mm de diámetro. ^(2,9,19,22)
- Agar con alcohol fenil-etílico (PEA) con un 5% de sangre de carnero.** El alcohol inhibe el crecimiento de bacilos gramnegativos facultativos, principalmente el crecimiento en velo de las especies de

Proteus. También evita el crecimiento en velo de algunas especies de *Clostridium* como *Clostridium septicum*, facilitando de este modo su aislamiento. Se aconseja sembrar en este medio las muestras purulentas o cuando sea previsible una infección mixta.

- **Agar sangre selectivo.** Como agar Schaedler con neomicina (75 µg/ml) y vancomicina (7,5 µg/ml) (SNV) o con kanamicina (75 µg/ml) y vancomicina (7,5 µg/ml) (SKV) o el clásico agar *Brucella* con kanamicina, vancomicina y en este caso sangre lacada (ASLKV). Son medios selectivos para bacilos gramnegativos como el grupo de *Bacteroides fragilis* y especies de *Prevotella*. La presencia de neomicina o de kanamicina inhibe a la mayor parte de los aerobios facultativos y la presencia de vancomicina inhibe la mayoría de los grampositivos y especies de *Porphyromonas*. A veces pueden crecer en estos medios levaduras y anaerobios facultativos resistentes a estos aminoglucósidos por lo que siempre debe realizarse una tinción de Gram y un ensayo de aerotolerancia a todos los aislados.
- **Agar con yema de huevo (AYE).** Cuando se sospecha la presencia de clostridios, para detectar la producción de lipasa y/o lecitinasa.
- **Agar selectivo para *Clostridium difficile*.** Cuando se investigue la presencia de esta especie, como agar fructosa-cicloserina-cefoxitina (CCFA) o agar yema de huevo-cicloserina-cefoxitina (CCEY).
- **Medio líquido de enriquecimiento o de mantenimiento.** Se recomienda usar caldo de tioglicolato sin indicador, complementado con vitamina K₁ (200 µl) y hemina (20 µl). Este medio se utiliza para recuperar las bacterias anaerobias en caso de que falle la anaerobiosis en la incubación de los cultivos primarios, haya una inhibición del

crecimiento debido a antibióticos o a otros factores, o bien cuando las bacterias se encuentran en cantidades muy pequeñas. ^(2,4,9,19.)

7.7. Sistemas de incubación en anaerobiosis. Su elección viene determinada por el costo, número de cultivos y limitaciones de espacio. Los más comunes son las cámaras, jarras o cajas y bolsas de anaerobiosis.

Independientemente del sistema utilizado es importante monitorizar el ambiente anaerobio con una tira indicadora de azul de metileno o de resazurina, y la temperatura de incubación.

Existen diferentes modelos de cámaras para anaerobios, en las que se consigue una atmósfera anaerobia mediante una mezcla de gases que contiene 5% de H_2 , 5-10% de CO_2 y 85-90% de N_2 . Poseen un sistema de intercambio que consiste en un compartimiento rígido con una puerta interior y otra exterior. Las jarras son recipientes cilíndricos, de metal o de plástico rígido, que deben cerrarse herméticamente y en los que la atmósfera anaerobia se obtiene entre 1 y 2 horas después de introducir unos sobres (GasPak[®], Becton Dickinson) en los que, al añadir H_2O se libera H_2 y CO_2 . El H_2 se combina con el oxígeno existente formando agua gracias a la presencia de un catalizador. Actualmente existen sistemas en los que no hace falta añadir H_2O o introducir el catalizador (Anaerogen[®], Oxoid).

Mediante una técnica automatizada, Anoxomat[®], también se puede lograr una atmósfera anaerobia en las jarras. Como ya se ha señalado debe introducirse un indicador de oxígeno, que suelen ser tiras de papel con azul de metileno, que se decoloran al desaparecer la presencia del oxígeno.

También se encuentran disponibles en el mercado diferentes sistemas de bolsas de anaerobiosis de plástico transparente y flexible como GasPack

Pouch® (Becton Dickinson) o AnaerogenCompact® (Oxoid) con generadores e indicadores adecuados. Se pueden utilizar tanto para el transporte de muestras al laboratorio como para la incubación de cultivos.

7.8. Tiempo de incubación. Inmediatamente después de su siembra las placas de cultivo se incuban a 35-37° C en el sistema de anaerobiosis disponible. Si se utiliza una cámara se pueden examinar a las 24 h, puesto que no es necesario sacarlas, mientras que si se emplean jarras o bolsas hay que esperar 48 h, a no ser que se busquen microorganismos de crecimiento rápido y se empleen medios selectivos como el BBE para el grupo de *Bacteroides fragilis* o el EYA para clostridios, en cuyo caso se pueden examinar a las 24 h.

Si en las placas no se observa ningún crecimiento se deben reincubar hasta completar 7 días, al menos las de agar sangre no selectivo, ya que algunos anaerobios requieren este tiempo para formar colonias visibles (*Actinomyces*, *Porphyromonas*, *Propionibacterium*, *Bilophila*). Se aconseja mantener la incubación del medio líquido de enriquecimiento entre 7 y 10 días y se deben realizar subcultivos, si se aprecia turbidez u otro signo de crecimiento, en agar sangre y agar chocolate que se incubarán en una atmósfera con 10% de CO₂, y en agar sangre para anaerobios incubado en anaerobiosis. Este mismo procedimiento se realiza al final del periodo de incubación si no se ha detectado crecimiento para considerarlo definitivamente estéril.

