

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



**TESIS DOCTORAL**

**Bacteriemias de origen periodontal:  
validación de técnicas microbiológicas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADO POR

**Nagore Ambrosio Elejalde**

Directores

**Elena Figuero Ruiz  
David Herrera González**

Madrid, 2020



# **Bacteriemias de origen periodontal: validación de técnicas microbiológicas**

**Nagore Ambrosio Elejalde**

**TESIS DOCTORAL**

**Directores:  
Elena Figuero Ruiz  
David Herrera González**



**Madrid, 2020**





U N I V E R S I D A D  
**COMPLUTENSE**  
M A D R I D

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS  
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. **Nagore Ambrosio Elejalde**, estudiante en el Programa de Doctorado **Ciencias Odontológicas**, de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

**“Bacteriemias de origen periodontal: validación de técnicas microbiológicas”**

y dirigida por: la Prof. **Elena Figuro Ruiz** y el prof. **David Herrera González**

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 29 de octubre de 2019

Fdo.: \_\_\_\_\_

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.



*A mis padres*



## **AGRADECIMIENTOS**

A lo largo de este camino echando la vista hacia atrás, siento que estos últimos años han representado una parte fundamental en mi vida. Por ello, me gustaría agradecer a todas las personas que me han ayudado durante este maravilloso proyecto a hacerme más grande, no sólo a nivel investigador y profesional, sino también a nivel personal.

En primer lugar, estoy y estaré eternamente agradecida con la Dra. Elena Figuro, cuyo interés y pasión por la investigación y el trabajo bien hecho, me han inspirado a lo largo de estos años. Gracias por tú paciencia depositada en mí y por brindarme tú apoyo, consejos y amistad infinita. Me siento afortunada de haber podido tenerte como directora de esta tesis y mucho más. Trabajar contigo es una experiencia de aprendizaje emocionante.

Al Dr. David Herrera, por su rigor de investigación y académico, porque sea uno de los “culpables” de que me apasione la periodoncia. Es de agradecer su trato cercano, por permitirme robar parte de su tiempo; pero sobre todo por confiar en mí para hacer este trabajo. Tienes todo mi cariño y respeto.

También me gustaría tener unas palabras de agradecimiento al Dr. Mariano Sanz, por incluirme en su grupo de investigación y dejarme formar parte de la “familia Periodoncia UCM”, del que tan orgullosa me siento. Es puro ejemplo de que el éxito sólo se alcanza con trabajo, esfuerzo y dedicación.

A María José Marín, porque sin su ayuda y apoyo inagotable no hubiera sido posible esta tesis. Porque cada día de enseñanza que me has dado ha sido muy valiosa. Trabajar codo con codo contigo es un gran placer. Gracias por tu generosidad.

A Pedro Diz y Maximiliano Álvarez, por la ayuda brindada en la elaboración de uno de los estudios de investigación de la presente tesis.

A los profesores del Master de Periodoncia, por compartir vuestros conocimientos. Gracias por instruir con excelencia y disposición; y por haber estimulado mi deseo de saber y aprender cada día más. Sois grandes profesionales y enormes personas.

Del Master también me llevo amistades que me han apoyado durante esta etapa y de las que espero perduren en el tiempo. Gracias a Benjamín S., Sofía C., Cristina L., Juan B., Alex C., María M., Blanca V.. Pero sin duda, no puedo no dedicarle unas palabras especiales de agradecimiento a mi promoción; una de las más internacionales donde las haya, que siendo cada uno tan diferentes hemos conseguido llevarnos tan bien, gracias a Honorato R., Fernando N., Myroslav S., y en especial a Ludovica F., que sin ti no hubiera sido lo mismo. Los buenos y los malos momentos vividos juntos nos han hecho más fuertes.

Quiero también dar las gracias a unas queridas compañeras que hicieron que los días del “Experto en Periodoncia” fuesen maravillosos y que, a día de hoy, siguen tendiéndome la mano y apoyándome con cariño. A Estefanía L., por co-autora de uno de los estudios, por tu alegría infinita y tu ayuda en el inicio de esta investigación; a Nerea S., porque me guiaste en mi primer trabajo de investigación y porque gracias a tí conocí a Elena; a Merche D. porque a día de hoy sigues confiando en mí para ayudarte; a María M. y Carmen A. que forman el tándem perfecto de esta piedra angular de 5.

También, quiero dar las gracias a la “pandilla”, Itziar G., Ana O., Leire V., Carmen R., María S. y Arancha L., por la ayuda que me habéis brindado y porque algunas de vosotras habéis sido consejeras y pilares fundamentales en estos años. Gracias por ser como sois.

A mis amigos de toda la vida y aquellos que conocí durante mi etapa universitaria, por ser mis confidentes y consejeros espirituales. Gracias a Irati; a mi familia “dientes” Jorge C., Marta M., Jezabel B., Marina L. y María G.; a mis Spínola Ana R., María F., Mar G., Cayetana H., Lorena L., Eva M. y Leticia R.. Sé que la amistad es uno de los mayores tesoros y aunque a veces no os he dedicado el tiempo suficiente, gracias por estar siempre, sobre todo cuando no os llamo.

También quiero agradecer la ayuda que me ha brindado la UCM a través de la concesión de *la beca predoctoral de investigación*.

Por último, y no por ello menos importante, gracias a mis padres, Félix y Esther, y a mi hermana Naiara. Motores de mi vida y que, aunque estemos desperdigados por el mapa y estemos lejos, yo siempre os siento muy cerca. Gracias por guiarme, por valorar mis inquietudes, por confiar en mí y dejarme volar. Estas líneas no son nada para todo lo que os debo. Gracias por ser extraordinarios, sin vosotros hoy no sería quien soy. Sois mis héroes.

A Fran, mi apoyo fundamental día a día. Gracias por acompañarme en este viaje y por haber comprendido -casi siempre- las ausencias y los momentos de pausa. Has sido el ingrediente perfecto y necesario para poder lograr que esta tesis viera la luz. Espero que sigamos disfrutando juntos de la infinidad de experiencias que nos depara la vida.

Gracias a todos de todo corazón por dejar huella en mí y en esta tesis doctoral.

- *“El que da, no debe volver a acordarse; pero el que recibe nunca debe olvidar”* -



## **PREFACIO**

La presente tesis doctoral está basada en los siguientes estudios publicados:

**Estudio 1:** Marín M.J., Ambrosio N., Virto L., Diz P., Álvarez M., Herrera D., Sanz M., Figuero E. Detection and quantification of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus oralis* in blood samples with different microbiological identification methods: An in vitro study. *Archives of Oral Biology*. 2017 Feb;74:55-62. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.11.007.

**Estudio 2:** Ambrosio N., Marín M.J., Laguna E., Herrera D., Sanz M., Figuero E. Detection and quantification of *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in bacteremia induced by interdental brushing in periodontally healthy and periodontitis patients. *Archives of Oral Biology*. 2019 Feb;98:213-219. doi: 10.1016/j.archoralbio. 2018.11.025.

**Estudio 3:** Marín M.J., Ambrosio N., Herrera D., Sanz M., Figuero E. Validation of a multiplex qPCR assay for the identification and quantification of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: In vitro and subgingival plaque samples. *Archives of Oral Biology*. 2018 Apr; 88:47-53. doi: 10.1016 / j.archoralbio. 2018.01.012.

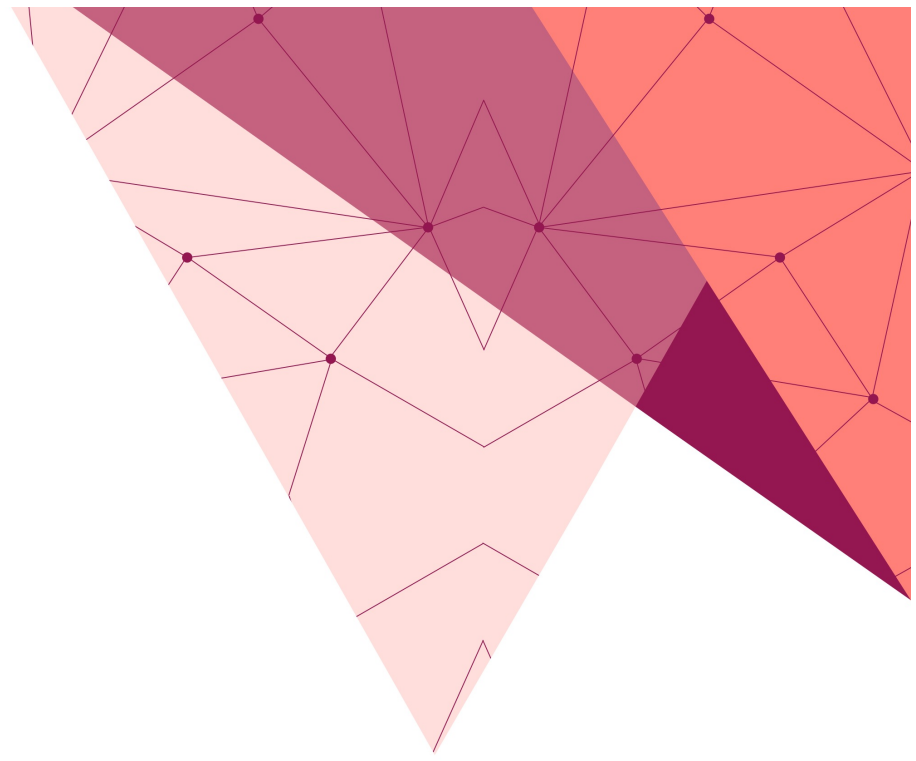
**Estudio 4:** Marín M.J., Ambrosio N., O'Connor A., Herrera D., Sanz M., Figuero E. Validation of a multiplex qPCR assay for detection and quantification of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in subgingival plaque samples. A comparison with anaerobic culture. *Archives of Oral Biology*. 2019 Jun;102:199-204. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.04.014.



# ÍNDICE

I. RESUMEN .....	17
1. Resumen.....	19
2. <i>Abstract</i> .....	21
II. INTRODUCCIÓN.....	23
1. Periodontitis, “la estrella de las enfermedades periodontales” .....	25
1.1. Definición y Clasificación .....	25
1.2. Prevalencia.....	26
1.3. Etiología: la periodontitis entendida como disbiosis .....	27
1.4. Importancia y consecuencias de la periodontitis .....	31
2. Periodontitis, "una enfermedad más allá del periodonto” .....	32
2.1. Medicina Periodontal.....	32
2.2. Estudios de bacteriemias de origen periodontal: ¿se pueden detectar bacterias patógenas periodontales en muestras de sangre?.....	38
3. Técnicas de análisis microbiológico .....	41
3.1. Técnicas basadas en cultivo .....	41
3.2. Técnicas de biología molecular: reacción en cadena de la polimerasa .....	45
III. JUSTIFICACIÓN.....	51
IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	55
V. MATERIAL Y MÉTODOS. RESULTADOS.....	61
Artículo #1 .....	65
Artículo #2.....	77
Artículo #3.....	89
Artículo #4.....	101
VI. DISCUSIÓN.....	111
1. Importancia de la validación de una técnica microbiológica.....	113
2. Validación de los métodos para la detección de bacterias patógenas periodontales en muestras de sangre.....	115

3. Validación de las técnicas moleculares para la detección y cuantificación de bacterias patógenas periodontales en muestras subgingivales .....	117
4. ¿Un antes y un después de los estudios de bacteriemias de origen periodontal?	120
5. Limitaciones, puntos fuertes e implicaciones.....	121
<b>VII. CONCLUSIONES</b> .....	123
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	127



# **I. RESUMEN**



## 1. RESUMEN

### **“Bacteriemias de origen periodontal: validación de técnicas microbiológicas”**

**Antecedentes:** El paso de bacterias a sangre (bacteriemias) se ha postulado como uno de los posibles mecanismos responsables de la relación entre la periodontitis y ciertas enfermedades sistémicas. Sin embargo, los estudios publicados han encontrado resultados contradictorios en cuanto a datos de prevalencia y, además, son pocos los que detectan bacterias de origen periodontal. Esto puede ser debido a que se han empleado diferentes técnicas, pero ninguna de ellas ha sido validada para la detección de estas bacterias específicamente. Además, pocos son los estudios que buscan bacteriemia de origen periodontal que, a su vez, analicen y correlacionen los datos obtenidos en las muestras de sangre con los obtenidos en muestras subgingivales. Por otro lado, se ha demostrado que la acumulación del biofilm y la inflamación gingival aumentan la prevalencia de bacteriemias tras manipulaciones bucodentales profesionales y no profesionales, lo que podría justificar el análisis de esas bacterias a nivel subgingival en estos pacientes.

**Objetivos:** Validar y comparar los resultados obtenidos con diferentes técnicas microbiológicas para la detección de patógenos clave en muestras de sangre (Estudios 1 y 2) y en muestras subgingivales (Estudios 3 y 4) para el estudio de bacteriemias de origen periodontal.

**Material y métodos:** *Estudios 1 y 2:* Se obtuvieron muestras de sangre de voluntarios periodontalmente sanos que fueron contaminadas *in vitro* con concentraciones definidas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus oralis*. Las muestras fueron analizadas por cuatro técnicas diferentes: tres técnicas de cultivo [cultivo anaerobio directo (CAD), hemocultivo BACTEC® y lisis centrifugación] y una técnica de biología molecular [reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR)]. Las dos técnicas con mejores resultados fueron utilizadas en un estudio *in vivo* donde se analizaron muestras de sangre de pacientes periodontalmente sanos, y pacientes con periodontitis antes y 1 minuto después del cepillado interdental, aplicado profesionalmente. También se recogieron muestras subgingivales.

*Estudios 3 y 4:* Estudios *in vitro* e *in vivo*. Para el estudio *in vitro* se prepararon

combinaciones de ADN de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* en concentraciones similares o diferentes. Para el estudio *in vivo* se utilizaron las muestras subgingivales, procedentes del Estudio 2. Las muestras fueron procesadas en paralelo por qPCR sencilla y qPCR múltiple, dirigidas a *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*. Por otro lado, se obtuvieron, además, muestras subgingivales de pacientes con diferentes diagnósticos periodontales y en diferentes fases de tratamiento periodontal, y fueron procesadas en paralelo por CAD y por qPCR múltiple dirigido a la detección y cuantificación simultáneas de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *Tannerella forsythia*.

**Resultados:** Estudio 1 y 2: CAD y qPCR fueron las dos técnicas más apropiadas para la detección de bacterias patógenas periodontales *in vitro* en la sangre. El hemocultivo BACTEC® no fue capaz de detectar dichas bacterias. Además, *in vivo* qPCR fue capaz de detectar tanto *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* en dos pacientes con periodontitis. Estudios 3 y 4: La técnica de qPCR múltiple fue capaz de cuantificar simultáneamente las bacterias patógenas periodontales. Además, en comparación con el CAD, mostró un alto grado de sensibilidad en la cuantificación simultánea de los tres patógenos periodontales.

**Conclusiones:** Los resultados de esta serie de estudios demuestran que la detección de patógenos periodontales, tanto en muestras de sangre como en muestras subgingivales, requiere de procesamiento y técnicas validadas para su identificación y cuantificación. Parece que las técnicas utilizadas en microbiología periodontal, tales como el CAD o la qPCR, son las técnicas de elección en aquellos estudios en los que se quiera evaluar el paso de patógenos periodontales al torrente sanguíneo.

## 2. ABSTRACT

### “Bacteremia of periodontal origin: validation of microbiological techniques”

**Background:** The entrance of periodontal pathogens into the blood circulation (bacteremia) has been postulated as one of the potential mechanisms responsible for the relationship between periodontitis and certain systemic diseases. However, published studies have found conflicting results in terms of prevalence, with very low detection rates of periodontal pathogens. This may be due to difference in techniques as none of them has been specifically validated for the detection of periodontal pathogens. In addition, not many studies have analyzed and correlated the data obtained in blood samples with those obtained in subgingival samples. Furthermore, biofilm accumulation and gingival inflammation have been shown to increase the prevalence of bacteremia after professional and non-professional oral manipulations, which could justify the analysis of these periodontal pathogens in patients suffering from bacteremia.

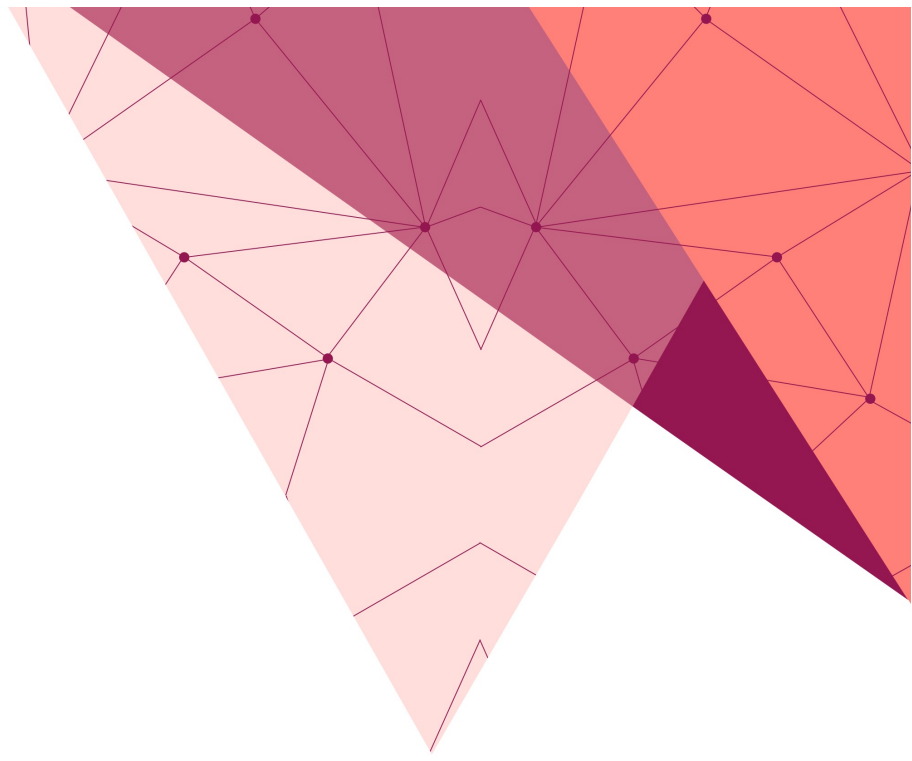
**Aim:** To validate and compare the results obtained with different microbiological techniques for the detection of periodontal pathogens in blood samples (Studies 1 and 2) and in subgingival samples (Studies 3 and 4) for the evaluation of bacteremia of periodontal origin.

**Material and methods:** Studies 1 and 2: In *in vitro* study, blood samples from periodontally healthy subjects were obtained and contaminated with defined concentrations of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus oralis*. The samples were analyzed by four different techniques: direct anaerobic culture (DAC), hemoculture BACTEC®, lysis centrifugation and quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The two techniques with the best results were used in an *in vivo* study in which blood samples from periodontally healthy patients and patients with periodontitis were analyzed before and 1 minute after professionally administered interdental brushing. Subgingival plaque samples were also collected. Studies 3 and 4: *In vitro* and *in vivo* studies. For the *in vitro* study, DNA combinations of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* were prepared in similar or different concentrations. For the *in vivo* study, subgingival plaque samples were collected, from Study 2. Both *in vitro* and *in vivo* samples were processed in parallel by simple qPCR and multiplex qPCR,

directed to both periodontal pathogens. On the other hand, subgingival plaque samples were obtained from patients with different periodontal diagnoses and at different stages of periodontal treatment and were processed in parallel by DAC and by multiplex qPCR directed to the simultaneous detection and quantification of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *Tannerella forsythia*.

**Results:** *Study 1 and 2:* DAC and qPCR were the two most appropriate techniques for the detection of periodontal bacteria in *in vitro* blood samples. The BACTEC® blood culture was not able to detect these bacteria. In addition, *in vivo* qPCR was able to detect both *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* in two patients with periodontitis after interdental brushing. *Studies 3 and 4:* The multiplex qPCR technique was able to quantify periodontal bacteria simultaneously. In addition, compared to the culture (DAC), it showed a high degree of sensitivity in the simultaneous quantification of the three periodontal pathogens.

**Conclusions:** The results of these series of studies show that the detection of periodontal bacteria both in blood samples and in subgingival samples requires adequate and validated techniques for their identification and quantification. It seems that the techniques used in periodontal microbiology, such as culture or qPCR, are the techniques of choice when trying to assess the entrance of periodontal pathogens into the bloodstream.



## **II. INTRODUCCIÓN**



# **1. Periodontitis, “la estrella de las enfermedades periodontales”**

## **1.1. Definición y Clasificación**

Las enfermedades periodontales engloban un grupo de enfermedades de carácter infeccioso e inflamatorio que afectan a los tejidos que rodean y soportan los dientes (periodonto) (Sanz y cols., 2011). Dentro de las enfermedades periodontales se destacaría como una de las más relevantes la periodontitis.

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria multifactorial crónica desencadenada por una disbiosis entre la microbiota subgingival y el sistema inmune del huésped. Se caracteriza por la pérdida de soporte del tejido periodontal (ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar), que se manifiesta por la pérdida de inserción clínica y la pérdida ósea alveolar evaluada radiográficamente, presencia de bolsas periodontales y sangrado gingival (Papapanou y cols., 2018). Entre las características clínicas de la periodontitis se encuentran: alteración en el color, textura y volumen gingival, aumento de la profundidad de sondaje, sangrado al sondaje, pérdida de inserción clínica, recesión gingival, pérdida ósea, movilidad dental aumentada, pérdida dental, retención de alimentos, halitosis e hipersensibilidad dentinaria.

Desde 1920 se han propuesto diferentes clasificaciones en relación a esta enfermedad. Hasta hace poco, se ha estado utilizando la clasificación de 1999 propuesta por la Academia Americana de Periodoncia. Esta clasificación ha sido utilizada ampliamente durante los últimos 20 años tanto en la práctica clínica como en la investigación en periodoncia. Sin embargo, en esta clasificación se han detectado varias deficiencias importantes, tales como la superposición y falta de una clara definición y diferenciación con base patobiológica entre las diferentes categorías de periodontitis descritas (Caton y cols., 2018). Por ello, en 2017, tras un *Workshop* organizado entre la Federación Europea de Periodoncia y la Academia Americana de Periodoncia, se desarrolló una nueva clasificación. Se eliminó el término de periodontitis crónica y/o agresiva, considerando la periodontitis como una única enfermedad (Tabla 1), a excepción de la periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas (Papapanou y cols., 2018).

<b>Clasificación de 1999</b>	<b>Clasificación 2017</b>
<p style="text-align: center;"><b><u>Periodontitis</u></b></p> <p>Dos tipos:</p> <p><b>1. Crónica</b>            Severidad: basado en PIC.            - <i>Leve: 1 a 2 mm de PIC</i>            - <i>Moderada: 3 a 4 mm de PIC</i>            - <i>Severa: <math>\geq 5</math> mm de PIC</i></p> <p>Extensión: basado en el total de localizaciones afectadas.            - <i>Localizada: <math>\leq 30\%</math></i>            - <i>Generalizada: <math>&gt;30\%</math></i></p> <p><b>2. Agresiva</b>            Clasificada en 2 tipos:  <i>Localizada:</i>            - Inicio circumpubertal.            - PIC en primeros molares e incisivos o al menos 2 dientes permanentes uno de los cuales es el primero molar.  <i>Generalizada:</i>            - Pacientes menores de 30 años.            - PIC generalizada, al menos 3 dientes permanentes diferentes de los molares e incisivos.</p>	<p style="text-align: center;"><b><u>Periodontitis</u></b></p> <p>Como única entidad:</p> <p><b>Estadio:</b> basado en la severidad (PIC en el sitio de mayor pérdida/ pérdida ósea radiográfica, número de pérdida de dientes) y complejidad de manejo.            - <i>Estadio 1: PIC 1 a 2 mm, pérdida ósea <math>&lt;15\%</math>, sin pérdida de dientes por periodontitis.</i>            - <i>Estadio 2: PIC 3 a 4 mm, pérdida ósea <math>15\%-30\%</math>, sin pérdida de dientes por periodontitis.</i>            - <i>Estadio 3: PIC <math>\geq 5</math> mm, pérdida ósea <math>&gt;30\%</math>, pérdida de <math>\leq 4</math> dientes por periodontitis.</i>            - <i>Estadio 4: PIC <math>\geq 5</math> mm, pérdida ósea <math>&gt;30\%</math>, pérdida de <math>\geq 5</math> dientes por periodontitis.</i></p> <p><b>Extensión:</b> localizada (<math>\leq 30\%</math> de las localizaciones), generalizada (<math>&gt;30\%</math> de las localizaciones), molar-incisivos.</p> <p><b>Grados:</b> evidencia de riesgo.            - <i>Grado A: velocidad lenta de progresión</i>            - <i>Grado B: velocidad media de progresión</i>            - <i>Grado C: velocidad rápida de progresión</i></p>

Tabla 1. Diferencias entre las clasificaciones de periodontitis propuestas de 1999 y 2017. (Armitage, 1999, Papapanou y cols., 2018). *PIC: pérdida de inserción clínica.*

## 1.2. Prevalencia

La periodontitis ha sido considerada la sexta enfermedad no contagiosa más frecuente (Kassebaum y cols., 2014). A nivel de la población mundial, la prevalencia de periodontitis en sus estadios más avanzados (severa) está afectando a alrededor del 10-15% de la población mundial. Además, pueden aparecer formas menos avanzadas (leves y moderadas) de periodontitis en aproximadamente el 20% hasta incluso el 40%

de la población (Marcenes y cols., 2013). Sin embargo, hay que considerar que la prevalencia de la periodontitis reportada en la comunidad científica puede diferir según la localización geográfica. Además, las diferencias en la metodología y en la definición de periodontitis de cada estudio, junto con la falta de un criterio uniforme de definición de periodontitis en los estudios epidemiológicos, reduce la validez de poder comparar algunos estudios observacionales entre sí.

En España, según la Encuesta Nacional de Salud Oral de 2015, cerca del 40% de las personas entre 65-74 años tendría lesiones evidentes de periodontitis, teniendo un 10% de ellos signos de periodontitis en estadios más avanzados. En el grupo etario entre 35-44 años, un 18% presentaría periodontitis en estadios moderados, siendo un 5% estadios severos (Bravo y cols., 2016). Por otro lado, en el estudio llevado a cabo en una población trabajadora de España en 2016, se observó que un 38.4% de la población padecía periodontitis, sobre todo en sujetos mayores de 45 años, de los cuales el 7.7% se podía asociar con una periodontitis en estadios más avanzados (Carasol y cols., 2016).

En Estados Unidos, aproximadamente el 47% de los adultos (aproximadamente 65 millones de adultos) tienen periodontitis: 30% con periodontitis moderada, 8.5% con periodontitis severa y 8.7% con periodontitis leve (Billings y cols., 2018).

### **1.3. Etiología: la periodontitis entendida como disbiosis**

La etiología de la periodontitis es multifactorial (Figura 1). A pesar de que se requiere de un huésped susceptible para poner en marcha la reacción inflamatoria crónica que origina la destrucción periodontal, las bacterias presentes en el biofilm subgingival son consideradas el agente etiológico clave en el inicio y posterior desarrollo de esta enfermedad. Por lo tanto, mientras que los procesos de destrucción irreversible de los tejidos blandos del periodonto y las estructuras de soporte óseo de los dientes se producen a través de mecanismos mediados por el huésped, estos dependen de la estimulación por un desafío bacteriano (Sanz y cols., 2011).

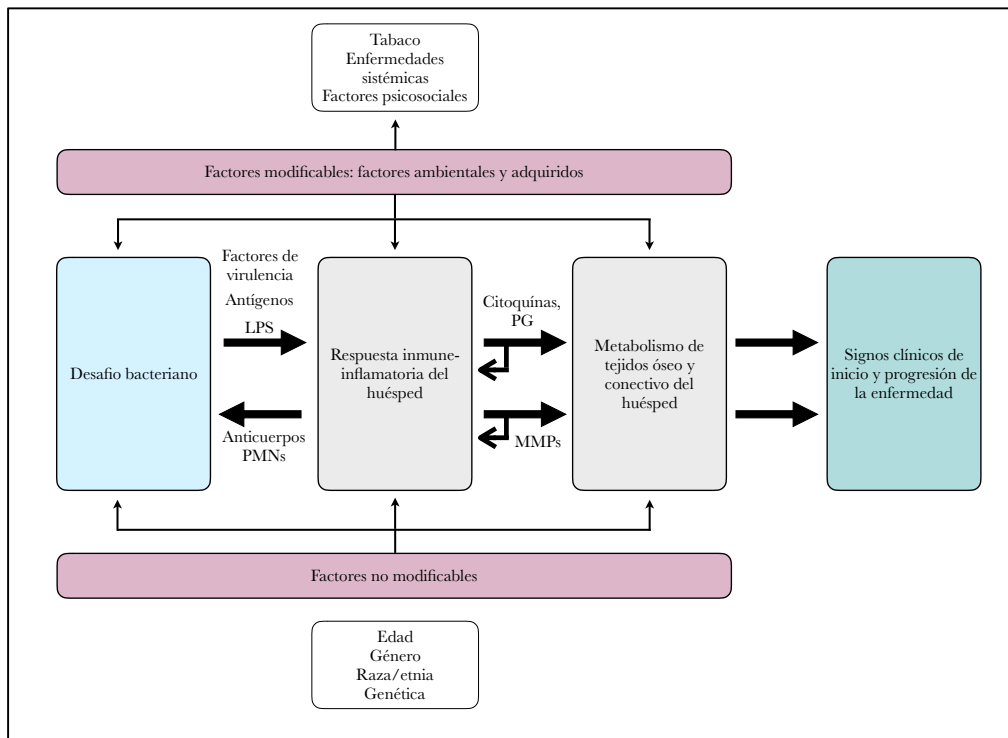


Figura 1. Modelo de la patología multifactorial de la periodontitis. Adaptado de Kornman, 2008. PG: prostaglandinas; PMN: leucocitos polimorfonucleares; LPS: lipopolisacáridos bacterianos; MMPs: metaloproteinasas.

Las bacterias orales, junto con los virus y hongos, constituyen el microbiota oral, que es la comunidad microbiana compleja que reside en la cavidad oral humana (Dewhirst y cols., 2010). Las comunidades bacterianas que aquí residen se organizan en una sofisticada estructura llamada “biofilm dental”, a la que se denominaba comúnmente “placa bacteriana o dental” (Marsh y Bradshaw, 1995). Esta organización en biofilms les confiere algunas propiedades, como son la protección y la resistencia frente a los factores ambientales o determinadas sustancias tóxicas (Costerton y cols., 1999).

La búsqueda de los agentes microbiológicos de la periodontitis ha ido progresando durante más de un siglo. Las ideas sobre cómo los cambios en la placa dental se relacionan con un cambio de la salud oral a la enfermedad han cambiado con el tiempo. En la actualidad se empieza a reconocer la importancia fundamental de la “disbiosis” de las poblaciones microbianas normalmente asociada a salud en el desarrollo de la periodontitis (Figura 2).

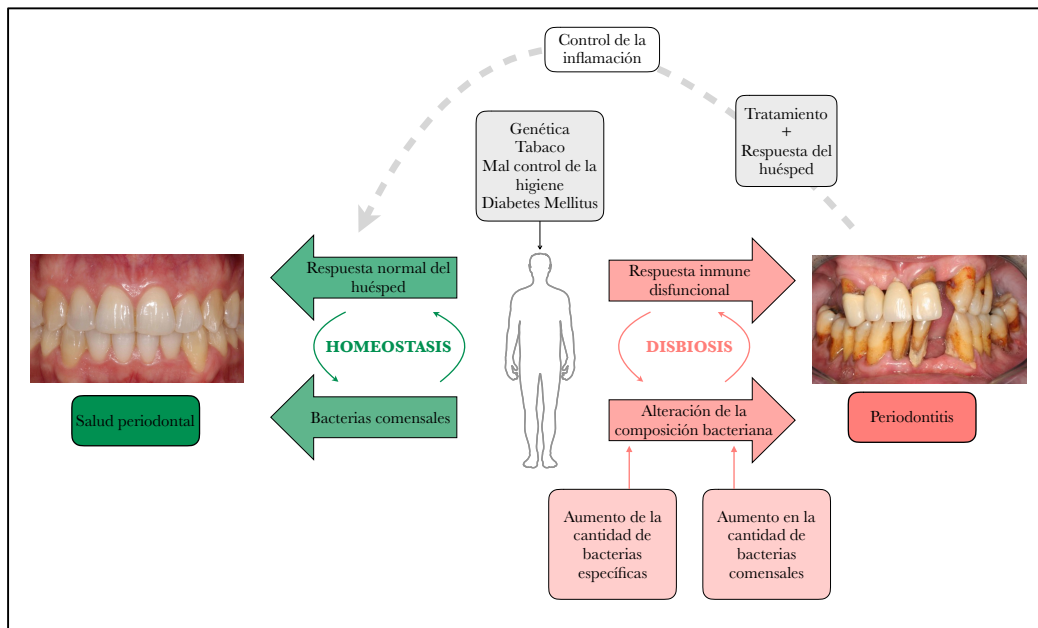


Figura 2. La salud periodontal resulta de un equilibrio homeostático entre el número y la composición de los microorganismos en la comunidad microbiana oral y la respuesta del huésped correspondiente. Los factores de riesgo pueden alterar este equilibrio y crear una comunidad microbiana oral disbiótica con una composición alterada de bacterias comensales orales. Los cambios en la comunidad bacteriana que resultan en una respuesta disfuncional del huésped incluyen un aumento en el número total de bacterias y/o el crecimiento de bacterias específicas. Adaptado de Roberts y Darveau, 2015.

En una situación de salud, existiría una relación mutuamente beneficiosa entre miembros de una comunidad microbiana y entre la comunidad y el huésped con diferentes grados de beneficio (*simbiosis*). Sin embargo, el equilibrio homeostático microbiano puede romperse produciéndose perturbaciones por cambios en el medio como una mala higiene oral, hábito tabáquico o la susceptibilidad genética, lo que se conoce como *disbiosis*. Según la teoría de “*Sinergia Polimicrobiana y Disbiosis*” propuesta por Hajishengallis y Lamont en 2012, un cambio en la relación del microbioma y el huésped, puede causar la alteración de la composición cualitativa y cuantitativa de las poblaciones microbianas, asociadas a la salud. Existiría una disminución en los simbiontes beneficiosos y un aumento de la proporción de especies bacterianas clave con potencial patogénico (denominados “patógenos clave” o *keystone pathogens*) que causarían un desequilibrio del microbioma oral. Esta hipótesis propone a su vez que la interferencia producida por estos patógenos clave establece posteriormente una disbiosis (Hajishengallis y Lamont, 2012, Mira y cols., 2017) (Figura 3).

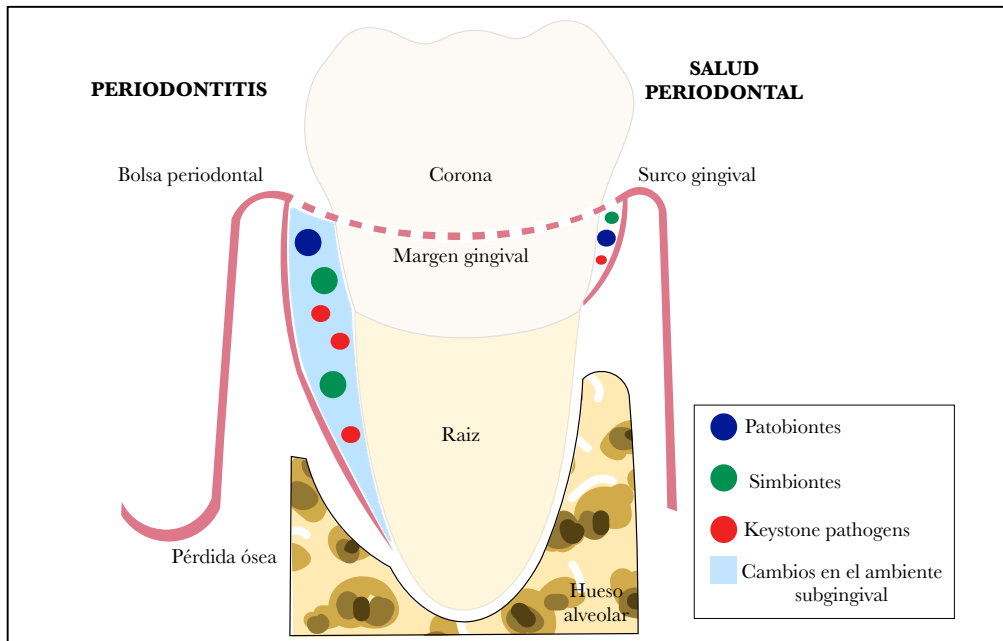


Figura 3. La periodontitis representa una condición disbiótica importante debido a la diversidad de géneros y especies involucrados en el microbioma a nivel periodontal. Las comunidades microbianas con menor diversidad y riqueza albergan patógenos clave, simbios y patobiontes con una frecuencia muy baja y en proporciones bajas y adecuadas para garantizar la salud. Cuando se producen perturbaciones en los tejidos periodontales (por ejemplo, higiene oral deficiente, tabaco, etc.) o el huésped es genéticamente susceptible, los agentes patógenos clave (*keystone pathogens*) provocan cambios en el nicho ecológico (es decir, la bolsa periodontal) y son capaces de desplazar a las demás especies y predisponer a la enfermedad. La alteración en el equilibrio promueve la expansión proporcional de los patobiontes en relación con los simbios, promoviendo la inflamación que finalmente conduce a la destrucción del tejido conectivo y óseo. La microbiota en la periodontitis se desplaza para incluir una mayor proporción de patobiontes y patógenos clave. Adaptado de Costalonga y Herzberg, 2014.

