



Máster de Ciencias Odontológicas
Universidad Complutense de Madrid

Departamento de Estomatología III
Curso 2015/2016

**Detección y cuantificación de
patógenos periodontales en pacientes
con gingivitis mediante el uso de
técnicas moleculares.**

Alumno: Luis Rodríguez-Batllori Aran
Tutorizado por: Dra. Elena Figuero

ÍNDICE

1. Introducción	
1.1 Enfermedades periodontales	Página 3
1.2 Gingivitis.	Páginas 3-5
1.3 Diagnóstico de la gingivitis.....	Páginas 5-9
1.4 Microbiología de la gingivitis.....	Páginas 9-11
1.5 Reacción en cadena de la polimerasa.....	Páginas 11-13
1.6 Justificación.....	Página 14
1.7 Objetivos.....	Página 14
1.8 Hipótesis.	Página 14
2 Material y métodos	
2.1 Selección de sujetos.....	Páginas 15-16
2.2 Registros clínicos.....	Páginas 16-17
2.3 Toma de muestra de Fluido Crevicular Gingival.....	Página 18
2.4 Análisis microbiológico.....	Página 18-20
2.5 Análisis estadístico.....	Página 21
3 Resultados.	Página 22
4 Discusión.	Páginas 23-29
5 Conclusiones.	Página 30
6 Bibliografía.....	Páginas 31-37

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedades periodontales

Las enfermedades periodontales son un conjunto de enfermedades de origen infeccioso que cursan con la inflamación de los tejidos de soporte de los dientes. Son actualmente patologías altamente prevalentes a nivel mundial (1-2), y suponen uno de los factores más importantes para la pérdida dentaria (3-6).

La periodontitis severa fue en 2010 la sexta patología más prevalente, afectando a un 11,2% de la población mundial (743 millones de personas). Esta prevalencia aumenta con la edad, alcanzando su pico máximo a partir de los 40 años, sin diferencias significativas entre hombres y mujeres. Los datos de incidencia de ese mismo año señalan que se diagnosticaron 701 nuevos casos por cada 100.000 habitantes de la población mundial. En Europa la prevalencia en 2010 es de 11,8% y la incidencia de 743,3 por cada 100.000 habitantes (7).

En España, según un reciente estudio de Carasol y colaboradores de 2016 la periodontitis tiene una prevalencia del 38,4% de la población trabajadora, incrementándose a partir de los 45 años de edad. Existen diferencias en cuanto al sexo, nivel socioeconómico y formación académica recibida, siendo estadísticamente superior en el género masculino, con una formación básica, nivel adquisitivo inferior y pacientes fumadores (8).

2. Clasificación de enfermedades gingivales

La clasificación actualmente más extendida de las enfermedades periodontales es la de la Asociación Americana de Periodoncia de 1999 (9). En ella se hace una clara distinción entre las enfermedades gingivales y la periodontitis, a su vez clasificada según la severidad (leve, moderada y avanzada) y la extensión (localizada o generalizada). Centrándonos en las enfermedades gingivales, se estableció que se dividían en dos grandes grupos: las gingivitis inducidas por placa, y las no inducidas por placa. Las gingivitis inducidas por placa a su vez se clasificaron en aquellas que se asocian solo a placa, o que pueden ser modificadas por factores sistémicos (endocrinos o discrasias sanguíneas), por medicamentos o malnutrición.

Las gingivitis no inducidas por placa engloba una serie de entidades en las que la inflamación gingival se desencadena por bacterias específicas, virus u hongos, por genética, condiciones sistémicas, lesiones traumáticas, cuerpos extraños u otros factores no especificados (tabla __)

Enfermedades gingivales:

Enfermedades gingivales inducidas por placa.

1. Gingivitis asociada solo a placa.
 - a. Sin otros factores locales contribuyentes.
 - b. Con factores locales contribuyentes.
2. Enfermedades gingivales modificadas por factores sistémicos.
 - a. Asociadas al sistema endocrino.
 - 1) Gingivitis asociada a la pubertad.
 - 2) Gingivitis asociada al ciclo menstrual.
 - 3) Gingivitis asociada al embarazo o granuloma piógeno.
 - 4) Gingivitis asociada a la diabetes.
 - b. Asociadas a discrasias sanguíneas
 - 1) Gingivitis asociada a leucemia
 - 2) Otros
3. Enfermedades gingivales modificadas por medicamentos
 - a. Agrandamientos gingivales inducidos por medicamentos.
 - b. Gingivitis inducida por medicamentos
 - 1) Gingivitis asociada a anticonceptivos orales
 - 2) Otros
3. Enfermedades gingivales modificadas por malnutrición
 - a. gingivitis por deficiencia de ácido ascórbico.
 - b. Otros

B. Gingivitis no inducidas por placa

1. Enfermedades gingivales originadas por bacterias específicas (*Neisseria gonorrhoea*, *Treponema pallidum*, estreptococos u otros)
2. Enfermedades gingivales de origen vírico (herpes virus u otros)
3. Enfermedades gingivales de origen fúngico (Candidiasis , eritema linear gingival, histoplasmosis u otros)
4. Enfermedades gingivales de origen genético (fibromatosis gingival hereditaria u otros)
5. Manifestaciones gingivales de condiciones sistémicas (desordenes mucocutáneos, o reacciones alérgicas)
6. Lesiones traumáticas
7. Reacciones a cuerpo extraño
8. Otras entidades no especificadas.

3. Diagnóstico de la gingivitis

Las primeras fases de la enfermedad se manifiestan clínicamente con inflamación y enrojecimiento de las encías, cuadro clínico definido como gingivitis. La gingivitis se presenta con diferentes niveles de severidad, desde signos leves de inflamación, como el enrojecimiento e hinchazón, hasta sangrado al sondaje o hemorragia espontánea de los tejidos (10-14). El sangrado al sondaje es de particular importancia con respecto a la severidad de la gingivitis, y factor de riesgo de progresión a periodontitis (15).

La gingivitis es reversible por naturaleza aunque, en ausencia de tratamiento, en algunos casos puede progresar a periodontitis, que está asociada a una pérdida de inserción, de hueso de soporte y en último término, puede cursar con la pérdida de dientes (16). Debe entenderse la periodontitis como una continuación de la gingivitis, aunque no necesariamente una gingivitis tiene por que progresar a una periodontitis (17). Aproximadamente un 10-15% de la población con gingivitis termina por desarrollar una periodontitis (18).

A lo largo de la historia, y especialmente en el último siglo, se han empleado gran cantidad de índices con el fin de aproximarse cada vez más a un diagnóstico preciso, y a unas mediciones reproducibles y unificadas para evaluar la existencia y la severidad de la gingivitis.

Definimos índice como la expresión numérica de criterios diagnósticos definidos. Se hacen de forma cuantitativa o cualitativa, y tienen los requisitos de ser simples, objetivos, reproducibles, rápidos y manejables estadísticamente. La utilización de estos índices se hace imperativa especialmente en estudios clínicos y epidemiológicos, pero también en la práctica clínica, a fin de evaluar a largo plazo la progresión de los pacientes.