En el diagnóstico de la actinomicosis el tiempo de incubación debe ser mayor, generalmente entre 2 y 4 semanas. (2, 5, 9, 19,21)

7.9. Otros procedimientos

- **Procesamiento de los líquidos orgánicos.** Los líquidos corporales habitualmente estériles, como ascítico, de diálisis peritoneal, articular,

pericárdico, amniótico, pleural, sinovial, intraocular. Se inoculan en frascos de hemocultivo para aerobios y anaerobios, reservando un pequeño volumen para hacer una tinción de Gram. A diferencia de otros líquidos, el amniótico y los líquidos obtenidos por culdocentesis no necesitan centrifugarse antes de realizar esta tinción. La lectura se realiza diariamente durante 7 días. En el caso de que haya crecimiento, se extrae una muestra del frasco aerobio mediante jeringa y aguja para realizar subcultivos en medios sólidos para aerobios y facultativos (agar sangre, agar chocolate, agar sangre con colistina y ácido nalidíxico y agar MacConkey, por ejemplo). Del frasco anaerobio se hacen subcultivos en agar sangre, agar chocolate y agar sangre para anaerobios.

Las bacterias anaerobias raramente causan meningitis, por lo que el cultivo de rutina del líquido cefalorraquídeo no es necesario. Los anaerobios pueden estar implicados en la formación de abscesos cerebrales, empiema subdural y absceso epidural y en estos casos no es útil el examen del líquido cefalorraquídeo.

Las muestras de sangre se procesan tal como se indica en el Procedimiento 3a de la SEIMC (Hemocultivos).

- **Procesamiento del catéter telescópico (CT).** Se corta el cepillo y se coloca en un tubo que contenga 1 mL de solución estéril de Ringer lactato. Se agita en el vortex durante 30 segundos y se preparan dos diluciones seriadas al 1/100 a partir de la inicial en Ringer lactato; se siembran partes alícuotas de 0,1 mL de cada una de las diluciones en medios para aerobios y facultativos (agar sangre, agar chocolate y agar MacConkey) que se incuban en 10% de CO₂ durante 24-48 horas

y para anaerobios (agar sangre y agar sangre selectivo) que se incuban en anaerobiosis hasta 5 días.

- **Procesamiento del lavado broncoalveolar (LBA).** Se preparan dos diluciones seriadas al 1/100 de la muestra inicial y se siembran en los mismos medios que el catéter telescópico.

7.10. Examen de los cultivos y aislamiento. En el análisis microbiológico de una muestra clínica se pueden distinguir, al menos teóricamente, dos etapas.

1ª. Dedicada a "buscar" los anaerobios que pueda contener, obtenerlos en cultivo puro, identificarlos de forma preliminar (a nivel de género o "grupo"), e informar al clínico lo antes posible.

2ª. Debe intentar conseguir una identificación más precisa y estudiar la sensibilidad a los antibióticos que habitualmente tienen actividad sobre estas bacterias.

Sería deseable que la primera etapa se realizara en todos los laboratorios de microbiología, mientras que la segunda puede quedar restringida a unos pocos, cuya experiencia debe servir de base para el conocimiento general de las bacterias anaerobias que se pueden encontrar en muestras clínicas correctamente obtenidas y su sensibilidad/ resistencia a los antibióticos habitualmente utilizados para su tratamiento.

Los medios con crecimiento deben observarse cuidadosamente para detectar todas las colonias diferentes, independientemente de su tamaño, y proceder a su subcultivo. Algunos anaerobios pueden formar colonias morfológicamente semejantes a las de los facultativos. **Los subcultivos se realizan siempre a partir de una única colonia.** Esta se siembra en una placa de agar sangre no selectivo para anaerobios y en una de agar

chocolate que se incuban en una atmósfera anaerobia y aerobia con 10% de CO₂, respectivamente. Deben realizarse los reaislamientos necesarios para poder subcultivar colonias únicas de todos los tipos morfológicos. Las colonias subcultivadas que no crezcan en agar chocolate incubado en CO₂ se consideraran en principio anaerobios estrictos y se procede a su estudio. Hay que tener en cuenta que algunos bacilos grampositivos *Actinomyces* spp., *Propionibacterium* spp., *Bifidobacterium* spp., e incluso algunas especies de *Clostridium*, pueden ser lo bastante aerotolerantes como para crecer en CO₂ y sin embargo se deben considerar como anaerobias. Por el contrario algunos estreptococos pueden aparecer como anaerobios estrictos en el primer subcultivo y mostrarse como perfectamente facultativos tras un periodo más o menos largo de adaptación. Confirmado el carácter de anaerobio estricto de la bacteria aislada se comunica el hallazgo lo antes posible al clínico, aunque sólo se le de una información muy general e inespecífica. (2, 5, 9, 19, 21,22)