Aunque hay más de 700 especies bacterianas diferentes en simbiosis con el huésped dentro de la cavidad oral humana (Dewhirst y cols., 2010), solo una pequeña fracción de estas bacterias tiene el potencial de inducir disbiosis y cambios responsables de la destrucción del tejido periodontal (Sanz y cols., 2017). Entre estas bacterias con potencial patogénico se encuentran dos especies, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*. Además, en los últimos años, *P. gingivalis* ha sido identificado en estudios experimentales como un patógeno clave en la promoción del ambiente

disbiótico que conduce a los cambios inflamatorios crónicos característicos de la lesión de periodontitis (Hajishengallis y cols., 2012).

En los estudios clásicos de microbiología periodontal se definieron grupos de patógenos clave con clara asociación con el inicio y la progresión de la periodontitis (AAP, 1996). En el primer grupo se encuentran especies bacterianas como *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *Tannerella forsythia*, teniendo éstas una fuerte evidencia. En un segundo grupo con una moderada asociación con la periodontitis, se engloban las bacterias *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Parvimonas micra* y *Treponema denticola*. Por último, en el tercer grupo se encuentran bacterias como *Eikenella corrodens*, teniendo ésta una evidencia inicial (AAP, 1996). Estudios recientes de microbioma subgingival han revelado también nuevos patógenos emergentes como *Filifactor alocis*, que pueden desempeñar un papel importante en la periodontitis (Aruni y cols., 2015)

#### **1.4. Importancia y consecuencias de la periodontitis**

La importancia de la periodontitis no deriva exclusivamente de sus altos índices de prevalencia, sino de la posible morbilidad que conlleva esta enfermedad. Las consecuencias de la periodontitis se manifiestan obviamente en la dentición afectada pero, lo que es más importante, también en una persona, cuyas funciones físicas y psicosociales pueden verse afectadas.

El no recibir prevención o tratamiento de esta enfermedad hace que la periodontitis progrese hasta el punto en que la pérdida ósea conduce a la pérdida de dientes. En última instancia, los pacientes que tienen pocos dientes o dientes con movilidad avanzada experimentan una salud oral deficiente y tienen dificultad para masticar, hablar o pronunciar palabras (Boehm y Scannapieco, 2007). Junto con el deterioro funcional, como resultado de la migración dental, la movilidad y la pérdida de los dientes, existen consecuencias estéticas evidentes, así como efectos psicosociales adversos debido a la halitosis y la conciencia del mal estado de salud bucal (Papapanou y cols., 2018). Se podría explicar, por ello, la asociación entre la pérdida de dientes y la falta de socialización, afectando así a su calidad de vida y ser una fuente de desigualdad social (Ferreira y cols., 2017).

Además de las consecuencias locales, esta enfermedad tiene un impacto negativo plausible en la salud general. De hecho, es importante destacar que hay evidencia de que la periodontitis en sus estadios más avanzados sin tratamiento, está relacionada con ciertas enfermedades y entidades sistémicas. En la última década se ha observado que existe una plausibilidad biológica real de que la inflamación periodontal y las bacterias patógenas periodontales relacionadas pueden contribuir y estar relacionadas con diabetes mellitus, enfermedades respiratorias, enfermedad cardiovascular aterosclerótica (Tonetti y cols., 2013, Dietrich y cols., 2017), artritis reumatoide (Kaur y cols., 2013), resultados adversos del embarazo (Sanz y cols., 2013) o enfermedad de Alzheimer (Leira y cols., 2017), entre otras. Por ello, el entender el mecanismo biológico plausible que unen la periodontitis con diferentes enfermedades sistémicas ayudaría al enfoque y tratamiento englobado del paciente a nivel de salud pública.

## **2. Periodontitis, "una enfermedad más allá del periodonto"**

### **2.1. Medicina Periodontal**

En 1989 gracias al estudio observacional publicado por científicos finlandeses, se observó que un estado periodontal deficiente se asociaba positivamente con el desarrollo de infarto agudo de miocardio e infarto cerebral (Mattila y cols., 1989). Desde entonces empezó un nuevo campo de investigación en Periodoncia, acuñado con el término de "Medicina Periodontal", que nació de la mano de Steven Offenbacher en 1996. Esta rama de la Periodoncia tiene como objetivo estudiar y establecer una posible relación entre la periodontitis y las enfermedades o afecciones sistémicas, así como evaluar su plausibilidad biológica y sus implicaciones preventivas y terapéuticas (Williams y Offenbacher, 2000). Muchos investigadores se han preguntado qué fundamento biológico podría explicar el posible vínculo entre la periodontitis en sus formas más severas y ciertas afecciones sistémicas.

Como bien se ha descrito, la periodontitis es una enfermedad multifactorial donde las bacterias a nivel subgingival juegan un papel fundamental, siendo estas bacterias el posible nexo de unión entre la periodontitis y dichas entidades sistémicas. De hecho, son varios los estudios que han encontrado patógenos periodontales clave del biofilm subgingival en lugares lejanos al nicho subgingival, en muestras de tejidos y órganos

distantes. La detección de estas bacterias patógenas periodontales en lugares lejanos al nicho subgingival, sugiere que estos patógenos orales pueden migrar desde la cavidad oral, lo que implica la translocación de estas bacterias por el torrente sanguíneo confirmando la capacidad de éstas para invadir la barrera endotelial y desencadenar una respuesta local. Este paso de patógenos periodontales a la vía sanguínea circulatoria es uno de los mecanismos biológicos plausibles que explican la coherencia que existe entre la periodontitis y las enfermedades sistémicas, siendo esta vía comúnmente denominada como vía directa (Reyes y cols., 2013) (Figura 4).

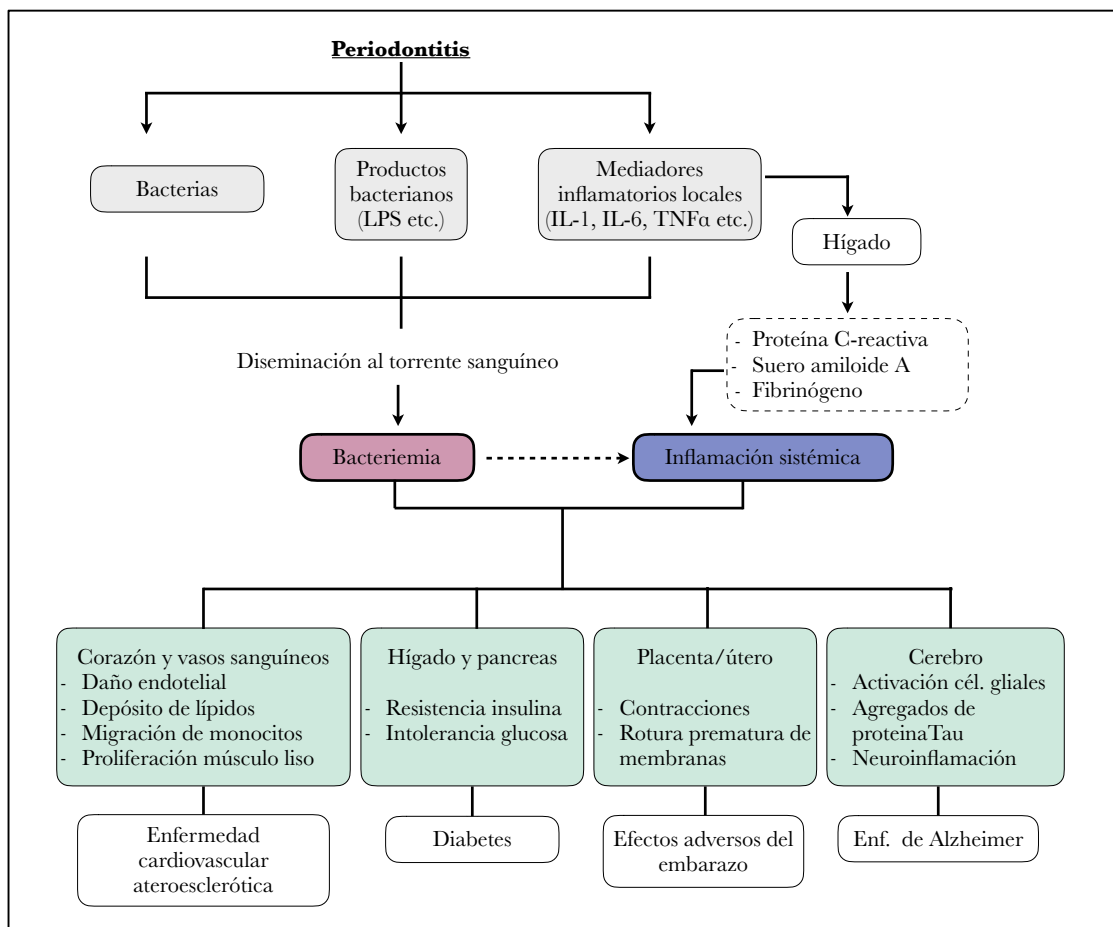


Figura 4. Esquema de la relación de periodontitis con ciertas entidades sistémicas. Relación y posibles mecanismos directos e indirectos.

*IL-1: interleuquina-1; IL-6: interleuquina-6; TNFα: factor de necrosis tumoral- α; LPS: lipopolisacáridos bacterianos.*

La bacteriemia de origen oral se ha definido como el tránsito o la presencia continua de bacterias viables en el torrente sanguíneo procedentes del biofilm subgingival (Carmona y cols., 2002). Se ha sugerido que la bacteriemia crónica de bajo nivel es un mecanismo directo para explicar las asociaciones entre periodontitis y entidades

sistémicas (Reyes y cols., 2013). En la periodontitis, la microbiota subgingival patógena se encuentra en contacto cercano con el epitelio ulcerado de las bolsas periodontales. El epitelio ulcerado en el paciente con periodontitis puede tener fácilmente un área de 8-20 cm<sup>2</sup> (Hujoel y cols., 2001). Esto hace que la translocación de bacterias patógenas y sus endotoxinas al torrente sanguíneo sea plausible (Parahitiyawa y cols., 2009) generando bacteriemias transitorias. Además de las bacterias, las toxinas bacterianas (endotoxinas, es decir, lipopolisacáridos) y todo tipo de otros componentes antigénicos de las bacterias tienen la posibilidad de penetrar en los tejidos periodontales y entrar en los vasos sanguíneos (Hirschfeld y Kawai, 2015). Por este motivo, cualquier perturbación en la integridad física del epitelio ulcerado subgingival, podría dar lugar al paso de bacterias patógenas periodontales al sistema vascular.

Son varios los estudios que han detectado la presencia de patógenos periodontales en lugares distantes del área subgingival. En la Figura 5, se resumen las bacterias patógenas periodontales encontradas en lugares distantes y en relación con diversas entidades sistémicas.

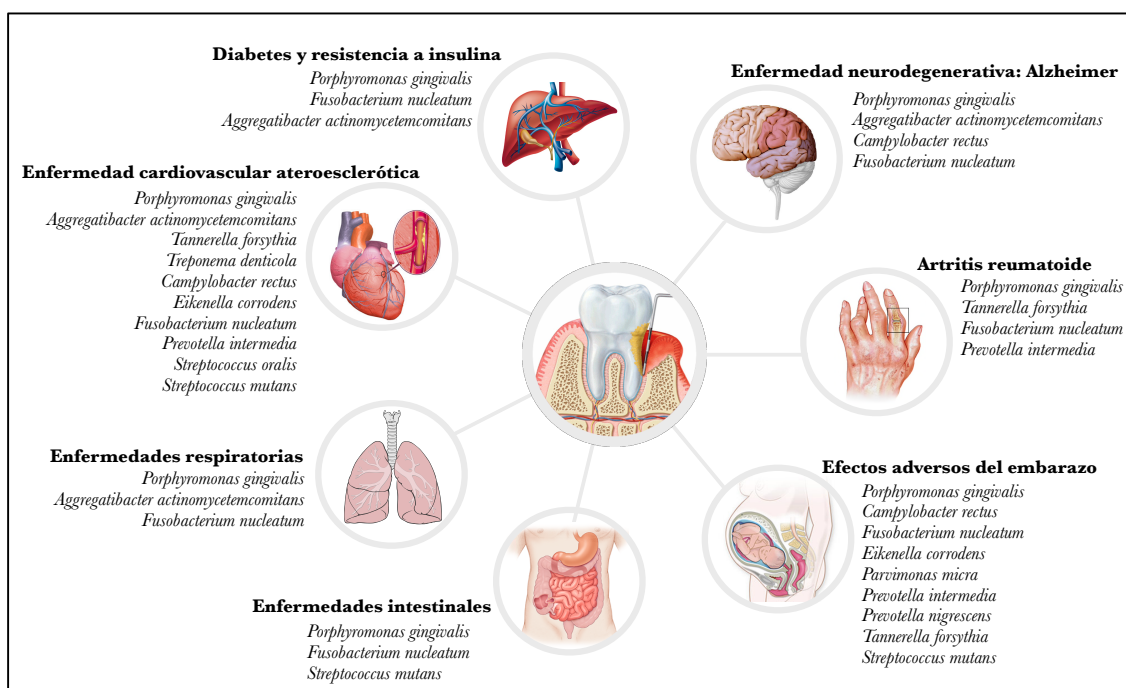


Figura 5. Resumen de las especies bacterianas, de posible origen periodontal, encontradas en lugares distantes al surco subgingival.

### ***Enfermedad cardiovascular aterosclerótica***

La enfermedad cardiovascular aterosclerótica, comprende un grupo de enfermedades que afectan principalmente la vascularización de los órganos vitales, incluidos el corazón, el cerebro y los riñones, e incluyen eventos fatales y no fatales. Tradicionalmente, la enfermedad cardiovascular aterosclerótica se puede agrupar en (1) enfermedad de la arteria coronaria, (2) enfermedad cerebrovascular isquémica; (3) enfermedades arteriales periféricas; y (4) otras manifestaciones (Stary y cols., 1995).

La detección de ADN de bacterias periodontopatógenas en placas de ateroma humanas fue descrita por primera vez en el año 2000, donde se encontró ADN de patógenos periodontales, como *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* y *T. forsythia* (Haraszthy y cols., 2000). Posteriormente, otro estudio confirmó la presencia de ADN bacteriano en 42 placas ateromatosas recuperadas por endarterectomía. Las especies bacterianas más comúnmente encontradas en este estudio fueron *P. gingivalis*, seguido de *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *E. corrodens*, *F. nucleatum* y *C. rectus* (Figuero y cols., 2011). Más recientemente, Clandrini y cols. en una muestra de 35 placas de ateroma de pacientes que sufrieron un infarto de miocardio, detectaron *A. actinomycetemcomitans* en 7 placas (20%) (Calandrini y cols., 2014). En resumen, se han detectado las siguientes bacterias de posible origen periodontal: *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *E. corrodens* y *C. rectus*.

La implicación de las bacterias de posible origen periodontal en el inicio y la progresión de la lesión aterosclerótica es ahora ampliamente conocida. Las bacterias difundidas dentro del torrente sanguíneo pueden adherirse a la superficie vascular a través de proteínas de adhesión. Además, se ha demostrado que los patógenos periodontales pueden invadir directamente las células endoteliales y las células del músculo liso (Deshpande y cols., 1998). Así, las células inflamatorias presentes en las placas ateroscleróticas son estimuladas y activadas (Zaremba y cols., 2007). Los monocitos activados por patógenos periodontales migran quimiotácticamente hacia el espacio subendotelial, se transforman en macrófagos y, posteriormente, en células espumosas después de la absorción de lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidada (oxLDL). La formación de estas células espumosas resulta de la conversión inicial de LDL a oxLDL por la respuesta al estrés oxidativo de los macrófagos que se transforman en células espumosas. Se ha demostrado que esta oxidación es estimulada por *P. gingivalis* y que sus vesículas de membrana externa fueron capaces de inducir la formación de células espumosas directamente. La apoptosis de los macrófagos cargados

de LDL produce la acumulación de lípidos en el espacio subendotelial. Por lo tanto, los patógenos periodontales pueden mantener una respuesta inflamatoria dentro de la placa aterosclerótica, predominantemente mediada por macrófagos y células endoteliales. Además, pueden inducir la expresión y actividad del factor tisular, lo que conduce a una mayor tendencia a la coagulación. Los estudios *in vivo* en animales han demostrado que *P. gingivalis* puede inducir lesiones ateroscleróticas aórticas coronarias en cerdos normocolesterolémicos a través de bacteriemias (Brodala y cols., 2005) y acelerar la aterosclerosis existente (Li y cols., 2002).

### ***Efectos adversos del embarazo***

Los resultados adversos del embarazo es un término amplio que incluye el parto prematuro, preeclampsia, aborto espontáneo, retraso del crecimiento intrauterino, bajo peso al nacer, muerte fetal y sepsis neonatal. Los patógenos bacterianos, los antígenos, las endotoxinas y las citoquinas proinflamatorias producidas durante la periodontitis pueden atravesar la barrera placentaria y provocar trastornos en la unidad materno-fetal que podrían contribuir a resultados adversos en el embarazo (Madianos y cols., 2013). *F. nucleatum* es, con mucho, la especie periodontal más prevalente con estas patologías y se ha detectado en una amplia variedad de tejidos placentarios y fetales, incluido el líquido amniótico, las membranas fetales, la sangre del cordón umbilical, los aspirados gástricos neonatales, el pulmón y el estómago fetales, asociados con parto prematuro, muerte fetal y sepsis neonatal (Gonzales-Marin y cols., 2011, Wang y cols., 2013). *P. gingivalis*, *F. nucleatum* y *C. rectus* se detectaron en el líquido amniótico y placentas de mujeres con periodontitis que tuvieron un parto prematuro (Katz y cols., 2009, Reyes y cols., 2018). Por otro lado, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* (y sus endotoxinas), fueron encontradas en placentas de mujeres con preeclampsia y partos prematuros con bajo peso del recién nacido (Swati y cols., 2012).

Para estudiar el efecto directo que supondrían las bacterias de origen periodontal en las complicaciones del embarazo, se han utilizado modelos *in vitro*. Se ha observado que la infección de trofoblastos (un grupo de células que forma la capa externa del blastocito, que provee nutrientes al embrión y se desarrolla como parte importante de la placenta) con *P. gingivalis*, indujo apoptosis de las mismas (Riewe y cols., 2010).

Además, se ha observado en modelos de animal que la inyección de *P. gingivalis* en ratones, produjo un incremento en la estimulación de la producción de prostaglandinas

en el corion, pudiendo exacerbar la maduración cervical y aumentar las contracciones uterinas dando lugar al parto prematuro (Reyes y cols., 2018).

### ***Enfermedad de Alzheimer***

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa progresiva caracterizada por un deterioro progresivo e irreversible en la memoria, el pensamiento y el lenguaje y la capacidad de aprendizaje, que finalmente termina en la muerte. La presencia de células gliales activadas que producen niveles significativos de citoquinas inflamatorias es una característica clave de la enfermedad de Alzheimer. Además, las placas b-amiloides y los agregados de tau causan un daño directo en esta enfermedad. La respuesta inmune innata intenta eliminar estos agregados del cerebro, pero en cambio agrava la neurodegeneración. Por lo tanto, se detecta un aumento de las citoquinas proinflamatorias en pacientes de edad avanzada con enfermedad de Alzheimer y periodontitis (Dominy y cols., 2019).

Curiosamente, el lipopolisacárido (LPS) de los patógenos periodontales como *P. gingivalis* y *T. denticola* se ha aislado en cerebros humanos de enfermedad de Alzheimer, lo que sugiere que los factores de virulencia de estos patógenos podrían desempeñar un papel en el desarrollo de la activación de célula gliales, inflamación cerebral y la enfermedad de Alzheimer (Poole y cols., 2013). Además, se detectaron bacterias como el patógeno periodontal *T. denticola* en los cerebros postmortem de enfermedad de Alzheimer, lo que sugiere que, además de los mediadores inflamatorios, algunos patógenos periodontales pueden invadir el cerebro al cruzar la barrera hematoencefálica (Riviere y cols., 2002). Estudios en ratas, en los se producía una inhibición de la gingipaina a nivel cerebral, mostraron una reducción en la carga bacteriana de infección cerebral establecida por *P. gingivalis* y un descenso en la neuroinflamación (Dominy y cols., 2019).

### ***Artritis reumatoide***

La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune caracterizada por la inflamación crónica de las articulaciones y los tejidos circundantes, que eventualmente conduce a la destrucción de la arquitectura articular y la función deteriorada. Numerosos estudios clínicos apuntan hacia una posible asociación entre esta enfermedad y la periodontitis (Martinez-Martinez y cols., 2009, Dissick y cols., 2010). El ADN bacteriano periodontal de *P. intermedia* y *P. gingivalis* se detectó en el líquido sinovial

de pacientes con artritis reumatoide y periodontitis (Martinez-Martinez y cols., 2009, Arana y cols., 2018). En un estudio reciente, en dos pacientes con artritis reumatoide y periodontitis, *F. nucleatum* fue detectado tanto en el líquido sinovial como en las muestras subgingivales correspondientes (Temoin y cols., 2012). El hallazgo de ADN bacteriano periodontal en el líquido sinovial sugiere la posibilidad de que los organismos se trasladen de la cavidad bucal a la sinovial.

Se ha postulado que la capacidad de patógenos periodontales tales como *P. gingivalis*, podría inducir la citrulinación, que es la modificación postraducional que conduce a la producción de anticuerpos anticitrulinados de proteínas / péptidos, y estos son el biomarcador de artritis reumatoide más sensible y específico (Olsen y cols., 2018).

## **2.2. Estudios de bacteriemias de origen periodontal: ¿se pueden detectar bacterias patógenas periodontales en muestras de sangre?**

Se ha observado, por tanto, la presencia de patógenos periodontales en lugares distantes al área subgingival y su posible implicación local que éstas pueden tener en el desarrollo de diferentes enfermedades sistémicas. Por ello, esto sugiere que las bacterias periodontales clave viajan a través del torrente sanguíneo, dándose episodios de bacteriemias. Estos episodios de bacteriemia se han descrito tras manipulaciones no profesionales, tales como la masticación, procedimientos de higiene oral, y tras manipulaciones profesionales periodontales, como profilaxis dental, sondaje periodontal, raspado y alisado radicular, cirugía periodontal, o extracción dental (Tomas y cols., 2012, Horliana y cols., 2014).

Sin embargo, los estudios que analizan muestras de sangre tras bacteriemias asociadas con manipulaciones periodontales han reportado resultados muy heterogéneos en términos de prevalencia global (15–80%). Además, no todos los estudios detectan bacterias patógenas periodontales tales como *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans* en esas muestras de sangre directas (Tabla 2). Aquellos pocos estudios que detectan patógenos periodontales lo hacen en bajas prevalencias y sin describir el grado de magnitud de las bacteriemias.

Se ha argumentado que esto puede deberse: (1) a las diferencias en las características de los grupos de estudio respecto al estado de salud periodontal del paciente; (2) a las técnicas de análisis utilizadas; o (3) al estado o carga bacteriana subgingival del paciente.

Con respecto al estado de salud periodontal, se ha informado que la bacteriemia es más común en presencia de inflamación periodontal (Lockhart y cols., 2009, Tomas y cols., 2012). Aún más, se encontró que mayores niveles de sangrado al sondaje y una mayor profundidad de bolsa periodontal, se asociaron significativamente con bacteriemia positiva (Daly y cols., 2001). Esta es la razón por la que la periodontitis en sus estadios más avanzados cabría de esperar que tuviera mayores episodios de bacteriemia.

El uso de diferentes técnicas de análisis microbiológicas puede ser, al menos en parte, responsable de esta variabilidad entre los estudios de bacteriemias. En la mayoría de los trabajos, la identificación de los aislamientos bacterianos se efectuó mediante el empleo de técnicas microbiológicas convencionales y técnicas que no han sido validadas para su uso en la detección de patógenos periodontales clave. Además, un aspecto interesante sería valorar la magnitud de bacteriemia que pueden sufrir los pacientes con diferentes grados de periodontitis. Este aspecto sólo es posible valorarlo mediante el empleo de técnicas cuantitativas y específicas.

Por otro lado, teniendo en cuenta que el nicho subgingival sirve de reservorio para la diseminación sistémica de bacterias patógenas periodontales y sus toxinas al torrente sanguíneo, son pocos los estudios de bacteriemia que analizan este aspecto. Son pocos los que toman muestras a nivel subgingival (Perez-Chaparro y cols., 2008, Castillo y cols., 2011) y aquellos que las toman no hacen una correlación con la carga microbiológica de los pacientes que hayan podido sufrir bacteriemia con lo encontrado a nivel subgingival. Además, teniendo en cuenta lo que sabemos de la microbiología periodontal y de las técnicas de análisis utilizadas para detectar patógenos periodontales clave a nivel subgingival, sería interesante el aplicar este conocimiento para validar y optimizar técnicas de análisis para su uso a nivel de bacteriemias de origen periodontal tanto para la detección de bacterias a nivel de muestras de sangre como a nivel subgingival.

<b>Autor, año</b>	<b>Tipo de intervención</b>	<b>Técnica microbiológica</b>	<b>Bacterias periodontales</b>	<b>Muestras subgingivales</b>
Beutler y cols., 2019	RAR/Mantenimiento periodontal	Frascos de cultivo	-	-
Balejo y cols., 2017	RAR	Cultivo directo / qPCR	<i>Pg</i>	Sí
Rotto y cols., 2016	RAR	Frascos de cultivo / qPCR	-	-
Kinane y cols., 2015	Profilaxis	qPCR	-	-
Sahrmann y cols., 2015	RAR	Lisis-centrifugación	<i>Pg, Fn, Pm</i>	-
Waghmare y cols., 2013	RAR	Frascos de cultivo	<i>Pg, Tj, Pi, Cr, Ec</i>	-
Zhang y cols., 2013	Seda dental / RAR	Lisis-centrifugación	<i>Aa, Fn, Pi</i>	-
Castillo y cols., 2011	RAR	Frascos de cultivo / PCR	<i>Pg, Aa, Tj, Cr, Pi</i>	Sí
Morozumi y cols., 2010	RAR	Frascos de cultivo	-	Sí
Asi y cols., 2010	Cirugía periodontal	Frascos de cultivo	-	-
Fine y cols., 2010	Masticación	Frascos de cultivo	-	-
Perez-chaparro y cols., 2009	RAR	PCR	<i>Pg</i>	Sí
Lockhart y cols., 2008/2009	Cepillado dental	Frascos de cultivo / PCR	<i>Aa</i>	-
Crasta y cols., 2009	Seda dental	Frascos de cultivo	<i>Aa</i>	-
Maestre y cols., 2008	RAR	Frascos de cultivo	<i>Fn, Pi</i>	-
Lafauries y cols., 2007	RAR	Frascos de cultivo	<i>Pg, Pi, Tj, Cr</i>	-
Padilla y cols., 2007	RAR	Frascos de cultivo / PCR	<i>Pg, Aa</i>	Sí
Forner y cols., 2006	Masticación/Cepillado/Profilaxis	Lisis-centrifugación	<i>Pg, Ec</i>	-
Kinane y cols., 2005	Sondaje periodontal/ Cepillado/ Profilaxis	Frascos de cultivo / PCR	<i>Pi</i>	-
Hartzell y cols., 2005	Cepillado dental	Frascos de cultivo	-	-
Daly y cols., 2001	Sondaje periodontal	Frascos de cultivo	-	-

Tabla 2. Estudios de bacteriemia de origen periodontal que incluyen pacientes con periodontitis tras procedimientos periodontales tanto no profesionales como profesionales.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa cualitativa; qPCR: PCR cuantitativa; RAR: raspado y alisado radicular.

Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; Pg: *Porphyromonas gingivalis*; Pi: *Prevotella intermedia*; Fn: *Fusobacterium nucleatum*; Ec: *Eikenella corrodens*; Cr: *Campylobacter rectus*; Tj: *Tannerella forsythia*; Capno: *Campytophaga spp.*; Pm: *Parvimonas micra*.

### **3. Técnicas de análisis microbiológico**

Dado que en el desarrollo de la periodontitis la microbiota subgingival juega un papel fundamental y que está en relación con diferentes afecciones sistémicas, el desarrollo de técnicas de análisis microbiológico destinadas a la detección y cuantificación de patógenos periodontales clave como *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans*, tanto a nivel subgingival como a nivel de muestras de sangre, constituye una vía importante de información.

La comprensión de la microbiota periodontal ha experimentado cambios secuenciales a lo largo del tiempo tras la introducción y aplicación de métodos cada vez más sofisticados y de mayor rendimiento para la caracterización e identificación bacteriana. La apreciación de la complejidad de la microbiota oral ha aumentado con el desarrollo de las tecnologías. Por ello, viendo el progreso en el ámbito de la microbiología periodontal y la investigación en este campo, es importante la identificación y detección de estos patógenos periodontales tanto para la práctica diaria como en el ámbito de la investigación. Para ello, a lo largo de este último siglo las técnicas microbiológicas han ido evolucionando y apareciendo nuevas técnicas para esta aplicación. Tanto en las muestras de sangre como en las subgingivales, las técnicas más empleadas han sido englobadas en dos grandes grupos: técnicas basadas en cultivo y técnicas moleculares.

#### **3.1. Técnicas basadas en cultivo**

##### **3.1.1. Técnica de frascos/botellas para hemocultivo**

Es una de las técnicas de referencia en el estudio de bacteriemias en ámbito médico-hospitalario, así como en estudios de bacteriemia de origen oral. El hemocultivo se define como el cultivo microbiológico de una muestra de sangre obtenida por una punción. Es un método de diagnóstico destinado a la detección de bacterias en sangre y su posterior identificación. Los sistemas de hemocultivo incluyen clásicamente dos fases: inoculación de la sangre en botellas/frascos con diferentes medios de cultivo para la detección de bacterias después de un tiempo de incubación; y posterior subcultivo para la identificación bacteriana en placas de medios enriquecidos (Weinstein, 1996). Ningún medio o sistema es capaz de detectar todos los microorganismos. La decisión sobre la

elección de las formulaciones de los medios debería basarse en datos de estudios controlados en los que se evaluó este aspecto. De hecho, el inconveniente de utilizarlo a nivel de bacteriemias de origen periodontal, es que ningún estudio ha validado su uso y además muchos de ellos no utilizan un subcultivo adecuado y específico para la identificación de patógenos periodontales.

Existen métodos tradicionales o manuales y sistemas más modernos automatizados y automatizados de control continuo. Los métodos manuales o tradicionales se basan en el uso de botellas de hemocultivo apropiadas, que se colocan en una incubadora estática convencional y se inspeccionan diariamente para detectar signos de crecimiento bacteriano, como el enturbiamiento del medio, la hemólisis de los hematíes, o la formación de colonias en el fondo del frasco. En cuanto a los sistemas automatizados, tipo BACTEC® (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.), las botellas/frascos se introducen en una máquina de hemocultivo, que incuba las muestras a temperatura corporal. La producción de dióxido de carbono por microorganismos en las botellas se controla continuamente, ya sea por detección colorimétrica o fluorescente. Durante la incubación, las botellas se agitan continuamente en el equipo automatizado. Sin embargo, estos sistemas automatizados son costosos y requieren de un mantenimiento regular (Lamy y cols., 2016).

Algunas de las ventajas y desventajas de este método en frascos/botellas, es que podemos detectar cantidades pequeñas de bacterias en sangre, pero el inconveniente es que no permite cuantificar los niveles de bacteriemia, ya que requiere el uso de un medio líquido enriquecido que sobredimensione la presencia de patógenos en la sangre periférica, por ello es considerado un método cualitativo, no pudiendo obtener información sobre la magnitud de bacteriemia que puede tener un paciente con periodontitis. Además, los niveles de sangre necesarios suelen ser mayores en comparación a otras técnicas (10-30 mL para un paciente adulto, aunque se recomiendan volúmenes inferiores para los nuevos sistemas automatizados de monitoreo continuo). Se considera que el índice de positividad aumenta entre el 3% y el 5% por cada mililitro adicional de sangre cultivada (Weinstein, 1996). Sin embargo, no es recomendable aumentar el volumen para así mantener una proporción de volumen sangre/medio de cultivo adecuados.

Si se analiza lo publicado en estudios de bacteriemias en pacientes con periodontitis con el uso de sistemas de hemocultivo en frascos/botellas, tanto tras procedimientos de la vida cotidiana como tras procedimientos periodontales, *P. gingivalis* fue identificado en

cuatro estudios tras procedimientos de raspado y alisado radicular (Lafaurie y cols., 2007, Padilla y cols., 2007, Castillo y cols., 2011, Waghmare y cols., 2013) no siendo detectado tras manipulaciones no profesionales. En cuanto a *A. actinomycetemcomitans*, sólo fue identificado en cuatro estudios, en dos tras procedimientos de raspado y alisado radicular (Padilla y cols., 2007, Castillo y cols., 2011), y en dos tras manipulaciones de vida cotidiana tales como el uso de la seda dental o cepillado dental (Crasta y cols., 2009, Lockhart y cols., 2009).



Figura 6. Frascos de hemocultivo para sistemas automatizados de detección de crecimiento bacteriano mediante fluorescencia.

### 3.1.2. Lisis-centrifugación

Es un sistema de cultivo de sangre de un solo tubo basado en lisis, centrifugación y posterior cultivo directo en medios apropiados. Su nombre comercial es Isolator® (Oxoid Limited, Basingstoke, Hants, Reino Unido). Estos tubos contienen los siguientes reactivos en una solución acuosa: saponina (agente de lisis celular), propilenglicol (bloquea la tendencia espumosa de la saponina) y polianetol sulfonato sódico (SPS, anticoagulante) (Loza y cols., 2003).

Se demostró que es más sensible y rápido que otras técnicas de cultivo de sangre, incluidos los hemocultivos en frascos, para detectar bacteriemia en pequeñas cantidades (Henry y cols., 1984). Además, la cantidad de sangre necesaria es inferior, con 5 mL por cada tubo. Es considerado un método cuantitativo, ya que podemos hacer recuentos de número de colonias en sangre, pudiendo por ello valorar la magnitud de bacteriemias. Sin embargo, tiene inconvenientes tales como la necesidad de procesado inmediato, mayor incidencia de contaminaciones, manejo laborioso, y que es un sistema caro (Loza

y cols., 2003). Además, al igual que el sistema de cultivo en frascos/botellas, es un método específico sólo para la detección de bacterias en sangre, no pudiéndose utilizar para otro tipo de muestras como las subgingivales.

Son varios los estudios de bacteriemia en el campo de la medicina periodontal que han utilizado esta técnica, obteniendo resultados positivos en la detección de *A. actinomycetemcomitans* (Zhang y cols., 2013) y *P. gingivalis* (Forner y cols., 2006) tras tratamientos de raspado y alisado radicular. A pesar de su utilización en este campo, no ha sido comparada con otras técnicas ni validado para la detección de bacterias patógenas periodontales.

### **3.1.3. Cultivo anaerobio directo**

Durante muchos años, el cultivo bacteriano se ha considerado el método “gold-standard” o de referencia para detectar bacterias patógenas periodontales que residen en el biofilm subgingival (Sanz y cols., 2004). Se basa en la utilización de medios suplementados o específicos para la detección de patógenos periodontales clave tales como *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans* (Figura 7). Para la detección de la bacteria anaerobia *P. gingivalis* se utilizan medios de agar-sangre no selectivos suplementados con hemina-menadiona. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* es una bacteria anaerobia facultativa que requiere medios nutricionales complejos para el crecimiento, siendo el medio Dentaid-1 uno de los medios más selectivos para su aislamiento y crecimiento en muestras periodontales. Este medio carece de sangre y suero, y está suplementado con vancomicina (Alsina y cols., 2001). No hay estudios donde hayan utilizado esta técnica con estos medios específicos para la detección de bacterias patógenas periodontales clave en muestras de sangre. Sin embargo, sería una técnica cuantitativa con la que podríamos valorar la magnitud de las bacteriemias de origen periodontal y a su vez analizar las muestras subgingivales de los mismos pacientes con la misma metodología.