Entre los índices de placa mas utilizados tenemos el Índice de Higiene Oral (OHI), descrito por Greene y Vermillion, Índice de Placa de Quigley y Hein, y su modificación llevada a cabo por Turesky, y el Índice de Placa Sillness y Loe. Estos índices están orientados a determinar la cantidad de placa que presenta un individuo. (TABLA 1.) Los índices de sangrado gingival mas utilizados son el índice Gingival de Loe y Silness, y su modificación de Lobene y colaboradores, el índice de Sangrado de la Papila por Saxer y Muhlemann, el índice de sangrado gingival de Ainamo y Bay, el sangrado tras el sondaje de Greenstein y colaboradores, y el mas utilizado, el sangrado al sondaje de Bandersten y colaboradores. Todos estos índices se utilizan para determinar el sangrado que se produce en las encías al ser estimuladas de diferentes maneras mediante una sonda periodontal. (TABLA 2)

Índices de placa			
Índice	Autor, año	Medición	Comentarios
Índice de Higiene Oral	Green y Vermillon 1960	<ul style="list-style-type: none"> • 0. no placa • 1. $\leq 1/3$ • 2. $1/3-2/3$ • 3. $\geq 2/3$ 	Índice visual solo por vestibular
Índice de Placa	Quigley y Hein 1962	<ul style="list-style-type: none"> • 0. No placa • 1. punteados de tinción en el margen gingival • 2. línea definida de placa • 3. $1/3$ de la superficie dental • 4. entre $1/3$ y $2/3$ • 5. $+2/3$ 	Se realiza con revelador de placa
Índice de placa de Quigley y Hein modificado	Turesky y cols 1970	<ul style="list-style-type: none"> • 0. no placa • 1. $\leq 1/3$ • 2. $1/3-2/3$ (1mm o menos) • 3. $\geq 2/3$ 	Se valora por vestibular y lingual
Índice de Placa	Silness y Løe 1964	<ul style="list-style-type: none"> • 0. No placa • 1. placa no visible que se recoge con sonda • 2. acumulación moderada de placa que se puede ver a simple vista • 3. acumulación abundante de placa 	-

TABLA 1. Índices de placa

Índices de sangrado

Índice	Autor, año	Medición	Comentarios
Índice gingival	Löe y Silness 1967	<ul style="list-style-type: none"> • 0. ausencia de inflamación • 1. inflamación ligera • 2. Inflamación moderada con sangrado al pasar la sonda por el margen • 3. Inflamación severa con sangrado espontáneo 	-
Índice Gingival Modificado	Lobene y cols 1986	<ul style="list-style-type: none"> • 0. ausencia de inflamación • 1. Inflamación ligera • 2. Inflamación ligera afectando a la totalidad de la encía marginal y de la papila • 3. Inflamación moderada • 4. Inflamación severa 	Alta sensibilidad
Índice de sangrado de la papila	Saxer y Muhlemann 1975	<ul style="list-style-type: none"> • 0.no sangra • 1. solamente un punto de sangrado. • 2. varios puntos aislados de sangrado o una pequeña área de sangre. • 3. pequeño triángulo interdental de sangre. • 4. sangrado se extiende hasta el margen gingival. 	Se evalúa 10-30 segundos tras el sondaje
índice de Sangrado Gingival	Ainamo y Bay 1975	<ul style="list-style-type: none"> • + Sangrado • - No sangrado 	Índice dicotómico únicamente pasando la sonda.

Sangrado tras el sondaje	Greenstein y cols 1981	<ul style="list-style-type: none"> • + Sangrado • - No sangrado 	30 segundos después del sondaje con una sonda periodontal de 0,5mm de diámetro y usando fuerza de 25g
Sangrado al sondaje	Badersten y cols 1975	<ul style="list-style-type: none"> • + Sangrado • - No sangrado 	Sonda de 0,5mm de diámetro y fuerza de 0,75 N

TABLA 2. Índices de sangrado

4. Microbiología de la gingivitis

El papel esencial de la placa bacteriana en la gingivitis fue por primera vez determinado utilizando modelos experimentales de gingivitis (19). Mediante el uso de microscopio, los investigadores evaluaron los cambios en las bacterias predominantes presentes en la placa durante la transición de un estado de salud gingival a la gingivitis. Concluyeron que la composición de la placa en salud, consistía mayoritariamente en cocos y bacilos Gram positivos. A medida que la placa madura, aumenta la proporción de bacilos Gram negativos, bacterias fusiformes y espiroquetas. Estudios de gingivitis experimental posteriores, confirmaron estos hallazgos mediante el uso de técnicas de cultivo, y aportaron mas información acerca de la naturaleza de la placa (20-22).

El clásico estudio de gingivitis experimental de Loesche en 1978 se realizó cultivando muestras de placa de 25 sujetos (24 varones y 1 mujer) tras haber estado 3 semanas sin medidas higiénicas de ningún tipo. Las muestras se cultivaron en un medio anaerobio, y se aislaron las bacterias a fin de identificarlas. Detectaron 29 especies. Las especies de

Actinomyces predominaban en aquellos pacientes que no presentaban sintomatología gingival, y mas especialmente, *Actinomyces israelii* era mayor en aquellos casos en los que la presencia de *Streptococcus sanguis* era menor. En los casos en los que aumentaba el sangrado gingival estaban asociados a una mayor presencia de *Actinomyces viscosus* y *Bacteroides melaninogenicus* (20).

Moore (año) determinó, los principales agentes etiológicos de la gingivitis a partir de los resultados de un estudio que realizó en 4 sujetos. Detectaron 166 especies en 96 muestras, y concluyendo que el perfil microbiológico es muy variable de un individuo a otro, y además que depende del grado de inflamación que presente. Las bacterias que mayor asociación demostraron con la gingivitis fueron *Actinomyces naeslundii*, *Actinomices odontolyticus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Lactobacillus spp.*, *Streptococcus anginosus*, *Veillonella párvula* y *Treponema spp.* Se encontró únicamente un 0,03% de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* del total de la flora, y únicamente en los sujetos gingivalmente sanos. *Fusobacterium nucleatum* por el contrario se detectó en todos los individuos y con un porcentaje de 4,42% del total de la flora (21).

Los miembros de los géneros *Actinomyces* y *Streptococcus* predominan en la placa supra y subgingival junto con un aumento de la flora subgingival de especies Gram negativas (*Fusobacterium. nucleatum*, *Veillonella. párvula* y especies de *Treponema*. En la gingivitis de larga duración el 25% de las bacterias son Gram negativas e incluye filamentos largos, miembros de *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella*, *Campylobacter* y *Bacteroides intermedius* (23).

La interacción de los diferentes tipos de microorganismos de la placa bacteriana define la infección periodontal, y promueve la iniciación de procesos inflamatorios. Actualmente, las bacterias mas asociadas a la destrucción tisular con la que tiende a continuarse la gingivitis, pertenecen a un microflora anaerobia que incluye: *Aggregatibacter actynomicetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus* y *Fusobacterium, nucleatum* (22,24-28) (TABLA 3.)

Asociación muy alta	Asociación alta	Asociación moderada	Asociación dudosa
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>T. forsythia</i>	<i>S.intermedius</i>	<i>Selenomonas</i> sp.
<i>P.gingivalis</i>	<i>P.intermedia</i>	<i>P.nigrescens</i>	M. entéricos G(-)
Espiroquetas	<i>C.rectus</i>	<i>P.micros</i>	<i>Staphylococcus</i> sp.
	<i>E.nodatum</i>	<i>F.nucleatum</i>	<i>B.gracilis</i>
	<i>T. Sp</i>	<i>Eubacterium</i> sp.	
		<i>E.corrodens</i>	

TABLA 3. Bacterias periodontopatógenas y grado de asociación con la periodontitis

5. Reacción en Cadena de la Polimerasa

Las técnicas de cultivo han sido el método diagnóstico clásico para identificar bacterias periodontopatógenas (29,30). Esta técnica ha evolucionado en gran medida desde que fue por primera vez utilizado con baterías orales por van Leuwenhoek, incluyéndose mejoras como el uso de sangre y medios anaerobios (31). Es el único capaz de detectar nuevas especies, de evaluar su susceptibilidad a antibióticos y además permite cuantificar el número de bacterias. Aun así, tiene una serie de limitaciones, principalmente la dificultad para cultivar ciertas bacterias, la imposibilidad de cultivar muchas, y la lentitud y el coste del proceso (32), además de no tener una elevada sensibilidad. (33). Se estima que cerca de la mitad de las bacterias presentes en la cavidad oral no son cultivables.