7.11. Identificación.

7.11.1. Identificación preliminar. El primer paso, el más básico pero imprescindible, es la observación detallada de las características de la colonia y de la tinción de Gram. Dado que entre los anaerobios hay especies que retienen de forma variable el colorante principal (cristal violeta), en ocasiones puede ser de gran ayuda un subcultivo con un disco de vancomicina de 5 µg para determinar el carácter de grampositividad o gramnegatividad. Con los datos obtenidos de estas observaciones ya se puede informar sobre: cocos grampositivos anaerobios, *Clostridium* spp. (Observación de esporas o morfología típica de *C. perfringens*) o bacilos grampositivos anaerobios, (en este último caso si la morfología es de *Propionibacterium* se puede notificar como tal si se detecta la producción de catalasa). Los cocos gramnegativos anaerobios se informan como tales o como *Veillonella* spp., puesto que este es el género más frecuentemente

hallado en las clínicas. En el caso de los bacilos gramnegativos anaerobios es aconsejable informar de ellos una vez encuadrados en ciertos "grupos": grupo *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides/Prevotella*, *Prevotella/ Porphyromonas*, *Bacteroides ureolyticus/ Campylobacter*, *Fusobacterium*, o *Bilophila/ Sutterella*. Este encuadre preliminar se puede lograr con algunas pruebas adicionales como:

- Capacidad para crecer en presencia de un 20% de bilis (resistencia a la bilis u *oxgall*).
- Sensibilidad (S) o resistencia (R) (halos de inhibición) por el método de difusión con discos a vancomicina (con carga de 5 µg), kanamicina (de 1000 µg), y colistina (de 10 µg).

La interpretación de estas observaciones es la siguiente:

- **Crecimiento en bilis (+)**, vancomicina R, kanamicina R, colistina R = grupo *Bacteroides fragilis*.
- **Crecimiento en bilis (+)**, vancomicina R, kanamicina S, colistina S = grupo *Bilophila/Sutterella*.
- **Crecimiento en bilis (-)**, vancomicina variable (V), kanamicina R, colistina V = grupo *Prevotella/ Porphyromonas*.
- **Crecimiento en bilis (-/+)**, vancomicina R, kanamicina S, colistina S = *Fusobacterium* spp. (dos especies bilis+).
- **Crecimiento en bilis (-)**, vancomicina R, kanamicina S, colistina S = grupo *Bacteroides ureolyticus/ Campylobacter* (la diferenciación presuntiva entre este grupo y *Fusobacterium* tendría que basarse en las características morfológicas de la cepa). También estaría en este grupo el género *Leptotrichia*.

Aunque la sensibilidad a la vancomicina puede diferenciar los géneros *Prevotella* (vancomicina R) y *Porphyromonas* (vancomicina S), se sugiere la

agrupación imprecisa de "grupo *Prevotella/Porphyromonas*" para los bacilos gramnegativos anaerobios que dan colonias negras, dada la dificultad que puede existir para conseguirlos en cultivo puro a pesar de su fácil detección por la pigmentación de sus colonias.

7.11.2. Identificación final. Probablemente es deseable una identificación lo más precisa posible. La identificación a nivel de género y especie de todos los aislamientos clínicos ayudaría a conocer con precisión su implicación en diferentes enfermedades infecciosas, su sensibilidad a los antibióticos y los posibles mecanismos de resistencia existentes. Sin embargo conseguir identificar la especie (e incluso en ocasiones el género) de todos los aislamientos es una tarea prácticamente imposible y seguramente ni siquiera necesaria. No obstante sería conveniente que al menos en algunos laboratorios con mayor capacidad se intentara su identificación con la mayor precisión posible.

La dificultad en la **identificación** de la totalidad de las bacterias anaerobias aisladas tiene un **doble origen**. En **primer lugar taxonómico**, ya que las clasificaciones utilizadas cambian constantemente debido a la introducción de estudios geonómicos. Los análisis del ARN 16S han demostrado que muchos de los géneros definidos por caracteres fenotípicos eran muy heterogéneos y contenían géneros diversos, y que muchas especies, definidas igualmente sobre bases fenotípicas, estaban mal agrupadas en el esquema taxonómico. En segundo lugar la gran dificultad de los laboratorios de microbiología clínica estriba en el alto costo y tiempo requeridos para asignar sus aislamientos, por medio de caracteres fenotípicos, a géneros y especies definidos sobre bases genéticas, ya que es imposible recurrir de forma ordinaria a estudios del ARN 16S y a técnicas de amplificación geonómica con cebadores específicos. Cada laboratorio debe intentar estudiar tantos caracteres fenotípicos como le sea posible y que le permitan llegar a una identificación adecuada. Los caracteres fenotípicos

habitualmente estudiados, aparte de los morfológicos y de sensibilidad citados, son los derivados de la actividad metabólica: producción de indol, descomposición del H_2O_2 (catalasa), capacidad sacarolítica y/o proteolítica, detección de determinados enzimas y caracterización de productos finales de su metabolismo. (2, 4, 5,9.)

El estudio de la capacidad de producir indol y de descomponer el H_2O_2 está al alcance de cualquier laboratorio de microbiología, por lo que deberían incluirse en todo esquema de identificación.

El estudio de la capacidad sacarolítica y/o proteolítica ha constituido la base de la identificación bacteriana desde los tiempos más remotos y aún hoy es el que se ofrece en todas las descripciones y/o redefiniciones de géneros y **especies**. La puesta en práctica de este estudio analizando un gran número de sustratos con métodos clásicos es larga y costosa. Una buena alternativa es la utilización de sistemas comerciales, en los que se ofrecen, en pozos de plástico, un gran número de sustratos liofilizados que se rehidratan con el propio inóculo. En estos sistemas (por ejemplo, el API 20 A[®]) la bacteria tiene que crecer y ejercer su actividad metabólica, por lo que tienen que incubarse en anaerobiosis durante 24 a 48 horas.