Este método tiene, entre sus ventajas, la capacidad de detectar múltiples especies bacterianas a la vez, incluyendo bacterias inesperadas (Atieh, 2008). Sin embargo, entre las limitaciones de esta técnica, al igual que todas las técnicas que se basan en cultivo, se encuentra la imposibilidad de detectar ciertos organismos, bien porque sean especies no cultivables, porque requieran condiciones de crecimiento rigurosas, porque las especies cultivables estén presentes en poca abundancia o bien porque las bacterias hayan muerto durante alguna de las fases del cultivo o durante el transporte, lo cual puede conducir a resultados de falsos negativos. De hecho, del 20% al 60% de las especies

bacterianas presentes en el biofilm subgingival, se consideran no cultivables, ya que solo se han identificado mediante métodos moleculares (Paster y cols., 2001). Además, esta técnica tiene otros inconvenientes como la lentitud, el coste de los procedimientos, así como la necesidad de personal experimentado en la identificación y aislamiento de este tipo de especies (Morillo y cols., 2003, Sanz y cols., 2004). Para superar estas limitaciones, se han desarrollado técnicas basadas en métodos moleculares como los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

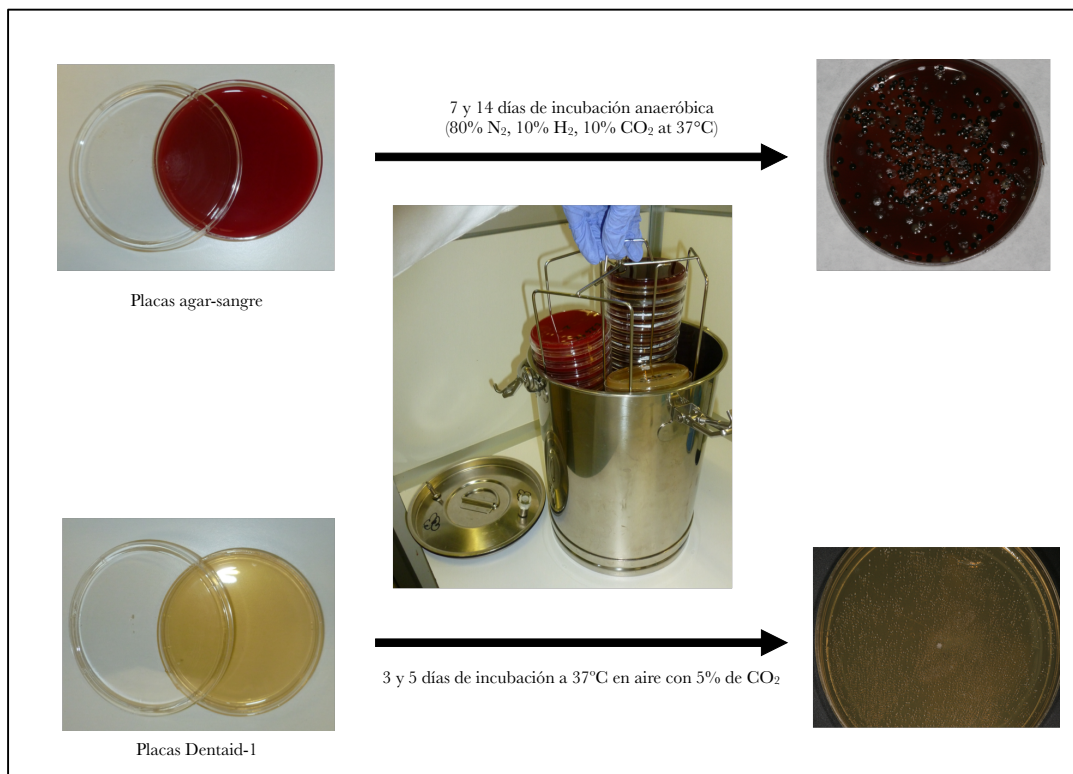


Figura 7. Medios empleados para la técnica de cultivo anaerobio directo.

### 3.2. Técnicas de biología molecular: reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), tiene como objetivo obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN específico, partiendo de un mínimo, por lo que resulta mucho más fácil identificar con una alta probabilidad, las bacterias presentes en una muestra. Comprende la amplificación y detección de productos de ADN utilizando cebadores específicos (Suchett-Kaye y cols., 2001). En los últimos años, en base a las limitaciones mostradas por los métodos de cultivo, la PCR y otro tipo de técnicas moleculares se han

erigido como procedimientos complementarios, alternativos o incluso de referencia, ya que permiten detectar la presencia de bacterias no cultivables así como aquellas de lento o difícil crecimiento, además de acortar los tiempos de procesado y obtención de resultados, lo cual aporta ventajas importantes para la obtención de diagnósticos rápidos en la práctica clínica diaria. Además, la PCR es más específica y sensible que el cultivo, basándose en la detección de secuencias de ADN específicas de genes bacterianos, por lo que se ofrece la posibilidad de distinguir bacterias estrechamente relacionadas (Jervoe-Storm y cols., 2005). Esta metodología ha sido ampliamente utilizada en muestras subgingivales de pacientes con periodontitis (Lau y cols., 2004, Jervoe-Storm y cols., 2007, Cionca y cols., 2010, Guglielmetti y cols., 2014, Iniesta y cols., 2012, Montero y cols., 2017) y también ha sido utilizada, con mucha menor frecuencia, en la detección de bacteriemias de origen periodontal (Kinane y cols., 2005, Padilla y cols., 2007, Lockhart y cols., 2008, Castillo y cols., 2011, Kinane y cols., 2015, Balejo y cols., 2017). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la bacteriemia *per se* conlleva la detección de bacterias “vivas” o “viables” en muestras de sangre. Sin embargo, mientras que el cultivo bacteriano sí que se basa en la detección de células vivas, la PCR se basa en la detección del ADN de las bacterias, ya sea vivo o muerto (Atieh, 2008). Sin embargo, al igual que la técnica de cultivo anaerobio directo, se podrían analizar tanto las muestras subgingivales como las muestras de sangre del mismo paciente con la misma metodología.

La mayoría de los ensayos de PCR para bacterias periodontales utilizan secuencias de 16S rARN, es un componente de la subunidad pequeña (30S) de todos los ribosomas bacterianos. Los genes que lo codifican se denominan ADNr 16S. Esta pequeña subunidad de ADN presente en todas las especies bacterianas contiene secuencias específicas de especies altamente conservadas. Por lo tanto, una vez que se ha determinado la secuencia de un gen de ADNr 16S de una bacteria, es posible diseñar una PCR, usando cebadores que se unan a secuencias, que amplificarán específicamente sólo el ADN 16S de la bacteria objetivo.

Existen distintas modalidades de PCR, entre las que destacan:

### **3.2.1. PCR convencional**

Mediante esta modalidad, los millones de copias de esta secuencia de ADN particular que se amplifican, son detectados a tiempo final y pueden visualizarse mediante

electroforesis en gel de agarosa. Esta técnica solo proporciona información cualitativa sobre las bacterias objeto de estudio y, por lo tanto, su uso con fines de diagnóstico puede ser limitado. Debido a que los patógenos periodontales existen no solo en bolsas periodontales sino también en el surco sano, la detección cualitativa o semi-cuantitativa no es adecuada para el diagnóstico en periodontitis. A su vez, la utilización de esta técnica en muestras de sangre limitaría la información a la presencia/ausencia de bacterias en sangre, sin poder valorar la magnitud de bacteriemias de origen periodontal. Además, requiere una fase post-PCR para identificar la amplificación y es menos sensible que la modalidad de PCR cuantitativa.

Autores como Lockhart y cols., Kinane y cols. y Castillo y cols. (Kinane y cols., 2005, Lockhart y cols., 2008, Castillo y cols., 2011) complementan el sistema de hemocultivo de frascos/botellas con una técnica cualitativa basada en PCR convencional. En el caso de Kinane y cols. se observó que la prevalencia global de bacteriemia del 3% obtenida con hemocultivo se incrementó hasta el 13% cuando se analizó con PCR. En el estudio de Castillo y cols. observaron que tras raspado y alisado radicular en los pacientes con periodontitis la PCR fue capaz de detectar *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, y *T. forsythia* en muestras de sangre; y además a mayores prevalencias que los hemocultivos (Castillo y cols., 2011).

### **3.2.2. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)**

La qPCR es una variante de la PCR que tiene como característica principal su capacidad de cuantificar la cantidad de ADN presente en la muestra original. En este caso, se puede monitorizar el progreso de la amplificación mientras éste sucede, mucho antes de que ésta termine, y, por tanto, no requiere de un procesado una vez finalizado el proceso.

Para la amplificación por PCR en tiempo real, es necesario emplear un fluoróforo, de manera que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN que se va generando, permitiendo conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. El proceso se puede automatizar fácilmente usando un sistema que realice la amplificación (termociclador) y que a su vez sea capaz de leer fluorescencia.

La PCR cuantitativa en tiempo real ha demostrado ser un método preciso y sensible para la cuantificación de bacterias periodontales clave a nivel subgingival, con alta sensibilidad y especificidad (Boutaga y cols., 2007). Es más, varios estudios han

demostrado y validado la alta precisión diagnóstica de la qPCR para la detección de bacterias patógenas periodontales como *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *T. forsythia* en comparación con el cultivo en muestras subgingivales (Boutaga y cols., 2003, Yoshida y cols., 2003). Esto haría pensar que podría ser una buena técnica para utilizar en estudios de bacteriemia de origen periodontal para así analizar muestras de sangre y subgingival con la misma metodología.

Sin embargo, para la detección de patógenos periodontales en muestras de sangre sólo dos estudios han utilizado esta metodología (Balejo y cols., 2017, Ratto-Tespestini y cols., 2016), obteniendo sólo uno de ellos resultados positivos en la detección de *P. gingivalis* tras raspado y alisado radicular (Balejo y cols., 2017).

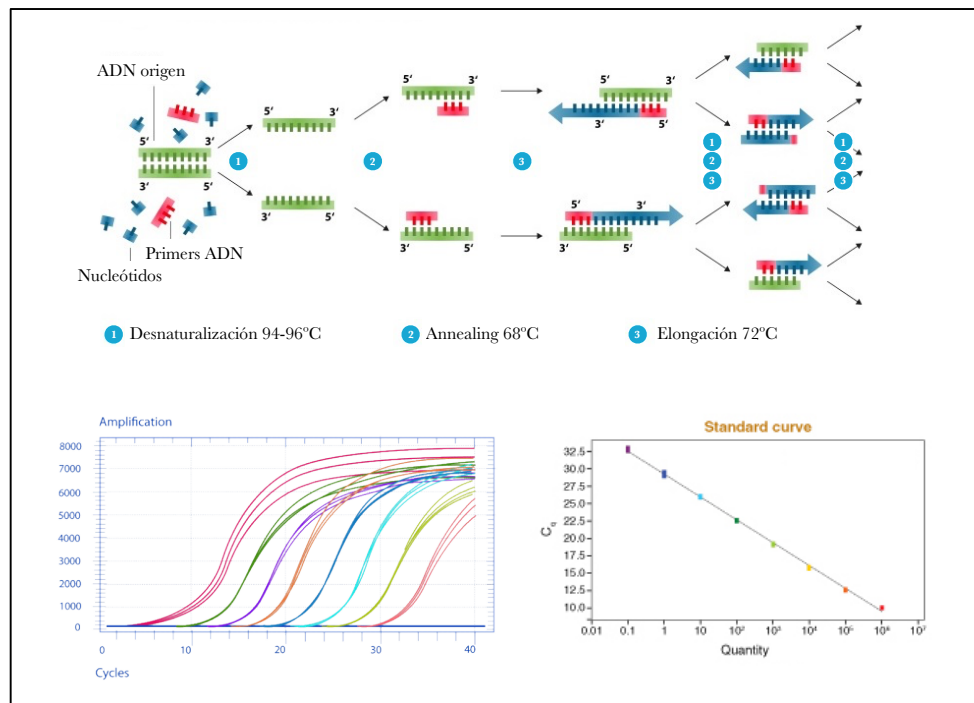


Figura 8. La qPCR permite la detección directa de productos de PCR, combinando amplificación y detección en un solo paso. Se realiza en un termociclador con capacidad de hacer incidir sobre cada muestra un haz de luz de una longitud de onda determinada y de detectar la fluorescencia emitida por el fluorocromo excitado. La cuantificación puede realizarse de forma absoluta. Se relaciona la señal de amplificación obtenida con el contenido en ADN empleando una curva de calibración.

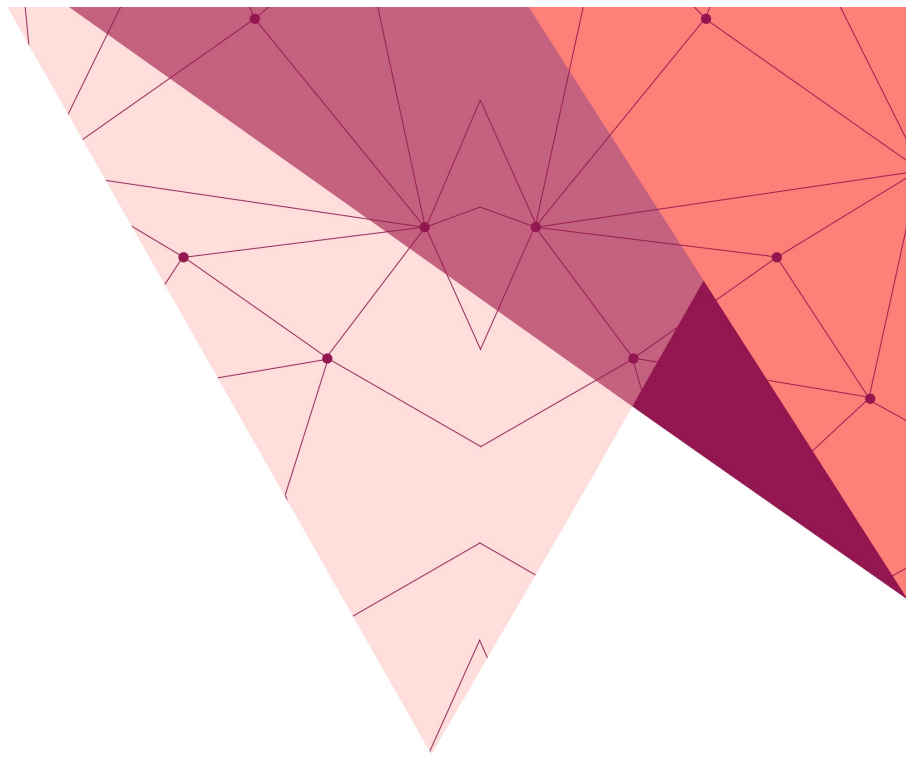
### 3.2.3. qPCR múltiple

Recientemente, una modalidad diferente de qPCR, qPCR multiplex o múltiple (m-qPCR) se ha utilizado con éxito en el diagnóstico microbiológico médico (Puenpa y

cols., 2017). El ensayo m-qPCR lleva el análisis un paso más allá, permitiendo la amplificación simultánea de diferentes secuencias objetivo de la misma muestra, lo que implica una clara reducción en el tiempo y el costo (Bolívar y cols., 2014). Las grandes ventajas de la aplicación de esta metodología en la detección de bacterias patógenas periodontales en muestras subgingivales es la alta sensibilidad de detección, el alto rendimiento, la velocidad del ensayo y las múltiples especies bacterianas que se pueden detectar en la misma reacción. Sin embargo, estos ensayos de m-qPCR no han sido validados en la identificación y cuantificación de patógenos periodontales a nivel subgingival ni a nivel de muestras de sangre. Por ello, sería de interés el validar estas técnicas para la detección de bacterias periodontales a nivel subgingival primero, para posteriormente poder aplicar a diferentes tipos de muestras para detectar bacterias patógenas periodontales.

En el contexto de un ensayo de m-qPCR, muchos factores contribuyen a la amplificación óptima de los fragmentos de ADN diana. Estos factores incluyen la calidad de la plantilla, las condiciones de amplificación y los reactivos. Es razonable ajustar las condiciones de qPCR para lograr la eficiencia de amplificación más óptima para todos los objetivos previstos, evitando al mismo tiempo la amplificación cruzada de ADN no deseados. Uno de los inconvenientes de este método son las posibles reacciones cruzadas que puedan detectar ADN no objeto de estudio. Otra dificultad asociada con la tecnología m-qPCR es la selección de múltiples sondas con diferente longitud de onda de fluorescencia, lo que permite la distinción de señales de diferentes conjuntos de cebadores / sondas, pero los espectros de emisión de los fluoróforos utilizados con el qPCR pueden superponerse, lo que podría producir un diálogo cruzado entre los diferentes canales (Molenkamp y cols., 2007).





## **III. JUSTIFICACIÓN**

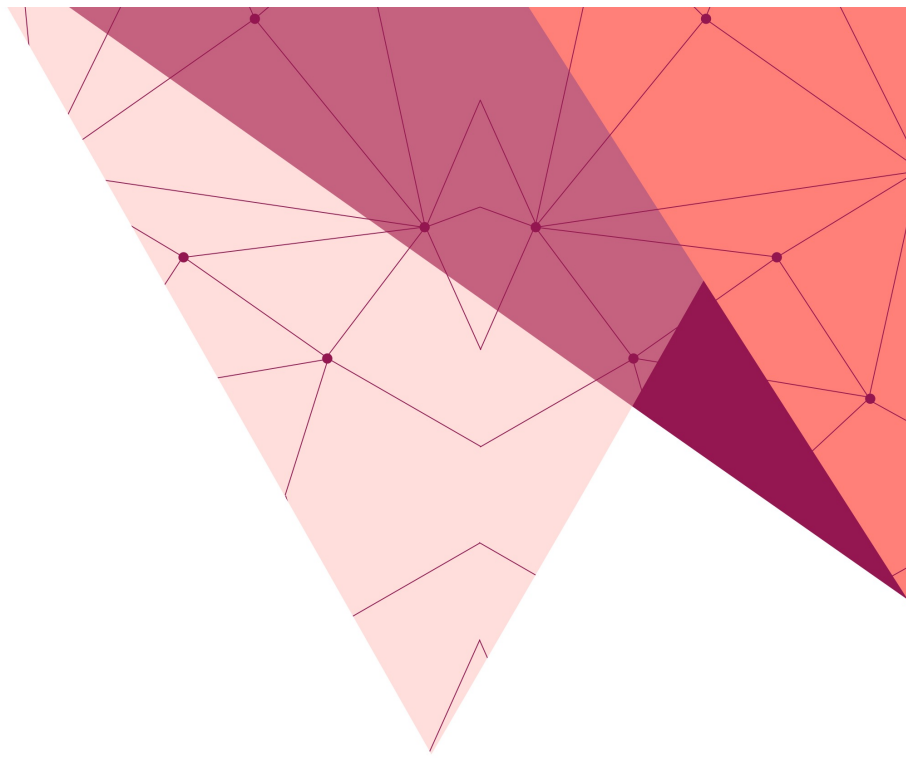


La periodontitis, en sus estadios más avanzados, afecta al 7-10% de la población mundial, produciendo cambios relevantes a nivel local y sistémico en estos pacientes. Las bacterias responsables del inicio y progresión de esta enfermedad parecen ser también los responsables del nexo de unión entre la periodontitis y diferentes enfermedades o entidades sistémicas. Las bacterias procedentes del biofilm subgingival son capaces de alcanzar el torrente sanguíneo tras diferentes manipulaciones no profesionales y profesionales, dando lugar a episodios de bacteriemia. A pesar de que en la literatura se haya detectado la presencia de bacterias patógenas periodontales, tales como *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans*, en muestras de sangre evaluando bacteremias de origen periodontal, las prevalencias son muy bajas y son muy pocos estudios los que evalúan la magnitud de esa bacteriemia.

Además, dada la importancia que tendría la detección de bacterias patógenas periodontales en sangre, por la relación que existe entre la periodontitis y ciertas entidades sistémicas, sería de interés la correlación de estas bacterias con lo encontrado a nivel subgingival.

Por tanto, resulta de interés la aplicación de los conocimientos de los que se dispone en la actualidad en el campo de la microbiología periodontal para identificar las técnicas apropiadas para el análisis de bacteremias en sujetos con periodontitis, siendo técnicas que permitan la detección de patógenos periodontales, tanto en muestras de sangre como a nivel subgingival, para así poder aplicar esta metodología en futuros estudios de bacteriemia de origen periodontal.





## **IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



# HIPÓTESIS

## 1. Hipótesis general

Las técnicas más adecuadas para la detección y cuantificación de bacteriemias de origen periodontal son aquellas utilizadas para la detección de bacterias patógenas periodontales a nivel subgingival, tales como el cultivo anaerobio directo y la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR). Esto permitiría utilizar las mismas técnicas en cada paciente y establecer correlaciones entre ambos tipos de muestras (sangre y subgingival).

## 2. Hipótesis específicas

**Estudio 1:** Los métodos validados para la detección de patógenas periodontales a nivel subgingival, como el cultivo anaerobio directo y la qPCR, son las técnicas de elección para la detección de bacterias periodontopatógenas en muestras de sangre.

**Estudio 2:** Los pacientes con periodontitis sufren bacteriemias de origen periodontal tras procedimientos de higiene oral interdental, los cuales pueden ser detectados mediante cultivo anaerobio directo y qPCR.

**Estudio 3:** La técnica de qPCR multiplex es válida para la identificación y cuantificación simultánea de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* en muestras subgingivales.

**Estudio 4:** La técnica de qPCR multiplex es válida para la identificación y cuantificación simultánea de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *T. forsythia* en muestras subgingivales, en comparación con el cultivo anaerobio directo.



## OBJETIVOS

### 1. Objetivo general

Validar y comparar los resultados obtenidos con diferentes técnicas microbiológicas (BACTEC®, lisis centrifugación, cultivo anaerobio directo, qPCR) para la detección de bacterias patógenas periodontales en muestras de sangre y en muestras subgingivales, para el estudio de bacteriemias de origen periodontal.

### 2. Objetivos específicos

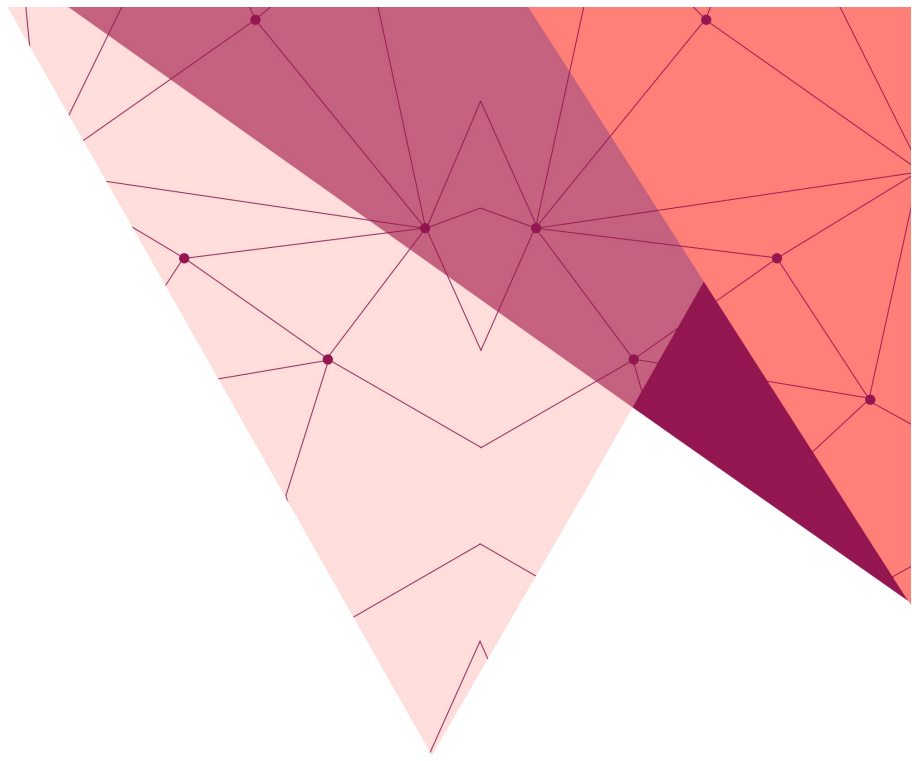
**Estudio 1:** Comparar y validar la capacidad de detectar y cuantificar *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *Streptococcus oralis* (solos o en combinación) en muestras de sangre *in vitro* con tres técnicas de cultivo [cultivo anaerobio directo, hemocultivo (BACTEC®) y lisis centrifugación] y un enfoque no dependiente del cultivo, con técnica molecular [reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR)].

**Estudio 2:** Comparar la presencia y las cantidades de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* en muestras de sangre tras episodios de bacteriemia inducida por el cepillado interdental en individuos periodontalmente sanos y con periodontitis utilizando una técnica basada en cultivo (cultivo anaerobio directo) y una técnica molecular (qPCR) en un modelo de estudio transversal. Además, establecer la correlación entre los recuentos microbiológicos en muestras subgingivales y de sangre.

**Estudio 3:** Validar *in vitro* e *in vivo* una técnica de biología molecular, qPCR multiplex para la identificación y cuantificación simultánea de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* en muestras subgingivales.

**Estudio 4:** Validar y comparar los resultados obtenidos en la detección y cuantificación simultánea de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *T. forsythia* en muestras subgingivales de pacientes con diferentes grados de periodontitis con el cultivo anaerobio directo frente a qPCR multiplex.





# **V. MATERIAL Y MÉTODOS. RESULTADOS.**



El **Material y Métodos**, así como los **Resultados** de cada estudio publicado que engloban esta tesis doctoral, han sido descritos detalladamente y publicados como artículos científicos independientes con las siguientes referencias:

**Estudio - Artículo #1:** Marín MJ., Ambrosio N., Virto L., Diz P., Álvarez M., Herrera D., Sanz M., Figuero E. Detection and quantification of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus oralis* in blood samples with different microbiological identification methods: an in vitro study. *Archives of Oral Biology*. 2017 Feb;74:55-62. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.11.007.

**Estudio - Artículo #2:** Ambrosio N., Marín MJ., Laguna E., Herrera D., Sanz M., Figuero E. Detection and quantification of *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in bacteremia induced by interdental brushing in periodontally healthy and periodontitis patients. *Archives of Oral Biology*. 2019 Feb;98:213-219. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.11.025.

**Estudio - Artículo #3:** Marín MJ., Ambrosio N., Herrera D., Sanz M., Figuero E. Validation of a multiplex qPCR assay for the identification and quantification of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: In vitro and subgingival plaque samples. *Archives of Oral Biology*. 2018 Apr; 88:47-53. doi: 10.1016 / j.archoralbio.2018.01.012.

**Estudio - Artículo #4:** Marín MJ., Ambrosio N., O'Connor A., Herrera D., Sanz M., Figuero E. Validation of a multiplex qPCR assay for detection and quantification of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in subgingival plaque samples. A comparison with anaerobic culture. *Archives of Oral Biology*. 2019 Jun;102:199-204. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.04.014.



# *ARTÍCULO #1*



## ARTÍCULO #1:

### **“Detección y cuantificación de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus oralis* en muestras de sangre con diferentes técnicas de identificación microbiológicas: un estudio *in vitro*”**

**Objetivos:** Comparar la capacidad de detectar y cuantificar *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *S. oralis* (solos o en combinación) en muestras de sangre con tres técnicas de cultivo [cultivo anaerobio directo (CAD), hemocultivo BACTEC® y lisis centrifugación (LC)] y un enfoque no dependiente del cultivo (qPCR) en un estudio *in vitro*.

**Material y métodos:** Las muestras de sangre de 12 voluntarios periodontalmente sanos se contaminaron con tres concentraciones [ $10^4$ ,  $10^2$  y  $10^1$  unidades formadoras de colonias (UFC)/mL] de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *S. oralis*, solas o en combinación. Las muestras fueron analizadas por CAD, BACTEC®, LC y qPCR. Se analizó la sensibilidad, especificidad, los valores predictivos, el índice kappa y los coeficientes de correlación de Lin.

**Resultados:** CAD, LC y qPCR detectaron las tres bacterias en todas las concentraciones. Se observó una excelente concordancia (coeficiente de correlación r: 0.92-1) entre los valores de CAD y el estándar de referencia (sensibilidad de 93.33% a 100% y especificidad de 88.89% a 100%). BACTEC® no pudo identificar *P. gingivalis* en ninguno de los experimentos realizados. qPCR proporcionó falsos negativos para *S. oralis*.

**Conclusiones:** CAD mostró los mejores resultados para la identificación y cuantificación adecuadas de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *S. oralis*, solos o en combinación, en muestras de sangre.





## Detection and quantification of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus oralis* in blood samples with different microbiological identification methods: An *in vitro* study



María José Marin<sup>a</sup>, Nagore Ambrosio<sup>a</sup>, Leire Virto<sup>a</sup>, Pedro Diz<sup>b</sup>, Maximiliano Álvarez<sup>c</sup>, David Herrera<sup>d</sup>, Mariano Sanz<sup>d</sup>, Elena Figuero<sup>a,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Oral Research Laboratory, Faculty of Odontology, University Complutense, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department of Special Needs, School of Medicine and Dentistry, Santiago de Compostela University, Santiago de Compostela, Spain

<sup>c</sup> Research Laboratory, Department of Clinical Microbiology, Xeral-Ciés Hospital, Vigo, Spain

<sup>d</sup> Etiology and Therapy of Periodontal Diseases (ETEP) Research Group, University Complutense, Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 January 2016

Received in revised form 11 October 2016

Accepted 6 November 2016

#### Keywords:

Bacteremia

Quantitative PCR

Culture

Periodontal

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

*Porphyromonas gingivalis*

### ABSTRACT

**Background:** Culture-based methods (culture broth bottles or lysis methods) have been the standard for detecting bacteremia. More recently, quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was proposed as a more sensitive and specific test although none of them has been validated for the identification of periodontal pathogens (fastidious growing bacteria) in blood samples.

**Objective:** To compare the ability to detect and quantify *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus oralis* (alone or in combination) in blood samples with three culture techniques [direct anaerobic culturing (DAC), haemo-culture (BACTEC), and lysis-centrifugation (LC)] and a non-culture dependent approach (qPCR) in an *in vitro* study.

**Material and methods:** Blood samples from 12 periodontally healthy volunteers were contaminated with three concentrations [ $10^4$ ,  $10^2$  and  $10^1$  colony forming units (CFU)/mL] of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *S. oralis*, alone or in combination. Samples were analysed by DAC, BACTEC, LC and qPCR. Sensitivity, specificity, predictive values, kappa index and Lin's correlation coefficients were calculated.

**Results:** DAC, LC and qPCR were able to detect the three target species at all concentrations. An excellent concordance (correlation coefficient  $r$ : 0.92–1) was observed between DAC and the reference standard (sensitivity ranging 93.33–100% and specificity 88.89–100%) values. BACTEC was not able to identify *P. gingivalis* in any of the performed experiments. qPCR provided false negative results for *S. oralis*.

**Conclusions:** DAC showed the best results for the proper identification and quantification of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *S. oralis*, alone or in combination, in blood samples.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Bacteremia has been defined as the transient, intermittent, or continuous presence of viable bacteria in the bloodstream (Carmona, Diz Dios, & Scully, 2002). *Streptococcus oralis* is considered as one of the initial colonizer of the subgingival biofilm ("Consensus report. Periodontal diseases: pathogenesis

and microbial factors," 1996) and has been described as the most frequently isolated bacterium in positive blood cultures after toothbrushing (Forner, Larsen, Kilian, & Holmstrup, 2006; Diz, Tobías, Scully, & Donos, 2012) flossing and scaling and root planning (Crasta et al., 2009; Zhang, Daly, Mitchell, & Curtis, 2013). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* are considered specific pathogens associated with periodontitis ("Consensus report. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors," 1996). They have been found in atherosclerotic plaques, abdominal aortic aneurysms and heart valves (Figuero et al., 2011; Gaetti-Jardim, Marcelino, Feitosa, Romito, & Avila-Campos, 2009; Nakano et al., 2009; Zaremba, Górska, Suwalski, & Kowalski, 2007). Furthermore, these bacteria have been found,

\* Corresponding author at: Section of Periodontology, Faculty of Odontology, University Complutense of Madrid, Plaza Ramón y Cajal, s/n (Ciudad Universitaria), 28040 Madrid, Spain.

E-mail address: [elfiguero@ucm.es](mailto:elfiguero@ucm.es) (E. Figuero).

although in lower frequency than *S. oralis*, in blood samples after toothbrushing (Lockhart et al., 2008), flossing (Crasta et al., 2009) or scaling and root planing (Castillo et al., 2011). Therefore, these three target bacteria might represent and adequate representation of bacteremia in periodontitis patients.

However, these studies have reported very heterogeneous results in terms of prevalence (15–90%) and it has been argued that the use of different microbiological techniques may be, at least, in part responsible of this variability (Reyes, Herrera, Kozarov, Roldá, & Progulské-Fox, 2013; Tonetti, Van Dyke, & Working group 1 of the joint EFP/AAP workshop, 2013).

In gingival crevicular samples, direct anaerobe culturing (DAC), in which samples are directly cultivated in enriched medium agar plates, is considered the gold-standard culture method the detection and isolation of periodontal pathogens (Sanz, Lau, Herrera, Morillo, & Silva, 2004). In blood samples the most broadly used approaches are the standard hemoculture methods, using culture broth bottle-based (Crasta et al., 2009; Daly, Mitchell, Highfield, Grossberg, & Stewart, 2001; Kinane, Riggio, Walker, MacKenzie, & Shearer, 2005; Lafaurie et al., 2007; Lockhart et al., 2008; Maestre, Mateo, & Sánchez, 2008), lysis filtration (Forner et al., 2006) or lysis (Zhang et al., 2013). All these culture-based approaches, however, require the proper bacterial growth conditions, the need to identify species based on the colony and cell morphology and suitable specific tests, and time for an appropriate growth. To overcome some of these limitations, microbial diagnosis based on polymerase chain reaction (PCR) has been proposed for detecting bacterial pathogens in blood samples, as it has been considered as a more sensitive and specific method when compared to culture (Castillo et al., 2011; Kinane et al., 2005).

In spite of these bacteremia studies using different microbiological methodologies, there is no published investigation aimed to validate these microbial diagnostic techniques. It is, therefore, the aim of this *in vitro* investigation to compare and validate different microbiological methods (DAC, BACTEC, LC and qPCR) in the detection and quantification of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *S. oralis* in blood samples. Specifically, it was aimed to determine the diagnostic validity (sensitivity, specificity and predictive values), detection limits and the reproducibility of tested microbiological diagnostic approaches.

## 2. Material and methods

### 2.1. Study design

This was an *in vitro* study consisting on twelve experiments ( $n = 12$ ) where bacteremia was simulated by direct contamination of blood with *A. actinomycetemcomitans* ( $n = 3$ ), *P. gingivalis* ( $n = 3$ ), *S. oralis* ( $n = 3$ ), and all three bacterial species combined ( $n = 3$ ).

### 2.2. Patients

Samples were obtained from periodontally healthy volunteers at the Faculty of Odontology, University Complutense, Madrid (UCM). All subjects were informed about the aims of the study and signed a consent form, previously approved by the local ethical committee (Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain). At a screening visit, a full mouth periodontal examination by a trained examiner (N.A.), for assessing the following inclusion criteria: (a) less than three sites with probing pocket depth  $\geq 3$  mm or clinical attachment loss  $\geq 2$  mm, (b) no radiographic evidence of bone loss, and (c) full-mouth bleeding on probing  $< 25\%$ . Subjects were excluded if they: (a) had received periodontal treatment in last week, (b) had taken antibiotics in the previous month, or (c) were infected with human immunodeficiency or hepatitis B viruses. When fulfilling these criteria, subjects were invited to participate

in the study and, one week later, peripheral blood samples were drawn by venipuncture.

### 2.3. Blood samples

Prior to sampling the skin area of venipuncture was carefully wiped with ethanol and an indwelling catheter was inserted in the antecubital vein. Then peripheral blood samples were drawn and placed in Isolator tubes<sup>®</sup> (Oxoid Limited, Basingstoke, Hants, United Kingdom) with polypropylene glycol (8 mL/L), sodium polyanetholsulphonate (15.3 g/L) and purified saponin (28 mg/mL) for the lysis-centrifugation technique and in tubes with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Vacutainer<sup>™</sup>, Becton Dickinson, San Agustín de Guadalix, Madrid, Spain) for the remaining techniques. A total volume of 72 mL was extracted from each subject.

### 2.4. Bacterial strains and culture conditions

Reference strains were used to contaminate the blood samples: *A. actinomycetemcomitans* strain DSMZ 8324, *P. gingivalis* strain ATCC 33277 and *S. oralis* strain CECT 907T. BHI medium (Brain Heart Infusion, Becton, Dickinson and Company, USA) was used for bacterial growth under anaerobic conditions for 24–48 h (depending on the bacterial species) at 37 °C in order to reach exponential growth phase. Thereafter, ten-fold serial dilutions of each bacterium were performed in phosphate-buffered saline (PBS) to achieve concentrations of approximately  $10^4$ ,  $10^2$  and  $10^1$  CFU/mL. In order to confirm the exact concentration of the dilutions, aliquots of 0.1 mL of PBS were plated manually onto non-selective blood agar plate (Blood Agar Base II<sup>®</sup> DOxoid, Basingstoke, England), supplemented with haemine (5 mg/L), menadione (1 mg/L) and 5% sterile horse blood and incubated under anaerobic conditions (80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> and 10% H<sub>2</sub>) during 7–14 days. This methodology, denominated as bacterial culturing (Sanz et al., 2004), was considered as the reference diagnostic technique in the present study.