Estas limitaciones sugieren la evaluación de técnicas diferentes. Se han utilizado técnicas de inmunoensayo (34,35), citometría de flujo (36), e hibridación de ADN (35, 37-39). Estos estudios han proporcionado información útil acerca de la microbiología de las enfermedades periodontales.

Actualmente existe una mayor tendencia a la identificación de las bacterias mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (30, 40-46). La PCR es un método *in vitro* de síntesis de ADN, desarrollado en 1986, que consiste en la expansión exponencial de un fragmento de ADN delimitado por unos oligonucleótidos denominados cebadores o “primers”, mediante una ADN polimerasa, bajo condiciones *in vitro* favorables. Este proceso, que ha revolucionado todos los campos de la biología, permite obtener un gran número de copias a partir de un fragmento de ADN. Esto permite detectar bacterias de manera específica y con mayor sensibilidad, puesto que detecta cantidades mínimas de ADN. Se considera actualmente una técnica de alta sensibilidad que puede incrementar nuestro entendimiento del papel de cada microorganismo en el desarrollo de las enfermedades periodontales (47).

El proceso que tiene lugar en esta técnica se resume en la Imagen 1. En primer lugar es necesario que el ADN se desnaturalice, es decir, que las dos cadenas de ADN se separen, lo cual se produce elevando su temperatura a unos 94 °C. Posteriormente, se reduce la temperatura para que los cebadores se unan al ADN molde. Esta fase se conoce como hibridación, y se realiza a temperaturas que oscilan entre 35 y 60°C. Finalmente se realiza la elongación. La ADN polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre, donde se ha unido uno de los primers (forward). La temperatura de elongación suele ser de 72°C. Todas estas fases se repiten en numerosos ciclos produciéndose múltiples copias de ADN que posteriormente van a ser detectadas por electroforesis. La técnica de la *PCR convencional* tiene la limitación de no poder cuantificar el número de bacterias, además de que requiere de mucho tiempo para su análisis, lo cual complica su viabilidad clínica (48).

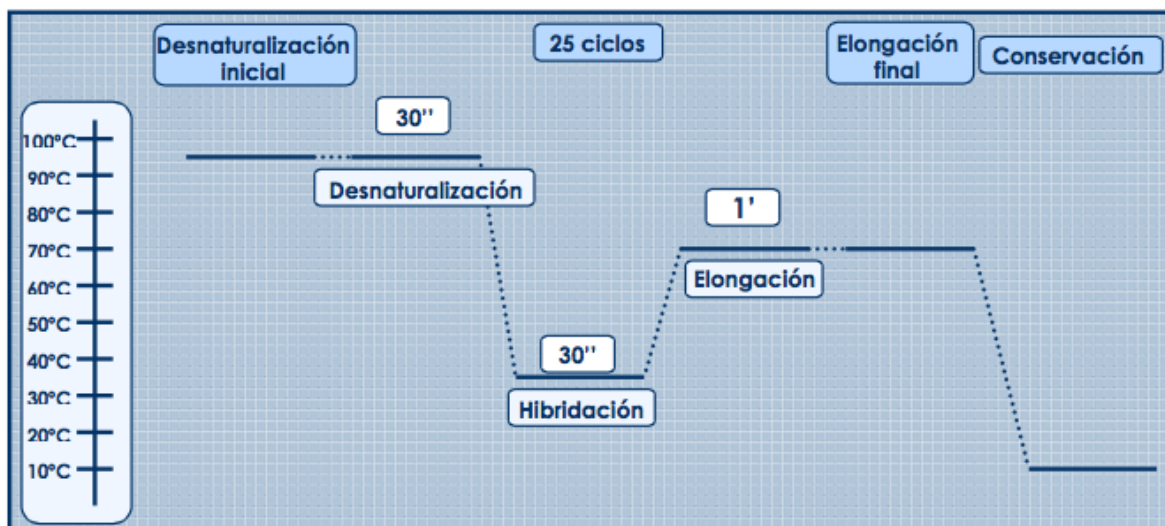


Imagen 1. Resumen del proceso de la PCR

Para solventar estas limitaciones, se ha desarrollado la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), utilizando una sonda TaqMan (una sonda fluorescente de ADN basada en la actividad exonucleasa en sentido 5'-3' de la Taq polimerasa) para el análisis cuantitativo de las muestras (49). La sonda con un colorante indicador fluorescente unido a su extremo se hibrida con el gen diana. Durante la amplificación por PCR, el colorante extintor se escinde por la actividad 5' exonucleasa de la Taq polimerasa, proceso en el que se produce una reacción fluorescente. Esta reacción permite la detección rápida y cuantificación del ADN (48, 50).

La alta sensibilidad y especificidad de la qPCR justifica su utilización en estudios epidemiológicos en periodoncia y para diagnóstico clínico. Hasta ahora, la gran mayoría de estudios microbiológicos sobre gingivitis se han realizado mediante técnicas de cultivo, y afirman que bacterias como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, y *Tannerella forsythia* son bacterias propias de estadios más avanzados de periodontitis, pero no de gingivitis. La aparición de la q-PCR está cambiando todos los paradigmas, ya que al tener un límite de detección mucho menor que las técnicas de cultivo, permite la detección de bacterias en concentraciones menores que las detectadas por cultivo. Es por ello que la tendencia actual es a pensar que la microbiología de la gingivitis y la periodontitis puede que no sea tan diferentes en cuanto a especies bacterianas, pero sí en cuanto a la concentración de bacterias de cada especie en un caso y en otro.

JUSTIFICACIÓN

Las bacterias *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia* y *Campylobacter rectus* se asocian en mayor o menor medida al desarrollo de las enfermedades periodontales, pero son bacterias que en concentraciones bajas son difícilmente detectables mediante técnicas de cultivo convencionales, y que durante muchos años se pensó que no se hallaban en pacientes con gingivitis. El desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular como la qPCR, con una

mayor sensibilidad y un límite de detección mucho menor, permitiría la identificación de estas bacterias en menores concentraciones, como podría ocurrir en pacientes con gingivitis.

OBJETIVOS

El objetivo de este estudio es determinar la presencia y los niveles de los periodontopatógenos *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia* y *Campylobacter rectus* en una muestra de pacientes con gingivitis mediante la técnica molecular de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

HIPÓTESIS

La PCR cuantitativa es capaz de detectar de forma sensible y cuantificar las bacterias periodontopatógenas mencionadas en pacientes con gingivitis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio forma parte de un ensayo clínico que pretende analizar el efecto del tratamiento con probióticos en la flora subgingival de pacientes con gingivitis inducida con placa. En este trabajo solo se han usado los datos de basal de todos los pacientes del ensayo clínico.

1. Selección de sujetos.

Se seleccionaron los sujetos que acudían a las clínicas de la facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid. Tras determinarse el cumplimiento de los criterios de inclusión, ser adecuadamente informados y dar su consentimiento fueron incluidos en el estudio.