7.11.2.1. Detección de la cantidad enzimática de una bacteria. Puede, igualmente, hacerse por métodos clásicos o utilizando sistemas comerciales (API ZIM[®], ID 32A[®]) similares a los anteriormente descritos, pero con los sustratos adecuados. Estos micrométodos detectan solamente enzimas preelaboradas, por ello no es necesario que crezca la bacteria, se rehidratan con un inóculo bacteriano muy denso y se incuban en aerobiosis durante 4 horas. También se dispone de preparados individuales de algunos sustratos. La detección de la lecitinasa y la lipasa se hace fácilmente observando el

crecimiento de las bacterias en medios sólidos que contengan yema de huevo.

7.11.2.2. Detección de los productos finales del metabolismo bacteriano mediante cromatografía gas-líquido. Sólo es accesible para los laboratorios que dispongan del cromatógrafo adecuado. En estos casos es una técnica de fácil realización y escaso costo, aunque exige cultivar y obtener un buen crecimiento en un medio líquido, preferentemente rico en glucosa (como el PRAS PYG). Este estudio, incluso después de los cambios taxonómicos mencionados, asociado a las características microscópicas (morfología cocoide o bacilar, grampositividad o gramnegatividad) continúa definiendo, en algunos casos, el género (*Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Veillonella*, *Acidaminococcus*, *Megasphaera*, *Propionibacterium*), en otros casos presta una gran ayuda para establecer diferencias entre determinados géneros (*Actinomyces* y *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Eubacterium*) y en otros muchos permite "separar" géneros recientemente definidos (cocos grampositivos) y especies dentro de géneros muy amplios y heterogéneos (*Clostridium*). Su utilización facilita la identificación con los resultados de las otras pruebas bioquímicas. (2, 4, 5, 9, 21,22.)

7.12. Recomendaciones. Teniendo en cuenta todas estas técnicas que pueden estar al alcance de muchos laboratorios de microbiología clínica, una buena práctica podría ser:

1º. Realizar en todo aislamiento anaerobio estricto la identificación preliminar tal y como se ha descrito.

2º. Añadir en todos los casos el estudio de la capacidad de descomponer el H₂O₂ o de producir indol (aunque esto último suele estar incluido en las galerías de micrométodos, puede ser más rápido

y más fiable comprobarlo individualmente mediante el paradimetilaminocinamaldeído o en cualquier caldo rico en triptófano).

3°. Estudiar la actividad metabólica con alguna de las galerías de micrométodos disponibles, bien las que detectan enzimas preformados o las que nos muestran la actividad sacarolítica o proteolítica, teniendo en cuenta que estas últimas sólo serán útiles en el caso de bacterias que posean una cierta actividad sacarolítica y que sean capaces de crecer bien en las condiciones proporcionadas por el micrométodo. Si se considera necesario y es posible completar, se debe comprobar o confirmar la información obtenida realizando individualmente las siguientes pruebas, indicadas en cada caso:

- Reducción de nitratos en un caldo que los posea (*Veillonella*, grupo *B. ureolyticus/Campylobacter*, *Propionibacterium*, *Eggerthella*).
- Detección de lecitinasa y/o lipasa (*Clostridium*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, pigmentadas).
- Detección de ureasa (grupos *B. ureolyticus/ Campylobacter*, *Bilophila/ Sutterella*, *Clostridium*).
- Estimulo del crecimiento por determinados suplementos: (formato/fumarato en el grupo *B. ureolyticus/ Campylobacter*, arginina en *Eggerthella*)
- Detección de los productos finales del metabolismo (*Fusobacterium*, cocos gramnegativos y grampositivos, bacilos grampositivos no esporulados y *Clostridium*. ^(2,4,5,9,21,22.)

7.13. Interpretación de los resultados.

La interpretación de los resultados obtenidos en las pruebas practicadas conduce a una identificación más o menos específica de la bacteria en

estudio. Al describir las observaciones y pruebas necesarias para una identificación preliminar ya se han dado unas orientaciones para su interpretación. Respecto a todas las demás que se pueden realizar no se detalla aquí el resultado a obtener en cada una de ellas para llegar a la identificación de cada uno de los posibles anaerobios, pudiéndose encontrar esta interpretación detallada en las publicaciones originales en las que se describen o redefinen géneros y especies y en manuales de referencia (Wadsworth-KTL Anaerobic Bacteriology Manual o Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition). Aquí sólo se señalan algunas observaciones o sugerencias.

7.13.1. Interpretación de los resultados obtenidos con micrométodos comerciales. La realización e interpretación se hará siguiendo las instrucciones del fabricante. Todos vienen acompañados de tablas de identificación y de una base de datos que proporcionan la identificación de la cepa estudiada, señalando, además, la precisión y fiabilidad de esta. Son de gran ayuda, aunque estos métodos también presentan ciertos problemas a tener en cuenta:

- La lectura de las galerías, tanto si se hace manualmente como si la realiza un lector automático no es siempre clara y definida, con lo que con determinadas cepas se obtienen, para algunas pruebas, resultados dudosos o difíciles de interpretar.
- La inercia de estos sistemas suele ser grande por lo que sus bases de datos no se actualizan con facilidad y no se adaptan a los frecuentes cambios taxonómicos. Cuando alguno de esos cambios consiste en que una determinada especie es transferida a otro género y/o recalificada el problema se limita a utilizar la denominación correcta cada vez que se de esa identificación (por ejemplo, *Peptostreptococcus magnus*, *Finnegoldia magna*, *Peptostreptococcus micros*, *Micromonas micros*, *Eubacterium lentum*, *Eggerthella lenta*).