### 2.5. Blood contamination

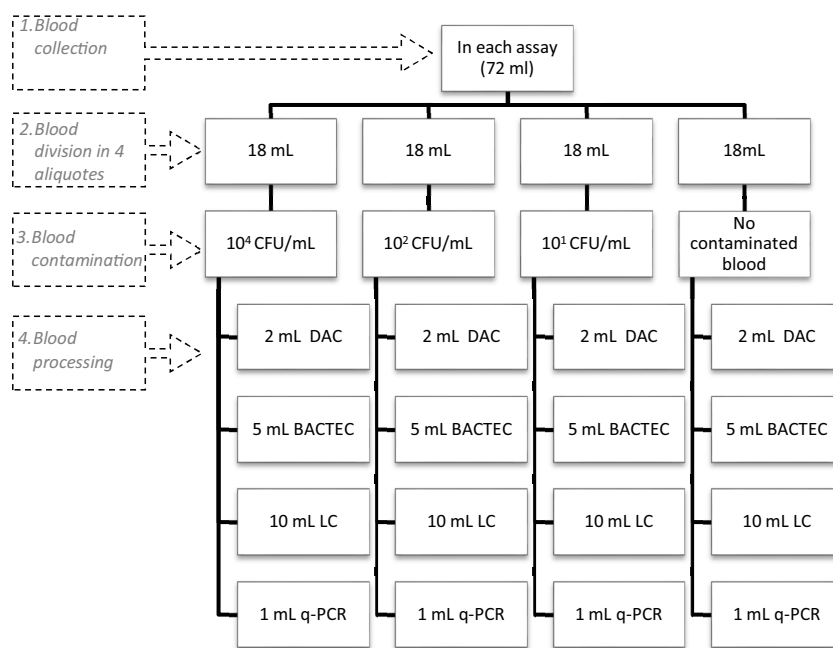
Blood samples were immediately transported to the Research Laboratory of the Faculty of Odontology (UCM). Each sample (72 mL) was equally divided into four tubes of 18 mL each one. For each target bacteria (alone and in combination), each tube was contaminated with one bacterial concentration ( $10^4$ ,  $10^2$  and  $10^1$  CFU/mL). In addition, a blood sample without contamination was prepared. These concentrations were selected based on data previously reported on bacteremia studies with average concentrations of  $10^1$  and  $10^2$  CFU/mL (Forner et al., 2006; Heimdahl et al., 1990; Lucas et al., 2002),  $10^4$  CFU/mL was used as a positive control, and 0 CFU/mL as a negative control. The obtained blood samples were analysed by four different microbiological technologies (DAC, BACTEC, LC and qPCR) (Fig. 1).

### 2.6. Processing of the samples

Samples for analysis by DAC, LC and qPCR were immediately processed in the Research Laboratory at UCM. Samples for analysis by BACTEC<sup>®</sup> were sent to the Department of Microbiology of Hospital Xeral CIES (Vigo, Pontevedra, Spain) for analysis within 24 h.

#### 2.6.1. Direct anaerobic culture (DAC)

For each sample 1 mL was plated on non-selective blood agar medium (Blood Agar Base II<sup>®</sup>, Oxoid, Basingstoke, England), supplemented with haemin (5 mg/L), menadione (1 mg/L) and 5%



DAC: Direct anaerobic culture; LC: Lysis centrifugation; q-PCR: quantitative polymerase chain reaction;

**Fig. 1.** Schematic view of the steps in each assay (n = 12).

DAC: Direct anaerobic culture; LC: Lysis centrifugation; q-PCR: quantitative polymerase chain reaction.

sterile horse blood, for determination of *S. oralis* and *P. gingivalis*. The remaining milliliter was plated onto the selective medium Denta-1 (Alsina, Olle, & Frias, 2001) at 37 °C for isolation and quantification of *A. actinomycetemcomitans*. In both cases, 5 plates were plated with 100  $\mu$ L each, and one plate with 500  $\mu$ L. During the first 24 h, plates with 500  $\mu$ L were incubated upright. Thereafter, all plates were inverted. Blood agar plates were incubated at 37 °C in jars with an anaerobic atmosphere (80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> and 10% H<sub>2</sub>) for 7–14 days of incubation. Denta-1 plates were incubated in air with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C for 3–5 days.

#### 2.6.2. BACTEC<sup>®</sup> blood culture

BACTEC<sup>®</sup> bottles were incubated and continuously monitored over 14 days for the presence of microorganisms in BACTEC 9240<sup>®</sup> (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA). A Gram staining was performed on each positive blood culture. Bottles signaling positive were subcultured on blood agar, chocolate agar medium and Schaedler agar in an anaerobic atmosphere (80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> and 10% H<sub>2</sub>). Isolated bacteria were identified using a battery of biochemical tests (Vitek System, BioMérieux Inc., Hazelwood, MO, USA).

#### 2.6.3. Lysis-centrifugation culture (LC)

After blood contamination, tubes were shaken, placed in a rack for 20 min and centrifuged at 1500 rpm for 30 min. The supernatant was carefully removed and the pellet was vigorously mixed (vortex) for 5–10 s in order to achieve a homogenous emulsion. Afterwards, plaques were plated in blood and Denta-1 agar plates, following the same procedure as described for DAC.

#### 2.6.4. Quantitative PCR (qPCR)

**DNA extraction.** Bacterial DNA coming from 1 mL of blood samples was extracted by a specifically designed commercial kit

specifically (MoYsis Complete5, Molzym GmbH & Co. KG, Bremen, Germany) following manufacturer's instructions. The final elution of DNA was done in 100  $\mu$ L of sterile water (PCR grade, Roche Diagnostic, CITY, COUNTRY).

**qPCR assay.** The hydrolysis probes 5' nuclease assay PCR method was used for detecting and quantifying the bacterial DNA. PCR amplification was performed in a total reaction mixture volume of 20  $\mu$ L. The reaction mixtures contained 10  $\mu$ L of 2x TaqMan master mixture, optimal concentrations of primers and probe (300, 300 and 100 nM for *A. actinomycetemcomitans*; 300, 300 and 300 nM for *P. gingivalis*; 300, 300 y 900 nM for *S. oralis*), and 5  $\mu$ L of DNA from the samples. The no-template control (NTC) consisted on 5  $\mu$ L of sterile water. Samples were subjected to an initial amplification cycle of 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min in a thermocycler. Quantification cycle (Cq) values were determined. Quantification was based on standard curves, which were constructed by plotting Cq values generated from qPCR against DNA extracted from serial 10-fold dilutions of purified genomic DNA from each bacterium (log CFU/mL).

#### 2.7. Statistical analysis

The detection limit was established at the lowest concentration in which bacterial growth or presence of DNA was detected for each bacterium.

The main outcome variables were CFU/mL for DAC, LC and qPCR, and prevalence (presence/absence) for BACTEC. In the case of DAC, LC and qPCR, quantitative results (CFU/mL) were also transformed into prevalence data (presence/absence).

In order to evaluate the degree of agreement between each diagnostic method (DAC, BACTEC<sup>®</sup>, LC and qPCR) and bacterial culturing (Sanz et al., 2004), contingency tables were constructed, and sensitivity, specificity, positive and negative predictive values

**Table 1**  
Primer and probe used for the qPCR amplifications.

Bacterial species	Sequence (5'–3')
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (Boutaga, van Winkelhoff, Vandenbroucke-Grauls, & Savelkoul, 2005)	F: GAA CCT TAC CTA CTC TTG ACA TCC GAA R: TGC AGC ACC TGT CTC AAA GC P: 6FAM-AGA ACT CAG AGA TGG GTT TGT GCC TTAGGG-TAMRA
<i>P. gingivalis</i> (Boutaga et al., 2003)	F: GCGCTCAACGTTTCAGCC R: CACGAATTCGCCCTGC P: 6FAM CACTGAACTCAAGCCCGCAGTTTCAA-TAMRA
<i>S. oralis</i> (Sanchez et al., 2014)	F: 5- CAA CGA TAC ATA GCC GAC CTG AG-3 R: 5- TCC ATT GCC GAA GAT TCC-3 P: 6FAM-CTC CTA CGGGAG GCA GCA GTA GGG A-BBQ-3

F: Forward primer, R: Reverse primer, P: Probe. qPCR: quantitative polymerase chain reaction. FAM: 6-carboxyfluorescein TAMRA: 6-carboxytetramethylrhodamine BBQ: BlackBerry Quencher.

Primers and probe sequences targeted 16S ribosomal-RNA (rRNA) genes.

of each technique were determined, considering bacterial culturing as the reference method.

In order to determine the reproducibility of DAC, LC and qPCR, when compared to bacterial culturing (concordance), the Passing-Bablok estimation of regression line was determined. In this regression line, two parameters were interpreted: (a) the constant with its 95% confidence interval (A, 95% CI), indicating constant differences between methods, when it is statistically different from 0; (b) The slope (B, 95% CI), indicating the existence of proportional differences between methods, when it is significantly different from 1. In addition, the Lin's Concordance correlation coefficient of absolute agreement (r) was calculated. In the case of BACTEC<sup>®</sup> system, the global agreement and kappa values were calculated.

These analyses were performed for each technique (DAC, LC, BACTEC, qPCR), and considering: all samples together; only those samples with the same bacteria; only samples with one bacteria (mono-species); and, only samples with a mix of bacteria (multispecies).

Results were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . A software package (IBM SPSS Statistics 21.0; IBM Corporation, Armonk, NY, USA) was used for all data analysis (Table 1).

### 3. Results

#### 3.1. Descriptive results

*Propionibacterium acnes* and Coagulase-negative *Staphylococcus* were detected with BACTEC<sup>®</sup> system. However, they were considered contaminants from either the blood sampling procedures or from laboratory procedures and were not considered in data analyses.

**Table 2**

Data of concentration (CFU/mL) and/or presence of identified bacteria in blood samples contaminated with bacteria individually (mono-species) by each of the four microbiological techniques.

Bacteria	n	Technique					BACTEC Identified bacteria
		Reference CFU/mL [mean(SD)]	DAC CFU/mL [mean(SD)]	LC CFU/mL [mean(SD)]	qPCR CFU/mL [mean(SD)]	BACTEC	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	3	$1.3 \times 10^4(3.1 \times 10^3)$	$4.8 \times 10^3(1.7 \times 10^3)$	$1.8 \times 10^3(1.8 \times 10^2)$	$4.1 \times 10^4(4.4 \times 10^4)$	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	
	3	$1.7 \times 10^2(9.1 \times 10^1)$	$1.1 \times 10^2(1.0 \times 10^1)$	$2.9 \times 10^1(3.2 \times 10^0)$	$8.2 \times 10^1(1.1 \times 10^2)$	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	
	3	$2.0 \times 10^1(0)$	$1.1 \times 10^1(3.2 \times 10^0)$	$3.5 \times 10^0(4.6 \times 10^{-1})$	$9.3 \times 10^0(1.5 \times 10^1)$	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	
<i>P. gingivalis</i>	3	$3.7 \times 10^3(1.3 \times 10^3)$	$9.5 \times 10^2(1.3 \times 10^3)$	$7.4 \times 10^2(6.5 \times 10^2)$	$2.5 \times 10^3(9.7 \times 10^2)$	<i>S. aureus</i>	
	3	$2.7 \times 10^1(2.9 \times 10^1)$	$1.5 \times 10^2(2.4 \times 10^2)$	$1.1 \times 10^1(1.9 \times 10^1)$	$4.3 \times 10^2(2.6 \times 10^2)$	<i>S. aureus</i>	
	3	0(0)	$3.3 \times 10^{-1}(5.8 \times 10^{-1})$	$6.7 \times 10^{-1}(1.2 \times 10^0)$	$4.5 \times 10^1(7.8 \times 10^1)$	<i>P. acnes</i>	
<i>S. oralis</i>	3	$1.5 \times 10^4(8.3 \times 10^3)$	$2.2 \times 10^3(1.4 \times 10^3)$	$1.9 \times 10^3(1.0 \times 10^3)$	$7.4 \times 10^4(1.1 \times 10^5)$	<i>S.oralis</i>	
	3	$2.5 \times 10^2(2.7 \times 10^2)$	$7.9 \times 10^1(5.6 \times 10^1)$	$5.8 \times 10^1(4.0 \times 10^1)$	$2.8 \times 10^3(4.5 \times 10^3)$	<i>S.oralis</i>	
	3	$1.1 \times 10^1(1.1 \times 10^0)$	$9.0 \times 10^0(1.4 \times 10^1)$	$8.9 \times 10^0(9.8 \times 10^0)$	$3.0 \times 10^3(5.2 \times 10^3)$	<i>S.oralis</i>	

DAC: Direct anaerobic culture; LC: Lysis centrifugation; qPCR: quantitative polymerase chain reaction; SD: Standard deviation; CFU: colony forming unit.

DAC, LC, qPCR detected *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *S. oralis* in blood samples while BACTEC<sup>®</sup> did not detect *P. gingivalis* (alone or in combination with other bacteria) and *A. actinomycetemcomitans* (in combination with other bacteria) (Tables 2 and 3). All techniques, except BACTEC<sup>®</sup>, were able to detect the lowest concentration ( $10^1$  CFU/mL) of the target periodontal bacterial species.

None of the culture-based techniques (DAC, LC and BACTEC) detected bacteria in negative controls while qPCR detected *S. oralis* in six negative controls, and *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* in one negative control.

#### 3.2. Diagnostic validity

Table 4 depicts the validity of each tested method (sensitivity, specificity, the predictive values) using the bacterial culture as the reference standard. The highest sensitivity and specificity values were obtained with CDA and LC (from 86.67% for *P. gingivalis* to 100% for *A. actinomycetemcomitans*, *S. oralis* and multi-species group). qPCR had high sensitivity values (73.33% for *P. gingivalis* to 100% for *S. oralis*) and low specificity values (50% for mono-species) becoming to 0% for *S. oralis*. The BACTEC<sup>®</sup> system had the lowest sensitivity values (47.06% for *A. actinomycetemcomitans* and 0% for *P. gingivalis*), while the specificity was the highest for both bacterial species (100%), mono-species group (100%) and 85.71% for *S. oralis*.

#### 3.3. Concordance

CDA and LC reported lower concentration values (CFU/mL) of *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *S. oralis* than the gold standard (Tables 2 and 3). For all bacterial groups, statistically significant differences (constant and proportional) were found

**Table 3**

Data of concentration (CFU/mL) and/or presence of identified bacteria in blood samples contaminated with three combined bacteria (multi-species) by each of the four microbiological techniques.

Bacteria	n	Technique					BACTEC Identified bacteria
		Reference CFU/mL[mean(SD)]	DAC CFU/mL[mean(SD)]	LC CFU/mL[mean(SD)]	qPCR CFU/mL[mean(SD)]		
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	3	$1.3 \times 10^4(3.0 \times 10^3)$	$6.9 \times 10^3(3.4 \times 10^3)$	$2.5 \times 10^3(5.8 \times 10^2)$	$1.2 \times 10^5(2.0 \times 10^5)$	–	
	3	$2.3 \times 10^2(1.5 \times 10^2)$	$1.4 \times 10^2(8.1 \times 10^1)$	$5.2 \times 10^1(1.5 \times 10^1)$	$8.5 \times 10^2(1.3 \times 10^3)$	–	
	3	$1.7 \times 10^1(5.8 \times 10^0)$	$1.5 \times 10^1(7.2 \times 10^0)$	$4.7 \times 10^0(3.1 \times 10^0)$	$5.0 \times 10^{-1}(8.6 \times 10^{-1})$	–	
<i>P. gingivalis</i>	3	$2.2 \times 10^4(2.5 \times 10^3)$	$2.4 \times 10^3(3.3 \times 10^2)$	$1.1 \times 10^2(1.1 \times 10^2)$	$3.7 \times 10^4(5.4 \times 10^4)$	–	
	3	$2.8 \times 10^2(2.6 \times 10^1)$	$7.4 \times 10^1(3.1 \times 10^1)$	$2.5 \times 10^1(1.3 \times 10^1)$	$3.5 \times 10^3(5.9 \times 10^3)$	–	
	3	$1.5 \times 10^1(4.6 \times 10^0)$	$8.0 \times 10^0(1.0 \times 10^0)$	$3.2 \times 10^0(8.0 \times 10^{-1})$	0	–	
<i>S. oralis</i>	3	$5.2 \times 10^3(2.8 \times 10^3)$	$3.5 \times 10^2(3.5 \times 10^2)$	$6.9 \times 10^2(6.3 \times 10^2)$	$1.5 \times 10^5(2.3 \times 10^5)$	<i>S. oralis</i>	
	3	$3.9 \times 10^1(3.7 \times 10^1)$	$1.0 \times 10^1(8.6 \times 10^0)$	$2.1 \times 10^1(2.1 \times 10^1)$	$2.2 \times 10^2(2.8 \times 10^2)$	<i>S. oralis</i>	
	3	$6.7 \times 10^0(5.8 \times 10^0)$	$1.7 \times 10^0(2.1 \times 10^0)$	$1.5 \times 10^0(1.5 \times 10^0)$	$2.5 \times 10^1(3.5 \times 10^1)$	<i>S. oralis</i>	

DAC: Direct anaerobic culture; LC: Lysis centrifugation; qPCR: quantitative polymerase chain reaction; SD, Standard deviation; CFU: colony forming unit.

when compared with the reference method, although the concordance was high for all bacterial groups studied (Table 5).

Quantitative PCR reported higher concentration values (CFU/ml) for *S. oralis* than the reference method (Tables 2 & 3) and demonstrated statistically significant differences with the reference method ( $A = 1.85$ ). No statistically significant differences were found between qPCR and the reference method for *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* or the combination (Table 5).

The BACTEC<sup>®</sup> system showed low concordance values for all bacteria except for *S. oralis* ( $\kappa = 0.89$ ) (Table 6).

#### 4. Discussion

The present *in vitro* investigation was designed to compare four microbiological techniques, three of them previously used in bacteremia studies, targeting *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and/or *S. oralis* in blood samples. Results revealed that: (1) conventional BACTEC<sup>®</sup> haemoculture was not able to identify *P. gingivalis* (alone or in combination), or *A. actinomycetemcomitans* (in combination with *P. gingivalis* and *S.oralis*); (2) the use of DAC

reported the best results in terms of concordance, sensibility and specificity; and (3) DAC, LC and qPCR were able to detect all bacteria, even at the lowest concentrations, ( $10^1$  CFU/mL). However, due to the contamination associated to qPCR, a well-known limitation of this technique (Sanz et al., 2004), it is recommended to establish the detection limit for this technique in future investigations at  $10^2$  CFU/mL for *P. gingivalis* (although false negative results only occurred one out of six times) and  $10^4$  CFU/mL for *S. oralis*.

According to our knowledge, this is the first *in vitro* study comparing four different diagnostic methods (DAC, BACTEC, LC or qPCR), with bacterial culturing as reference (Sanz et al., 2004), for detecting artificially simulated bacteremia with *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *S. oralis*, alone or in combination. Previous publications have only compared two microbiological methods in *in vivo* studies (Bahrani-Mougeot et al., 2008; Castillo et al., 2011; Hutchinson, Thomas, & Shanson, 1992; Kinane et al., 2005; Lockhart et al., 2008; Lucas et al., 2002; Morozumi et al., 2010; Reyes et al., 2013).

**Table 4**

Diagnostic validity indicators of each of the four microbiological techniques (including sensitivity, specificity and predictive values) for the bacteremia diagnosis.

Technique	Bacterial species	n	Prevalence	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
DAC	Overall	71	69.01	97.96	95.46	97.96	95.46
	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	23	73.91	100.00	100.00	100.00	100.00
	<i>P. gingivalis</i>	24	62.50	93.33	88.89	93.33	88.89
	<i>S. oralis</i>	24	70.83	100.00	100.00	100.00	100.00
	Monos-species	35	65.71	95.65	91.67	95.65	91.67
	Multi-species	36	72.22	100.00	100.00	100.00	100.00
LC	Overall	71	69.01	95.92	95.46	97.92	91.30
	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	23	73.91	100.00	100.00	100.00	100.00
	<i>P. gingivalis</i>	24	62.50	86.67	88.89	92.86	80.00
	<i>S. oralis</i>	24	70.83	100.00	100.00	100.00	100.00
	Mono-species	35	65.71	91.30	91.67	95.46	84.62
	Multi-species	36	72.22	100.00	100.00	100.00	100.00
qPCR	Overall	71	69.01	87.76	54.55	80.77	63.16
	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	23	73.91	82.35	83.33	93.33	62.50
	<i>P. gingivalis</i>	24	62.50	73.33	77.78	84.62	63.64
	<i>S. oralis</i>	24	70.83	100.00	0.00	70.83	0.00
	Mono-species	35	65.71	95.65	50.00	78.57	85.71
	Multi-species	36	72.22	76.92	60.00	83.33	50.00
BACTEC	Overall	70	68.57	50.00	95.46	96.00	46.67
	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	23	73.91	47.06	100.00	100.00	40.00
	<i>P. gingivalis</i>	24	62.50	0.00	100.00	0.00	37.50
	<i>S. oralis</i>	23	69.57	100.00	85.71	94.12	100.00
	Mono-species	34	64.71	72.73	100.00	100.00	66.67
	Multi-species	36	72.22	30.77	90.00	88.89	33.33

DAC: Direct anaerobic culture; LC: Lysis centrifugation; qPCR: quantitative polymerase chain reaction; PPV: Positive Predictive value; NPV: Negative Predictive value.

**Table 5**

Diagnostic concordance for DAC, LC and qPCR with the reference standard providing by Passing-Bablok regression intercept (A), slope (B), 95% confidence intervals (CI) and correlation coefficient (r).

Technique	Bacteria	n	A	95% CI		B	95% CI		r
DAC	Overall	71	-0.27	-0.43	-0.17	0.93	0.89	0.96	0.95
	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	23	-0.17	-0.13	-0.10	0.96	0.93	0.98	1.00
	<i>P. gingivalis</i>	24	-0.43	-0.21	-0.15	0.89	0.81	0.95	0.89
	<i>S. oralis</i>	24	-0.44	-0.77	-0.36	0.89	0.80	0.95	0.96
	Mono-species	35	-0.27	-0.27	-0.14	0.93	0.88	0.96	0.92
	Multi-species	36	-0.29	-0.43	-0.18	0.93	0.88	0.96	0.98
LC	Overall	71	-0.42	-0.51	-0.35	0.90	0.87	0.91	0.89
	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	23	-0.37	-0.46	-0.44	0.91	0.88	0.93	0.98
	<i>P. gingivalis</i>	24	-0.60	-1.12	-0.39	0.85	0.72	0.93	0.74
	<i>S. oralis</i>	24	-0.42	-0.47	-0.34	0.90	0.85	0.92	0.97
	Mono-species	35	-0.37	-0.50	-0.35	0.91	0.88	0.93	0.84
	Multi-species	36	-0.49	-0.61	-0.40	0.88	0.84	0.91	0.95
qPCR	Overall	71	0.01	0.23	0.42	1.00	0.91	1.13	0.64
	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	23	-0.23	-1.73	0.01	1.11	1.00	1.71	0.79
	<i>P. gingivalis</i>	24	-0.02	-0.14	0.69	1.00	0.89	1.31	0.65
	<i>S. oralis</i>	24	1.85	1.32	1.97	0.60	0.35	0.92	0.44
	Mono-species	35	0.25	0.16	1.44	0.95	0.56	1.04	0.67
	Multi-species	36	0.28	-0.83	0.02	1.11	0.92	1.55	0.62

DAC: Direct anaerobic culture; LC: Lysis centrifugation; qPCR: quantitative polymerase chain reaction.

The most commonly used diagnostic method to identify periodontal pathogens in peripheral blood has been automated blood culture systems (such as BACTEC<sup>®</sup> system) (Crasta et al., 2009; Daly et al., 2001; Kinane et al., 2005; Lafaurie et al., 2007; Lockhart et al., 2008; Maestre et al., 2008; Messini et al., 1999; Reyes et al., 2013; Tomás et al., 2007; Waghmare, Vhanmane, Savitha, Chawla, & Bagde, 2013) and it has been considered the standard reference in medical bacteremia research (Kinane et al., 2005). However, the results of the present investigation demonstrated that BACTEC<sup>®</sup> system was not able to detect key periodontal pathogens, such as *P. gingivalis* or *A. actinomycetemcomitans*, in blood samples. The presence of false negatives in the results be linked to the inherent difficulties in the cultivation of some specific fastidious bacterial species such as *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans*, which require specific culture media and specific conditions for growth (Alsina et al., 2001; Gibbons and Macdonald, 1960; Shah, Bonnett, Mateen, & Williams, 1979). In fact, both bacterial species have not yielded a positive identification, except in the case of *P. gingivalis*, when using Brucella agar enriched with haemin-menadione (Lafaurie et al., 2007), and *A. actinomycetemcomitans* after using vancomycin in blood agar plates (Crasta et al., 2009; Lockhart et al., 2008). It also needs to be highlighted that BACTEC<sup>®</sup> system does not enable to quantify levels of bacteremia as it requires the use of a liquid enriched medium that oversize the presence of pathogens in peripheral blood (Lucas et al., 2002).

Denta-1, sensitivity, specificity and concordance values for qPCR were lower than those of DAC and LC. In addition, an overestimation in bacterial quantification was observed when comparing qPCR with the standard reference (Tables 2 and 3). This

might be due to the selection of bacterial culturing as reference diagnostic technique, which is only capable of detecting viable bacteria, while qPCR does not discriminate between alive and dead bacteria.

Lysis centrifugation has been considered as the most sensitive quantitative culture technique for the recovery of bacteria in the blood stream (Lockhart et al., 2008; Zhang et al., 2013). Additionally, it was shown to be more sensitive than other blood-culturing techniques, including broth cultures, in detecting bacteremia in small quantities (Henry, Grewell, Van Grevenhof, Ilstrup, & Washington, 1984; Henry, McLimans, Wright, Thompson, Wilson, & Washington, 1983), which is in agreement with the results of the present study. In contrast to LC, DAC technique has never been used (to the best of our knowledge) before in bacteremia investigations. The present study has demonstrated its ability to detect and quantify *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *S. oralis* in blood samples. The reported results showed that both LC and DAC attained the best results in terms of sensitivity, specificity and concordance with the reference standard, although some underestimation in the bacterial quantification was observed, especially in the case of LC.

We are conscious that differences in blood volume used for each technique (based on those recommended for each one) could affect to use of sensitivity, specificity, but in spite of this, DAC achieved the best results in terms of sensitivity and specificity using only a volume of 2 mL of blood. DAC has different additional advantages: a reduced time of processing, a simpler sample processing (since it only requires the direct cultivation of samples on an adequate agar medium) and the relatively lower cost, compared to LC. These considerations might lead to consider DAC as the most appropriate

**Table 6**

Diagnostic concordance for BACTEC system with the standard reference.

Bacteria	Global agreement	Kappa index	95% CI		P value
Overall	64.29%	0.35	0.19	0.00	0.52
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	60.87%	0.32	0.06	0.04	0.57
<i>P. gingivalis</i>	37.50%	0.00	0.00	.	0.00
<i>S. oralis</i>	95.65%	0.89	0.69	0.00	1.1 <sup>a</sup>
Mono-species	82.35%	0.65	0.42	0.00	0.89
Multi-species	47.22%	0.14	-0.05	0.20	0.32

<sup>a</sup> Out of range; CI: Confidence Interval.

technique for bacteremia analysis. Moreover, DAC is considered as the reference standard in the microbiological analysis of plaque samples in GCF (Sanz et al., 2004), and therefore, both oral and blood samples could be processed with the same technology within the same patient.

Culture dependent techniques, however have important disadvantages, as the need of experienced personnel, relatively time-consuming, and the difficulty of detecting slow growing or very fastidious oral bacterial species. Some of these drawbacks can be overcome by molecular techniques, such as qPCR that allows the analysis of large number of samples in short periods of time and it has demonstrated high sensitivity in detecting periodontal pathogens, such as *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *Tannerella forsythia* (Boutaga, van Winkelhoff, Vandenbroucke-Grauls, & Savelkoul, 2003; Lau, Sanz, Herrera, Morillo, Martin, & Silva, 2004; Morillo et al., 2004). The results from this study also showed the ability of qPCR to identify the target species in blood samples, although its sensitivity, specificity and concordance values were lower in comparison with DAC and LC. In addition, with qPCR higher bacterial counts were obtained when compared to the standard of reference (Tables 2 and 3), what may be interpreted to the capability of qPCR to detect both alive and dead bacteria, while culture based tests are only capable of detecting viable bacteria.

In conclusion, the results from this investigation have shown that DAC seems to be the most adequate microbiological method to detect and quantify *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *S. oralis* in blood samples. This study also clearly shows that the conventional BACTEC<sup>®</sup> haemoculture technique is not an adequate method for identifying periodontal pathogens in bacteremia studies. These conclusions, however, must be interpreted with caution in light of the in vitro nature of this investigation, what makes uncertain its extrapolation onto the clinical or in vivo conditions. Furthermore, it is yet unknown whether bacteremia is the result of bacterial invasion as mono or multi-species.

### Conflicts of interest

The authors report no conflicts of interest related to this study.

### Ethical approval

Ethical Approval was given by the local ethical committee (Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain). Reference number: 13/027-E

### Acknowledgements

This work was partially support by a research grant from the ministry of Science and Innovation of Spain (FIS [P11/00542]).

### References

Alsina, M., Olle, E., & Frias, J. (2001). Improved, low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(2), 509–513.

Bahrani-Mougeot, F. K., Paster, B. J., Coleman, S., Ashar, J., Knost, S., Sautter, R. L., & Lockhart, P. B. (2008). Identification of oral bacteria in blood cultures by conventional versus molecular methods. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, 105(6), 720–724.

Boutaga, K., van Winkelhoff, A. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., & Savelkoul, P. H. (2003). Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11), 4950–4954.

Boutaga, K., van Winkelhoff, A. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., & Savelkoul, P. H. (2005). Periodontal pathogens: A quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 45(2), 191–199.

Carmona, I. T., Diz Dios, P., & Scully, C. (2002). An update on the controversies in bacterial endocarditis of oral origin. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, 93(6), 660–670.

Castillo, D. M., Sánchez-Beltrán, M. C., Castellanos, J. E., Sanz, I., Mayorga-Fayad, I., Sanz, M., & Lafaurie, G. I. (2011). Detection of specific periodontal microorganisms from bacteraemia samples after periodontal therapy using molecular-based diagnostics. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(5), 418–427.

Consensus report (1996). Periodontal diseases: Pathogenesis and microbial factors. *Annals of Periodontology*, 1(1), 926–932.

Crasta, K., Daly, C. G., Mitchell, D., Curtis, B., Stewart, D., & Heitz-Mayfield, L. J. (2009). Bacteraemia due to dental flossing. *Journal of Clinical Periodontology*, 36(4), 323–332.

Daly, C. G., Mitchell, D. H., Highfield, J. E., Grossberg, D. E., & Stewart, D. (2001). Bacteremia due to periodontal probing: A clinical and microbiological investigation. *Journal of Periodontology*, 72(2), 210–214.

Figuro, E., Sánchez-Beltrán, M., Cuesta-Frecho, S., Tejerina, J. M., del Castro, J. A., Gutiérrez, J. M., . . . Sanz, M. (2011). Detection of periodontal bacteria in atherosclerotic plaque by nested polymerase chain reaction. *Journal of Periodontology*, 82(10), 1469–1477.

Forner, L., Larsen, T., Kilian, M., & Holmstrup, P. (2006). Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *Journal of Clinical Periodontology*, 33(6), 401–407.

Gaetti-Jardim, E., Marcelino, S. L., Feitosa, A. C., Romito, G. A., & Avila-Campos, M. J. (2009). Quantitative detection of periodontopathic bacteria in atherosclerotic plaques from coronary arteries. *Journal of Medical Microbiology*, 58(Pt 12), 1568–1575.

Gibbons, R. J., & Macdonald, J. B. (1960). Hemin and vitamin K compounds as required factors for the cultivation of certain strains of *Bacteroides melaninogenicus*. *Journal of Bacteriology*, 80, 164–170.

Heimdaahl, A., Hall, G., Hedberg, M., Sandberg, H., Söder, P. O., Tunér, K., & Nord, C. E. (1990). Detection and quantitation by lysis-filtration of bacteremia after different oral surgical procedures. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(10), 2205–2209.

Henry, N. K., McLimans, C. A., Wright, A. J., Thompson, R. L., Wilson, W. R., & Washington, J. A. (1983). Microbiological and clinical evaluation of the isolator lysis-centrifugation blood culture tube. *Journal of Clinical Microbiology*, 17(5), 864–869.

Henry, N. K., Grewell, C. M., Van Grevenhof, P. E., Ilstrup, D. M., & Washington, J. A. (1984). Comparison of lysis-centrifugation with a biphasic blood culture medium for the recovery of aerobic and facultatively anaerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 20(3), 413–416.

Hutchinson, N. A., Thomas, F. D., & Shanson, D. C. (1992). The clinical comparison of Oxoid Signal with Bactec blood culture systems for the detection of streptococcal and anaerobic bacteraemias. *Journal of Medical Microbiology*, 37(6), 410–412.

Kinane, D. F., Riggio, M. P., Walker, K. F., MacKenzie, D., & Shearer, B. (2005). Bacteraemia following periodontal procedures. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(7), 708–713.

Lafaurie, G. I., Mayorga-Fayad, I., Torres, M. F., Castillo, D. M., Aya, M. R., Barón, A., & Hurtado, P. A. (2007). Periodontopathic microorganisms in peripheral blood after scaling and root planing. *Journal of Clinical Periodontology*, 34(10), 873–879.

Lau, L., Sanz, M., Herrera, D., Morillo, J. M., Martin, C., & Silva, A. (2004). 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. *Journal of Clinical Periodontology*, 31(12), 1061–1069.

Lockhart, P. B., Brennan, M. T., Sasser, H. C., Fox, P. C., Paster, B. J., & Bahrani-Mougeot, F. K. (2008). Bacteremia associated with toothbrushing and dental extraction. *Circulation*, 117(24), 3118–3125.

Lucas, V. S., Lytra, V., Hassan, T., Tatham, H., Wilson, M., & Roberts, G. J. (2002). Comparison of lysis filtration and an automated blood culture system (BACTEC) for detection, quantification, and identification of odontogenic bacteremia in children. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(9), 3416–3420.

Maestre, J. R., Mateo, M., & Sánchez, P. (2008). Bacteremia after periodontal procedures. *Revista Espanola de Quimioterapia*, 21(3), 153–156.

Messini, M., Skourti, I., Markopulos, E., Koutsia-Carouzou, C., Kyriakopoulou, E., Kostaki, S., . . . Georgopoulos, A. (1999). Bacteremia after dental treatment in mentally handicapped people. *Journal of Clinical Periodontology*, 26(7), 469–473.

Morillo, J. M., Lau, L., Sanz, M., Herrera, D., Martin, C., & Silva, A. (2004). Quantitative real-time polymerase chain reaction based on single copy gene sequence for detection of periodontal pathogens. *Journal of Clinical Periodontology*, 31(12), 1054–1060.

Morozumi, T., Kubota, T., Abe, D., Shimizu, T., Komatsu, Y., & Yoshie, H. (2010). Effects of irrigation with an antiseptic and oral administration of azithromycin on bacteremia caused by scaling and root planing. *Journal of Periodontology*, 81(11), 1555–1563.

Nakano, K., Nemoto, H., Nomura, R., Inaba, H., Yoshioka, H., Taniguchi, K., . . . Ooshima, T. (2009). Detection of oral bacteria in cardiovascular specimens. *Oral Microbiology and Immunology*, 24(1), 64–68.

Reyes, L., Herrera, D., Kozarov, E., Roldá, S., & Proguiske-Fox, A. (2013). Periodontal bacterial invasion and infection: Contribution to atherosclerotic pathology. *Journal of Periodontology*, 84(Suppl. 4), S30–50.

Sanchez, M. C., Marin, M. J., Figuro, E., Llama-Palacios, A., Leon, R., Blanc, V., . . . Sanz, M. (2014). Quantitative real-time PCR combined with propidium monoazide for the selective quantification of viable periodontal pathogens in an in vitro subgingival biofilm model. *Journal of Periodontal Research*, 49(1), 20–28.

Sanz, M., Lau, L., Herrera, D., Morillo, J. M., & Silva, A. (2004). Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and

- Tannerella forsythensis in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: A review. *Journal of Clinical Periodontology*, 31 (12), 1034–1047.
- Shah, H. N., Bonnett, R., Mateen, B., & Williams, R. A. (1979). The porphyrin pigmentation of subspecies of *Bacteroides melaninogenicus*. *Biochemical Journal*, 180(1), 45–50.
- Tomás, I., Alvarez, M., Limeres, J., Potel, C., Medina, J., & Diz, P. (2007). Prevalence, duration and aetiology of bacteraemia following dental extractions. *Oral Diseases*, 13(1), 56–62.
- Tomás, I., Diz, P., Tobías, A., Scully, C., & Donos, N. (2012). Periodontal health status and bacteraemia from daily oral activities: Systematic review/meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 39(3), 213–228.
- Tonetti, M. S., Van Dyke, T. E., & Working group 1 of the joint EFP/AAP (2013). Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: Consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal of Periodontology*, 84(Suppl. 4), S24–29.
- Waghmare, A. S., Vhanmane, P. B., Savitha, B., Chawla, R. L., & Bagde, H. S. (2013). Bacteremia following scaling and root planing: A clinico-microbiological study. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 17(6), 725–730.
- Zaremba, M., Górska, R., Suwalski, P., & Kowalski, J. (2007). Evaluation of the incidence of periodontitis-associated bacteria in the atherosclerotic plaque of coronary blood vessels. *Journal of Periodontology*, 78(2), 322–327.
- Zhang, W., Daly, C. G., Mitchell, D., & Curtis, B. (2013). Incidence and magnitude of bacteraemia caused by flossing and by scaling and root planing. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(1), 41–52.

## *ARTÍCULO #2*



## ARTÍCULO #2:

### **“Detección y cuantificación de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en bacteriemias inducidas tras cepillado interdental en pacientes periodontalmente sanos y con periodontitis”**

**Objetivo:** Este estudio tuvo como objetivo comparar la presencia y las cantidades de bacteriemia inducida por el cepillado interdental en individuos periodontalmente sanos (H) y con periodontitis (P) utilizando técnicas basadas en cultivo [cultivo anaerobio directo (CAD)] y molecular [reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR)] en un modelo de estudio transversal.