1.1. Criterios de inclusión:

Criterios demográficos:

- Pacientes entre 18 y 55 años.
- Muestra equilibrada en cuanto al sexo.
- No fumadores (o exfumadores desde hace más de 6 meses)

Criterios clínicos:

- Sujetos con gingivitis definida con un Índice gingival (GI) > 1.3
- Sin pérdida de inserción interproximal mayor de 2mm en la mayoría de las localizaciones.

1.2. Criterios de exclusión

Criterios clínicos:

- Lesiones cariosas y/o restauraciones inadecuadas en incisivos laterales maxilares, premolares y primer molar o dientes adyacentes, que interfieran con la remoción de placa en las zonas de interés.
- Sujetos actualmente en tratamiento dental.
- Sujetos actualmente en tratamiento ortodóncico o portadores de férula oclusal.

Criterios Médicos:

- Sujetos con enfermedad sistémica o condición que pudiera afectar a la respuesta de los tejidos gingivales o a la capacidad de ejecutar un adecuado control de placa (embarazo, diabetes, alteraciones cuantitativas o cualitativas en células polimorfonucleares, otros trastornos inmunológicos, etc...)
- Sujetos que estén tomando medicación que pudiera interferir en la respuesta gingival (por ejemplo, antiinflamatorios, difenilhidantoina, bloqueantes del calcio, ciclosporina A, inmunoestimulantes,/inmunomoduladores...)
- Sujetos con tratamiento antibiótico o antiséptico en los 2 meses previos al estudio.
- Pacientes que hayan usado probióticos con fines de salud oral en los 2 meses previos al estudio.
- Historia de hipersensibilidad o alergia a cualquiera de los componentes de los productos de tratamiento.

2. Registros clínicos

Los datos clínicos se evaluaron en 4 localizaciones de todos los dientes (distovestibular, vestibular, mesiovestibular y lingual)

1. **Índice gingival**, de acuerdo con una modificación del método de Løe y Silness en 1963 (51), sin el componente de sangrado al sondaje. Este índice se evalúa de la siguiente manera:

0: ausencia de inflamación.

1: inflamación ligera (ligero cambio de color).

2: Inflamación moderada con sangrado al pasar la sonda. Aspecto brillante, enrojecimiento, edema e hipertrofia. Originalmente en este índice, el sangrado es a la presión, solo tocando con la sonda. En este estudio y de acuerdo a una modificación que se hizo posteriormente, se midió el sangrado sondando realmente.

3: Inflamación severa con sangrado espontáneo, ulceración, marcado enrojecimiento e hipertrofia.

2. **Índice de placa**, de acuerdo con Silness y Løe 1964(52). Este test se lleva originalmente a cabo de la siguiente manera:

0 No placa.

1 Placa no visible que se puede recoger pasando la sonda por la superficie.

2 Acumulación moderada de placa que se puede ver a simple vista.

3 Acumulación abundante de placa.

En este estudio se llevó a cabo con una modificación consistente en que la placa presente en las distintas superficies de los dientes se clasifica por primera vez 0 (placa no visible) ó 2 (placa visible). Posteriormente, la placa se tiñe con eritrosina para distinguir entre el 0 (realmente no hay placa) y el 1 (si hay placa).

3. **Sangrado**, que es una modificación del Índice de Sangrado Angulado según Van Der Weijden et al. (1994). Este índice consiste en pasar la sonda por la encía marginal en un ángulo de aproximadamente 60° al eje axial del diente. Este método fue comparado con sondear hasta el fondo de la bolsa, y comprobaron que es mas apropiado, para detectar diferencias en el desarrollo de la gingivitis entre los grupos experimentales (Van der Weijden et al 1994^a) (53), además de un mayor acuerdo intra e interexaminador comparándolo con otros métodos. Este es por lo tanto un índice mas adecuado para detectar lesiones inflamatorias interproximales. Se evalúa de la siguiente manera:

0: no hay sangrado.

1: sangrado a la estimulación de la sonda.

2: sangrado espontáneo.

3. Toma de muestras de fluido crevicular gingival (FCG)

Se seleccionó una localización en cada cuadrante en base a la presencia de inflamación (gingivitis). Después de secar la zona, se introdujeron 2 puntas de papel estéril en cada localización durante 10 segundos, y se agruparon todas las puntas en un único tubo (tipo *Eppendorf*) de plástico, vacío, de 1,5 mL.

4. Análisis microbiológico

El procesado de las muestras se realizó en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Odontología (Universidad Complutense, Madrid).

Las muestras se procesaron en el mismo día de su obtención o en un plazo de 24 horas conservado en un frigorífico.

4.1. Procesado inicial

En condiciones de esterilidad (halo de esterilidad alrededor de un mechero Bunsen, empleo de guantes y mascarilla y utilización puntas estériles) se añadieron 1000 microlitros (1 mL) de agua de Roche estéril en el interior del vial. Después se vorteoó durante 2 minutos para que el contenido bacteriano de las puntas se liberase al medio. Posteriormente, alrededor del halo de esterilidad y con la ayuda de pinzas estériles se retiraron las puntas de papel del interior del eppendorf y se desecharon. Después el eppendorf con 1 mL de agua y las bacterias suspendidas se centrifugó en todas las muestras a 13.000 rpm durante 3 minutos.

Finalmente y tras retirar el sobrenadante (casi el mL de agua) en condiciones de esterilidad y con ayuda de una pipeta, se congelaron las muestras para su posterior extracción de ADN.

4.2. Extracción de ADN

Este procedimiento consiste en aislar el ADN total contenido en el conjunto de las bacterias de la muestra, el cual se puede resuspender en agua o en un tampón apropiado.

La extracción de ADN se realizó mediante el kit comercial MoIYsis Complete5 (Molzym GmbH & Co.KG. Bremen, Alemania) específico para extracción de ADN bacteriano. Una vez

realizado este procedimiento, tenemos una el ADN bacteriano suspendido en agua, que es conservado a -80°C hasta su posterior análisis.

4.3. Amplificación mediante PCR cuantitativa en tiempo real

Una vez realizada la extracción de ADN, este debe amplificarse para ser detectable.

Para esta amplificación, se utilizaron primers para cada bacteria, todos ellos dirigidos al ARN 16S, y cuyas secuencias se pueden ver en la Tabla 4.

Secuencias de primers para cada bacteria		
Bacteria	Primer forward	Primer reverse
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	5-GAA CCT TAC CTA CTC TTG ACA TCC GAA-3	5-AGA ACT CAG AGA TGG GTT TGT GCC TTAGGG-3
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	5- GCGCTCAACGTTTCAGC C-3.	5- CACGAATTCCGCCT GC-3
<i>Tannerella forsythia</i>	5-GGG TGA GTA ACG CGT ATG TAA CCT-3	5-ACC CAT CCG CAA CCA ATA AA-3
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	5- GGATTTATTGGGCGTA AAGC-3	5- GGCATTCTACAA ATATCTACGAA-3
<i>Campylobacter rectus</i>	5-TTT CGG AGC GTA AAC TCC TTT TC-3	5-CGC TTG CAC CCT CCG TAT-3

TABLA 4. Secuencias de los primers para cada bacteria.

Las sondas de oligonucleótidos están marcadas con los fluorocromos 6-carboxyfluoresceína (FAM) en el extremo 5' y 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA) en el extremo 3'.