El problema es mayor cuando el cambio supone la creación de nuevas especies, muchas veces a partir de una anteriormente descrita (por ejemplo, *Peptostreptococcus prevotii*, *P. prevotii*, *P. vaginalis*, *P. lacrimalis*, *P. lactolyticus*).

- Las bases de datos suelen ser amplias y fiables pero lógicamente limitadas, no incluyen algunas especies que aún no siendo muy frecuentes pueden encontrarse en clínica (*Campylobacter* spp., *Bilophila/Sutterella*, *Acidaminococcus*), por ello con estos sistemas una cepa perteneciente a alguna de estas especies puede o no ser identificada o serlo erróneamente.

Cuando la lectura de las pruebas no proporciona ninguna identificación, esta es calificada por el propio sistema de poco fiable o de escasa discriminación, en estos casos o cuando este en clara contradicción con las observaciones realizadas para la identificación preliminar, es de gran ayuda disponer de alguna prueba complementaria cuyo resultado centre la identificación.

7.13.2. Interpretación de los resultados de las pruebas individuales complementarias realizadas en casos concretos.

- Ante una identificación preliminar de bacilos gramnegativos anaerobios con crecimiento en bilis (-), vancomicina R, kanamicina S y colistina S, la producción de **ácido butírico como producto final del metabolismo** indica sin ninguna duda que se trata de *Fusobacterium*. Una reducción de **nitratos** positiva sitúa en el grupo *Bacteroides ureolyticus/Campylobacter*. En las bases de datos de los micrométodos más utilizados *F. nucleatum*, la especie más frecuente, se identifica bien pero con escasa discriminación, sólo una prueba positiva, y del grupo *Bacteroides ureolyticus/Campylobacter* sólo *B. ureolyticus* esta contemplado.

- Una prueba de **lipasa (+)** en *Fusobacterium* confirma su identificación como *F. necrophorum*, especie que con las galerías de micrométodos comerciales se identifica bien pero con escasa discriminación (sólo dos pruebas positivas).
- Ante una identificación preliminar de bacilos gramnegativos anaerobios crecimiento en bilis (-), vancomicina R, kanamicina S y colistina S, la producción de **ácido láctico como producto final del metabolismo** indica su pertenencia al género *Leptotrichia*.
- Ante una identificación preliminar de bacilos gramnegativos anaerobios crecimiento en bilis (+), vancomicina R, kanamicina S, y colistina S, una prueba de **catalasa (+) o (-)** indica *Bilophila wadsworthia* o *Sutterella wadsworthensis*.
- Una identificación preliminar de cocos gramnegativos anaerobios **nitratos (+)** separa el género *Veillonella*, y los productos finales del metabolismo definen perfectamente los tres géneros: *Veillonella* (ácido propiónico), *Acidaminococcus* (ácido butírico) y *Megasphaera* (ácido caproico).
- Ante una identificación preliminar de bacilos grampositivos anaerobios, que morfológicamente aparecen como *Propionibacterium*, la detección de **ácido propiónico como producto final del metabolismo** confirma el diagnóstico de género. Si se añaden las pruebas de **catalasa (+)**, **indol (+)** y **nitratos (+)**, esta prácticamente identificada la especie *Propionibacterium acnes*.^(2,4,3,9,21,22,)
- La identificación de un bacilo grampositivo anaerobio como *Eggerthella lenta* (antes *Eubacterium lentum*) con los micrométodos habituales, tanto con los que estudian la capacidad sacarolítica como con los que detectan enzimas prefabricados, es de escasa discriminación: resultado negativo en todas las pruebas en el primer caso (API 20 A[®]) y con sólo un resultado positivo, el ADH (arginina dehidrolasa), en el segundo caso (ID 32A[®]). La reducción de **nitratos**

(+), la estimulación del crecimiento con arginina y la producción de SH_2 en medio de TSI (*triple sugar iron*) confirman plenamente el diagnóstico.

- Ante una identificación preliminar de cocos grampositivos anaerobios, la sensibilidad mediante la técnica de disco-placa a **polianetol sulfonato sódico (SPS)** indica la identificación de *Peptostreptococcus anaerobius* o, con menos probabilidad, *Micromonas micros*. Aparte de la fácil diferenciación de este último por su morfología microscópica (tamaño) y porque se identifica muy bien con los micrométodos que detectan enzimas preformados, un cromatograma abigarrado, incluyendo hasta ácido isocaproico en los **productos finales del metabolismo** orienta claramente hacia *P. anaerobius*.