**Material y métodos:** Después de una evaluación periodontal de boca completa, se tomaron muestras de sangre antes y 1 minuto después del cepillado interdental aplicado profesionalmente. Estas muestras fueron analizadas por CAD y qPCR, dirigidas a la detección de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*. También se recogieron y analizaron muestras subgingivales. Se utilizaron las pruebas T de Student, Chi-cuadrado y las correlaciones para analizar los datos.

**Resultados:** Se incluyeron 30 individuos por grupo. *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* se detectaron con la técnica de qPCR, pero no con CAD. Al inicio del estudio, se observó bacteriemia en 5 pacientes con P (16.7%) y en 2 individuos H (6.6%) ( $p = 0.421$ ). Después del cepillado interdental, la bacteriemia sólo se observó en 2 pacientes con P (6.6%) ( $p = 0.901$ ). Se observó una correlación positiva entre los niveles subgingivales y sanguíneos de *A. actinomycetemcomitans* ( $r = 0.3$ ;  $p = 0.013$ ).

**Conclusión:** La bacteriemia relacionada con *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* no aumentó significativamente después de una sola sesión de uso de cepillos interdentales.





Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Oral Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/archoralbio](http://www.elsevier.com/locate/archoralbio)

## Detection and quantification of *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in bacteremia induced by interdental brushing in periodontally healthy and periodontitis patients

Nagore Ambrosio<sup>a</sup>, María José Marín<sup>a</sup>, Estefanía Laguna<sup>b</sup>, David Herrera<sup>a</sup>, Mariano Sanz<sup>a</sup>, Elena Figuero<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Etiology and Therapy of Periodontal Diseases (ETEP) Research Group, University Complutense, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Section of Post-Graduate Periodontology – Faculty of Odontology, University Complutense, Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Bacteremia  
Periodontitis  
Interdental brush  
*Porphyromonas gingivalis*  
*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

### ABSTRACT

**Objective:** This study was aimed to compare the presence and amounts of bacteremia induced by interdental brushing in periodontally healthy (H) and periodontitis (P) individuals using culture based (direct culture [DC]) and molecular based techniques (real-time quantitative polymerase chain reaction [qPCR]) in a cross-sectional study model.

**Materials and methods:** After a full mouth periodontal evaluation, blood samples were taken before and 1 min after professionally-administered interdental brushing. These samples were analyzed by DC and qPCR, targeting *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Subgingival samples were also collected and analyzed. Student t-test, chi-squared tests and correlations were used for analyzing the data.

**Results:** Thirty individuals per group were included. *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* were detected with qPCR methods, but not with DC. At baseline, bacteremia was observed in 5 P patients (16.7%) and in 2 H individuals (6.6%) ( $p = 0.421$ ). After interdental brushing, bacteremia was only observed in 2 P patients (6.6%) ( $p = 0.901$ ). A positive correlation between subgingival and blood levels of *A. actinomycetemcomitans* was observed ( $r = 0.3$ ;  $p = 0.013$ ).

**Conclusion:** Bacteremia related to *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* did not significantly increase after a single session of use of interdental brushes.

### 1. Introduction

Periodontitis is characterized by loss of periodontal tissue support (clinical attachment loss) due to inflammation (Papapanou et al., 2018). The presence of subgingival biofilm has been described as its primary etiological factor (Genco, Kornman, & Williams, 1996; Sanz, van Winkelhoff, Working Group 1 of Seventh European Workshop on, & P., 2011), being *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* key pathogens leading to dysbiosis through altering the balance with the host homeostasis and leading to disease (Hajishengallis, Darveau, & Curtis, 2012; Sanz et al., 2017).

Bacteremia has been defined as the transit or continuous presence of

viable bacteria in the bloodstream (Carmona, Diz Dios, & Scully, 2002). In periodontitis the pathogenic subgingival microbiota is located in intimate contact with the ulcerated epithelium of periodontal pockets (Marsh, 2005). This makes plausible the translocation of pathogenic bacteria to the bloodstream (Parahitiyawa, Jin, Leung, Yam, & Samaranayake, 2009). Chronic low-level bacteremia has been suggested as a direct mechanism to explain the proven associations between periodontitis and cardiovascular diseases (Tonetti et al., 2007) or adverse pregnancy outcomes (Sanz, Kornman, Working group 3 of joint, & E. F. P. A. A. P. w., 2013). Several studies have demonstrated the presence of *P. gingivalis* or *A. actinomycetemcomitans* in atherosclerotic plaques, aneurysms of the abdominal aorta and heart valves (Calandrini

**Abbreviations:** BOP, bleeding on probing; CFU/mL, colony forming units/mL; DC, direct culture; H, periodontally healthy individuals; P, periodontitis individuals; PD, probing depth; PII, plaque index; qPCR, real-time quantitative polymerase chain reaction; REC, recession; SD, standard deviation

\* Corresponding author at: Etiology and Therapy of Periodontal Diseases (ETEP) Research Group, Department of Dental Clinical Specialties, Faculty of Odontology, University Complutense of Madrid, Plaza Ramón y Cajal, s/n (Ciudad Universitaria), 28040 Madrid, Spain.

**E-mail addresses:** [nambrosio@ucm.es](mailto:nambrosio@ucm.es) (N. Ambrosio), [mjmarin@ucm.es](mailto:mjmarin@ucm.es) (M.J. Marín), [estefanialaguna@periocentrum.com](mailto:estefanialaguna@periocentrum.com) (E. Laguna), [davidher@ucm.es](mailto:davidher@ucm.es) (D. Herrera), [marsan@ucm.es](mailto:marsan@ucm.es) (M. Sanz), [elfiguer@ucm.es](mailto:elfiguer@ucm.es) (E. Figuero).

<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.11.025>

Received 6 October 2018; Received in revised form 21 November 2018; Accepted 22 November 2018

0003-9969/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

et al., 2014; Figuero et al., 2011, 2014; Mahendra, Mahendra, Felix, & Romanos, 2013). In addition, *in vitro* studies have shown that *P. gingivalis* can induce through bacteremia coronary aortic atherosclerotic lesions in normocholesterolemic pigs (Brodala et al., 2005).

The incidence of bacteremia has been associated with every-day activities (Ratto-Tespestini et al., 2016), oral hygiene procedures [tooth brushing (Forner, Larsen, Kilian, & Holmstrup, 2006; Kinane, Riggio, Walker, MacKenzie, & Shearer, 2005; Lockhart et al., 2008) or interdental cleaning (Crasta et al., 2009)] and periodontal interventions, such as periodontal probing (Daly, Mitchell, Highfield, Grossberg, & Stewart, 2001), scaling and root planing (Castillo et al., 2011; Kinane et al., 2005; Zhang, Daly, Mitchell, & Curtis, 2013), or periodontal surgery (Lineberger & De Marco, 1973; Pineiro et al., 2010). There is, however, a wide variability on reported prevalence (0 to 80%), which might be explained by differences in the microbiological techniques (Marin et al., 2017) or by differences in the periodontal condition of the included individuals (Tomas, Diz, Tobias, Scully, & Donos, 2012). In a recent study from our research group, four different techniques were utilized to evaluate blood samples and the bacteremia outcome was compared demonstrating that direct culture (DC) and real time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) were the best strategies to study bacteremia (Marin et al., 2017). Furthermore, it has been demonstrated that gingival inflammation increase the prevalence of cumulative exposure to bacteremia after tooth brushing (Tomas et al., 2012), suggesting a different risk of bacteremia in patients with different periodontal diagnoses.

It was, therefore, the aim of this study to compare the presence and amounts of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* in blood samples after interdental brushing procedures in individuals with periodontitis (P) and in those being periodontally healthy (H) using a culture-based technique (DC) and a molecular based approach (qPCR). As secondary outcome, the correlation between the microbiological counts identified in the subgingival and blood samples were studied.

## 2. Material and methods

### 2.1. Study design

This was a cross-sectional study model, whose protocol was approved by the ethical committee at the Hospital Clínico San Carlos, Madrid (Spain). The study procedures were carried out according to the Declaration of Helsinki, the Universal Declaration of UNESCO and the Council of Europe Convention.

### 2.2. Study population

Individuals were consecutively selected among those attending the dental clinics at the Faculty of Dentistry in the University Complutense of Madrid (UCM), Spain. The screening period lasted from January 2013 to July 2015.

Individuals older than 30 years old and with at least 3 teeth per quadrant were included and divided into two different groups. Periodontitis group consisted on individuals with a diagnosis of periodontitis [probing depth (PD) greater than 5 mm and bone loss greater than 30% in at least 50% of the teeth] (Tonetti et al., 2007). Periodontally healthy individuals were those presenting bleeding on probing (BOP) in less than 25% of the sites, and no loss of periodontal attachment. Individuals that have received periodontal treatment in the last year or systemic antibiotics within the previous 3 months or chronic intake of anti-inflammatory drugs were excluded. Pregnant or lactating females, individuals who smoked more than 10 cigarettes per day, had congenital or acquired immune deficiencies or any other relevant systemic disease (hematological disorders, congenital or acquired heart defects, diabetes) or having suffered previous problems with venipuncture were also excluded.

### 2.3. Study visits

#### 2.3.1. Screening visit

Those individuals fulfilling the inclusion and exclusion criteria were asked to participate in this study and once they were explained on the detailed characteristics and needed study visits, they were enrolled if they agreed to participate by signing the approved informed consent form.

#### 2.3.2. Baseline visit

A full mouth periodontal examination was performed by the same trained examiner (ELV) using a CPC 12 periodontal probe (Hu-Friedy Europe, Rotterdam, The Netherlands). The following outcome variables were assessed at six sites per tooth, excluding 3<sup>rd</sup> molars: (1) PD and recession (REC) in millimeters; (2) Plaque index (PII) as presence/absence visually or detected by probe (Ainamo & Bay, 1975) and (3) BOP, as presence/absence 30 s after probing (Ainamo & Bay, 1975). All patients received an orthopantomography to evaluate bone loss.

#### 2.3.3. Intervention visit

The intervention visit was carried out one week after the baseline visit. All individuals were asked to avoid any oral hygiene procedure before the venipuncture and to avoid eating solid foods during the meal prior to this appointment.

Blood samples were taken throughout venipuncture prior and 1 min after the interdental brushing. Interdental cleaning was performed using an interdental brush (Interprox®, Dentaïd, Cerdanyola, Spain), with the most appropriate size for each interdental space, always by the same trained investigator (NAE). This procedure was carried out for a total time of 2 min in all interdental spaces distal to the canines. Immediately after the venipuncture, subgingival samples were taken.

### 2.4. Blood samples

After skin disinfection with alcohol, an intravenous catheter was inserted into the antecubital fossa or on the dorsum of the arm using a conventional technique (Vacutainer™, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) according to the recommendations of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (Loza Fernández, Planes, & Rodríguez, 2003). For each patient, peripheral venous blood samples were collected in EDTA tubes (Vacutainer®, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) before and 1 min after the session of interdental tooth brushing. The final blood volume sample extracted each time was 4 mL, which was divided in half to be processed either by DC or by qPCR.

### 2.5. Subgingival samples

Samples were taken using two consecutive sterile medium paper points (#30, Maillefer, Ballaigues, Switzerland) in each site. Before sampling, cotton rolls and compressed air was applied in each site in order to avoid contamination. Paper points were kept in place for 10 s and after were introduced into a vial containing 1.5 mL of reduced transport fluid (RTF) (Mombelli, Schmid, Rutar, & Lang, 2002). In P group, from each quadrant, the most accessible site with the deepest PD and BOP was selected. In H individuals a standard site was chosen, from the mesio-buccal site of the first molars, if absent, from the adjacent second molar (when absent next choice would be the second premolar).

### 2.6. Sample analyses

Blood and subgingival samples were immediately sent to the Research Laboratory of the Faculty of Dentistry (UCM), where they were processed by DC and qPCR techniques. Samples for DC were immediately analyzed and those for qPCR were processed for bacterial DNA extraction and stored at -20 °C until being processed.

Blood samples were processed according to a validated methodology previously described (Marin et al., 2017, 2016). Briefly, in DC analyses, blood samples (aliquots of 0.1 mL and 0.5 mL) were plated onto non-selective blood agar (Blood Agar Base II®, Oxoid, Basingstoke, England), supplemented with hemin (5 mg/L), menadione (1 mg/L) and 5% sterile horse blood and onto a selective medium Dentaaid-1 (Alsina, Olle, & Frias, 2001) plates. Non-selective blood agar plates were incubated for 7–14 days of anaerobic incubation (80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> and 10% H<sub>2</sub>). From these plates, bacterial identification was based on Gram stain and cellular morphology, aerotolerance, catalase production and was confirmed by the use of standard biochemical tests (RapID™ ANA II System, Remel, Lenexa, KS, USA). According selective medium Dentaaid-1 for the detection of *A. actinomycetemcomitans* were incubated for 3 days in air with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. The identification was based on the typical morphology of its colony (internal star structure), its positive catalase reaction and the use of a series of specific enzymes (RapID™ NH System, Remel, Lenexa, KS, USA).

For quantitative qPCR, bacterial DNA was extracted using a commercial kit specifically designed to extract bacterial DNA in blood samples (MoYsis Complete5, Molzym GmbH & Co.KG, Bremen, Germany) following manufacturer's instructions. The sequence of the primers and probes used for *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* have been previously reported (Boutaga, van Winkelhoff, Vandenbroucke-Grauls, & Savelkoul, 2005; Boutaga, van Winkelhoff, Vandenbroucke-Grauls, & Savelkoul, 2003) (Table 1). The hydrolysis probes 5' nuclease assay PCR method was used for detecting and quantifying the bacterial DNA. PCR amplification was performed in a total reaction mixture volume of 20 µL. Samples were subjected to an initial amplification cycle of 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min in a thermocycler. Quantification was based on standard curves, which were constructed by plotting Cq values generated from qPCR against DNA extracted from serial 10-fold dilutions of purified genomic DNA from each bacterium (log CFU/mL). Each sample was analyzed in duplicate and in two independent qPCR assays performed in different days. Detection limit were defined by the quantification cycle values (Cq) obtained from four NTCs (No Template Control) included in each plate, which monitor contamination and primer-dimer formation that could produce false positive results (Marin et al., 2017). These thresholds correspond to around 10<sup>1</sup> CFU/mL (Cq: 37).

Subgingival samples were analyzed by DC. The methodology used was previously described in (Oteo et al., 2010). Briefly, samples were vortex and 100 µL were diluted in 900 µL of phosphate buffer saline (PBS), serially diluted (1:10) and aliquots of 0.1 mL were then plated on non-selective blood agar and Dentaaid-1 plates and the same steps as those described for blood samples were followed.

## 2.7. Statistical analysis

Sample size calculation could not be performed due to high variability in the frequency of bacteremia previously reported after oral hygiene or other physiologic maneuvers (between 0–45% for healthy

and 3.3–41% for periodontitis individuals). A convenience sample of 30 individuals per group was, therefore, selected based on previous bacteremia studies (Crasta et al., 2009; Forner et al., 2006; Hartzell, Torres, Kim, & Wortmann, 2005; Kinane et al., 2005; Zhang et al., 2013).

The primary outcome variable was the presence/absence of bacteremia after interdental brushing. Secondary outcome variables included all other microbiological variables: total anaerobic counts, frequency of detection of target pathogens, counts of each studied pathogen and proportions of flora of each pathogen and clinical variables (PD, BOP, REC, PII).

A subject-level analysis was performed for each study parameter. Data were expressed by means and standard deviation (SD), prevalence and proportions (%) for all variables. After evaluating the normality of the distribution (assessed by the Kolmogorov-Smirnov test), both groups (P and H) were compared by Student's T-test in case of quantitative variables and chi-square tests in case of categorical variables. Correlation analysis between subgingival samples and blood samples was performed by Pearson correlation test.

The level of statistical significance was set at  $p < 0.05$ . A statistical software package IBM®SPSS Statistics 21.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) was used for the data analysis.

## 3. Results

### 3.1. Sample description

From a total of 367 screened individuals, 292 did not meet the inclusion criteria and 15 refused to participate. Finally, 60 individuals were recruited to participate in the study, 30 in each group (P and H). Data from this sample population is depicted in Table 2.

### 3.2. Periodontal outcome variables

Data from clinical outcome variables is depicted in Table 3. PII, PD, BOP, REC and bone loss were significantly higher in P patients ( $p < 0.001$ ). Probing depths were 4.11 mm (SD = 0.71) in the P versus 1.82 mm (SD = 0.24) in H individuals. Similarly, BOP percentages were significantly higher in the P group (70.1% [SD = 25.5%]) versus 7.8% [SD = 5.6%].

### 3.3. Bacteremia

Results of detection and quantification of *P. gingivalis* or *A. actinomycetemcomitans* in blood samples are presented in Table 4. At baseline, DC was not able to detect *P. gingivalis* or *A. actinomycetemcomitans* in any blood sample. However, it was able to detect *F. nucleatum* in one patient, with a concentration of  $1 \times 10^1$  colony forming units (CFU)/mL. *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* were also detected in three patients, but they were considered as contaminants, either from the catheter-extraction or from laboratory procedures, and therefore, they were excluded from the

**Table 1**  
Primer and probe used for the real-time quantitative polymerase chain reaction amplifications.

Bacterial species	Sequence (5'–3')
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	F: GAA CCT TAC CTA CTC TTG ACA TCC GAA
	R: TGC AGC ACC TGT CTC AAA GC
	P: 6FAM-AGA ACT CAG AGA TGG GTT TGT GCC TTAGGG-TAMRA
<i>P. gingivalis</i>	F: GCG CTC AAC GTT CAGC
	R: CAC GAA TTC CGC CTGC
	P: 6FAM-CAC TGA ACT CAA GCC CGG CAG TTT CAA-TAMRA

**Table 2**  
Demographics data for the periodontitis and periodontally healthy groups.

	Healthy	Periodontitis	<i>p</i> -value
Age (years) [mean (SD)]	41.7 (9.8)	52.3 (9.3)	0.001*
Sex [n (%)]			
Male	13 (43.3)	16 (53.3)	0.438
Female	17 (56.7)	14 (46.7)	0.438
Smoking [n (%)]			
Non-smoker	25 (83.3)	23 (76.7)	0.519
Smoker	5 (16.7)	7 (23.3)	0.519
<i>N</i> cigarettes/day [mean (SD)]	0.9 (2.2)	2.1 (3.7)	0.131

SD: standard deviation.

\* Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).

**Table 3**  
Mean values and standard deviation (SD) of clinical variables.

	Healthy Mean (SD)	Periodontitis Mean (SD)	p-value
PII (%)	20.59 (14.63)	81.25 (27.04)	< 0.001 <sup>*</sup>
PD (mm)	1.82 (0.24)	4.11 (0.71)	< 0.001 <sup>*</sup>
BOP (%)	7.81 (5.65)	70.14 (25.49)	< 0.001 <sup>*</sup>
REC (mm)	0.06 (0.11)	1.15 (0.88)	< 0.001 <sup>*</sup>

BOP: bleeding on probing; PD: probing depth; PII: plaque index; REC: recession; SD: standard deviation.

\* Statistically significant differences (p < 0.05).

analyses. With qPCR, *P. gingivalis* was detected in blood samples coming from 2 (6.6%) H and 5 (16.7%) P individuals, with mean concentrations of  $1.2 \times 10^2$  CFU/mL (SD =  $3.7 \times 10^1$ ) and  $9.25 \times 10^1$  CFU/mL ( $7.2 \times 10^0$ ), respectively. After interdental brushing, *P. gingivalis* or *A. actinomycetemcomitans* were not detected, neither by DC nor by qPCR in H individuals, while in the P group, one blood sample was positive for *P. gingivalis* ( $6.7 \times 10^1$  CFU/mL) and another for *A. actinomycetemcomitans* ( $2.6 \times 10^2$  CFU/mL) (p = 0.901) with qPCR. *Actinomyces* spp. was detected by DC in one patient with a concentration of  $2.0 \times 10^1$  CFU/mL. Patients with positive samples after interdental brushing were not the same as those found at baseline.

### 3.4. Subgingival samples

Table 5 depicts data on detection of pathogens from subgingival samples, including their frequency of detection, and mean concentrations and proportions.

*Prevotella intermedia* was the most prevalent bacterial species in P individuals (97%) followed by *P. gingivalis* (90%). *Fusobacterium nucleatum* was the most prevalent periodontal bacteria in H patients (90%). Differences between study groups were statistically significant for *P. gingivalis* (p = 0.004), *P. intermedia* (p = 0.006) and *T. forsythia* (p = 0.001).

The total anaerobic counts in subgingival samples was  $9.06 \times 10^6$  CFU/mL (SD =  $4.33 \times 10^7$ ) and  $1.16 \times 10^7$  CFU/mL (SD =  $1.18 \times 10^7$ ) in H and P individuals, respectively, but differences were not statistically significant (p = 0.762). Significantly higher counts (CFU/mL) were found for *P. gingivalis* (p = 0.001), *P. intermedia* (p = 0.003), *T. forsythia* (p = 0.014) and *P. micra* (p = 0.008) in P compared to H individuals. In the latter, the highest counts were found for *F. nucleatum*, with statistically significant differences between groups (p = 0.025).

The proportions of *P. gingivalis* and *T. forsythia* were significantly higher (p < 0.01) in P compared to H patients (26.8% and 1.8%,

respectively, for *P. gingivalis*; 5.2% and 0.5%, respectively, for *T. forsythia*).

### 3.5. Correlation of subgingival samples and positive blood samples after interdental brushing

In the P individual where *A. actinomycetemcomitans* was detected in blood samples after interdental brushing ( $2.6 \times 10^2$  CFU/mL), the patient also demonstrated the highest counts of *A. actinomycetemcomitans* in the subgingival sample ( $6.2 \times 10^5$  CFU/mL). The correlation between *A. actinomycetemcomitans* levels in blood and subgingival samples was statistically significant (r = 0.3; p = 0.013). This patient presented 82% of PII, 100% of BOP and a mean PD of 5.3 mm.

In the P individual who harbored *P. gingivalis* after interdental brushing ( $6.7 \times 10^1$  CFU/mL), the counts of *P. gingivalis* in the subgingival sample were  $1.57 \times 10^5$  CFU/mL. The correlation between the levels of *P. gingivalis* in blood and subgingival samples was not statistically significant (r = -0.05; p = 0.687). This patient presented 77% of PII, 85% of BOP and a mean PD of 4.2 mm.

## 4. Discussion

The present study was designed to determine the prevalence and levels of *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* in blood samples, before and after the professional use of interdental brushes, using two microbiological techniques in P and H individuals. Results revealed that: (1) in blood samples, while DC was not able to detect *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans*, qPCR detected both bacterial species; (2) *A. actinomycetemcomitans* was not detected in blood in baseline, but appeared in one blood sample in a P individual (prevalence = 3.3%, counts =  $2.6 \times 10^2$  CFU/mL) after the use of interdental brushes; (3) *P. gingivalis* was detected in two H (6.6%) and in 5 (16.7%) P individuals at baseline and in one (3.3%) P individual after interproximal tooth brushing (counts range:  $6.7 \times 10^1$  CFU/mL to  $1.2 \times 10^2$  CFU/mL); (4) correlations between *A. actinomycetemcomitans* levels in blood and subgingival samples were statistically significant (r = 0.3; p = 0.013).

The results on the prevalence of *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* were in agreement with those from Kinane et al. (Kinane et al., 2005) and Forner et al. (Forner et al., 2006) (0% at baseline and 3–5% after manual tooth brushing in H, gingivitis or P patients). However, these values were lower than those reported by Crasta et al. (Crasta et al., 2009), Lockhart et al. (Lockhart et al., 2008) or Zhang et al. (Zhang et al., 2013), with reported ranges between 22–54% after manual tooth brushing or flossing. It should be emphasized that this study aimed to identify two specific bacteria, rather than analyzing general bacteremia. Therefore, comparisons with other studies should be done with caution. In regards to the amounts of reported bacteremia,

**Table 4**  
Prevalence and concentration of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* in blood samples by both techniques.

	<i>A. actinomycetemcomitans</i>				<i>P. gingivalis</i>			
	DC Pre	Post	qPCR Pre	Post	DC Pre	Post	qPCR Pre	Post
Prevalence, n (%)								
H	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (6.6)	0 (0)
P	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (3.3)	0 (0)	0 (0)	5 (16.7)	1 (3.3)
p-value	-	-	-	0.901	-	-	0.421	0.901
Concentration (CFU/mL) [Mean (SD)]								
H	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	$1.2 \times 10^2$ ( $3.7 \times 10^1$ )	0 (0)
P	0 (0)	0 (0)	0 (0)	$2.6 \times 10^2$	0 (0)	0 (0)	$9.25 \times 10^1$ ( $7.2 \times 10^0$ )	$6.7 \times 10^1$
p-value	-	-	-	0.324	-	-	0.421	0.901

DC: Direct culture; qPCR: real time quantitative polymerase chain reaction.

Pre: Before interdental tooth brushing; Post: After interdental brushing.

P: Periodontitis individuals; H: periodontally healthy individuals.

SD: standard deviation.

**Table 5**

Frequency of detection (%), mean counts (in colony forming units, CFU/mL) and mean proportions of microbiota (%) of periodontal pathogens in subgingival samples.

	Aa	Pg	Pi	Fn	Cr	Ec	Tf	Capo	Pm
Prevalence n (%)									
H	3 (10)	17 (57)	21 (70)	27 (90)	2 (7)	5 (17)	5 (17)	5 (17)	11 (37)
P	6 (20)	27 (90)	29 (97)	27 (90)	1 (3)	4 (13)	22 (73)	3 (10)	12 (40)
p-value	0.278	0.004 <sup>*</sup>	0.006 <sup>*</sup>	1.000	0.554	0.718	< 0.001 <sup>*</sup>	0.448	0.791
Concentration CFU/mL [Mean (SD)]									
H	9.30 × 10 <sup>2</sup> (3.93 × 10 <sup>3</sup> )	1.57 × 10 <sup>4</sup> (2.62 × 10 <sup>4</sup> )	2.40 × 10 <sup>4</sup> (5.54 × 10 <sup>4</sup> )	7.69 × 10 <sup>4</sup> (2.19 × 10 <sup>5</sup> )	8.17 × 10 <sup>3</sup> (4.03 × 10 <sup>4</sup> )	2.03 × 10 <sup>3</sup> (5.50 × 10 <sup>3</sup> )	1.06 × 10 <sup>4</sup> (5.47 × 10 <sup>4</sup> )	1.20 × 10 <sup>3</sup> (5.47 × 10 <sup>3</sup> )	7.90 × 10 <sup>3</sup> (1.91 × 10 <sup>4</sup> )
P	3.41 × 10 <sup>4</sup> (1.19 × 10 <sup>5</sup> )	4.42 × 10 <sup>6</sup> (6.79 × 10 <sup>6</sup> )	3.85 × 10 <sup>5</sup> (6.18 × 10 <sup>5</sup> )	2.96 × 10 <sup>5</sup> (4.67 × 10 <sup>5</sup> )	4.67 × 10 <sup>3</sup> (2.56 × 10 <sup>4</sup> )	1.80 × 10 <sup>4</sup> (7.54 × 10 <sup>4</sup> )	4.80 × 10 <sup>5</sup> (9.77 × 10 <sup>5</sup> )	1.03 × 10 <sup>4</sup> (4.02 × 10 <sup>4</sup> )	2.20 × 10 <sup>5</sup> (4.07 × 10 <sup>5</sup> )
p-value	0.139	0.001 <sup>*</sup>	0.003 <sup>*</sup>	0.025 <sup>*</sup>	0.689	0.257	0.014 <sup>*</sup>	0.227	0.008 <sup>*</sup>
Mean proportions of microbiota % [Mean (SD)]									
H	0.2 (0.8)	1.8 (2.8)	3.5 (6.1)	5.7(6.7)	1.4 (5.5)	0.1 (0.4)	0.5 (1.3)	0.3 (1.2)	1.1 (2.4)
P	0.5 (1.7)	26.8 (26.4)	4.7 (4.8)	3.1 (3.2)	0.2 (0.9)	0.3 (1.5)	5.2 (6.8)	0.1 (0.2)	3.0 (8.8)
p-value	0.457	< 0.001 <sup>*</sup>	0.387	0.059	0.224	0.442	0.001 <sup>*</sup>	0.261	0.258

Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; Pg: *Porphyromonas gingivalis*; Pi: *Prevotella intermedia*; Fn: *Fusobacterium nucleatum*; Cr: *Campylobacter rectus*; Ec: *Eikenella corrodens*; Tf: *Tannerella forsythia*; Capo: *Capnocytophaga* spp.; Pm: *Parvimonas micra*.

H: periodontally healthy individuals; P: Periodontitis individuals; SD: Standard deviation.

\* Statistically significant differences (p < 0.05).

our total counts are higher (6.7x10<sup>1</sup> CFU/mL for *P. gingivalis* and 2.6x10<sup>2</sup> CFU/mL for *A. actinomycetemcomitans*) than those observed by Zhang et al. (Zhang et al., 2013) (mean = 7.4 x10<sup>0</sup> CFU/mL; SD = 16.2) or by Forner et al. (Forner et al., 2006) (mean = 0.11 CFU/mL; SD = 0.11). These differences might be attribute to the microbiological methods used, to the periodontal condition of the individuals assayed or to the intervention selected to trigger bacteremia.

The use of different microbiological techniques might justify the heterogeneity in the results reported by different studies. In a recent bacteremia microbiological methodology study, comparing the following methods: DC, qPCR, BACTEC<sup>®</sup> (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) and lysis centrifugation, DC and qPCR demonstrated the best diagnostic capability to identify periodontal pathogens in blood samples (Marin et al., 2017), with thresholds of detection > 1 × 10<sup>1</sup> CFU/mL (*A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*). In fact, the use of BACTEC<sup>®</sup>, lysis filtration or direct culturing for detection *A. actinomycetemcomitans* in bacteremia, has only reported one positive individual in each of three studies (Crasta et al., 2009; Lockhart et al., 2008; Zhang et al., 2013) and none showed positive detection of *P. gingivalis*. It should be noted that BACTEC<sup>®</sup> and lysis filtration systems are used in a hospital environment to detect and identify bacteria in a more general way, not being specific for periodontal bacteria. The studies that used BACTEC<sup>®</sup>, lysis filtration or direct culturing, do not use any specific medium plates for periodontal bacteria isolation. On the other hand, qPCR was able to detect *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* in two periodontitis patients after interdental brushing. This result may be in partial accordance with authors such as Lockhart et al. and Kinane et al. that complement the haemoculture system with a qualitative PCR molecular based technique. In the case of Kinane et al. (Kinane et al., 2005; Lockhart et al., 2008), it was observed that the prevalence of 3% obtained with haemoculture was increased up to 13% when it was analyzed with PCR. These results may strengthen the importance of using appropriate microbiological techniques, with specific grow mediums or molecular technique without the use of specific primers.

Concerning the periodontal diagnosis, the results from this investigation showed that the two individuals with positive bacteremia after interdental brushing were periodontitis patients. The patient with the worst PD and BOP values status corresponded to the individual positive to bacteremia with *A. actinomycetemcomitans*. These findings are in line with previous studies reporting that bacteremia was more likely in individuals with worse periodontal status (deep PD and BOP) (Daly et al., 2001; Lockhart et al., 2009; Parahitiyawa et al., 2009; Tomas et al., 2012).

Professionally performed interdental brushing during 2 min was the intervention selected in the present research to trigger bacteremia, resulting in 6.6% cases of bacteremia. Previous studies using interdental devices such as flossing (Crasta et al., 2009; Zhang et al., 2013) or brushing together with the use of interdental sticks (Madsen, 1974) have reported higher prevalence data (30–54%), what suggests that a unique episode of interdental brushing may not be of sufficient to induce bacteremia.

The present study has some limitations that should be considered when interpreting the results, including the lack of sample size calculation and the high number of positive blood samples at baseline. The presence of these positive samples might be explained by the evidence that daily activities such as chewing or oral hygiene procedures could be related with a chronic cumulative exposure effects of small amounts of periodontal pathogens in vascular system (Guntheroth, 1984; Reyes, Herrera, Kozarov, Roldan, & Progulske-Fox, 2013; Roberts, 1999). In conclusion, this study has shown that bacteremia related to *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* did not significantly increase after a single session of use of interdental brushes.

#### Authors contribution

Nagore Ambrosio:

- Conception and study design.
- Acquisition and analysis of data: Patient recruitment, bacteremia induction, transport blood sampling to the laboratory, blood cultivation and DNA extraction.
- Interpretation of data.
- Drafting the article.
- Final approval of the version.

M<sup>®</sup> José Marin:

- Conception and study design.
- Acquisition of data: blood cultivation and qPCR analyses
- Interpretation of data.
- Drafting the article.
- Final approval of the version.

Estefanía Laguna:

- Acquisition of data: Patient recruitment, Full-mouth periodontal examination.

- Interpretation of data.
- Revising it critically for important intellectual content.
- Final approval of the version.

David Herrera:

- Conception and study design.
- Interpretation of data.
- Revising it critically for important intellectual content.
- Final approval of the version.

Mariano Sanz:

- Conception and study design.
- Interpretation of data.
- Revising it critically for important intellectual content.
- Final approval of the version.

Elena Figuero:

- Conception and study design.
- Data analyses.
- Interpretation of data.
- Revising it critically for important intellectual content.
- Final approval of the version.

## Funding

This study was partially supported by a grant from the Ministry of Science and Innovation of Spain (FIS [PI11/00542]).

## Conflict of interests

The authors declare that there are no conflicts of interest related to this study.

## Acknowledgments

Authors would like to thank Rosa Simón, Ana O'Connor, Itziar González and Leire Virto from the Research Laboratory of the Faculty of Odontology, University Complutense of Madrid.