La curva patrón empleada para la posterior cuantificación del DNA bacteriano en las muestras de pacientes se logró mediante el empleo de diluciones seriadas desde 10^1 a 10^9 UFC/ml (Unidades Formadoras de Colonias por mililitro) de ADN genómico purificado de las bacterias. En cada experimento se usaron curvas estándar con estas diluciones.

Las muestras se analizaron por duplicado en un volumen final de 20 μ l, en una solución de master mix que contiene 2x TaqMan master mix (Taqman Gene Expression Master Mix; AppliedBiosystems), concentraciones óptimas de primers y sondas, y 5 μ l de ADN de las muestras. Los controles negativos consistieron en 5 μ l de agua estéril.

Las muestras fueron sometidas a un ciclo inicial de amplificación de 95°C durante 10 minutos, seguidas de 40 ciclos de amplificación a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Los datos se analizaron mediante el termociclador LightCycler® 480 (Roche).

5. Análisis estadístico

Se determinó la media de la concentración (UFC(/ml)) de bacterias detectadas para cada caso y la desviación estándar (DE). Se determinó, además, la prevalencia de cada bacteria, definida como el porcentaje de pacientes positivos a cada bacteria. También se cuantificó el límite de detección de la técnica utilizada (qPCR) para cada bacteria.

RESULTADOS

Los datos de prevalencia para cada bacteria fueron de 89,80% para *Porphyromonas gingivalis*, 50,80% para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, del 100% para *Fusobacterium nucleatum*, 96,60% para *Tannerella forsythia* y de un 94,90% para *Campylobacter rectus*.

Los valores de media basales de las distintas bacterias fueron para *Porphyromonas gingivalis* de $1,59 \times 10^5$ (DE= $4,70 \times 10^5$) UFC/ml para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* de $5,39 \times 10^3$ (DE= $2,17 \times 10^4$) UFC/ml, de para *Fusobacterium nucleatum* de $1,88 \times 10^5$ (DE= $2,59 \times 10^5$) UFC/ml, para *Tannerella forsythia* de $4,08 \times 10^5$, con una desviación estándar de (DE= $9,07 \times 10^5$) UFC/ml, y para *Campylobacter rectus* de $1,25 \times 10^4$, de (DE= $2,12 \times 10^4$) UFC/ml.

El límite de detección de la qPCR para cada bacteria es: para *Porphyromonas gingivalis* de $1,46 \times 10^1$ UFC/mL, para *Aggregatibacter actinoyicetemcomitans* de $3,33 \times 10^1$ UFC/mL, para *Fusobacterium nucleatum* de $2,39 \times 10^1$ UFC/mL, para *Tannerella forsythia* de $2,39 \times 10^1$ UFC/mL y para *Campylobacter rectus* de $2,39 \times 10^1$ UFC/mL. (TABLA 5)

	<i>A.actinomycetemcomitans</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>T.forsythia</i>	<i>F. nucleatum</i>	<i>C. rectus</i>
Media/					
Desviación	$5,39 \times 10^3$ /	$1,59 \times 10^5$	$4,08 \times 10^5$	$1,88 \times 10^5$	1,25E
Estandar	$2,17 \times 10^4$	$4,70 \times 10^5$	$9,07 \times 10^5$	$2,59 \times 10^5$	$2,12 \times 10^4$
Prevalencia	50,8%	89,8%	96,6%	100%	94,9%
Límite de detección	$3,33 \times 10^1$ UFC/mL	$1,46 \times 10^1$ UFC/mL	$2,39 \times 10^1$ UFC/mL	$2,39 \times 10^1$ UFC/mL	$2,39 \times 10^1$ UFC/mL

TABLA 5. Datos de media, desviación estándar, prevalencia y límite de detección para cada bacteria

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el estudio revelan unos valores de prevalencia altos de las bacterias estudiadas, encontradas en cantidades muy reducidas en una muestra de sujetos con gingivitis. Estos resultados se deben a la utilización de la PCR cuantitativa, una técnica mucho más sensible y por tanto con unos límites de detección mucho más reducidos para cada bacteria que las técnicas tradicionales de cultivo.

Los estudios existentes sobre el perfil microbiológico de la gingivitis concluyen, a grandes rasgos, que la presencia de bacterias como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Tanarella forsythia* es un indicador de estadios más avanzados de la enfermedad, y que no son bacterias que comúnmente encontremos en gingivitis. Pero en los últimos años, la utilización de técnicas más sensibles, es decir, con capacidad de detectar cantidades mínimas de microorganismos, está cambiando todos los paradigmas en este sentido puesto que, como revelan los resultados de este estudio, estas bacterias sí que se encuentran presentes en la placa de pacientes con gingivitis, pero en cantidades muy reducidas que nunca hubieran sido detectables mediante las técnicas tradicionales. Esta teoría fue enunciada por primera vez por Marsh et al en 1994 como “teoría ecológica de la placa” y sostiene que los organismos asociados con la enfermedad pueden estar presentes también en los sitios sanos, pero en niveles tan bajos, que no son clínicamente relevantes. La enfermedad es el resultado de los cambios ocurridos en el balance de la microflora que reside en la placa, como consecuencia de la modificación de las condiciones medioambientales locales (55). Los resultados de este estudio señalan que las bacterias estudiadas se encuentran en la mayoría de sujetos con gingivitis.

El clásico estudio de gingivitis experimental de Loesche utilizó el cultivo para hacer un análisis descriptivo de la microbiología de la gingivitis (20). De las bacterias incluidas en el presente estudio, la única presente en el estudio de Loesche fue *Fusobacterium nucleatum*, bacteria de la cual se conoce su importante función de coagregar otras bacterias en los estadios iniciales de la formación de placa, y que sirve como puente entre las bacterias iniciales Gram positivas y las Gram negativas características de la placa madura. Los resultados en las demás bacterias se deben a la dificultad de cultivarlas cuando se encuentran en cantidades muy bajas, como parece ocurrir en individuos con gingivitis. Resultados similares se obtuvieron de *Fusobacterium*

nucleatum en el estudio de Moore (22), además de una detección de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* de un 0,03%.

Actualmente la qPCR parece la técnica con resultados mas prometedores a largo plazo tanto para ampliar nuestro conocimiento de la microflora oral como para finalidades diagnósticas. Pero dadas las limitaciones mencionadas (no permite detectar bacterias nuevas por casualidad, sino únicamente aquellas que se pretenden encontrar), conviene tener en cuenta otras técnicas de estudio que están siendo utilizadas en estudios de periodontitis desde hace tiempo, y que conviene tener en cuenta como la *fluorization in situ hybridation* (56), técnicas inmunohistoquímicas (57) o pirosecuenciación (58-60). Estas técnicas continúan evolucionando, y presentan cada vez resultados más aceptables.

La qPCR permite una cuantificación exacta de la población bacteriana seleccionada, mientras que la PCR cualitativa únicamente ofrece datos de prevalencia. La literatura descriptiva de la microbiología de la gingivitis por PCR es escasa. Por ello, los datos deben ser extraídos de valores basales de otros estudios que tenían otras finalidades, como por ejemplo evaluar efectos de tratamiento, o sucesiones bacteriológicas. En la TABLA 6 se representan los datos de prevalencia obtenidos para cada bacteria en diferentes estudios, todos ellos obtenidos de muestras analizadas por PCR.