8. PRUEBAS DE DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD

8.1. Indicaciones. No se recomienda realizar, de una forma rutinaria, ensayos de sensibilidad a todos los aislamientos de bacterias anaerobias. La comunicación con el clínico es importante para decidir la realización de dichas pruebas. En la actualidad, se consideran las siguientes indicaciones para realizar estudios de sensibilidad:

1) Estudios periódicos de vigilancia y seguimiento en cada centro hospitalario, con el fin de conocer los patrones locales de resistencia y de esta forma tener información útil para seleccionar la terapia antimicrobiana empírica más adecuada y detectar posibles cambios en la sensibilidad o aparición de resistencias.

2) Casos individuales de pacientes que no responden a la terapia empírica, o que presentan infecciones graves o infecciones que requieran terapia prolongada (absceso cerebral, endocarditis, osteomielitis, infección articular, de prótesis, de injertos vasculares, y bacteriemias recurrentes).

3) Estudios de la actividad *in vitro* de nuevos antimicrobianos frente a bacterias anaerobias.

4) Infecciones producidas por especies de *Bacteroides*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Bilophila* y *Sutterella*, que son más virulentas y/o con una sensibilidad poco predecible a los antibióticos comúnmente utilizados para el tratamiento de las infecciones por anaerobios.

8.2. Métodos. Para una información más completa sobre la metodología de los ensayos de sensibilidad de las bacterias anaerobias es conveniente

consultar el Procedimiento en Microbiología Clínica nº 11 de la SEIMC (Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos). En el presente documento se incluyen, especialmente, las modificaciones que se han producido, especialmente en los últimos documentos del NCCLS (M11-A5, 2001 y M11-A6, 2004). **El método de difusión con discos en agar no está aprobado para las bacterias anaerobias y el de dilución en agar es el de referencia para todos los anaerobios.** En cuanto al método de microdilución en caldo el NCCLS solamente lo ha aprobado para el ensayo de aislamientos pertenecientes al grupo de *Bacteroides fragilis* y a un número limitado de antibióticos, ya que diversas especies anaerobias crecen poco o no lo hacen en los pocillos y, además, hay pocos estudios comparativos con el método de referencia. Cuando se realizan estudios amplios, ya sea para ensayar nuevos antimicrobianos o para conocer los patrones actuales de resistencia, la técnica de dilución en agar es el método más eficaz, ya que permite el crecimiento de una gran variedad de microorganismos anaerobios. El método de microdilución así como la utilización de tiras de E-test, son alternativas recomendadas para casos individuales.

8.2.1. Dilución en agar. Medios de cultivo: En sus últimos documentos el NCCLS recomienda utilizar **agar *Brucella* enriquecido** con 5% de sangre de carnero lacada, vitamina K₁ (5 µg/ml) y hemina (5 µg/ml), en lugar del medio recomendado anteriormente, agar Wilkins-Chalgren, al comprobar que en el primero crecen mejor las bacterias anaerobias.

Preparación del inóculo: A partir de un cultivo en placas de agar *Brucella* enriquecido para anaerobios, de 24 horas o del tiempo necesario para conseguir colonias de por lo menos 1 milímetro de diámetro, se suspenden de 3 a 5 colonias en un caldo de tioglicolato enriquecido sin indicador, que se incuba entre 6 y 24 horas o hasta que alcance una turbidez adecuada. Posteriormente, se ajusta la turbidez a una densidad equivalente al 0,5 de la escala turbidométrica de McFarland mediante la adición de caldo *Brucella* u

otro caldo previamente reducido, o hervido y enfriado para eliminar el oxígeno. También se puede preparar el inóculo directamente haciendo una emulsión de las colonias y ajustándola a la turbidez mencionada partiendo del cultivo, medios citados y según el procedimiento anteriormente indicado. Las placas con medio de agar *Brucella* con antibióticos no deben dejarse en aerobiosis un tiempo superior a 30 minutos.

La inoculación en la superficie del agar se hace con la ayuda de un replicador de Steers. El inóculo final debe ser, aproximadamente, de 10^5 UFC por punto de inoculación. Se recomienda, tanto al principio como al final de cada serie, inocular dos placas control sin antibiótico, una se incuba en una atmósfera con un 5% de CO₂ y la otra en anaerobiosis, durante 42-48 h, con el fin de comprobar la viabilidad y pureza del inóculo. Se debe empezar a inocular siempre por la concentración más pequeña de cada antibiótico. A las 42-48 h de incubación en anaerobiosis a 35-37°C, se lleva a cabo la lectura examinando en primer lugar las placas control. La CMI (concentración mínima inhibitoria) se considera como aquella concentración de antibiótico en la que se observa una reducción marcada en el crecimiento de la bacteria al compararlo con el crecimiento de la placa control, como es el cambio a una fina película, o a numerosas colonias pequeñas, o bien a una o varias colonias de tamaño normal. ^(2,4,5,9,21,22.)

La interpretación de los valores de CMI obtenidos para cada antibiótico se realiza según los criterios del documento M11-A6 del NCCLS.

8.2.2. Microdilución en caldo. Como se ha mencionado solamente está aceptado por el NCCLS para las especies del grupo de *Bacteroides fragilis* y para ampicilina-sulbactam, cefoxitina, clindamicina, ertapenem, metronidazol, piperacilina y trovafloxacin. Para su realización se recomienda usar caldo *Brucella* complementado con hemina (5 µg/ml), vitamina K₁ (1 µg/ml) y sangre lacada de caballo (5%). El inóculo puede prepararse siguiendo uno de

los procedimientos descritos en el método de dilución en agar y debe ser de 1×10^5 UFC/pocillo. Se aconseja realizar un control de pureza de la suspensión del inóculo, haciendo un subcultivo de una parte alícuota en un medio enriquecido y no selectivo para incubar en aerobiosis y en anaerobiosis.