## References

- Ainamo, J., & Bay, I. (1975). Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *International Dental Journal*, 25(4), 229–235.
- Alsina, M., Olle, E., & Frias, J. (2001). Improved, low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(2), 509–513.
- Boutaga, K., van Winkelhoff, A. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., & Savelkoul, P. H. (2003). Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11), 4950–4954.
- Boutaga, K., van Winkelhoff, A. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., & Savelkoul, P. H. (2005). Periodontal pathogens: A quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 45(2), 191–199.
- Brodala, N., Merricks, E. P., Bellinger, D. A., Damrongri, D., Offenbacher, S., Beck, J., et al. (2005). *Porphyromonas gingivalis* bacteremia induces coronary and aortic atherosclerosis in normocholesterolemic and hypercholesterolemic pigs. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(7), 1446–1451.
- Calandrini, C. A., Ribeiro, A. C., Gonnelli, A. C., Ota-Tsuzuki, C., Rangel, L. P., Saba-Chujfi, E., et al. (2014). Microbial composition of atherosclerotic plaques. *Oral Diseases*, 20(3), e128–134.
- Carmona, I. T., Diz Dios, P., & Scully, C. (2002). An update on the controversies in bacterial endocarditis of oral origin. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 93(6), 660–670.
- Castillo, D. M., Sanchez-Beltran, M. C., Castellanos, J. E., Sanz, I., Mayorga-Fayad, I., Sanz, M., et al. (2011). Detection of specific periodontal microorganisms from bacteremia samples after periodontal therapy using molecular-based diagnostics. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(5), 418–427.
- Crasta, K., Daly, C. G., Mitchell, D., Curtis, B., Stewart, D., & Heitz-Mayfield, L. J. (2009). Bacteremia due to dental flossing. *Journal of Clinical Periodontology*, 36(4), 323–332.
- Daly, C. G., Mitchell, D. H., Highfield, J. E., Grossberg, D. E., & Stewart, D. (2001). Bacteremia due to periodontal probing: A clinical and microbiological investigation. *The Journal of Periodontology*, 72(2), 210–214.
- Figuero, E., Lindahl, C., Marin, M. J., Renvert, S., Herrera, D., Ohlsson, O., et al. (2014). Quantification of periodontal pathogens in vascular, blood, and subgingival samples from patients with peripheral arterial disease or abdominal aortic aneurysms. *The Journal of Periodontology*, 85(9), 1182–1193.
- Figuero, E., Sanchez-Beltran, M., Cuesta-Frechoso, S., Tejerina, J. M., del Castro, J. A., Gutierrez, J. M., et al. (2011). Detection of periodontal bacteria in atheromatous plaque by nested polymerase chain reaction. *The Journal of Periodontology*, 82(10), 1469–1477.
- Forner, L., Larsen, T., Kilian, M., & Holmstrup, P. (2006). Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *Journal of Clinical Periodontology*, 33(6), 401–407.
- Genco, R., Korman, K., & Williams, R. (1996). Consensus report. Periodontal diseases: Pathogenesis and microbial factors. *Annals of Periodontology*, 1(1), 926–932.
- Guntheroth, W. G. (1984). How important are dental procedures as a cause of infective endocarditis? *The American Journal of Cardiology*, 54(7), 797–801.
- Hajishengallis, G., Darveau, R. P., & Curtis, M. A. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nature Reviews Microbiology*, 10(10), 717–725.
- Hartzell, J. D., Torres, D., Kim, P., & Wortmann, G. (2005). Incidence of bacteremia after routine tooth brushing. *The American Journal of the Medical Sciences*, 329(4), 178–180.
- Kinane, D. F., Riggio, M. P., Walker, K. F., MacKenzie, D., & Shearer, B. (2005). Bacteremia following periodontal procedures. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(7), 708–713.
- Lineberger, L. T., & De Marco, T. J. (1973). Evaluation of transient bacteremia following routine periodontal procedures. *The Journal of Periodontology*, 44(12), 757–762.
- Lockhart, P. B., Brennan, M. T., Sasser, H. C., Fox, P. C., Paster, B. J., & Bahrani-Mougeot, F. K. (2008). Bacteremia associated with toothbrushing and dental extraction. *Circulation*, 117(24), 3118–3125.
- Lockhart, P. B., Brennan, M. T., Thornhill, M., Michalowicz, B. S., Noll, J., Bahrani-Mougeot, F. K., et al. (2009). Poor oral hygiene as a risk factor for infective endocarditis-related bacteremia. *Journal of the American Dental Association*, 140(10), 1238–1244.
- Loza Fernández, E., Planes, A., & Rodríguez, M. (2003). *Procedimientos en Microbiología Clínica: Haemocultivos*. España: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Madsen, K. L. (1974). Effect of chlorhexidine mouthrinse and periodontal treatment upon bacteremia produced by oral hygiene procedures. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 82(1), 1–7.
- Mahendra, J., Mahendra, L., Felix, J., & Romanos, G. (2013). Prevalence of periodontopathogenic bacteria in subgingival biofilm and atherosclerotic plaques of patients undergoing coronary revascularization surgery. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 17(6), 719–724.
- Marin, M. J., Ambrosio, N., Virto, L., Diz, P., Alvarez, M., Herrera, D., et al. (2017). Detection and quantification of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus oralis* in blood samples with different microbiological identification methods: An in vitro study. *Archives of Oral Biology*, 74, 55–62.
- Marin, M. J., Figuero, E., Gonzalez, I., O'Connor, A., Diz, P., Alvarez, M., et al. (2016). Comparison of the detection of periodontal pathogens in bacteremia after tooth brushing by culture and molecular techniques. *Medicina Oral, Patología Oral Y Cirugía Bucal*, 21(3), e276–284.
- Marsh, P. D. (2005). Dental plaque: Biological significance of a biofilm and community life-style. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(Suppl 6), 7–15.
- Mombelli, A., Schmid, B., Rutar, A., & Lang, N. P. (2002). Local antibiotic therapy guided by microbiological diagnosis. *Journal of Clinical Periodontology*, 29(8), 743–749.
- Oteo, A., Herrera, D., Figuero, E., O'Connor, A., Gonzalez, I., & Sanz, M. (2010). Azithromycin as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of *Porphyromonas gingivalis*-associated periodontitis: A pilot study. *Journal of Clinical Periodontology*, 37(11), 1005–1015.
- Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., et al. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *The Journal of Periodontology*, 89(Suppl 1), S173–S182.
- Parahitayawa, N. B., Jin, L. J., Leung, W. K., Yam, W. C., & Samaranyake, L. P. (2009). Microbiology of odontogenic bacteremia: Beyond endocarditis. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 46–64 Table of Contents.
- Pineiro, A., Tomas, I., Blanco, J., Alvarez, M., Seoane, J., & Diz, P. (2010). Bacteremia following dental implants' placement. *Clinical Oral Implants Research*, 21(9), 913–918.
- Ratto-Tespestini, A. C., Perez-Chaparro, P. J., Romito, G. A., Figueiredo, L. C., Favari, M., Carillo, H. P., et al. (2016). Comparison of independent and dependent culture methods for the detection of transient bacteremia in diabetic subjects with chronic periodontitis. *Biomedica*, 36(1), 156–161.
- Reyes, L., Herrera, D., Kozarov, E., Roldan, S., & Progluske-Fox, A. (2013). Periodontal bacterial invasion and infection: Contribution to atherosclerotic pathology. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(Suppl 14), S30–50.
- Roberts, G. J. (1999). Dentists are innocent! "Everyday" bacteremia is the real culprit: A review and assessment of the evidence that dental surgical procedures are a principal cause of bacterial endocarditis in children. *Pediatric Cardiology*, 20(5), 317–325.
- Sanz, M., Beighton, D., Curtis, M. A., Cury, J. A., Dige, I., Dommisch, H., et al. (2017). Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 44(Suppl 18), S5–S11.

- Sanz, M., Kornman, K., Working group 3 of joint, & E. F. P. A. A. P. w (2013). Periodontitis and adverse pregnancy outcomes: Consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(Suppl. 14), S164–169.
- Sanz, M., van Winkelhoff, A. J., & Working Group 1 of Seventh European Workshop on, P (2011). Periodontal infections: Understanding the complexity—Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(Suppl. 11), 3–6.
- Tomas, I., Diz, P., Tobias, A., Scully, C., & Donos, N. (2012). Periodontal health status and bacteraemia from daily oral activities: Systematic review/meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 39(3), 213–228.
- Tonetti, M. S., D’Aiuto, F., Nibali, L., Donald, A., Storry, C., Parkar, M., et al. (2007). Treatment of periodontitis and endothelial function. *The New England Journal of Medicine*, 356(9), 911–920.
- Zhang, W., Daly, C. G., Mitchell, D., & Curtis, B. (2013). Incidence and magnitude of bacteraemia caused by flossing and by scaling and root planing. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(1), 41–52.



## *ARTÍCULO #3*



### **ARTÍCULO #3:**

#### **“Validación de un ensayo de qPCR múltiple para la detección y cuantificación de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*: estudio *in vitro* y en muestras subgingivales”**

**Objetivo:** Validar un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real múltiple (m-qPCR) para la identificación y cuantificación simultánea de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* en muestras subgingivales.

**Material y métodos:** Para el estudio *in vitro*, se prepararon combinaciones de ADN de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* en concentraciones similares o diferentes. Las técnicas de qPCR simple y m-qPCR se realizaron utilizando los mismos cebadores y sondas de hidrólisis específicas para los genes 16S rRNA. Los resultados se analizaron utilizando los coeficientes de correlación (r) intraclase (ICC) y de Lin basados en los valores del ciclo de cuantificación (Cq). Para el estudio *in vivo*, se empleó un estudio transversal que analizó muestras subgingival recogidas de pacientes con periodontitis y periodontalmente sanos. Las muestras fueron procesadas por qPCR simple y m-qPCR dirigidas a ambas bacterias. La sensibilidad, la especificidad, los valores predictivos y los coeficientes de correlación de Lin (r) se calcularon utilizando unidades formadoras de colonias (UFC)/mL, como resultado primario.

**Resultados:** En el estudio *in vitro*, m-qPCR produjo una buena reproducibilidad (coeficientes de variación alrededor del 1% e ICC > 0.99) para ambas especies bacterianas; m-qPCR alcanzó límites de detección y especificidad similares a qPCR simple; y se observó una excelente concordancia (r = 0.99) entre m-qPCR y qPCR para *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos. En el estudio *in vivo*, se obtuvo una alta sensibilidad (superior al 80%) y especificidad (100%) con m-qPCR para ambas bacterias; la técnica m-qPCR produjo una buena concordancia en los valores de Cq, mostrando un buen nivel de acuerdo entre qPCR y m-qPCR.

**Conclusión:** El método m-qPCR probado fue exitoso en la cuantificación simultánea de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, con un alto grado de sensibilidad y especificidad en muestras subgingivales.





Contents lists available at ScienceDirect

## Archives of Oral Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/archoralbio](http://www.elsevier.com/locate/archoralbio)

# Validation of a multiplex qPCR assay for the identification and quantification of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: *In vitro* and subgingival plaque samples

MJ. Marin\*, N. Ambrosio, D. Herrera, M. Sanz, E. Figuero

Etiology and Therapy of Periodontal Diseases (ETEP) Research Group, University Complutense, Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
 Multiplex quantitative PCR  
 Periodontitis  
 Microbiology  
 Validation

## ABSTRACT

**Objective:** To validate a multiplex qPCR (m-qPCR) assay for the simultaneous identification and quantification of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival samples.

**Material and methods:** *In vitro samples:* DNA combinations of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* in similar or different concentrations were prepared. qPCR and m-qPCR were performed using the same primers and hydrolysis probes specific for 16S rRNA genes. Results were analyzed using intra-class (ICCs) and Lin's correlation coefficients (r) based on quantification cycle (Cq) values. *Subgingival plaque samples:* a cross-sectional study analyzing subgingival plaque samples harvested from periodontally-healthy and chronic periodontitis patients. Samples were processed by either qPCR or m-qPCR targeting both bacteria. Sensitivity, specificity, predictive values and Lin's correlation coefficients (r) were calculated using CFU/mL as primary outcome.

**Results:** *In vitro samples:* m-qPCR yielded a good reproducibility (coefficients of variation around 1% and ICCs > 0.99) for both bacterial species. m-qPCR achieved detection limits and specificity similar to qPCR. An excellent concordance (r = 0.99) was observed between m-qPCR and qPCR for *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* without statistical significant differences between both methods. *Subgingival plaque samples:* a high sensitivity (above 80%) and specificity (100%) was obtained with the m-qPCR for both bacteria. The m-qPCR yielded a good concordance in Cq values, showing a good level of agreement between qPCR and m-qPCR.

**Conclusion:** The tested m-qPCR method was successful in the simultaneous quantification of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*, with a high degree of sensitivity and specificity on subgingival plaque samples.

## 1. Introduction

Periodontitis is a chronic inflammatory condition characterised by the destruction of tooth supporting tissues. The primary etiological factor of this disease is the pathogenic bacterial species within the subgingival biofilm (APP, 1996). Although there are more than 700 different bacterial species in symbiosis with the host within the human oral cavity (Aas, Paster, Stokes, Olsen, & Dewhirst, 2005), only a small fraction of these bacteria have the potential to cause dysbiosis and induce the metabolic changes responsible of periodontal tissue destruction (Sanz et al., 2017). Amongst these bacteria with pathogenic potential, two species, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* have been clearly associated in many clinical studies with the initiation and progression of periodontitis (Slots & Ting, 1999). Moreover, in recent years, *P. gingivalis* has been identified in experimental studies as a key pathogen in promoting the dysbiotic environment leading to the chronic inflammatory changes characteristic

of the periodontitis lesion (Hajishengallis & Lamont, 2012). The appropriate detection and quantification of these periodontal pathogens in subgingival plaque samples, therefore, seems appropriate for the diagnosis, risk assessment and treatment planning of periodontitis patients (van Winkelhoff & Winkel, 2005).

For many years, bacterial culturing was considered the gold standard method for detecting bacterial pathogens residing in subgingival biofilms (Sanz, Lau, Herrera, Morillo, & Silva, 2004). This technique, however, has clear limitations, namely it is relatively time-consuming and expensive, it needs experienced personnel and it is difficult to identify and isolate cultivable species when present in low abundance or those species with stringent growing conditions (Morillo, Lau, Sanz, Herrera, & Silva, 2003; Sanz et al., 2004). In fact, most of the bacterial species present in the subgingival biofilms are considered as non-cultivable, since they have only been identified by molecular methods. To overcome these limitations, techniques based on molecular methods such as the polymerase chain reaction (PCR) assays have been

\* Corresponding author at: Research Laboratory, Faculty of Odontology (University Complutense), Plaza Ramón y Cajal, s/n (Ciudad Universitaria), 28040 Madrid, Spain.  
 E-mail address: [mjmarin@ucm.es](mailto:mjmarin@ucm.es) (M. Marin).

<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.01.012>

Received 24 October 2017; Received in revised form 16 January 2018; Accepted 17 January 2018  
 0003-9969/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

developed. Among them, the quantitative real-time PCR (qPCR) provides a precise and sensitive method for an accurate quantification of individual periodontal pathogenic bacterial species with high sensitivity and specificity using fluorescence signals (Boutaga, Savelkoul, Winkel, & van Winkelhoff, 2007). These assays allow the detection of pathogens with slow or difficult growth in culture (Boutaga, van Winkelhoff, Vandenbroucke-Grauls, & Savelkoul, 2003; Yoshida et al., 2003). Previous studies from our research group have shown a high sensitivity and specificity of qPCR technology in detecting and quantifying target periodontal microorganisms (Morillo et al., 2003, 2004) and when compared to standard culturing techniques they demonstrated a positive predictive value (0.92) in detecting *P. gingivalis* in periodontitis patients (Lau et al., 2004).

Recently, a different modality of qPCR, the multiplex qPCR (m-qPCR) has been successfully used in microbiological diagnosis (Puenpa, Suwannakarn, Chansaenroj, Vongpunawad, & Poovorawan, 2017) and specifically in periodontology (Figuro et al., 2014; Miranda et al., 2017; Montero et al., 2017; Nagaoka et al., 2017; Zhou et al., 2015, 2017). The m-qPCR assay takes the analysis one step further, allowing simultaneous amplification of different target sequences from the same sample, what implies a clear reduction in time and cost (Bolivar, Rojas, & García, 2013). These m-qPCR assays, however, have not been validated in the identification and quantification of periodontal pathogenic bacteria. Only Milne et al. (2016) developed a multiplex assay aimed to subgingival plaque samples, but using primers targeting single copy genes (Rgpa and IlkA), instead of 16S rRNA sequences (Milne et al., 2016). Most real-time qPCR assays for the quantification of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* use 16S rRNA sequences, a small subunit of DNA present in all bacterial species that contains highly conserved species-specific sequences (Al-Hebshi, Shuga-Aldin, Al-Sharabi, & Ghandour, 2014; Heid, Stevens, Livak, & Williams, 1996; Marin et al., 2017; Sánchez et al., 2017). The study by Milne et al. (2016) only reported results from m-qPCR, without presenting the comparison with the gold-standard technique, qPCR. It is, therefore, the objective of this study to validate the m-qPCR for the simultaneous detection of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*.

## 2. Material and methods

### 2.1. In vitro samples

The primer-hydrolysis probe set were designed to target 16S rRNA gene from *A. actinomycetemcomitans* and for *P. gingivalis* strains. To test the sensitivity (detection limit) of this primer/hydrolysis probe combination, we used a series of 10-fold dilutions of known DNA concentrations of the reference strains. To test the specificity (cross-reactions) qPCR assays were performed with DNA from the reference strains of non-target species: *Tannerella forsythia* (strain ATCC 43037), *Fusobacterium nucleatum* (strain DMSZ 20482), *Campylobacter rectus* (strain NCTC 11489), *Streptococcus oralis* (strain CECT 907T) and *A. actinomycetemcomitans* (strain DSMZ 8324) (in assays with primers/hydrolysis probe of *P. gingivalis*) or *P. gingivalis* (strain ATCC 33277) (in assays with primers/hydrolysis probe of *A. actinomycetemcomitans*). DNA of each non-target species was included in qPCR reactions individually or pooled as a DNA mixture of all non-target bacteria. Primer and probe specificity was also checked in silico by BLAST analysis (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

To compare the quantification data (Cq) between qPCR and m-qPCR, pure culture samples of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* the following experiments were used:

- Serial dilutions from  $10^8$  to  $10^1$  colony forming units (CFU)/mL of purified genomic DNA of *P. gingivalis* (n = 8).
- Serial dilutions from  $10^8$  to  $10^1$  CFU/mL of purified genomic DNA of pure *A. actinomycetemcomitans* (n = 8).

c A combination of DNA from serial dilutions of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* in similar concentrations (from  $10^8$  to  $10^1$  CFU/mL) (n = 8).

d A combination of DNA from serial dilutions of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* in different concentrations:

- P. gingivalis* ( $10^8$  CFU/mL) and *A. actinomycetemcomitans* (serial dilutions from  $10^5$  to  $10^1$  CFU/mL) (n = 5).
- A. actinomycetemcomitans* ( $10^8$  CFU/mL) and *P. gingivalis* (serial dilutions from  $10^5$  to  $10^1$  CFU/mL) (n = 5).

Each DNA sample was analysed by both assays (qPCR and m-qPCR) in duplicate in different experiments in three separated days (n = 3).

#### 2.1.1. Strains

Reference strains (*A. actinomycetemcomitans* strain DSMZ 8324, *P. gingivalis* strain ATCC 33277) were grown on blood agar plates (Oxoid No. 2 Blood Agar, Oxoid, Basingstoke, UK) supplemented with horse blood 5% (Oxoid), haemin (5.0 mg/l) (Sigma, St. Louis, MO, USA) and menadione (1 mg/l) under anaerobic conditions (10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, and balanced N<sub>2</sub>) at 37 °C for 24–72 h. BHI media (Brain Heart Infusion, Becton, Dickinson and Company, USA) were used to grow bacteria under anaerobic conditions for 24–48 h (depending on the bacterial species) until reaching the exponential phase of growth (as measured by spectrophotometry at optical density 550 nm). From each BHI medium containing *A. actinomycetemcomitans* or *P. gingivalis* at the desired concentration, 1 mL was taken and vortexed. Then, each vial was centrifuged at 13,000 rpm for 1 min, and the supernatant was discarded. The resultant pellets were frozen to –20 °C until DNA extraction.

#### 2.1.2. DNA extraction

Bacterial DNA from each vial was extracted using a commercial kit specifically designed to extract bacterial DNA in blood samples (MoYsis Complete5, Molzym GmbH & Co. KG, Bremen, Germany) following manufacturer's instructions. Finally the extracted DNA was eluted in 100 µL of sterile water (Roche) and frozen at –20 °C for further analysis.

#### 2.1.3. qPCR assay

All qPCR procedures were conducted by a single experienced and blinded personnel (MJM).

#### 2.1.4. PCR primers and hydrolysis probes

The sequence of the primers and hydrolysis probes used for *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* targeted 16S ribosomal-RNA (rRNA) genes (Table 1) (Boutaga, van Winkelhoff, Vandenbroucke-Grauls, & Savelkoul, 2005). For qPCR, the oligonucleotide hydrolysis probes of both bacteria were labelled with the fluorescent dyes 6-

**Table 1**  
Primers and hydrolysis probes used for the qPCR amplifications.

Bacterial species	Sequence (5'–3')
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (Boutaga et al., 2005)	Primer F: GAA CCT TAC CTA CTC TTG ACA TCC GAA
	Primer R: TGC AGC ACC TGT CTC AAA GC
	Probe: FAM-AGA ACT CAG AGA TGG GTT TGT GCC TTAGGG-TAMRA
	Probe qPCR: FAM-CACTGAACCTAAGCCCCGGCAGTTTCAA-TAMRA
<i>P. gingivalis</i> (Boutaga et al., 2003)	Primer F: GCGCTCAACGTTTCAGCC
	Primer R: CACGAATTCGCGCTGC
	Probe qPCR: FAM-CACTGAACCTAAGCCCCGGCAGTTTCAA-TAMRA
	Probe m-qPCR: HEX5'-CACTGAACCTAAGCCCCGGCAGTTTCAA-BHQ1

F: Forward. R: Reverse; FAM: 6-carboxyfluorescein; TAMRA: 6-carboxy-tetramethylrhodamine; HEX: hexachloro-fluorescein phosphoramidite; BHQ1: Black Hole Quencher1; qPCR: quantitative polymerase chain reaction; m-qPCR: multiplex qPCR.

carboxyfluorescein (FAM) with a covalently attached at the 5' end and 6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) attached at the 3' end.

For m-qPCR, the fluorescent oligonucleotide hydrolysis probe of *A. actinomycetemcomitans* were also labelled with a reporter dye FAM attached at the 5' end and TAMRA attached at the 3' end, while *P. gingivalis* oligonucleotide hydrolysis probe were dually labelled with the fluorescent dyes HEX5' (hexachloro-fluorescein phosphoramidite) at the 5' end and BHQ1 (Black Hole Quencher-1) at the 3' end.

The hydrolysis probes 5'nuclease assay PCR method was used for detecting and quantifying the bacterial DNA. PCR amplification was performed in a total reaction mixture volume of 10  $\mu$ L. The reaction mixtures contained 5  $\mu$ L of 2 $\times$  TaqMan master mixture (LC 480 Probes Master, Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany), optimal concentrations of primers and hydrolysis probe (300, 300 and 100 nM for *A. actinomycetemcomitans* and 300, 300 and 300 nM, for *P. gingivalis*) and 2.5  $\mu$ L of DNA from the samples. In case of m-qPCR, primers and hydrolysis probes from *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* were also mixed in such concentrations. The no-template control (NTC) consisted on 2.5  $\mu$ L of sterile water.

Samples were subjected to an initial amplification cycle of 95  $^{\circ}$ C for 10 min, followed by 40 cycles at 95  $^{\circ}$ C for 15 s and 60  $^{\circ}$ C for 1 min in LightCycler<sup>®</sup> 480 II thermocycler (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany). Each DNA sample was analysed in duplicate on one 384-well plate in each one of the three experiments performed in different days. Each plate included a standard curve with DNA of target bacteria (acting as internal calibration control) and a NTC. All assays were developed with a linear quantitative detection range established by the slope range of 3.3–3.6 cycles/log decade,  $r^2 > 0.997$  and an efficiency range of 1.9–2.0. Quantification cycle values (Cq), defined as the PCR cycle number at which fluorescence rises above the baseline, were determined.

### 2.1.5. Statistical analysis

Quantification cycle values (Cq) were considered the main outcome variables for this study. In relation to reproducibility, means and standard deviations (SD) were obtained to calculate the coefficient of variation (CV) for each DNA concentration. A reliability analysis was carried out using intra-class correlation coefficients (ICCs) with a two-way random effects model (absolute agreement). In order to determine the concordance of m-qPCR when compared to qPCR, the Passing-Bablok estimation of regression line was determined. In this regression line, two parameters were interpreted: (a) the constant with its 95% confidence interval (A, 95% CI), indicating constant differences between methods, when it is statistically different from 0; (b) the slope (B, 95% CI), indicating the existence of proportional differences between methods, when it is significantly different from 1. In addition, the Lin's Concordance correlation coefficient of absolute agreement ( $r$ ) was calculated.

The level of statistical significance was set at  $p < 0.05$ . A statistical software package IBM<sup>®</sup>SPSS Statistics 21.0 was used for the data analysis.

## 2.2. Subgingival plaque samples

Subgingival samples were consecutively collected from subjects volunteering for this investigation among those attending the dental clinics at the Faculty of Odontology, University Complutense, Madrid (Spain).

This cross-sectional study was approved by the ethical committee from Hospital Clínico Universitario de San Carlos, Madrid (Spain). All participants signed a written informed consent and the study procedures were conducted according to the Declaration of Helsinki, the Council of Europe Convention, the Universal Declaration of UNESCO and the requirements of the Spanish legislation.

Participating subjects were included if they were older than 30 years and had at least 3 teeth per quadrant. Depending on their clinical

diagnosis, two groups were included, according to the following criteria:

- Moderate to severe chronic periodontitis (ChP): probing pocket depth (PPD) deeper than 5 mm and bone loss greater than 30% in at least 50% of the teeth (Tonetti et al., 2007).
- Periodontally healthy patients: defined as bleeding on probing (BOP) in less than 25% of sites, with no loss of attachment.

Patients were excluded if they had received periodontal treatment in the last year and/or if they had used systemic antibiotics within the previous 3 months.

The following clinical variables were assessed using a CPC-12 periodontal probe (Hu-Friedy Europe, Rotterdam, Holland) by a trained operator (NAE) at six sites per tooth, in all teeth except 3rd molars:

- Plaque index (PI), as present/absent, visually or detected with probe (Ainamo&Bay 1975).
- Probing Pocket Depth (PPD) and gingival recession (REC) in millimeters.
- Bleeding on probing (BOP), recorded as present/absent 30 s after probing (Ainamo&Bay 1975).

In each patient an orthopantomography (OPG) was performed in order to assess radiographic bone loss.

The concentrations of targeted bacteria (CFU/mL) obtained by qPCR and m-qPCR in each subgingival plaque sample were compared considering qPCR as the gold standard.

### 2.2.1. Sample collection

In the healthy group, GCF samples were taken from the mesio-buccal sites of the first molars and, when absent, from the adjacent second molars (the next alternative would be the second premolars and from there, any teeth present mesially). In ChP patients, GCF samples were taken from the most accessible site with the deepest PPD and BOP, per quadrant.

Samples were collected with two consecutive sterile medium paper points inserted in the sulcus/pocket (#30, Maillefer, Ballaigues, Switzerland). Prior to sampling, the selected sites were isolated from saliva and supragingival contamination with the use of cotton rolls and compressed air. The paper points were inserted subgingivally, kept in place for 10 s and then transferred into a screw-capped vial, containing 1 mL of reduced transport fluid (RTF) (Syed & Loesche, 1972). Samples were vortexed and paper points of each vial were removed. Then, samples were centrifuged at 13,000 rpm for 3 min, and the supernatant were discarded. The resultant pellets were frozen to  $-20^{\circ}$ C to DNA extraction.

### 2.2.2. Bacterial DNA extraction and analysis by qPCR

The same protocol (including test to establish detection limit) as described in the *in vitro* study was used.

### 2.2.3. Statistical analysis

Demographical and clinical data of the patient groups (age, PI, PPD, REC and BOP) were expressed by means and standard deviation (SDs) and compared by student *T*-tests. The concentration of each target bacteria in GCF samples was considered the main outcome variable. These concentrations were calculated from the standard curve of serially diluted reference strains. Quantitative results were expressed in CFU/mL, log transformed and expressed in mean values and SD. All bacterial quantitative data from all subjects were considered (including values below 100 CFU/ml). An independent *T*-test was used to compare these mean counts (log) between healthy and ChP patients using both techniques (qPCR and m-qPCR). Passing-bablok estimation of regression line and Lin's concordance correlation coefficient of absolute agreement were determined using qPCR as the diagnostic reference

standard. Qualitative results (presence or absence of both pathogens) using both diagnostic methods were presented with contingency tables. The chi-squared test was used to compare detection frequency between both study groups (H and ChP) using both techniques (qPCR and m-qPCR). In addition, all diagnostic parameters (sensitivity, specificity, positive and negative predictive values and positive and negative likelihood ratios) were calculated using qPCR as the diagnostic reference standard.

The level of statistical significance was set at  $p < 0.05$ . A statistical software package IBM®SPSS Statistics 21.0 was used for the data analysis.

### 3. Results

#### 3.1. In vitro samples

##### 3.1.1. Analytical sensitivity (detection limit) and specificity (cross-reaction) of m-qPCR

The detection limit and cross-reactions of m-qPCR assay were similar to qPCR. In terms of sensitivity both qPCR detected as few as 100 CFU/mL for *A. actinomycetemcomitans* and for *P. gingivalis*. Standard curves were found to be linear from  $10^2$  to  $10^8$  CFU/mL (Fig. 1 and Fig. 2).

The primers and hydrolysis probes for each bacteria (*A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*) specifically amplified the bacterial DNA, whereas no amplifications were detected with any of the other bacterial species tested (range from  $10^1$  to  $10^6$  CFU/mL). When DNA with more than  $10^6$  CFU/mL from non-targeting bacterial cells was present (alone or mixed with DNA from  $\leq 10^2$  CFU/ml of target bacteria), unspecific amplifications were detected in qPCR assay.

##### 3.1.2. Reproducibility, reliability and concordance

Mean, and SD, Cq values for both techniques are presented in Tables 2A and 2B. The coefficients of variations were around 1% in most of

samples, revealing a high reproducibility for both qPCR and m-qPCR.

When comparing mean values of Cq in m-qPCR and qPCR, no statistically significant differences (constant and proportional) for both bacterial species (*A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*) were observed (Table 3). An excellent concordance (correlation coefficient,  $r$ : 0.99) was observed between m-qPCR and the reference standard (qPCR) for both bacteria. The reliability analysis provided values of ICCs higher than 0.99 ( $p < 0.01$ ), therefore demonstrating a highly statistically significant reproducibility (Table 4).

#### 3.2. Subgingival plaque samples

From a total of 367 subject screened from 2012 to 2015, 292 did not meet the inclusion criteria. From the 75 subject that meet the criteria, 15 refused to participate. Finally, a sample population of sixty patients was recruited to participate in the study, 30 with a diagnosis of ChP and 30 periodontally healthy. In the periodontally healthy group, mean PPD was 1.82 mm (SD = 0.24 mm) and mean BOP 7.8% (SD = 5.6%). In patients with ChP, mean PPD and BOP values were 4.11 mm (SD = 0.71 mm) and 70.1% (SD = 25.5%), respectively ( $p < 0.001$ ). There were 17 females (56.7%) in the healthy group and 14 females (46.7%) in the ChP group ( $p > 0.05$ ). The mean age was 41.7 (SD = 9.8) years for the healthy group and 52.3 (SD = 9.3) years for the ChP group ( $p < 0.001$ ).

Table 5 describes the prevalence and mean counts (log CFU/mL) of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* in subgingival plaque samples from the two groups detected by both diagnostic methods (qPCR and m-qPCR). Similar CFU/mL mean values were detected by qPCR and m-qPCR. A slight decline was observed in regards frequency of detection of both bacteria by m-qPCR. No significant differences were detected between the two diagnostic methods for either mean counts and prevalences in any of the patient's groups.

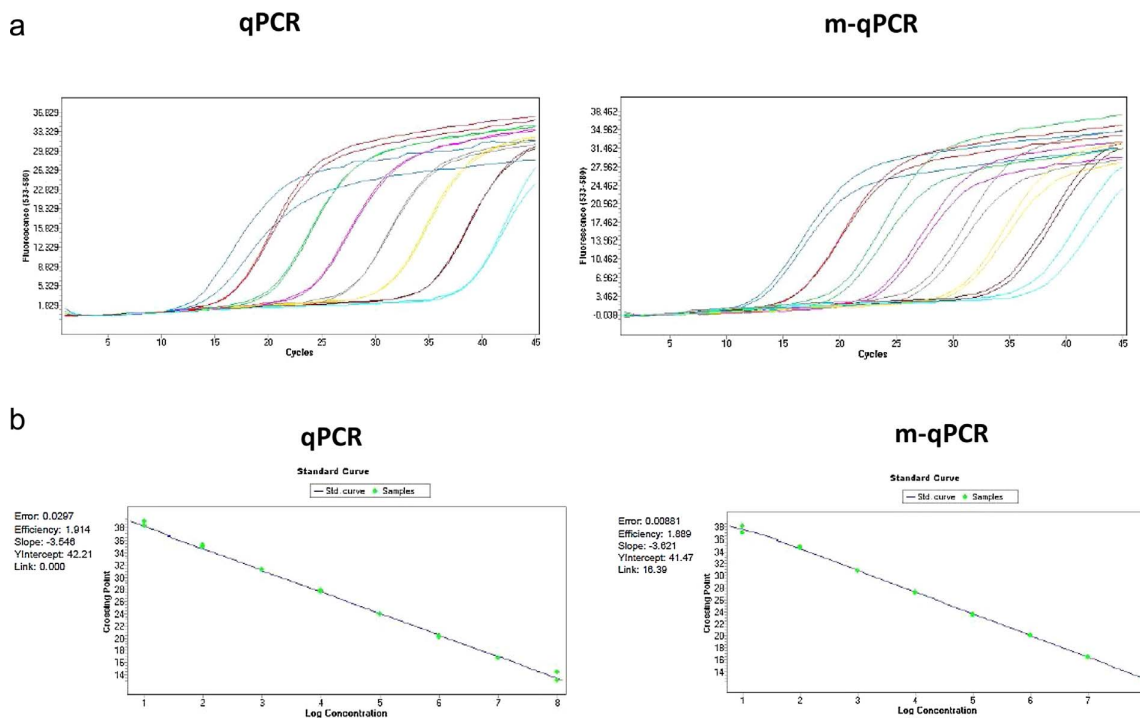


Fig. 1. (a) In vitro study: Quantification curves of 10-fold serial dilutions of purified genomic *Porphyromonas gingivalis* (Pg) DNA obtained by qPCR versus multiple qPCR. The X-axis displays the Cq values and the Y-axis represents fluorescence. (b) In vitro study: Standard curve of qPCR and multiplex qPCR for *Porphyromonas gingivalis* (Pg). The X-axis displays log CFU (colony forming units)/ml and the Y-axis represents the Cq values. qPCR efficiency is determined by using a 10-fold serial dilutions of purified genomic Pg DNA.

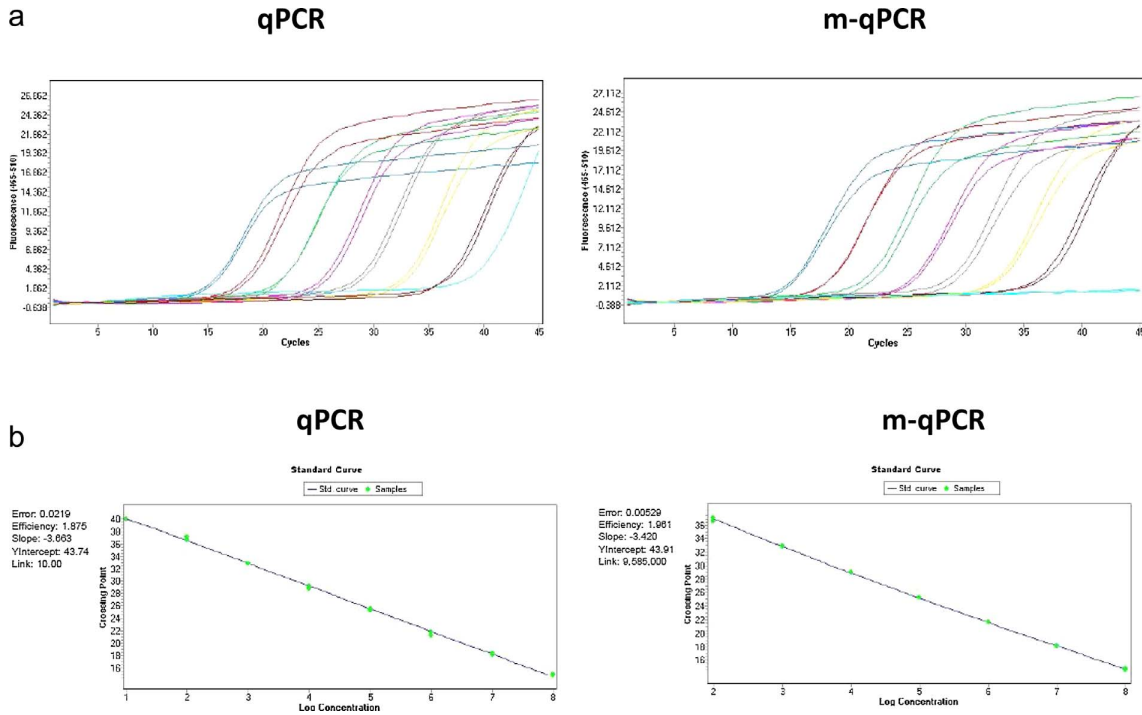


Fig. 2. (a) *In vitro* study: Quantification curves of 10-fold serial dilutions of purified genomic *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) obtained by qPCR versus multiple qPCR. The X-axis displays the Cq values and the Y-axis represents fluorescence. (b) *In vitro* study: Standard curve of qPCR and multiplex qPCR for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). The X-axis displays log CFU (colony forming units)/ml and the Y-axis represents the Cq values. qPCR efficiency is determined by using a 10-fold serial dilutions of purified genomic Aa DNA.

Table 2A

*In vitro* study: comparison of detection of *P. gingivalis* by qPCR and multiplex qPCR [mean quantification cycle (Cq), standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV)].