	<i>A.actinomycetemcomitans</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>T.forsythia</i>	<i>F. nucleatum</i>	<i>C. rectus</i>
Resultados	50,8%	89,8%	96,6%	100%	94,9%
<i>Ashimoto 1996</i>	14%	10%	18%	NE	52%
<i>Birsan 2005</i>	16%	ND	50%	NE	NE
<i>Igig 2012</i>	14%	17%	3%	NE	NE
<i>Scapoli 2015</i>	9%	34%	52%	86%	67%
<i>Marin 2016</i>	ND	10%	ND	90%	20%

TABLA 6. Datos prevalencia de las bacterias obtenidos por PCR en el actual y los diferentes estudios incluidos

ND: No detectado.

NE: No estudiado.

El estudio de Ashimoto en 1996, realizó un análisis descriptivo de la población bacteriana mediante PCR cualitativa con sondas para *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), *Bacteroides forsythus* (*Tannerella forsythia*), *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia*, para individuos adultos con periodontitis, adultos con gingivitis, y niños con gingivitis. En el grupo de adultos con gingivitis los datos de prevalencia obtenidos fueron del 14% en *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, 18% *Tannerella forsythia*, 52% *Campylobacter rectus*, y 10% *Porphyromonas gingivalis* (61). En el grupo de pacientes adultos con periodontitis estos datos de prevalencia aumentan, como es evidente, puesto que el número de bacterias de este tipo tiende a crecer, y se hace mucho mas detectable mediante técnicas tanto moleculares como de cultivo. Mediante la qPCR podemos, por tanto, no solo determinar la prevalencia, sino asociar este aumento de prevalencia al incremento del número de bacterias presentes en las muestras.

Birsan et al en 2015, analizaron por PCR muestras de sujetos con diferentes características. En el grupo de individuos con gingivitis la detección de microorganismos periodontopatógenos fue del 50% para *Tannerella forsythia* y 16% para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Porphyromonas gingivalis* no fue detectado en individuos con gingivitis (47). El tamaño muestral en este caso fue reducido (n=14).

Igic et al 2012 estudió en adolescentes con gingivitis la presencia de bacterias periodontopatógenas antes y después del tratamiento básico. Los valores basales muestran una prevalencia de *Porphyromonas gingivalis* 17%, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 14% *Tannerella forsythia* 3% (62). Masunaga et al 2010, de la misma manera evalúa la microflora bacteriana en individuos de distintas características. Este estudio solo ofrece valores absolutos de detección de bacterias obtenidas de diferentes maneras (fluido crevicular gingival, enjuagues y saliva). Observando los datos obtenidos de las muestras de fluido crevicular gingival de los sujetos con gingivitis, como en el presente estudio, se obtuvieron valores de bacterias totales de 10^3 para *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia* (63). Estos datos son ligeramente menores que los obtenidos en el presente estudio.

Un estudio de Scapoli en 2015, realiza un análisis descriptivo por qPCR muy similar al actual estudio en 539 individuos con periodontitis o gingivitis. Obtiene unos datos de prevalencia en gingivitis que se incluyen en la TABLA 6 junto con el resto de resultados mencionados, y concluye que bacterias como *Tannerella forsythia* se pueden encontrar en cualquier estadio de la enfermedad, mientras que hay otras bacterias mas propias de la periodontitis como *Porphyromonas gingivalis* o con gingivitis como *Campylobacter rectus* (64).

Marin et al 2016, en un estudio que se realizó con el fin de evaluar la bacteremia producida tras el cepillado mediante diferentes técnicas, presenta una tabla con valores basales de muestras subgingivales obtenidas de pacientes con gingivitis. *Porphyromonas gingivalis* se detectó en el 10%, *Fusobacterium nucleatum*, en un 90% y *Campylobacter rectus* en un 20% de los casos (65).

Existen en los últimos años una serie de estudios comparando las técnicas tradicionales con la PCR a fin de determinar las ventajas reales de la PCR con respecto al cultivo. Estos estudios presentan una enorme heterogeneidad en cuanto a los resultados, que puede deberse a diferencias en la metodología, selección de pacientes, diferentes serotipos bacterianos, o diferencias geográficas (30), además de que la mayoría de ellos evalúan las diferencias entre ambas técnicas en pacientes con periodontitis, y no con gingivitis.

Se comparó en 2004 la técnica de cultivo y PCR para la detección de *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Tanerella forsythia* en individuos sanos, con gingivitis y con periodontitis. Se obtuvieron importantes diferencias en la detección de estos patógenos utilizando una técnica u otra en los individuos con gingivitis. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, fue la menos encontrada en todos los casos, pero se comprobó que *Porphyromonas gingivalis* era significativamente mayor en pacientes con gingivitis, y todavía más en pacientes con periodontitis. En cuanto a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en un 6,7% de los individuos por cultivo, y 3,3% por PCR, con una media de $8,5 \times 10^1$ y $1,4 \times 10^2$ respectivamente. *Porphyromonas gingivalis* por el contrario fue detectada en un 40% de los casos con gingivitis mediante cultivo, y un 30% mediante PCR, con valores medios de $2,9 \times 10^4$ y $1,4 \times 10^4$ respectivamente. Estas diferencias fueron todavía mayores en los casos de pacientes con periodontitis, concluyendo que existe una buena asociación entre las dos técnicas, y que la PCR tiene importantes ventajas con respecto al cultivo (30).

Otro de estos estudios comparativos, Kotsilkov et al en 2015, evaluó las diferencias de detección entre el cultivo y la qPCR, en este caso, en pacientes con bolsas periodontales profundas. Obtuvieron como resultados grandes diferencias entre el uso de una técnica y otra. Centrándonos en las bacterias analizadas en el presente estudio, obtuvieron en cuanto a *Porphyromonas gingivalis*, un 33% de prevalencia por cultivo y un 93,33% por qPCR, en *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, un 0% en cultivo y un 30% en qPCR. En cuanto a *Fusobacterium nucleatum* un 0% frente a un 76,67%, *Tanerella forsythia* 43,33% frente a 100% con qPCR (66). En este estudio se observa claramente las diferencias en cuanto a la sensibilidad de una técnica y otra, y aunque sus resultados no nos aporten información sobre la microflora bacteriana en pacientes con gingivitis, sí que colabora a aumentar las dudas sobre si la flora bacteriana en gingivitis presenta pequeñas cantidades de bacterias de este tipo nunca detectadas previamente, como confirman los resultados que se presentan en este estudio.

En la TABLA 7 se reflejan las diferencias de prevalencia obtenidas en estos dos estudios para las diferentes bacterias utilizando una técnica u otra.

Se realizó una comparación para la detección de *Porphyromonas gingivalis* que muestra claras ventajas en cuanto a la velocidad y sensibilidad en la detección (54). Además de otro estudio en el 2006 de este mismo autor demostrando la eficacia en la detección de patógenos periodontales en muestras de enjuague bucal de individuos con periodontitis (67).

	<i>A.actinomycetemcomitans</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>F. nucleatum</i>
Cultivo	0-6,7%	33%-40	0
PCR	3,3-30%	30-93,33	76,67%

TABLA 7. Comparación de prevalencia de *A.actinomycetemcomitans* , *P. gingivalis* y *F. nucleatum* utilizando cultivo y PCR

Un metaanálisis realizado con el fin de evaluar la precisión diagnóstica de la PCR y el cultivo microbiológico en la detección de patógenos periodontales, principalmente *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (68). Solo se incluyeron publicaciones en las que los individuos tuvieran periodontitis, por lo que no podemos comparar los resultados, pero si reiterar en la demostrada mayor sensibilidad en la detección de estos patógenos con respecto a las técnicas de cultivo, una mayor rapidez, precisión, y detección cuantitativa.