A las 48 horas de incubación en atmósfera anaerobia a 35-37° C, se realiza la lectura en un fondo oscuro, con luz indirecta o mediante un espejo. Se considera como CMI aquella concentración del antibiótico en la que se observa una reducción significativa del crecimiento bacteriano al compararlo con el crecimiento del pocillo control, ya sea una inhibición completa del crecimiento o un botón de crecimiento muy tenue.

8.2.3. Sistemas comercializados. Se encuentran disponibles microplacas con diferentes antibióticos con actividad frente a bacterias anaerobias Sensititre®, Trek Diagnostic Systems.

Sensititre®. Los paneles de contienen el sustrato antibiótico desecado, se pueden almacenar a temperatura ambiente y presentan larga caducidad (18-24 meses). El autoinoculador Sensititre® permite su inoculación automática. Como medio de cultivo se utiliza, siguiendo las normas del NCCLS, caldo *Brucella* con sangre lacada de caballo (5%) que proporciona la casa comercial.

ATB ANA® (bioMérieux). Otro micrométodo de dilución en caldo comercializado son las galerías de sensibilidad para bacterias anaerobias de bioMérieux. Contienen 16 pares de pocillos con diferentes antibióticos que se ensayan a dos concentraciones determinadas. La lectura se realiza mediante un lector automatizado.

Tiras de E-test® (AB Biodisk). Consisten en unas tiras de plástico impregnadas con un gradiente exponencial continuo del antimicrobiano y una

escala de valores de CMI. Siguiendo las normas de los fabricantes del producto.

Preparación del inóculo. Se prepara como inóculo una suspensión del microorganismo a ensayar en caldo *Brucella* hasta alcanzar una turbidez correspondiente al nº 1 de la escala de McFarland, que se aplica en placas de agar *Brucella* enriquecidas con 5% de sangre de carnero, vitamina K1 (1 µg/ml) y hemina (5 µg/ml). Una vez secas las placas se aplican las tiras sobre la superficie del agar con la escala hacia arriba y evitando la formación de burbujas bajo ella. Se incuban en anaerobiosis durante 24-48h. La lectura de la CMI se realiza en el punto de intersección de la escala de la tira y la zona de inhibición del crecimiento del microorganismo, que tiene forma de elipse. Para el metronidazol es importante alcanzar la atmósfera anaerobia en 1 ó 2 horas. Con la clindamicina se debe confirmar la lectura a las 48 horas. (2,4,5,9,21,22.)

8.2.4. Controles de calidad. Con cualquiera de los métodos utilizados se deben realizar ensayos de control de calidad con las cepas de referencia de la colección americana de cultivos tipo ATCC® (*Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 y *Eubacterium lentum* ATCC 43055). El NCCLS recomienda efectuar los ensayos de control de calidad en la dilución en agar, con al menos 2 de las cepas ATCC indicadas y en la microdilución en caldo, con 1 o más cepas ATCC. Los intervalos aceptables de los valores de CIM de cada uno de los 3 microorganismos ATCC y para los diferentes antibióticos se pueden obtener consultando el mencionado documento M11-A6 del NCCLS.

8.2.5. Detección de β -lactamasas. La presencia de β -lactamasas se puede investigar con el método de la cefalosporina cromogénica utilizando como sustrato nitrocefín (Cefinase®, Becton Dickinson). El disco de nitrocefín se humedece con agua estéril y sobre el mismo se extienden varias colonias. El

cambio de color amarillo a rojo indica una reacción positiva. La reacción suele ser positiva a los 5-10 minutos. En algunas cepas la reacción puede ser más lenta, pero no debe observarse tras un periodo de tiempo superior a 30 minutos. (2,4,5,9,21,22.)

Dado que la mayoría del grupo *Bacteroides fragilis* son productores de β -lactamasas, se consideran de forma natural resistentes a penicilina, por lo que no es necesario ensayar de rutina la producción de β -lactamasas en este grupo. Cualquier otra bacteria anaerobia que sea productora de β -lactamasas se debe considerar resistente a penicilina y ampicilina e informar como tal, independientemente de los resultados de los estudios de sensibilidad *in vitro*. Una prueba de detección de β -lactamasas negativa no implica necesariamente que la bacteria sea sensible a la penicilina, ya que puede ocurrir que la bacteria sea resistente a los β -lactámicos por otros mecanismos diferentes a la producción de β -lactamasas

III. CONCLUSIONES

En la actualidad y gracias a las investigaciones realizadas en los últimos 20 años podemos recopilar esta información que nos ayuda a obtener datos de gran importancia sobre esta extensa comunidad de microorganismos anaerobios asociados a la enfermedad periodontal. Ya que la dificultad de aislarlos nos limita para conocerlos aun mas .