<i>P. gingivalis</i>	n	qPCR Cq			Multiplex qPCR Cq		
		Mean	SD	CV (%)	Mean	SD	CV (%)
Sample_Predicted concentration (CFU/ml)							
<i>Pg</i> 10 <sup>8</sup>	3	13.01	0.04	0.31	12.97	0.23	1.74
<i>Pg</i> 10 <sup>7</sup>	3	15.70	0.34	2.13	15.88	0.11	0.72
<i>Pg</i> 10 <sup>6</sup>	3	19.80	0.06	0.28	19.91	0.18	0.90
<i>Pg</i> 10 <sup>5</sup>	3	23.69	0.10	0.43	23.84	0.24	0.99
<i>Pg</i> 10 <sup>4</sup>	3	27.81	0.23	0.81	27.80	0.14	0.49
<i>Pg</i> 10 <sup>3</sup>	3	31.86	0.40	1.25	31.94	0.56	1.76
<i>Pg</i> 10 <sup>2</sup>	3	35.64	0.54	1.52	35.42	0.45	1.28
<i>Pg</i> 10 <sup>1</sup>	3	39.87	0.23	0.57	39.12	1.03	2.62
<i>Aa</i> 10 <sup>8</sup> + <i>Pg</i> 10 <sup>8</sup>	3	13.50	1.11	8.23	13.09	0.49	3.71
<i>Aa</i> 10 <sup>7</sup> + <i>Pg</i> 10 <sup>7</sup>	3	16.90	1.00	5.89	16.60	0.62	3.74
<i>Aa</i> 10 <sup>6</sup> + <i>Pg</i> 10 <sup>6</sup>	3	20.57	1.19	5.79	20.15	0.64	3.19
<i>Aa</i> 10 <sup>5</sup> + <i>Pg</i> 10 <sup>5</sup>	3	24.48	1.04	4.24	23.89	0.41	1.72
<i>Aa</i> 10 <sup>4</sup> + <i>Pg</i> 10 <sup>4</sup>	3	28.24	0.79	2.81	27.63	0.38	1.36
<i>Aa</i> 10 <sup>3</sup> + <i>Pg</i> 10 <sup>3</sup>	3	31.84	0.88	2.76	31.26	0.42	1.34
<i>Aa</i> 10 <sup>2</sup> + <i>Pg</i> 10 <sup>2</sup>	3	35.86	0.71	1.99	34.81	0.35	1.02
<i>Aa</i> 10 <sup>1</sup> + <i>Pg</i> 10 <sup>1</sup>	3	39.02	0.86	2.20	37.92	0.32	0.85
<i>Aa</i> 10 <sup>8</sup> + <i>Pg</i> 10 <sup>5</sup>	3	24.41	0.56	2.31	23.97	0.06	0.27
<i>Aa</i> 10 <sup>8</sup> + <i>Pg</i> 10 <sup>4</sup>	3	27.43	0.44	1.59	27.33	0.30	1.09
<i>Aa</i> 10 <sup>8</sup> + <i>Pg</i> 10 <sup>3</sup>	3	30.93	0.48	1.55	30.62	0.47	1.52
<i>Aa</i> 10 <sup>8</sup> + <i>Pg</i> 10 <sup>2</sup>	3	33.69	0.61	1.82	33.65	0.76	2.24
<i>Aa</i> 10 <sup>8</sup> + <i>Pg</i> 10 <sup>1</sup>	3	35.66	0.04	0.11	36.44	0.19	0.52
<i>Pg</i> 10 <sup>8</sup> + <i>Aa</i> 10 <sup>5</sup>	3	13.70	0.19	1.37	13.66	0.08	0.58
<i>Pg</i> 10 <sup>8</sup> + <i>Aa</i> 10 <sup>4</sup>	3	13.83	0.13	0.97	13.72	0.06	0.42
<i>Pg</i> 10 <sup>8</sup> + <i>Aa</i> 10 <sup>3</sup>	3	13.79	0.20	1.47	13.60	0.20	1.47
<i>Pg</i> 10 <sup>8</sup> + <i>Aa</i> 10 <sup>2</sup>	3	13.76	0.10	0.74	13.71	0.04	0.27
<i>Pg</i> 10 <sup>8</sup> + <i>Aa</i> 10 <sup>1</sup>	3	13.82	0.16	1.17	13.71	0.06	0.43

qPCR: quantitative polymerase chain reaction; CFU: colony forming unit; *Pg*: *Porphyromonas gingivalis*; *Aa*: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Table 2B

*In vitro* study: comparison of detection of *A. actinomycetemcomitans* by qPCR and multiplex qPCR [mean quantification cycle (Cq), standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV)].

<i>A. actinomycetemcomitans</i>	n	qPCR Cq			Multiplex qPCR Cq		
		Mean	SD	CV (%)	Mean	SD	CV (%)
Sample_Predicted concentration (CFU/ml)							
<i>Aa</i> 10 <sup>8</sup>	3	14.34	0.62	4.35	14.63	0.62	4.27
<i>Aa</i> 10 <sup>7</sup>	3	18.24	0.67	3.69	17.95	0.51	2.84
<i>Aa</i> 10 <sup>6</sup>	3	21.66	0.78	3.59	21.67	0.81	3.72
<i>Aa</i> 10 <sup>5</sup>	3	25.23	0.78	3.08	25.17	1.04	4.11
<i>Aa</i> 10 <sup>4</sup>	3	28.85	1.13	3.92	29.14	1.28	4.40
<i>Aa</i> 10 <sup>3</sup>	3	32.55	1.26	3.86	32.46	1.25	3.84
<i>Aa</i> 10 <sup>2</sup>	3	35.72	1.40	3.92	35.79	1.55	4.33
<i>Aa</i> 10 <sup>1</sup>	3	38.75	1.03	2.67	39.32	1.18	3.01
<i>Aa</i> 10 <sup>8</sup> + <i>Pg</i> 10 <sup>8</sup>	3	14.89	0.13	0.89	14.77	0.07	0.44
<i>Aa</i> 10 <sup>7</sup> + <i>Pg</i> 10 <sup>7</sup>	3	18.28	0.03	0.17	18.14	0.04	0.21
<i>Aa</i> 10 <sup>6</sup> + <i>Pg</i> 10 <sup>6</sup>	3	21.96	0.44	1.99	21.78	0.13	0.58
<i>Aa</i> 10 <sup>5</sup> + <i>Pg</i> 10 <sup>5</sup>	3	25.79	0.32	1.24	25.35	0.19	0.76
<i>Aa</i> 10 <sup>4</sup> + <i>Pg</i> 10 <sup>4</sup>	3	29.65	0.62	2.08	29.36	0.55	1.86
<i>Aa</i> 10 <sup>3</sup> + <i>Pg</i> 10 <sup>3</sup>	3	33.28	0.40	1.22	33.30	0.76	2.29
<i>Aa</i> 10 <sup>2</sup> + <i>Pg</i> 10 <sup>2</sup>	3	37.01	0.49	1.32	37.28	0.90	2.41
<i>Aa</i> 10 <sup>1</sup> + <i>Pg</i> 10 <sup>1</sup>	3	38.94	0.32	0.82	40.00	0.00	0.00
<i>Aa</i> 10 <sup>8</sup> + <i>Pg</i> 10 <sup>5</sup>	3	15.32	0.30	1.93	15.08	0.37	2.45
<i>Aa</i> 10 <sup>8</sup> + <i>Pg</i> 10 <sup>4</sup>	3	15.11	0.55	3.65	15.14	0.21	1.42
<i>Aa</i> 10 <sup>8</sup> + <i>Pg</i> 10 <sup>3</sup>	3	15.21	0.28	1.83	15.23	0.24	1.59
<i>Aa</i> 10 <sup>8</sup> + <i>Pg</i> 10 <sup>2</sup>	3	15.24	0.22	1.47	15.21	0.25	1.64
<i>Aa</i> 10 <sup>8</sup> + <i>Pg</i> 10 <sup>1</sup>	3	14.94	0.47	3.12	15.26	0.17	1.10
<i>Pg</i> 10 <sup>8</sup> + <i>Aa</i> 10 <sup>5</sup>	3	25.92	0.45	1.75	25.82	0.29	1.14
<i>Pg</i> 10 <sup>8</sup> + <i>Aa</i> 10 <sup>4</sup>	3	29.50	0.38	1.30	30.53	2.12	6.95
<i>Pg</i> 10 <sup>8</sup> + <i>Aa</i> 10 <sup>3</sup>	3	31.82	0.20	0.64	31.93	0.33	1.02
<i>Pg</i> 10 <sup>8</sup> + <i>Aa</i> 10 <sup>2</sup>	3	32.95	0.29	0.88	32.73	0.23	0.69
<i>Pg</i> 10 <sup>8</sup> + <i>Aa</i> 10 <sup>1</sup>	3	33.02	0.34	1.04	32.80	0.27	0.82

qPCR: quantitative polymerase chain reaction; CFU: colony forming unit; *Pg*: *Porphyromonas gingivalis*; *Aa*: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

**Table 3**

*In vitro* study: diagnostic concordance for multiplex qPCR with the reference standard (qPCR) for *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*, providing by Passing-Bablok regression intercept (A), slope (B), 95% confidence intervals (CI) and correlation coefficient (r).

Bacteria	n	A	95% CI	B	95% CI	r
<i>P. gingivalis</i>	26	0.12	−0.23 0.43	0.99	0.96 1.00	0.99
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	26	−0.22	−0.65 0.12	1.01	0.99 1.02	0.99

**Table 4**

*In vitro* study: reliability analysis for the *in vitro* qPCR assay for *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*.

Bacteria	ICC value	95% IC	F-value	p-value
<i>P. gingivalis</i>	0.99	0.99 0.99	13.17	0.001
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0.99	0.98 0.99	13.66	< 0.001

ICC: intra-class correlation coefficient; CI: confidence interval.

**Table 5**

Subgingival plaque samples study: frequency of detection, mean counts (log) in positive plaque samples by qPCR and multiplex qPCR for *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*. Caution: values below 100 CFU/ml are approximations with a high degree of probability.

	qPCR	m-qPCR
<i>P. gingivalis</i>		
<b>Prevalence, n (%)</b>		
Healthy	29 (96.66)	25 (83.33)
Periodontitis	28 (93.33)	27 (90.00)
p value	0.554	0.448
<b>Mean count, log CFU/mL (SD)</b>		
Healthy	2.28 (1.39)	1.63 (2.31)
Periodontitis	5.57 (1.39)	5.39 (3.15)
p value	< 0.001	< 0.001
<i>A. actinomycetemcomitans</i>		
<b>Prevalence, n (%)</b>		
Healthy	10 (33.33)	8 (26.67)
Periodontitis	17 (56.67)	16 (53.33)
p value	0.069	0.035
<b>Mean count, log CFU/mL (SD)</b>		
Healthy	−1.01 (2.89)	−1.33 (2.83)
Periodontitis	0.65 (3.36)	0.46 (3.39)
p value	0.045	0.030

CFU: colony forming unit, SD: Standard deviation.

### 3.2.1. Diagnostic validity and concordance

Table 6 describes the validity (diagnostic sensitivity, specificity and predictive values) of m-qPCR using qPCR as the reference standard. The sensitivity of m-qPCR ranged between 86% and 96% for *P. gingivalis*, and between 80% and 94% for *A. actinomycetemcomitans*. Positive predictive values were 100% in all cases. For both bacteria, specificity values were 100% in all groups.

m-qPCR reported similar CFU/mL values when compared to qPCR,

**Table 6**

Subgingival plaque samples study: diagnostic validity indicators of multiplex qPCR (including sensitivity, specificity and predictive values) using qPCR as reference standard.

Bacterial species	Prevalence	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
<i>P. gingivalis</i>					
Healthy	96.67	86.21	100	100	20
Periodontitis	93.33	96.43	100	100	66.67
<i>A. actinomycetemcomitans</i>					
Healthy	33.33	80	100	100	90.91
Periodontitis	56.67	94.12	100	100	92.80

PPV: Positive Predictive value; NPV: Negative Predictive value.

**Table 7**

Subgingival plaque samples study: diagnostic concordance for multiplex qPCR with the reference standard qPCR; *in vivo* assay providing by Passing-Bablok regression intercept (A), slope (B), 95% confidence intervals (CI) and correlation coefficient (r).

Bacteria	Patient	n	A	95% CI	B	95% CI	r
<i>P. gingivalis</i>							
All		60	−0.06	−0.17 0.00	1.02	1.01 1.05	0.87
Healthy		30	−0.38	−1.13 −0.09	1.13	1.04 1.41	0.58
Periodontitis		30	0.05	−0.03 0.32	1.00	0.96 1.02	0.90
<i>A. actinomycetemcomitans</i>							
All		60	0.00	−0.03 0.02	1.00	0.99 1.01	0.94
Healthy		30	0.02	0.00 0.06	1.01	1.00 1.02	0.90
Periodontitis		30	−0.02	−0.05 0.00	0.99	0.98 1.00	0.96

demonstrating a high concordance (correlation coefficient,  $r > 0.87$ ; except for *P. gingivalis* in healthy patients,  $r: 0.58$ ). No statistically significant differences were found between m-qPCR and the reference method qPCR for *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* in the periodontitis group (Table 7).

## 4. Discussion

The results from the validation of a m-qPCR assay for the simultaneous detection of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* has demonstrated that: (1) the m-qPCR assay had similar detection limits and analytical specificity for the targeted bacteria when compared to qPCR; (2) m-qPCR detected comparable amounts of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* when compared to qPCR, both from pure bacterial cultures and subgingival plaque samples harvested from patients with different periodontal status; and (3) when compared with the reference method (qPCR), m-qPCR showed excellent results in terms of concordance, sensibility and specificity.

As expected, a greater prevalence and mean counts of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* were identified in ChP patients, when compared to periodontally-healthy subjects (Table 5). The overall reported prevalence (89–92% for *P. gingivalis* and 30–55% for *A. actinomycetemcomitans*) was higher than what has been reported in studies using a similar methodology (qPCR). Lau et al. (2004) and Boutaga et al. (2005) reported prevalence values of 13.3–81.3% and 9.9–45.5% for *P. gingivalis* and 6.7–18.8% and 18–27.4% for *A. actinomycetemcomitans* respectively. These differences might be attributed to the primer design, based on single copy gene sequence (Lau et al., 2004) versus 16S rRNA gene as a target gene in the present study, or to the geographical origin of the patient (Boutaga et al., 2005), as a higher prevalence of *P. gingivalis* has been reported in the subgingival microbiota from the Spanish population when compared to Dutch patients (Sanz et al., 2000). The reported results also showed higher prevalences than those reported using bacterial culture (20–84.4% and 7.2–42.9% for *P. gingivalis*; 0–6.3% and 6.3–31.6% for *A. actinomycetemcomitans*) (Boutaga et al., 2005; Lau et al., 2004). These differences could be explained by the improvement in detection limits obtained the qPCR technology ( $10^2$  CFU/mL) compared to bacterial culture techniques ( $10^4$  CFU/mL, Boutaga et al., 2005). Furthermore, qPCR technology detects DNA of viable and non-viable bacteria, whereas culture detects only alive bacteria.

A common limitation of qPCR was also highlighted in the present study. When low concentrations of DNA of the targeted bacteria ( $\leq 10^2$  or  $10^1$  CFU/ml) were mixed with higher DNA concentrations of non-target bacterial cells (DNA  $> 10^6$  CFU/mL), unspecific amplifications were detected in both m-qPCR and qPCR, what may indicate that cross reactions could only occur under these conditions. In daily practice, this should not be a problem, since levels higher than  $10^6$  CFU/mL of specific bacteria are not usually detected in clinical samples (Lau et al., 2004; Teles, Teles, Frias-Lopez, Paster, & Haffajee, 2013). Such cross reactions determinate the detection limit of qPCR (around  $10^2$  CFU/

mL), value which can vary minimally depending on the environmental conditions and the type of sample analysed (Figuro et al., 2014; Marin et al., 2017).

A specific limitation of this investigation was that only two bacterial species were targeted. We need to optimise this m-qPCR assay for the identification of other key periodontal pathogens associated with periodontitis, such as *Tannerella forsythia*, *Parvimonas micra* or *Treponema denticola*.

## 5. Conclusion

A single tube multiplex one-step qPCR was validated for the detection of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* in clinical samples. The results have showed that m-qPCR assay could streamline the testing of both periodontal bacteria and replace qPCR assays, thus reducing time and labor while retaining a similar sensitivity and specificity.

## Conflict of interests

None.

## Ethical approval

Ethical Approval was given by the local ethical committee (Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain).

## Acknowledgement

This study was partially supported from the Ministry of Science and Innovation of Spain (FIS [PI11/00542]).

## References

- Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., & Dewhirst, F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(11), 5721–5732.
- Al-Hebshi, N. N., Shuga-Aldin, H. M., Al-Sharabi, A. K., & Ghandour, I. (2014). Subgingival periodontal pathogens associated with chronic periodontitis in Yemenis. *BMC Oral Health*, *14*, 13.
- APP (1996). Consensus report. Periodontal diseases: Pathogenesis and microbial factors. *Annals of Periodontology*, *1*(1), 926–932.
- Bolivar, A., Rojas, A., & García, P. (2013). Avances en Biomedicina. PCR and PCR-Multiplex: critical parameters and standardization protocol. (vol 3, pp 25–33). Venezuela.
- Boutaga, K., van Winkelhoff, A. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., & Savelkoul, P. H. (2003). Comparison of real-time PCR and culture for detection of Porphyromonas gingivalis in subgingival plaque samples. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(11), 4950–4954.
- Boutaga, K., van Winkelhoff, A. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., & Savelkoul, P. H. (2005). Periodontal pathogens: A quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunology Medical Microbiology*, *45*(2), 191–199.
- Boutaga, K., Savelkoul, P. H., Winkel, E. G., & van Winkelhoff, A. J. (2007). Comparison of subgingival bacterial sampling with oral lavage for detection and quantification of periodontal pathogens by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Periodontology*, *78*(1), 79–86.
- Figuro, E., Lindahl, C., Marín, M. J., Renvert, S., Herrera, D., Ohlsson, O., ... Sanz, M. (2014). Quantification of periodontal pathogens in vascular, blood, and subgingival samples from patients with peripheral arterial disease or abdominal aortic aneurysms. *Journal of Periodontology*, *85*(9), 1182–1193.
- Hajishengallis, G., & Lamont, R. J. (2012). Beyond the red complex and into more complexity: The polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Molecular Oral Microbiology*, *27*(6), 409–419.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, *6*(10), 986–994.
- Lau, L., Sanz, M., Herrera, D., Morillo, J. M., Martín, C., & Silva, A. (2004). 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. *Journal of Clinical Periodontology*, *31*(12), 1061–1069.
- Marin, M. J., Ambrosio, N., Virto, L., Diz, P., Álvarez, M., Herrera, D., ... Figuro, E. (2017). Detection and quantification of Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis and Streptococcus oralis in blood samples with different microbiological identification methods: An in vitro study. *Archives of Oral Biology*, *74*, 55–62.
- Milne, T. J., Coates, D. E., Leichter, J. W., Soo, L., Williams, S. M., Seymour, G. J., & Cullinan, M. P. (2016). Periodontopathogen levels following the use of an Er:YAG laser in the treatment of chronic periodontitis? *Australian Dental Journal*, *61*(1), 35–44.
- Miranda, T. S., Feres, M., Retamal-Valdés, B., Perez-Chaparro, P. J., Maciel, S. S., & Duarte, P. M. (2017). Influence of glycemic control on the levels of subgingival periodontal pathogens in patients with generalized chronic periodontitis and type 2 diabetes. *Journal of Applied Oral Science*, *25*(1), 82–89.
- Montero, E., Iniesta, M., Rodrigo, M., Marín, M. J., Figuro, E., Herrera, D., & Sanz, M. (2017). Clinical and microbiological effects of the adjunctive use of probiotics in the treatment of gingivitis: A randomized controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, *44*(7), 708–716.
- Morillo, J. M., Lau, L., Sanz, M., Herrera, D., & Silva, A. (2003). Quantitative real-time PCR based on single copy gene sequence for detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis. *Journal of Periodontal Research*, *38*(5), 518–524.
- Morillo, J. M., Lau, L., Sanz, M., Herrera, D., Martín, C., & Silva, A. (2004). Quantitative real-time polymerase chain reaction based on single copy gene sequence for detection of periodontal pathogens. *Journal of Clinical Periodontology*, *31*(12), 1054–1060.
- Nagaoka, K., Yanagihara, K., Harada, Y., Yamada, K., Migiyama, Y., Morinaga, Y., ... Kohno, S. (2017). Quantitative detection of periodontopathic bacteria in lower respiratory tract specimens by real-time PCR. *Journal of Infection and Chemotherapy*, *23*(2), 69–73.
- Puenpa, J., Suwannakarn, K., Chansaenroj, J., Vongpunswad, S., & Poovorawan, Y. (2017). Development of single-step multiplex real-time RT-PCR assays for rapid diagnosis of enterovirus 71, coxsackievirus A6, and A16 in patients with hand, foot, and mouth disease. *Journal of Virological Methods*, *248*, 92–99.
- Sánchez, M. C., Fernández, E., Llama-Palacios, A., Figuro, E., Herrera, D., & Sanz, M. (2017). Response to antiseptic agents of periodontal pathogens in in vitro biofilms on titanium and zirconium surfaces. *Dental Materials*, *33*(4), 446–453.
- Sanz, M., van Winkelhoff, A. J., Herrera, D., Dellemijn-Kippuw, N., Simón, R., & Winkel, E. (2000). Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. *European Journal of Oral Sciences*, *108*(5), 383–392.
- Sanz, M., Lau, L., Herrera, D., Morillo, J. M., & Silva, A. (2004). Methods of detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythensis in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: A review. *Journal of Clinical Periodontology*, *31*(12), 1034–1047.
- Sanz, M., Beighton, D., Curtis, M. A., Cury, J. A., Dige, I., Dommisch, H., ... Zaura, E. (2017). Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, *44*(Suppl. 18), S5–S11.
- Slots, J., & Ting, M. (1999). Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in human periodontal disease: Occurrence and treatment. *Periodontology 2000*, *20*, 82–121.
- Syed, S. A., & Loesche, W. J. (1972). Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Applied Microbiology*, *24*(4), 638–644.
- Teles, R., Teles, F., Frias-Lopez, J., Paster, B., & Haffajee, A. (2013). Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. *Periodontology 2000*, *62*(1), 95–162.
- Tonetti, M. S., D'Aiuto, F., Nibali, L., Donald, A., Storry, C., Parkar, M., ... Deanfield, J. (2007). Treatment of periodontitis and endothelial function. *The New England Journal of Medicine*, *356*(9), 911–920.
- van Winkelhoff, A. J., & Winkel, E. G. (2005). Microbiological diagnostics in periodontics: Biological significance and clinical validity. *Periodontology 2000*, *39*, 40–52.
- Yoshida, A., Suzuki, N., Nakano, Y., Oho, T., Kawada, M., & Koga, T. (2003). Development of a 5' fluorogenic nuclease-based real-time PCR assay for quantitative detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(2), 863–866.
- Zhou, X., Liu, X., Li, J., Aprecio, R. M., Zhang, W., & Li, Y. (2015). Real-time PCR quantification of six periodontal pathogens in saliva samples from healthy young adults. *Clinical Oral Investigations*, *19*(4), 937–946.
- Zhou, X., Kattadiyil, M. T., Aprecio, R. M., Liu, X., Zhang, W., & Li, Y. (2017). Effect of opposing implant prostheses on periodontal pathogens in dentures: A pilot study. *Journal of Prosthetic Dentistry*, *118*(2), 153–158.



## *ARTÍCULO #4*



## **ARTÍCULO #4:**

### **“Validación de qPCR múltiple para la detección y cuantificación de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia* en muestras subgingivales. Una comparación con el cultivo anaerobio”**

**Objetivo:** Validar un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa múltiple en tiempo real (m-qPCR) para la detección y cuantificación simultánea de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *T. forsythia* en muestras subgingivales, en comparación con el cultivo anaerobio directo.

**Material y métodos:** Se obtuvieron muestras de placa subgingival de pacientes en diferentes fases del tratamiento periodontal. Las muestras se procesaron en paralelo mediante cultivo anaerobio y m-qPCR dirigido a las especies bacterianas objetivo. Los recuentos y la frecuencia de detección se calcularon y analizaron mediante pruebas U de Mann-Whitney y Chi-cuadrado, respectivamente. Se construyeron tablas de contingencia y se calcularon la sensibilidad, la especificidad, los valores predictivos y los coeficientes de correlación de Lin.

**Resultados:** Se incluyeron 59 muestras en el estudio. Se logró una buena concordancia entre m-qPCR y cultivo para *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* (acuerdo neto, 94.92% y 91.53%, respectivamente). Para *T. forsythia*, m-qPCR mostró recuentos estadísticamente significativos más altos que el cultivo ( $p < 0.005$ ), y baja especificidad (3.12%) y concordancia (47.46%). Se alcanzó una alta sensibilidad (superior al 96.22%) para las tres bacterias objetivo con m-qPCR.

**Conclusión:** En comparación con el cultivo, el ensayo m-qPCR probado para muestras subgingival mostró un alto grado de sensibilidad en la cuantificación simultánea de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *T. forsythia*.





## Validation of a multiplex qPCR assay for detection and quantification of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in subgingival plaque samples. A comparison with anaerobic culture

M<sup>a</sup> José Marín, Nagore Ambrosio, Ana O'Connor, David Herrera, Mariano Sanz, Elena Figuero\*

Etiology and Therapy of Periodontal Diseases (ETEP) Research Group, Department of Dental Clinical Specialties, Faculty of Dentistry, University Complutense, Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Multiplex quantitative PCR  
Periodontitis  
Culture  
Validation

### ABSTRACT

**Objective:** To validate a multiplex real time qPCR (m-qPCR) assay for the simultaneous detection and quantification of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in subgingival samples, when compared with anaerobic culture.

**Material and methods:** Subgingival plaque samples were obtained from patients seeking periodontal treatment. Samples were processed in parallel by anaerobic culturing and by m-qPCR directed to the target bacterial species. Counts and frequency of detection were calculated and analyzed by Mann-Whitney *U* and chi-square tests, respectively. Contingency tables were constructed, and sensitivity, specificity, predictive values and Lin's correlation coefficients were calculated.

**Results:** Fifty-nine samples were included in the study. A good concordance was achieved between m-qPCR and culture for *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* (net agreement, 94.92% and 91.53%, respectively). For *T. forsythia*, m-qPCR showed statistically significant higher counts than culture ( $p < 0.005$ ), and low specificity (3.12%) and concordance (47.46%). High sensitivity (above 96.22%) was attained for the three target bacteria with m-qPCR.

**Conclusion:** Compared to culture, the tested m-qPCR assay for subgingival plaque samples showed high degree of sensitivity in the simultaneous quantification of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *T. forsythia*.

### 1. Introduction

Periodontitis is a chronic inflammatory disease triggered by a dysbiotic biofilm and characterized by the destruction of the tooth-supporting periodontal tissues (Papapanou et al., 2018). Bacterial species, such as *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Tannerella forsythia* have been considered pathogens with strong association with periodontitis (Socransky, Haffajee, Cugini, Smith, & Kent, 1998) and in particular, *P. gingivalis* has been identified as a keystone pathogen, triggering the dysbiotic state that disturbs the community of commensal microorganisms and, provokes an unresolved chronic inflammation (Hajishengallis & Lamont, 2012; Sanz et al., 2017).

For decades, the reference method to identify and quantify periodontal pathogens has been anaerobic culturing (Sanz, Lau, Herrera, Morillo, & Silva, 2004). This method has the advantage to target multiple bacterial species simultaneously, to detect unexpected bacteria and to test for antimicrobial susceptibilities (Atieh, 2008). However, many of the bacterial species present in the subgingival biofilm are not cultivable, either due to their stringent environmental conditions or to the inherent limitations of the bacterial culturing. In addition, this technique is relatively time-consuming and labor-intensive. To overcome these drawbacks, non-cultural molecular methods have been developed for the microbiological diagnosis of subgingival samples, mainly those based on the detection highly specific 16S rRNA genes by polymerase chain reaction (PCR), and those able to quantify

**Abbreviations:** BOP, bleeding on probing; CFU/mL, colony forming units/mL; PD, probing depth; m-qPCR, multiple real-time quantitative polymerase chain reaction  
\* Corresponding author at: Etiology and Therapy of Periodontal Diseases (ETEP) Research Group, Faculty of Odontology, Plaza Ramón y Cajal, s/n (Ciudad Universitaria), 28040, Madrid, Spain.

**E-mail addresses:** [mjmarin@ucm.es](mailto:mjmarin@ucm.es) (M.J. Marín), [nambrosio@ucm.es](mailto:nambrosio@ucm.es) (N. Ambrosio), [labmicro@odon.ucm.es](mailto:labmicro@odon.ucm.es) (A. O'Connor), [davidher@ucm.es](mailto:davidher@ucm.es) (D. Herrera), [marsan@ucm.es](mailto:marsan@ucm.es) (M. Sanz), [elfiguer@ucm.es](mailto:elfiguer@ucm.es) (E. Figuero).

<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.04.014>

Received 6 December 2018; Received in revised form 27 March 2019; Accepted 24 April 2019

0003-9969/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

uncultivable, slow growing and fastidious bacteria, such as the real-time quantitative PCR (qPCR) (Boutaga, van Winkelhoff, Vandenbroucke-Grauls, & Savelkoul, 2003; Yoshida et al., 2003). This method, using fluorescence signals, allows for the accurate quantification of individually targeted species, with a high sensitivity and specificity (Boutaga, Savelkoul, Winkel, & van Winkelhoff, 2007; Marin, Figuero, Herrera, & Sanz, 2017).

Several studies have assessed the accuracy of qPCR compared to bacterial culturing, to identify and quantify *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*, using clinical samples from both healthy and periodontitis subjects (Boutaga, van Winkelhoff, Vandenbroucke-Grauls, & Savelkoul, 2005; Boutaga, van Winkelhoff, Vandenbroucke-Grauls, & Savelkoul, 2006, 2007; Jervoe-Storm, Koltzsch, Falk, Dorfler, & Jepsen, 2005; Kotsilkov, Popova, Boyanova, Setchanova, & Mitov, 2015; Lau et al., 2004; Westphal, Nonnenmacher, & Jehl, 2005). These studies have reported that qPCR provides high diagnostic accuracy (Atieh, 2008) with high sensitivity, specificity and positive predictive value (Tomas et al., 2017). To optimize this methodology, a multiplex qPCR (m-qPCR) was recently developed, for the simultaneous identification and quantification of *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans*, (Marin, Ambrosio, Herrera, Sanz, & Figuero, 2018), and when compared to simple qPCR it demonstrated a high degree of sensitivity and specificity. However, this method needs to be validated against the gold standard in bacterial identification methods (anaerobic culturing). It was, therefore, the purpose of this investigation to validate a m-qPCR assay, using subgingival plaque samples and targeting for *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *T. forsythia*, by comparing this method with conventional culture.

## 2. Material and methods

### 2.1. Study design

This study was designed as a cross-sectional study aiming to validate a microbial diagnostic assay (m-qPCR). STARD guidelines for reporting diagnostic accuracy studies were followed (Bossuyt, Cohen, Gatsonis, Korevaar, & Grp, 2016).

### 2.2. Study population

Consecutive subgingival clinical samples from different sources (private dental clinics, university clinics and clinical research studies), received for microbiological culture analysis in the Laboratory of Microbiology (Faculty of Dentistry, University Complutense of Madrid, Spain), from September to December of 2017, were selected for this study. These samples were taken from patients at different stages during their therapy: before treatment, after scaling and root planing (post-SRP), after periodontal surgery or during supportive periodontal therapy (SPT).

### 2.3. Clinical information

The received subgingival samples included relevant information from the patients (age, gender, smoking habit, recent antibiotic consumption) as well as periodontal clinical data from the sampling sites: probing depth (mm) (PD), recession (mm), plaque index (presence/absence) and bleeding on probing (BOP) (presence/absence) (Ainamo & Bay, 1975).

### 2.4. Sampling

In each patient, four sampling sites were selected, one in each quadrant, choosing those most accessible and with deepest PD and BOP (Mombelli, McNabb, & Lang, 1991). At the selected sites, supragingival plaque was removed and the sites were dried with sterile cotton rolls and air. Two consecutive sterile paper points (#30, Maillefer, Ballaugues, Switzerland) were inserted into the pocket as deep as possible, and left in place for 10 s. The paper points were pooled within a vial containing 2 mL of reduced transport fluid (RTF) (Syed & Loesche, 1972), which was kept at 4 °C and sent to the laboratory to be processed, within 14–36 h, by means of anaerobic culturing and m-qPCR.

### 2.5. Anaerobic culture procedures

Half of the subgingival sample material was processed according to the anaerobic cultural methodology previously described in scientific reports from our research group (Oteo et al., 2010). In brief, samples were homogenized by vortexing (Dahlén, Renvert, Wikström, & Egelberg, 1990) and serially diluted in phosphate buffer saline (PBS). The aliquots were plated in the specific medium Dentaaid-1, for the detection of *A. actinomycetemcomitans* (Alsina, Olle, & Frias, 2001) and incubated for 5 days in air with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. Sample dilutions were also plated onto a non-selective blood agar medium (Blood Agar Base II<sup>o</sup>, Oxoid, Basingstoke, England), supplemented with haemine (5 mg/L), menadione (1 mg/L) and 5% sterile horse blood, for the detection of *P. gingivalis* and *T. forsythia*, and incubated for 14 days in anaerobiosis (80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> and 10% H<sub>2</sub>).

### 2.6. Real-time quantitative PCR

#### 2.6.1. DNA extraction

Bacterial DNA from each sample was extracted using a commercial kit (MoYsis Complete5, MolzymGmbH & Co.KG, Bremen, Germany) following manufacturer's instructions (the protocol for bacterial DNA extraction was followed from step 6 since steps 1–5 were used only for blood samples). The extracted DNA was eluted in 100 µL of sterile water (Roche) and frozen at –20 °C for further analysis.

#### 2.6.2. qPCR assay

Subgingival samples were processed by m-qPCR following the method described in a recent publication (Marin et al., 2018). In brief,

**Table 1**  
Primers and probe used for multiplex quantitative polymerase chain reaction (m-qPCR) amplification.

Bacteria	Sequence (5'–3')
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (Boutaga et al., 2005; Marin et al., 2018)	Primer F: GAA CCT TAC CTA CTC TTG ACA TCC GAA Primer R: TGC AGC ACC TGT CTC AAA GC Probe: FAM-AGA ACT CAG AGA TGG GTT TGT GCC TTAGGG-TAMRA
<i>P. gingivalis</i> (Boutaga et al., 2003; Marin et al., 2018)	Primer F: GCGCTCAACGTTTCAGCC Primer R: CACGAATTCGCCTGC Probe m-qPCR: HEX5'-CACTGAACCTCAAGCCCGCAGTTTCAA-BHQ1
<i>T. forsythia</i> (Boutaga et al., 2005)	Primer F: GGG TGA GTA ACG CGT ATG TAA CCT Primer R: ACC CAT CCG CAA CCA ATA AA Probe m-qPCR: Red610- CCC GCA ACA GAG GGA TAA CCC GG-3BHQ2

F: Forward primer; R: Reverse primer; FAM: 6-carboxyfluorescein; TAMRA: 6-carboxytetramethylrhodamine; BHQ: Black Hole Quencher.

**Table 2**

Frequency of detection, mean and medians in positive plaque samples for *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *T. forsythia* by culture and multiplex quantitative polymerase chain reaction (m-qPCR).

		Culture	m-qPCR	p value
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	Global prevalence, n (%)	6 (10.17)	9 (15.25)	0.407
	Mean count, CFU/mL (SD)	$9.99 \times 10^3$ ( $3.63 \times 10^4$ )	$9.22 \times 10^3$ ( $4.15 \times 10^4$ )	
	Median, CFU/mL (IR)	0 (0)	0 (0)	0.483
<i>P. gingivalis</i>	Global prevalence, n (%)	53 (8983)	54 (91.52)	0.752
	Mean count, CFU/mL (SD)	$7.49 \times 10^6$ ( $1.41 \times 10^7$ )	$7.40 \times 10^6$ ( $1.11 \times 10^7$ )	
	Median, CFU/mL (IR)	$1.48 \times 10^6$ ( $7.40 \times 10^6$ )	$3.45 \times 10^6$ ( $9.19 \times 10^6$ )	0.538
<i>T. forsythia</i>	Global prevalence, n (%)	27 (45.76)	58 (98.31)	< 0.001
	Mean count, CFU/mL (SD)	$5.36 \times 10^5$ ( $1.12 \times 10^6$ )	$2.45 \times 10^7$ ( $3.16 \times 10^7$ )	
	Median, CFU/mL (IR)	0 ( $5.00 \times 10^5$ )	$1.47 \times 10^7$ ( $3.10 \times 10^7$ )	< 0.001

CFU: Colony forming units; SD: standard deviation; IR: Interquartile range.

the sequence of primers and hydrolysis probes, described in Table 1, were used, targeting 16S ribosomal-RNA (rRNA) genes for *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *T. forsythia*, as reported previously (Boutaga et al., 2005; Marín et al., 2018). PCR amplification was performed in a total reaction mixture volume of 10  $\mu$ L, which included 5  $\mu$ L of 2  $\times$  TaqMan master mixture (LC 480 Probes Master, Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany), optimal concentrations of primers and hydrolysis probe (300, 300 and 200 nM for *A. actinomycetemcomitans*; 300, 300 and 300 nM for *P. gingivalis* and 300, 300 and 200 nM for *T. forsythia*) and 2.5  $\mu$ L of DNA from the samples. The no-template control (NTC) consisted on 2.5  $\mu$ L of sterile water. Samples were subjected to an initial amplification cycle of 95  $^{\circ}$ C for 10 min, followed by 40 cycles at 95  $^{\circ}$ C for 15 s and 60  $^{\circ}$ C for 1 min in LightCycler<sup>®</sup> 480 II thermocycler (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany). All assays were developed with a linear quantitative detection range established by the slope range of 3.3–3.6 cycles/log decade,  $r^2 > 0.997$  and an efficiency range of 1.9–2.0.

Bacterial quantification was determined from the standard curves. The standard curve for each bacteria was developed by isolating the DNA of the bacteria containing  $10^8$  colony-forming units (CFU) mL<sup>-1</sup>, and then performing 10-fold serial dilutions for each DNA on sterile water. After running qPCR, a cross point cycle (Cp) value was obtained for each bacterial dilution, what allowed the determination of the bacterial concentration.

### 2.7. Statistical analysis

The primary outcome variable was the concentration of each target bacterial species. Quantitative results were expressed as colony forming units (CFU) per mL, in median values and interquartile range (IR) and mean values and standard deviation (SD). Secondary outcomes were the prevalence of target pathogens (expressed as proportions) and the clinical variables of the sampled sites (PD, BOP, REC, PII; expressed as means and SD). The unit of analysis was the patient.

After evaluating the normality of the distribution (assessed by Kolmogorov-Smirnov test and box-plots), differences between both methods were compared by Mann Whitney U-test, in case of quantitative variables, and chi-square test, in case of categorical variables.

Qualitative results (presence or absence of each pathogen), using both diagnostic methods, were presented in contingency tables. All diagnostic parameters (sensitivity, specificity, positive and negative predictive values and positive and negative likelihood ratios) were calculated using culture as the diagnostic reference. This analysis was repeated using m-qPCR as the diagnostic reference standard.