Lyons et al en el año 2000 publicaron un estudio que evaluaba la presencia de *Porphyromonas gingivalis* comparando sujetos sanos con sujetos con periodontitis. Aunque este estudio no incluyera sujetos con gingivitis, es interesante que utilizando la qPCR, se detectaba *Porphyromonas gingivalis* también en individuos sanos aunque evidentemente en mucha menor cantidad, y en una proporción mucho menor con respecto al total de bacterias, que en los pacientes enfermos (41). Un estudio similar, detecta una prevalencia del 70% de *Aggregatibacter*

actinmycetemcomitans, 30% de *Tannerella forsythia*, 66% de *Porphyromonas gingivalis*, y 92% de *Fusobacterium nucleatum* en individuos sanos (69). Braga et al en 2010 encontraron también altos niveles de periodontopatógenos en individuos sanos, en este estudio, todos mujeres. Obtuvieron una prevalencia del 46% para *Porphyromonas gingivalis* en sujetos sanos (70).

Los resultados de los estudios realizados en los últimos años confirman cada vez más las ventajas de la qPCR con respecto a otras técnicas, especialmente la velocidad, la alta sensibilidad, y la capacidad de cuantificar el número de bacterias de una manera precisa. De todas formas es importante no despreciar otras técnicas como la técnica de cultivo, que cubre algunas limitaciones de las técnicas moleculares, como la posibilidad de detectar nuevas bacterias ajustando las condiciones de los medios de cultivo. Los resultados de este estudio confirman que las bacterias que clásicamente se han asociado a periodontitis, también se presentan en sujetos con gingivitis, lo cual podría ser explicado como que una mayor sensibilidad en la técnica de detección permite hallar cantidades mínimas de microorganismos, que aumentan su concentración cuando se desarrolla la enfermedad.

Limitaciones del estudio

Los estudios descriptivos de la flora bacteriana en individuos con gingivitis mediante qPCR son escasos. Muchos de los resultados analizados corresponden a datos basales de estudios con muy diversos objetivos, de manera que los resultados de este estudio son difícilmente comparables cuando las metodologías han sido muy diferentes.

Una de las limitaciones intrínsecas de la técnica utilizada es que no permite determinar el porcentaje de la flora total que corresponde a cada bacteria, puesto que dichas bacterias se analizan aisladas por separado. De la misma manera no permite hallazgos casuales de nuevas bacterias, o de bacterias que no se pretendan encontrar puesto que requiere de primers específicos para la detección de cada bacteria. Estas limitaciones sugieren tener en cuenta la existencia de muchas otras técnicas de análisis microbiológico que se pueden utilizar para aumentar el conocimiento de la flora bacteriana de la gingivitis.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos y teniendo en cuenta las limitaciones del estudio, se puede concluir que las bacterias *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia* y *Campylobacter rectus* son encontradas en la mayoría de individuos con gingivitis,

La alta sensibilidad de la qPCR permite cuantificar la cantidad de bacterias y detectarlas en muy bajas concentraciones, de una manera fiable y rápida, lo cual justifica su utilización para el diagnóstico y para el desarrollo de mas estudios para aumentar el conocimiento de la microflora de las enfermedades periodontales.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. Lancet 2005 11/19;366(9499):1809-1820.
- (2) Papapanou PN. The prevalence of periodontitis in the US: forget what you were told. J Dent Res 2012 10;91(10):907-908.
- (3) Kassebaum NJ, Bernabe E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. J Dent Res 2014 Nov;93(11):1045-1053.
- (4) Petersen PE, Ogawa H. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. Periodontol 2000 2012 Oct;60(1):15-39.
- (5) Heitz-Mayfield LJ, Schatzle M, Loe H, Burgin W, Anerud A, Boysen H, et al. Clinical course of chronic periodontitis. II. Incidence, characteristics and time of occurrence of the initial periodontal lesion. J Clin Periodontol 2003 Oct;30(10):902-908.
- (6) Schatzle M, Loe H, Burgin W, Anerud A, Boysen H, Lang NP. Clinical course of chronic periodontitis. I. Role of gingivitis. J Clin Periodontol 2003 Oct;30(10):887-901.
- (7) Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJL, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. J Dent Res 2014 11;93(11):1045-1053.
- (8) Carasol M, Llodra JC, Fernández-Meseguer A, Bravo M, García-Margallo MT, Calvo-Bonacho E, et al. Periodontal conditions among employed adults in Spain. J Clin Periodontol 2016 03/30.
- (9) Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Northwest Dent 2000 11/20;79(6):31-35.

- (10) Goldman HM. Periodontal disease. Part I: A review of the histopathology of the disease. *Compend Contin Educ Dent* 1986 Jan;7(1):12, 14, 16 passim.
- (11) Ciancio SC. Chemotherapeutic agents and periodontal therapy. Their impact on clinical practice. *J Periodontol* 1986 02;57(2):108-111.
- (12) Greenstein G. The role of bleeding upon probing in the diagnosis of periodontal disease. A literature review. *J Periodontol* 1984 12;55(12):684-688.
- (13) Wei SH, Lang KP. Periodontal epidemiological indices for children and adolescents: I. Gingival and periodontal health assessments. *Pediatr Dent* 1981 12;3(4):353-360.
- (14) Løe H, Silness J. Periodontal Disease in Pregnancy. I. Prevalence and Severity. *Acta Odontol Scand* 1963 12;21:533-551.
- (15) Klukowska M, Goyal CR, Khambe D, Cannon M, Miner M, Gurich N, et al. Response of chronic gingivitis to hygiene therapy and experimental gingivitis. Clinical, microbiological and metabonomic changes. *Am J Dent* 2015 10;28(5):273-284.
- (16) Davis IJ, Wallis C, Deusch O, Colyer A, Milella L, Loman N, et al. A cross-sectional survey of bacterial species in plaque from client owned dogs with healthy gingiva, gingivitis or mild periodontitis. *PLoS One* 2013 12/13;8(12):e83158-e83158.
- (17) Smith M, Seymour GJ, Cullinan MP. Histopathological features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000 2010 06;53:45-54.
- (18) Petersen PE, Ogawa H. Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. *J Periodontol* 2005 Dec;76(12):2187-2193.
- (19) Løe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental Gingivitis in Man. *J Periodontol* 1965 05/19;36:177-187..
- (20) Loesche WJ, Syed SA (1978) Bacteriology of human experimental gingivitis: effect of plaque and gingivitis score. *Infect Immun* 21: 830–839.
- (21) Moore WE, Holdeman LV, Smibert RM, Good IJ, Burmeister JA, et al. (1982) Bacteriology of experimental gingivitis in young adult humans. *Infect Immun* 38: 651–667. Zee KY,

Samaranayake LP, Attstrom R, Davies WI (1996) Predominant cultivable microflora of supragingival dental plaque in Chinese individuals. *Arch Oral Biol* 41: 647–653.

(22) Zee KY, Samaranayake LP, Attstrom R, Davies WI (1996) Predominant cultivable microflora of supragingival dental plaque in Chinese individuals. *Arch Oral Biol* 41: 647–653.

(23) Caton, FA. *Periodontal Diagnosis and Diagnosis Aids*. Workshop 1989. Pag 1-11

(24) Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002 04;15(2):167-193.

(25) Doungudomdacha S, Rawlinson A, Douglas CW. Enumeration of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque samples by a quantitative-competitive PCR method. *J Med Microbiol* 2000 10;49(10):861-874.