1. La enfermedad periodontal es multifactorial. Dada por una serie de cambios histopatológicos que destruyen el tejido periodontal y modifican este hábitat para que los microorganismos logren compartir y establecer una serie de asociaciones con muchos otros siendo los mecanismos patógenos los responsables directos en los cambios de los tejidos en cada una de las etapas de la enfermedad.
2. Los nuevos métodos de diagnóstico que se poseen actualmente dan la información de la respuesta antígeno-anticuerpo, sustancias producidas por algunos anaerobios, de la producción enzimática y muchas otras sustancias de degradación tisular, mecanismos de adherencia.
3. La enfermedad periodontal se subdivide en una serie de enfermedades que se diferencian con respecto de su etiología, progresión respuesta del organismo, que pueden ser modificados por factores ambientales, factores adquiridos, factores genéticos y factores sistémicos.

IV. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Guilarte, C , **Patógenos periodontales**, 19/11/ 2001 Segunda revisión de la Rev_Esp_ Químico 1. htm .<http://www.Facultad de Odontología. Universidad Central de Venezuela>.
- 2.- Guilarte. C. **Prevotella sp. y Porphyromonas sp. En la periodontitis del adulto**. <http://www.odonto.ucv.ve/>
- 3.- Carranza Sznajder. **Microbiología e inmunología periodontales** Compendio de Periodoncia. Editorial Médica Panamericana, 5ta ed. 1996 pp 31-61.
4. <http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/odontologia/2005168/lecciones/Capitulo7/cap7-3.htm> 2005;(7-3)
- 5.- Dr. Martínez Téllez Javier Leonardo, **Factores de riesgo de la enfermedad periodontal**,2004.<http://www.periodoncia-factores de riesgo de la enfermedad>.
- 6.- Fresnadillo Martínez J., Blázquez de Castro AM., García Sánchez E., García Sánchez JE y García Rodríguez JA. **Estado actual y perspectivas en el tratamiento antibiótico de las infecciones odontógenas**.Salamanca.2000.
http://www.seq.es/seq/html/revista_seq/0397/rev2.html

7. - Samaranayake, **Microbiology of periodontal disease**. Essential Microbiology for Edinburgh London, New York Oxford Philadelphia, St Louis Sidney, Livingstone Churchill, Toronto 2002 : 224 – 232.

8. - T. Pöllänen Marja , I. Salonen Jukka & Jukka Uitto Veli ,**Structure and function of the tooth-epitelial interface in health and disease** , Periodontology 2003 :31 Pp. 12-31

9.- Meneses EM, Veitia Cabarrocas F, Hernández Moreno V.J. y Fleites Medina J. **Importancia del factor genético en las periodontitis de aparición temprana**. Journal periodontal 2000; 5(2)

10.- Veli Jukka Uitto, **Gingival crevice fluid-an introduction**, Periodontology 2003 .31:9-11

11.- Satoru Inagaki , Kazuyuki Ishihara , Yuriko Yasaki , Satoru Yamada, and Katsuji Okuda ,**Antibody responses of periodontitis patients to gingipains of Porphyromonas gingivalis** ,J of Periodontology 2003;74(10) : 1432-1437.

12.- Takeuchi Y, Umeda M, Sakamoto M, Benno Y, Yi H, and Ishikawa I, **Treponema socranskii, treponema denticola, and porphyromona gingivalis are associated with severity of periodontal tissue destruction** ,J Periodontol. 2001 ; 72 (10): 1354-1363.

13.- J. Delima Andrew & Van Dyke Thomas E. ,**Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid** , Periodontology 2003 ;31: 55-76.

14.- Dr. León-Ponce María Fernanda, **Relación entre los herpes virus y la periodontitis**. MUDR.2004;2(2) <http://www.ecuaodontologos.com/>

15.- Crawford J. , Wilton J. and Richardson P. **Neutrophils die in the gingival crevice, periodontal pocket, and oral cavity by necrosis and not apoptosis**. J periodontology,2000;71(7):1121-1127.

16.- Greenstein G. ,**Chaning periodontal paradigms:therapeutic implications**, Inter. J of peridontology an restautarive dentistry 2000;20 (4): 337-353.

17- Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD and Socransky SS. **Microbial composition of supra-and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis**. J of Clinical Periodont, 2000; 27 (10-12):722-732.

18. - R.B. Johnson , N. Wood , and G.Serio F. ,**Interleukin -11 and IL -17 and the pathogenesis of periodontal disease**, J. Periodontol 2004;75(1): 37-41.

19. - M. Eley Barry & W. Cox Stephen, **Proteolitic and hydrolytic enzymes from purative periodontal pathogens: characterization, molecular genetics, effects on host defenses and tissues and detection in gingival crevice fluid**, Periodontology 2003 ;31 :105-119.

20. - Veli Jukka Uito , Overall M. & Christopher Mc Culloch, **Proteoliic host cell enzymes in gingival crevice fluid** , Periodontology 2003 ;31 :77-97.

21. - Armitage G, **Enfermedad periodontal: diagnóstico**, Annals of Periodontology 1996, World Workshop. Pp. 156-193.<http://www/enf.peri dx.htmfuente>

22.- Dr.Sergio Hinski, **Nuevos métodos de diagnostico periodontal**. 2004
<http://www.sergiohiskin.com.ar/>

23.- <http://metodosdediagnosticolab/inmunofluorescencia> .

24.- Slots J, DMD.PhD, Tauhman A.M ,PhD DDS. **Characteristics of oral gram negative species**, Contemporary oral Microbiology an immunology , Mosby –Year ,Printer in the United Stated of America,1992;299-240.