(26) Griffen AL, Becker MR, Lyons SR, Moeschberger ML, Leys EJ. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status. *J Clin Microbiol* 1998 11;36(11):3239-3242.

(27) Loomer PM. Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 2004;34:49-56.

(28) Sakamoto M, Takeuchi Y, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. Rapid detection and quantification of five periodontopathic bacteria by real-time PCR. *Microbiol Immunol* 2001;45(1):39-44

(29) Chen C, Slots J. Microbiological tests for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000 1999 06;20:53-64.

(30) Lau L, Sanz M, Herrera D, Morillo JM, Martín C, Silva A. Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 2004 12;31(12):1061-1069.

- (31) Tanner ACR. Anaerobic culture to detect periodontal and caries pathogens. *J Oral Biosci* 2015 02;57(1):18-26.
- (32) Sheiham A, Netuveli GS. Periodontal diseases in Europe. *Periodontol 2000* 2002;29:104-121.
- (33) Jervøe-Storm P, Koltzsch M, Falk W, Dörfler A, Jepsen S. Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 2005 07;32(7):778-783.
- (34) Alpagot T, Wolff LF, Smith QT, Tran SD. Risk indicators for periodontal disease in a racially diverse urban population. *J Clin Periodontol* 1996 11;23(11):982-988.
- (35) Melvin WL, Assad DA, Miller GA, Gher ME, Simonson L, York AK. Comparison of DNA probe and ELISA microbial analysis methods and their association with adult periodontitis. *J Periodontol* 1994 06;65(6):576-582.
- (36) Veal DA, Deere D, Ferrari B, Piper J, Attfield PV. Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *J Immunol Methods* 2000 09/21;243(1-2):191-210.
- (37) Haffajee AD, Cugini MA, Tanner A, Pollack RP, Smith C, Kent RL, J., et al. Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *J Clin Periodontol* 1998 05;25(5):346-353.
- (38) Schlegel-Bregenzler B, Persson RE, Lukehart S, Braham P, Oswald T, Persson GR. Clinical and microbiological findings in elderly subjects with gingivitis or periodontitis. *J Clin Periodontol* 1998 11;25(11):897-907.
- (39) Tanner A, Maiden MF, Macuch PJ, Murray LL, Kent RL, J. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J Clin Periodontol* 1998 02;25(2):85-98.
- (40) Asai Y, Jinno T, Igarashi H, Ohyama Y, Ogawa T. Detection and quantification of oral treponemes in subgingival plaque by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002 09;40(9):3334-3340.
- (41) Lyons SR, Griffen AL, Leys EJ. Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. *J Clin Microbiol* 2000 06;38(6):2362-2365.

- (42) Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* 2002 01;148:257-266.
- (43) Nonnenmacher C, Dalpke A, Rochon J, Flores-de-Jacoby L, Mutters R, Heeg K. Real-time polymerase chain reaction for detection and quantification of bacteria in periodontal patients. *J Periodontol* 2005 09;76(9):1542-1549.
- (44) Socransky SS, Smith C, Haffajee AD. Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2002 03;29(3):260-268.
- (45) Yano A, Kaneko N, Ida H, Yamaguchi T, Hanada N. Real-time PCR for quantification of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett* 2002 11/19;217(1):23-30.
- (46) Yoshida A, Suzuki N, Nakano Y, Oho T, Kawada M, Koga T. Development of a 5' fluorogenic nuclease-based real-time PCR assay for quantitative detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol* 2003 02;41(2):863-866.
- (47) Birsan I. Polymerase chain reaction as a prospect for the early diagnosis and prediction of periodontal diseases in adolescents. *Eur Arch Paediatr Dent* 2015 02;16(1):9-12.
- (48) Suzuki N, Yoshida A, Nakano Y. Quantitative analysis of multi-species oral biofilms by TaqMan Real-Time PCR. *Clin Med Res* 2005 08;3(3):176-185.
- (49) Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 08/15;88(16):7276-7280.
- (50) Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996 10;6(10):986-994.
- (51) Løe H, Sillness J. Periodontal disease in pregnancy. *Acta Odontol Scand* 1963;21
- (52) Loe, H. & Silness, J. Periodontal disease in pregnancy. Prevalence and severity. *Acta Odontologica Scandinavica* 1964 21, 533-551.

- (53) Van der Weijden, G. A., Timmerman Nijboer, A., Reijerse, E. & Van der Velden, U. Comparison of different approaches to assess bleeding on probing as indicators of gingivitis. *Journal of Clinical Periodontology* (1994a) 21, 589–594.
- (54) Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls C, Savelkoul PHM. Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *J Clin Microbiol* 2003 11;41(11):4950-4954.
- (55) Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 1994;8(2):263-71.
- (56) Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer, Robert J., Jr, et al. Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol* 2006 04;72(4):2837-2848.
- (57) Grossi SG, Genco RJ, Machtei EE, Ho AW, Koch G, Dunford R, et al. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontol* 1995 01;66(1):23-29.
- (58) Griffen AL, Beall CJ, Firestone ND, Gross EL, Difranco JM, Hardman JH, et al. CORE: a phylogenetically-curated 16S rDNA database of the core oral microbiome. *PLoS One* 2011 04/22;6(4):e19051-e19051.
- (59) Kistler JO, Booth V, Bradshaw DJ, Wade WG. Bacterial community development in experimental gingivitis. *PLoS One* 2013 08/14;8(8):e71227-e71227.
- (60) Keijser BJJ, Zaura E, Huse SM, van der Vossen J.M.B.M., Schuren FHJ, Montijn RC, et al. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res* 2008 11;87(11):1016-1020.
- (61) Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1996 08;11(4):266-273.
- (62) Igić M, Kesic L, Lekovic V, Apostolovic M, Mihailovic D, Kostadinovic L, et al. Chronic gingivitis: the prevalence of periodontopathogens and therapy efficiency. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012 08;31(8):1911-1915.

- (63) Masunaga H, Tsutae W, Oh H, Shinozuka N, Kishimoto N, Ogata Y. Use of quantitative PCR to evaluate methods of bacteria sampling in periodontal patients. *J Oral Sci* 2010 12;52(4):615-621.
- (64) Scapoli L, Girardi A, Palmieri A, Martinelli M, Cura F, Lauritano D, et al. Quantitative Analysis of Periodontal Pathogens in Periodontitis and Gingivitis. *J Biol Regul Homeost Agents* 2015 07/20;29(3):101-110.
- (65) Marín M, Figuero E, González I, O'Connor A, Diz P, Álvarez M, et al. Comparison of the detection of periodontal pathogens in bacteraemia after tooth brushing by culture and molecular techniques. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2016 05/01;21(3):e276-e284.
- (66) Kotsilkov K, Popova C, Boyanova L, Setchanova L, Mitov I. Comparison of culture method and real-time PCR for detection of putative periodontopathogenic bacteria in deep periodontal pockets, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2015 29:5, 996-1002
- (67) Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls C, Savelkoul PHM. The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol* 2006 06;33(6):427-433.
- (68) Atieh MA. Accuracy of real-time polymerase chain reaction versus anaerobic culture in detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: a meta-analysis. *J Periodontol* 2008 09;79(9):1620-1629.
- (69) Ávila-campos MJ. PCR detection of four periodontopathofens from subgingival clinical samples. *Brazilian Journal of Microbiology* 2003 34:81-84.
- (70) Braga RRR, Carvalho MAR, Bruña-Romero O, Teixeira RE, Costa JE, Mendes EN, et al. Quantification of five putative periodontal pathogens in female patients with and without