In order to determine the concordance of m-qPCR, when compared

to culture, Passing-Bablok estimation of regression lines and Lin's concordance correlation coefficients of absolute agreement were determined (Marín et al., 2018; Marín, Ambrosio et al., 2017). In this regression procedure, the slope B and intercept A were calculated with their 95% confidence intervals (CI), to evaluate the existence of constant or proportional differences between methods. In addition, the global agreement and kappa values were calculated. Results were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . A software package (IBM SPSS Statistics 21.0; IBM Corporation, Armonk, NY, USA) was used for all data analysis.

### 3. Results

From the 75 samples received during the predetermined period, 16 were discarded due to technical problems associated with the anaerobic incubation and therefore, a total of 59 samples were included in this investigation. The clinical data from the sampled sites are depicted in Tables S1, S2 and Fig. S1. PD ranged from 2.75 mm (SD = 0.66), corresponding to patients in SPT, to 6.91 mm (SD = 1.20), in untreated patients. BOP also ranged from 18.75% (SD = 37.50%) to 91.03% (SD = 20.27%), respectively, in both groups of patients.

Table 2 shows the global prevalence and median counts (CFU/mL) of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *T. forsythia*, identified by culture and m-qPCR. Similar median counts and prevalences were detected with culture and with m-qPCR for *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*. In contrast, for *T. forsythia*, statistically significant lower median counts (0 versus  $1.47 \times 10^7$  CFU/mL, respectively) and frequencies of detection (45.76% versus 98.31%, respectively) were observed for culture, when compared to qPCR ( $p < 0.001$ ).

When assessing the results from untreated periodontitis subjects, similar frequencies of detection were obtained with both techniques for *P. gingivalis* (95.45%) and *A. actinomycetemcomitans* (11.36% versus 18.18%). However, for *T. forsythia*, lower frequencies of detection were detected for culture compared to m-qPCR (47.72% versus 100%, respectively)."

Table 3 depicts the contingency tables comparing the detection of each target bacterial species with each diagnostic method, providing the sensitivity, specificity and the predictive values of m-qPCR, when bacterial culture was used as the reference. For *A. actinomycetemcomitans*, the sensitivity and negative predictive values were 100%, and the specificity and positive predictive value were 94.34% and 66.67%, respectively. For *P. gingivalis*, the sensitivity and positive predictive value were high (96.22% and 94.44%, respectively) while the specificity and negative predictive values were 50% and 60%, respectively. Finally, the sensitivity and negative predictive values were high (100%), while the

**Table 3**

Contingency tables comparing the detection of each target bacterial species and validity of multiplex quantitative polymerase chain reaction (m-qPCR) using bacterial culture as the reference standard.

	<i>actinomycescomitans</i>		<i>P. gingivalis</i>		<i>T. forsythia</i>	
	Cult +	Cult –	Cult +	Cult –	Cult +	Cult –
<b>Contingency tables</b>						
m-qPCR + samples	6	3	51	3	27	31
m-qPCR – samples	0	50	2	3	0	1
<b>Validity</b>						
Sensitivity	100.00		96.22		100.00	
Specificity	94.34		50.00		3.12	
PPV	66.67		94.44		46.55	
NPV	100.00		60.00		100.00	

Cult +: culture positive samples; Cult -: culture negative samples; m-qPCR +: m-qPCR positive samples; m-qPCR -: m-qPCR negative samples; PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value.

**Table 4**

Diagnostic validity of bacterial culture using multiplex quantitative polymerase chain reaction (m-qPCR) as reference standard.

	<i>actinomycescomitans</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>T. forsythia</i>
Sensitivity	66.67	94.44	46.55
Specificity	100.00	60.00	100.00
PPV	100.00	96.22	100.00
NPV	94.34	50.00	3.12

PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value.

specificity was low (3.12%) for *T. forsythia*.

Table 4 reports the diagnostic validity of bacterial culturing when m-qPCR was considered as the diagnostic reference standard. For *A. actinomycescomitans* and *T. forsythia*, the specificity and positivity predictive value were 100%, while sensitivity and negative predictive value for *T. forsythia* was low (46.55% and 3.12%, respectively). Sensitivity and positive predictive value for *P. gingivalis* were high (94.44% and 96.22%, respectively) while specificity and negative predictive values were 60% and 50%, respectively.

### 3.1. Concordance

Results on concordance are presented in Tables 5 and 6. Multiplex-qPCR reported similar mean counts of *A. actinomycescomitans* and *P. gingivalis* when compared with culture, demonstrating a high concordance (correlation coefficient,  $r = 0.92$  and  $r = 0.58$ , respectively) between both methods. When comparing both methods, no statistically significant differences in the relative proportions of these target bacteria were found. However, for *T. forsythia*, the correlation coefficient ( $r = 0.004$ ) and the concordance values were low ( $\kappa = 0.03$ ).

**Table 5**

Diagnostic concordance for multiplex quantitative polymerase chain reaction (m-qPCR) with the reference standard for *A. actinomycescomitans*, *P. gingivalis* and *T. forsythia* providing by Passing-Bablok regression intercept (A), slope (B), 95% confidence intervals (CI) and correlation coefficient (r).

Bacterial species	A	95% CI		B	95% CI		r
		Lower	Upper		Lower	Upper	
<i>A. actinomycescomitans</i>	0.00	0.00	0.00	0.75	0.12	1.30	0.924
<i>P. gingivalis</i>	$2.01 \times 10^2$	$-1.17 \times 10^5$	$6.70 \times 10^4$	0.87	0.63	1.18	0.578
<i>T. forsythia</i>	$1.42 \times 10^5$	$1.42 \times 10^5$	$3.54 \times 10^6$	66.04	31.07	224.63	0.004

**Table 6**

Diagnostic concordance for multiplex quantitative polymerase chain reaction (m-qPCR) with the reference standard for *A. actinomycescomitans*, *P. gingivalis* and *T. forsythia* with global agreement and kappa values.

Bacterial species	Global agreement	Kappa index	95% CI		p value
			Lower	Upper	
<i>A. actinomycescomitans</i>	94.92	0.77	0.52	1.02	< 0.001
<i>P. gingivalis</i>	91.53	0.49	0.12	0.88	< 0.001
<i>T. forsythia</i>	47.46	0.03	-0.03	0.08	0.354

CI: Confidence interval.

## 4. Discussion

The present investigation, designed to evaluate the diagnostic validity of a multiplex m-qPCR method for detecting and quantifying *A. actinomycescomitans*, *P. gingivalis* and *T. forsythia* when compared to the diagnostic reference standard, anaerobic bacterial culturing, revealed that: (1) m-qPCR was able to simultaneously detect the three target bacterial species in subgingival samples; (2) m-qPCR showed similar prevalence and bacterial counts for *A. actinomycescomitans* and *P. gingivalis* when compared to culture, with no statistically significant differences between both methodologies; (3) m-qPCR revealed low concordance and specificity values for *T. forsythia*.

The prevalence of the three target bacterial pathogens in samples from untreated periodontitis subjects was high, when assessed by bacterial culturing, what is in agreement with previously reported data in similar Spanish populations (6.3–18.8% for *A. actinomycescomitans*, 81.3–84.4% for *P. gingivalis*, and 25–100% for *T. forsythia*) (Lau et al., 2004). Other studies have reported more heterogeneous results in different populations, ranging from 0 to 92.3% for *A. actinomycescomitans*, 10.9–93.3% for *P. gingivalis* and 34.4–100% for *T. forsythia* (Bankur et al., 2014; Boutaga et al., 2003, 2005; D'Ercole, Catamo,

Tripodi, & Piccolomini, 2008; Jervoe-Storm et al., 2005; Kotsilkov et al., 2015; Nonnenmacher et al., 2005; Verner et al., 2006). The heterogeneity in the prevalence of specific periodontal pathogens might be explained by differences in patient selection, geographical origin and the specific identification methods used.

For *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*, the present investigation has proven that m-qPCR and anaerobic culturing showed similar outcomes, both in counts and frequencies of detection, demonstrating a high degree of agreement and concordance (91.53%–94.92%,  $r = 0.92$ ). These results are in agreement with previous studies, which have shown a high diagnostic accuracy of qPCR, when compared to cultural techniques (Boutaga et al., 2005; Jervoe-Storm et al., 2005; Lau et al., 2004). However, the sensitivity and specificity results may be affected by the prevalence of the target bacteria in the sample, since an increase in prevalence would increase the sensibility while decreasing the specificity (Coughlin et al., 1992).

In contrast to *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*, a low level of concordance (47.46%) and low correlation coefficient ( $r = 0.004$ ) were observed for *T. forsythia*. This is also reflected by the low specificity value reported by m-qPCR (3.12%), compared to culture (only one out of the 32 negative culture samples were confirmed by m-qPCR). Consequently, m-qPCR yielded a significantly higher prevalence of *T. forsythia* than culture. These results are also in agreement with other studies, reporting a high sensitivity and low specificity for qPCR technique versus culture for *T. forsythia* (Bankur et al., 2014; Boutaga et al., 2005; Jervoe-Storm et al., 2005; Kotsilkov et al., 2015; Lau et al., 2004; Sakamoto, Takeuchi, Umeda, Ishikawa, & Benno, 2001). These results could be explained by the limitations of culturing to identify this fastidious bacterium, since qPCR needs a lower detection threshold for its identification and detection (Bankur et al., 2014; Paster et al., 2001).

The present investigation supports the use of m-qPCR as the most appropriate approach for the identification of periodontal pathogens due to the reported high specificity and positive predictive value for *A. actinomycetemcomitans* and *T. forsythia*, and high sensitivity and positive predictive value to *P. gingivalis* (Table 4), which is in agreement with previously published studies (Boutaga et al., 2005; Kotsilkov et al., 2015; Lau et al., 2004; Verner et al., 2006).

The present investigation, however, has also important limitations, due to the small sample size and the use of a convenience sample. In addition, possible problems with contamination of qPCR and the lack of ability to distinguish between live and dead bacteria should also be considered as limitations when using molecular techniques. In the present study, contamination was avoided by using ultraviolet (UV) light overnight over the benches used for the DNA extraction procedures and qPCR assays (Marín, Figuero et al., 2017). To distinguish between DNA from dead or live bacteria, the use of PMA (propidium monoazide) has been proposed (Sánchez et al., 2013, 2014; Sánchez et al., 2017) although this technique has not been used in clinical samples.

Another difficulty associated with m-qPCR technology is the selection of multiple probes with different fluoresce wavelength, which allows the distinction of signals from different primer/probe sets, but the emission spectra of the fluorophores used with the qPCR may overlap, what could produce a cross-talk between the different channels. To solve this problem, color compensation assays were performed to correct the signals and this allowed to read each dye in the corresponding channel, what excluded signals from neighboring fluorophores (Marín, Figuero et al., 2017; Molenkamp, van der Ham, Schinkel, & Beld, 2007).

In summary, this study has shown that m-qPCR is a sensitive and specific diagnostic method to identify and quantify specific bacterial pathogens from subgingival samples, with good concordance with anaerobic culture for *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*. However, for *T. forsythia*, a significantly higher sensitivity and predictive value were observed, when compared with culture.

## Conflict of interests

The authors declare that there are no conflicts of interest related to this study.

## Acknowledgments

Authors would like to thank Marta Garcia from the Oral Research Laboratory of the Faculty of Odontology, University Complutense of Madrid.

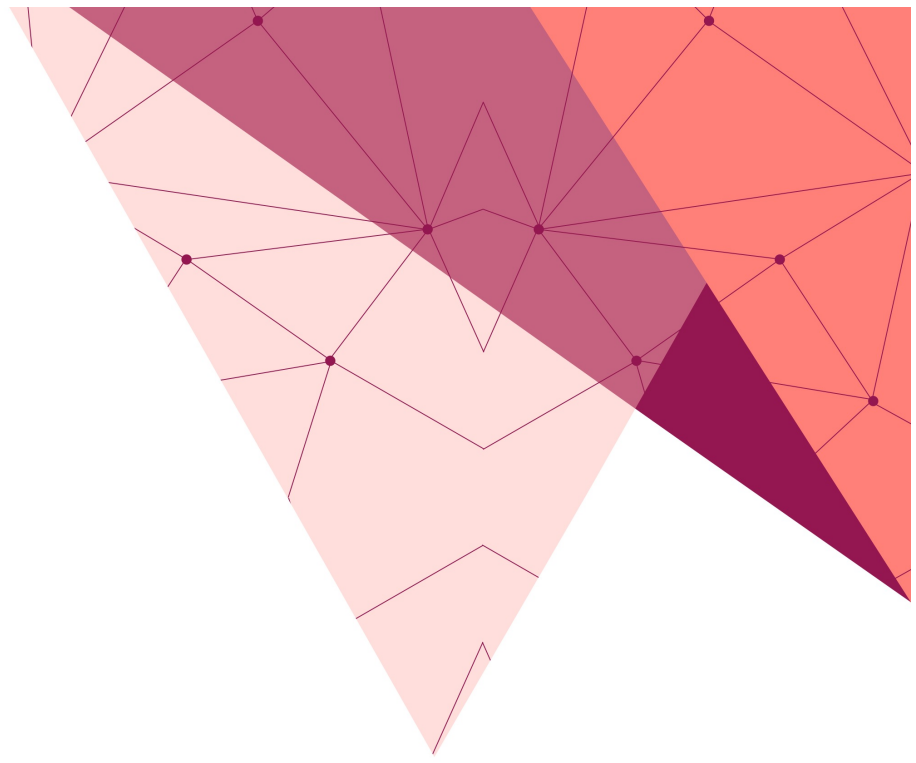
## Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.04.014>.

## References

- Ainamo, J., & Bay, I. (1975). Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *International Dental Journal*, 25(4), 229–235.
- Alsina, M., Olle, E., & Frias, J. (2001). Improved, low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(2), 509–513.
- Atieh, M. A. (2008). Accuracy of real-time polymerase chain reaction versus anaerobic culture in detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: A meta-analysis. *The Journal of Periodontology*, 79(9), 1620–1629.
- Bankur, P. K., Nayak, A., Bhat, K., Bankur, R., Naik, R., & Rajpoot, N. (2014). Comparison of culture and polymerase chain reaction techniques in the identification of *Tannerella forsythia* in periodontal health and disease, an in vitro study. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 18(2), 155–160.
- Bossuyt, P. M., Cohen, J. F., Gatsonis, C. A., Korevaar, D. A., & Grp, S. (2016). STARD 2015: Updated reporting guidelines for all diagnostic accuracy studies. *Annals of Translational Medicine*, 4(4).
- Boutaga, K., Savelkoul, P. H., Winkel, E. G., & van Winkelhoff, A. J. (2007). Comparison of subgingival bacterial sampling with oral lavage for detection and quantification of periodontal pathogens by real-time polymerase chain reaction. *The Journal of Periodontology*, 78(1), 79–86.
- Boutaga, K., van Winkelhoff, A. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., & Savelkoul, P. H. (2003). Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11), 4950–4954.
- Boutaga, K., van Winkelhoff, A. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., & Savelkoul, P. H. (2005). Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 45(2), 191–199.
- Boutaga, K., van Winkelhoff, A. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., & Savelkoul, P. H. (2006). The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. *Journal of Clinical Periodontology*, 33(6), 427–433.
- Coughlin, S. S., Trock, B., Criqui, M. H., Pickle, L. W., Browner, D., & Tefft, M. C. (1992). The logistic modeling of sensitivity, specificity, and predictive value of a diagnostic test. *Journal of Clinical Epidemiology*, 45(1), 1–7.
- D'Ercole, S., Catamo, G., Tripodi, D., & Piccolomini, R. (2008). Comparison of culture methods and multiplex PCR for the detection of periodontopathogenic bacteria in biofilm associated with severe forms of periodontitis. *The New Microbiologica*, 31(3), 383–391.
- Dahlén, G., Renvert, S., Wikström, M., & Egelberg, J. (1990). Reproducibility of microbiological samples from periodontal pockets. *Journal of Clinical Periodontology*, 17(2), 73–77.
- Hajishengallis, G., & Lamont, R. J. (2012). Beyond the red complex and into more complexity: The polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Molecular Oral Microbiology*, 27(6), 409–419.
- Jervoe-Storm, P. M., Koltzsch, M., Falk, W., Dorfler, A., & Jepsen, S. (2005). Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(7), 778–783.
- Kotsilkov, K., Popova, C., Boyanova, L., Setchanova, L., & Mitov, I. (2015). Comparison of culture method and real-time PCR for detection of putative periodontopathogenic bacteria in deep periodontal pockets. *Biotechnology, Biotechnological Equipment*, 29(5), 996–1002.
- Lau, L., Sanz, M., Herrera, D., Morillo, J. M., Martín, C., & Silva, A. (2004). 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. *Journal of Clinical Periodontology*, 31(12), 1061–1069.
- Marín, M. J., Ambrosio, N., Herrera, D., Sanz, M., & Figuero, E. (2018). Validation of a multiplex qPCR assay for the identification and quantification of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: In vitro and subgingival plaque samples. *Archives of Oral Biology*, 88, 47–53.
- Marín, M. J., Ambrosio, N., Virto, L., Diz, P., Álvarez, M., Herrera, D., ... Figuero, E. (2017). Detection and quantification of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*,

- Porphyromonas gingivalis and Streptococcus oralis in blood samples with different microbiological identification methods: An in vitro study. *Archives of Oral Biology*, 74, 55–62.
- Marín, M. J., Figuero, E., Herrera, D., & Sanz, M. (2017). Quantitative analysis of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction (PCR). *Methods in Molecular Biology*, 1537, 191–202.
- Molenkamp, R., van der Ham, A., Schinkel, J., & Beld, M. (2007). Simultaneous detection of five different DNA targets by real-time Taqman PCR using the Roche LightCycler480: Application in viral molecular diagnostics. *Journal of Virological Methods*, 141(2), 205–211.
- Mombelli, A., McNabb, H., & Lang, N. P. (1991). Black-pigmenting gram-negative bacteria in periodontal disease. II. Screening strategies for detection of *P. gingivalis*. *Journal of Periodontal Research*, 26(4), 308–313.
- Nonnenmacher, C., Dalpke, A., Rochon, J., Flores-de-Jacoby, L., Mutters, R., & Heeg, K. (2005). Real-time polymerase chain reaction for detection and quantification of bacteria in periodontal patients. *Journal of Periodontology*, 76(9), 1542–1549.
- Oteo, A., Herrera, D., Figuero, E., O'Connor, A., González, I., & Sanz, M. (2010). Azithromycin as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of Porphyromonas gingivalis-associated periodontitis: A pilot study. *Journal of Clinical Periodontology*, 37(11), 1005–1015.
- Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., ... Tonetti, M. S. (2018). Periodontitis: consensus report of workgroup 2 of the 2017 world workshop on the classification of periodontal and peri-implant diseases and conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, 45, S162–S170.
- Paster, B. J., Boches, S. K., Galvin, J. L., Ericson, R. E., Lau, C. N., Levanos, V. A., ... Dewhirst, F. E. (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of Bacteriology*, 183(12), 3770–3783.
- Sakamoto, M., Takeuchi, Y., Umeda, M., Ishikawa, I., & Benno, Y. (2001). Rapid detection and quantification of five periodontopathic bacteria by real-time PCR. *Microbiology and Immunology*, 45(1), 39–44.
- Sánchez, M. C., Fernández, E., Llama-Palacios, A., Figuero, E., Herrera, D., & Sanz, M. (2017). Response to antiseptic agents of periodontal pathogens in in vitro biofilms on titanium and zirconium surfaces. *Dental Materials*, 33(4), 446–453.
- Sánchez, M. C., Marín, M. J., Figuero, E., Llama-Palacios, A., Herrera, D., & Sanz, M. (2013). Analysis of viable vs. dead *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* using selective quantitative real-time PCR with propidium monoazide. *Journal of Periodontal Research*, 48(2), 213–220.
- Sánchez, M. C., Marín, M. J., Figuero, E., Llama-Palacios, A., León, R., Blanc, V., ... Sanz, M. (2014). Quantitative real-time PCR combined with propidium monoazide for the selective quantification of viable periodontal pathogens in an in vitro subgingival biofilm model. *Journal of Periodontal Research*, 49(1), 20–28.
- Sanz, M., Beighton, D., Curtis, M. A., Cury, J. A., Dige, I., Dommisch, H., ... Zaura, E. (2017). Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 44(Suppl 18), S5–S11.
- Sanz, M., Lau, L., Herrera, D., Morillo, J. M., & Silva, A. (2004). Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: A review. *Journal of Clinical Periodontology*, 31(12), 1034–1047.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent, R. L. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(2), 134–144.
- Syed, S. A., & Loesche, W. J. (1972). Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Applied Microbiology*, 24(4), 638–644.
- Tomas, A. C., Andrade, C. A., Diaz, A. B. F., Abad, M. M., Shaheen, I., Farfan, L. C., ... Herrero, C. C. (2017). 70-gene signature, an encouraging prognostic tool to guide adjuvant therapy in early breast cancer. *Annals of Oncology*, 28.
- Verner, C., Lemaitre, P., Daniel, A., Giumelli, B., Lakhssassi, N., & Sixou, M. (2006). Carpegen real-time polymerase chain reaction vs. anaerobic culture for periodontal pathogen identification. *Oral Microbiology and Immunology*, 21(6), 341–346.
- Westphal, J. F., Nonnenmacher, C., & Jehl, F. (2005). Quality of antibiotic utilization for pneumonia in mental healthcare setting: Assessment through a computerized surveillance program in a university-affiliated psychiatric hospital. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 77(2) P71-P71.
- Yoshida, A., Suzuki, N., Nakano, Y., Oho, T., Kawada, M., & Koga, T. (2003). Development of a 5' fluorogenic nuclease-based real-time PCR assay for quantitative detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(2), 863–866.



## **VI. DISCUSIÓN**



El presente trabajo de investigación, basado en una serie de estudios, tuvo como objetivo validar y comparar los resultados obtenidos con diferentes técnicas de microbiología para la detección de patógenos periodontales en muestras de sangre (Estudios 1 y 2) y en muestras subgingivales (Estudios 3 y 4) para el estudio de bacteriemias de origen periodontal.

Se observó que, para la detección de bacterias patógenas periodontales en muestras de sangre, (1) el hemocultivo BACTEC® no pudo identificar *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans in vitro*; (2) el cultivo anaerobio directo y qPCR pudieron detectar todas las bacterias, incluso a las concentraciones más bajas ( $10^1$  UFC/mL); y que (3), a pesar de que *in vitro* el uso de cultivo anaerobio directo reportó los mejores resultados en términos de concordancia, sensibilidad y especificidad, en el estudio *in vivo* de inducción de bacteriemias tras cepillado interdental, qPCR fue la única técnica que detectó bacterias patógenas periodontales en muestras de sangre.

Los resultados derivados de los estudios de validación de detección de bacterias patógenas periodontales mediante el uso de qPCR múltiple, revelaron que (1) el ensayo de m-qPCR detectó cantidades comparables de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* en comparación con qPCR simple y cultivo; (2) en comparación con el método de referencia, m-qPCR mostró excelentes resultados en términos de concordancia, sensibilidad y especificidad; y (3) m-qPCR reveló bajos valores de concordancia y especificidad para *T. forsythia*.

## **1. Importancia de la validación de una técnica microbiológica**

Las actividades relacionadas con la verificación y validación de métodos microbiológicos tienen gran importancia, debido por un lado al continuo desarrollo y actualización de técnicas cada vez más complejas y, por otro lado, al interés de los profesionales en garantizar la calidad de sus resultados clínicos y de investigación.

La validación se puede definir como "el proceso mediante el cual se establece que las características de rendimiento de un método o técnica cumplen los requisitos para la aplicación prevista". La validación de un método, por lo tanto, sirve como aportación de evidencias objetivas que demuestren el cumplimiento de ciertos requisitos de una técnica (Camaro y cols., 2013). En general, la base de la estrategia de validación debe

incluir los parámetros de: reproducibilidad, validez, sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos, y límite de detección (Tabla 3).

*Tabla 3. Parámetros para el estudio de validación*

Parámetros	Definición
Reproducibilidad	El grado en el que concuerdan dos o más mediciones de un mismo aspecto realizadas sobre una muestra. Capacidad de un instrumento de dar el mismo resultado en mediciones diferentes realizadas en las mismas condiciones a lo largo de periodos dilatados de tiempo.
Validez	Grado en el que una medición coincide con la verdad. Es el grado en el que los resultados de una medición corresponden al fenómeno real que se mide (“la verdad”). Los parámetros de validez interna son: la sensibilidad y especificidad.
Sensibilidad	Capacidad para detectar la enfermedad entre los enfermos. Probabilidad condicionada de obtener un resultado positivo en la prueba si la muestra presenta la enfermedad.
Especificidad	Capacidad para detectar la salud entre los sanos. Probabilidad condicionada de obtener un resultado negativo en la prueba si la muestra no presenta la enfermedad.
Valor predictivo positivo	Probabilidad de que una muestra con un valor positivo en la prueba tenga la enfermedad.
Valor predictivo negativo	Probabilidad de que una muestra con resultado negativo en la prueba no tenga la enfermedad.
Límite de detección	Es la concentración más baja posible a la que la técnica puede detectar la bacteria objeto de estudio con cierto grado de confianza. También se define como la concentración más baja que se puede separar del ruido de fondo con cierta fiabilidad.

La importancia de validar una técnica en microbiología periodontal, es la implicación tanto diagnóstica, terapéutica o de investigación que puedan tener los resultados derivados de los mismos. Por lo tanto, se deben asegurar al máximo la fiabilidad de los resultados mediante una adecuada validación de las técnicas. Esto implica que, además de reunir los criterios técnicos que aseguren su validez, deben ser realizados con una serie de garantías, que permitan obtener resultados comparables. En

este sentido, el empleo de métodos de referencia, reconocidos y aceptados, es la herramienta más eficaz para obtener estas garantías. Por ello, la validación de un método microbiológico periodontal requiere la comparación del mismo con un método de referencia, como es el cultivo.

En cuanto a las técnicas microbiológicas de detección de bacterias en sangre, sólo un estudio previo había analizado este tipo de parámetros de validación, y sólo comparando dos técnicas (Castillo y cols., 2011). Existen estudios donde han utilizado más de una técnica a la vez, pero sin hacer ningún tipo de comparación estadística entre ambas (Kinane y cols., 2005, Padilla y cols., 2007, Balejo y cols., 2017). En cuanto a las muestras subgingivales, en este caso sí que existe literatura comparando diferentes técnicas y usando estos parámetros de validación, sobre todo en aquellos estudios donde se ha comparado el cultivo anaerobio con nuevas técnicas moleculares como la qPCR simple (Lau y cols., 2004). Por ello, se debe resaltar que la investigación sobre las técnicas a utilizar en muestras de estudios de bacteriemia de origen periodontal no había sido evaluada con anterioridad a las investigaciones que forman parte de este trabajo.

## **2. Validación de los métodos para la detección de bacterias patógenas periodontales en muestras de sangre**

Se estima que, en pacientes con periodontitis, debido a la mayor prevalencia y cantidad de bacterias en el biofilm subgingival, existe un mayor riesgo de bacteriemia. Sin embargo, los estudios publicados han encontrado resultados contradictorios en cuanto a datos de prevalencia.

Los sistemas automatizados de hemocultivo (como el sistema BACTEC®) han sido el método de diagnóstico más utilizado para identificar patógenos periodontales en sangre periférica (Tabla 2) y se ha considerado la referencia estándar en la investigación de bacteriemia médica. Sin embargo, los resultados de la presente investigación (Estudio 1), demostraron que el sistema BACTEC® no pudo detectar en muestras de sangre patógenos periodontales clave como *P. gingivalis*. La presencia de resultados falsos negativos por este sistema puede estar relacionado con las dificultades inherentes al cultivo de algunas bacterias “fastidiosas” específicas como *P. gingivalis* y *A.*

*actinomycetemcomitans*, que requieren medios de cultivo específicos, o condiciones especiales para crecer: por ejemplo, hemina para *P. gingivalis* (Gibbons y Macdonald, 1960), o medio Dentaaid-1 suplementado con vancomicina para *A. actinomycetemcomitans* (Alsina y cols., 2001). Así que la elección del subcultivo posterior de este método es clave para poder identificar bacterias patógenas periodontales. Además, esta técnica carece de información para estudiar la magnitud de la bacteriemia que puede ocurrir en un paciente con periodontitis.

En cuanto a la técnica de lisis-centrifugación, se ha considerado como la técnica de cultivo cuantitativa más sensible para la recuperación de bacterias en el torrente sanguíneo en el ámbito hospitalario (Zhang y cols., 2013). Sin embargo, en comparación con otras técnicas de cultivo, como el cultivo anaerobio directo, requiere volúmenes de sangre mayores (al menos de 5 mL), los costes de procesado son mayores debido a la utilización de viales especiales y, además, en el Estudio 1 se ha observado cierta subestimación en la cuantificación bacteriana. Sin embargo, a diferencia de lisis centrifugación, la técnica de cultivo anaerobio directo (técnica de referencia estándar en microbiología periodontal) nunca se ha utilizado antes en investigaciones de bacteriemias de origen periodontal.

El cultivo anaerobio directo tiene diferentes ventajas a la hora de ser utilizado para el estudio de bacteriemias de origen periodontal: el volumen de sangre requerido es inferior (2 mL, en comparación a los 5 mL o 10 mL necesarios en lisis y BACTEC®, respectivamente), un tiempo de procesamiento más reducido, un procesamiento de muestra más simple (ya que solo requiere el cultivo directo de muestras en un medio de agar adecuado) y el costo relativamente más bajo, en comparación con lisis centrifugación. Estas consideraciones pueden llevar a considerar el cultivo anaerobio directo como la técnica más apropiada para el análisis de bacteriemias de origen periodontal. Además, se ha considerado el estándar de referencia en el análisis microbiológico de muestras subgingivales (Sanz y cols., 2004) y, por tanto, tanto las muestras orales como las de sangre podrían procesarse con la misma tecnología dentro del mismo paciente.

Sin embargo, las técnicas que dependen del cultivo tienen desventajas importantes. Algunos de los inconvenientes pueden superarse mediante técnicas moleculares, como qPCR, que ha demostrado una alta sensibilidad en la detección de bacterias patógenas periodontales, como *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *T. forsythia* a nivel subgingival (Boutaga y cols., 2003, Lau y cols., 2004, Morillo y cols., 2004). Autores como Lockhart

et al. y Kinane et al. complementan el sistema de hemocultivo con una técnica cualitativa basada en PCR. En el caso de Kinane et al. (Kinane y cols., 2005), se observó que la prevalencia del 3% obtenida con hemocultivo se incrementó hasta el 13% cuando se analizó con PCR. Estos resultados pueden fortalecer la importancia de utilizar técnicas microbiológicas apropiadas, con medios de cultivo específicos o técnicas moleculares. En el presente estudio de investigación *in vivo* (Estudio 2) se observó que qPCR pudo detectar *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* en dos pacientes con periodontitis después del cepillado interdental.

Este trabajo incluye el primer estudio *in vitro* e *in vivo* aplicando técnicas relevantes en microbiología periodontal (cultivo anaerobio directo y qPCR) para optimizar la detección de bacterias patógenas periodontales en sangre. Además, la ventaja añadida de poder utilizar estas técnicas, es la posibilidad de poder emplear las mismas técnicas para la detección de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* a nivel subgingival. Esto podría dar lugar al posible análisis de correlación entre muestras de sangre y subgingivales en el mismo paciente. Pocos son los estudios que analizan este aspecto en el ámbito de bacteriemia de origen periodontal, y aquellos que analizan ambos tipos de muestras no realizan análisis de correlación. En cuanto al resultado obtenido en esta investigación (Estudio 2), se observó una correlación positiva y estadísticamente significativa entre los niveles de *A. actinomycetemcomitans* en sangre y muestras subgingivales.

### **3. Validación de las técnicas moleculares para la detección y cuantificación de bacterias patógenas periodontales en muestras subgingivales**

Durante muchos años, el cultivo anaerobio directo se ha considerado el método estándar de referencia para la detección de patógenos periodontales que residen en el biofilm subgingival (Sanz y cols., 2004). Sin embargo, esta técnica tiene limitaciones claras. Además, los recuentos de UFC/mL no son un verdadero recuento celular (las células individuales son de naturaleza especial, lo que lleva a que la UFC sea una subestimación de la cantidad de bacterias presentes). A esto se le suma la dificultad de detectar concentraciones o niveles bajos de bacterias, teniendo un límite de detección de  $10^3$  a  $10^4$  UFC/mL (Boutaga y cols., 2003, Jervoe-Storm y cols., 2005).

Para superar estas limitaciones, se han desarrollado técnicas basadas en métodos moleculares, como la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estudios previos han demostrado una alta sensibilidad y especificidad de la tecnología qPCR en la detección y cuantificación de bacterias periodontales tales como *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* o *T. forsythia* (Morillo y cols., 2004) y, en comparación con las técnicas de cultivo anaerobio directo (Lau y cols., 2004). Además, la qPCR tiene un límite de detección entre  $10^1$  a  $10^2$  UFC/mL pudiendo así detectar más muestras positivas que el cultivo debido a sus excelentes límites de detección en comparación con el cultivo.

Recientemente, una modalidad diferente de qPCR, qPCR múltiple se ha utilizado con éxito en el diagnóstico microbiológico médico (Puenpa y cols., 2017). El ensayo m-qPCR lleva el análisis un paso más allá, permitiendo la amplificación simultánea de diferentes secuencias objetivo de la misma muestra, lo que implica una clara reducción en el tiempo y el costo (Bolívar y cols., 2014). Además, permite la utilización de una cantidad menor de muestra, pudiendo así conservar mayor cantidad de muestras para futuros análisis. Sin embargo, sólo dos autores han utilizado esta técnica para la detección de patógenos periodontales, pero ninguno había validado ni comparado con otra técnica la detección de bacterias patógenas periodontales (Milne y cols., 2016, Coffey y cols., 2016). Milne et al. (2016) desarrollaron un ensayo multiplex dirigido a muestras de placa subgingival, pero utilizando cebadores dirigidos a genes de copia única (Rgpa e IlkA), en lugar de secuencias de 16S rRNA. La mayoría de los ensayos de q-PCR en tiempo real para la cuantificación de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* usan secuencias 16S rRNA, una pequeña subunidad de ADN presente en todas las especies bacterianas que contiene secuencias específicas de especies altamente conservadas.

La presente investigación ha demostrado que m-qPCR y el cultivo anaerobio directo mostraron resultados similares, tanto en recuentos como en frecuencias de detección, demostrando un alto grado de acuerdo y concordancia, para *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos, que han demostrado una alta precisión diagnóstica de qPCR, en comparación con las técnicas de cultivo (Lau y cols., 2004, Jervoe-Storm y cols., 2005). Sin embargo, se observó un bajo nivel de concordancia y un bajo coeficiente de correlación para *T. forsythia*. Esto también se refleja en el bajo valor de especificidad de m-qPCR, en comparación con el cultivo (ya que muchas de las muestras que daban negativo para el cultivo, dieron positivas con m-qPCR). En consecuencia, m-qPCR produjo una prevalencia significativamente mayor

de *T. forsythia* que el cultivo. Estos resultados también están de acuerdo con otros estudios, informando una alta sensibilidad y baja especificidad para la técnica qPCR versus cultivo para *T. forsythia* (Sakamoto y cols., 2001, Jervoe-Storm y cols., 2005, Boutaga y cols., 2007, Kotsilkov y cols., 2015). Estos resultados podrían explicarse por las limitaciones del cultivo anaerobio directo para identificar este patógeno periodontal, ya que qPCR necesita un umbral de detección más bajo para su identificación y detección.

En el contexto de un ensayo de qPCR múltiple, uno de los inconvenientes de este método son las posibles reacciones cruzadas que puedan detectar ADN no objeto de estudio. En este presente estudio de investigación (Estudios 3 y 4), se observó que cuando se mezclaron concentraciones bajas del ADN objeto de estudio ( $\leq 10^2$  o  $10^1$  UFC/mL) con concentraciones mayores de ADN de células bacterianas no diana (ADN  $> 10^7$  UFC/mL), se detectaron amplificaciones inespecíficas en m-qPCR y qPCR. Esto puede indicar que las reacciones cruzadas sólo pueden ocurrir en estas condiciones. En la práctica diaria, esto no debería ser un problema, ya que los niveles superiores a  $10^7$  UFC/mL de bacterias específicas generalmente no se detectan en muestras clínicas (Lau y cols., 2004, Teles y cols., 2013). Dichas reacciones cruzadas determinan el límite de detección de m-qPCR (alrededor de  $10^2$  UFC/mL), valor que puede variar mínimamente según las condiciones ambientales y el tipo de muestra analizada (Figuro y cols., 2014). Otra dificultad asociada con la tecnología m-qPCR es la selección de múltiples sondas con diferente longitud de onda de fluorescencia, lo que permite la distinción de señales de diferentes conjuntos de cebadores/sondas, pero los espectros de emisión de los fluoróforos utilizados con el qPCR pueden superponerse, lo que podría producir un diálogo cruzado entre los diferentes canales. Para resolver este problema, en el presente trabajo de investigación (Estudio 4) se realizaron ensayos de compensación de color para corregir las señales y esto permitió leer cada sonda en el canal correspondiente, lo que excluyó las señales de los fluoróforos vecinos (Molenkamp y cols., 2007).

#### **4. ¿Un antes y un después de los estudios de bacteriemias de origen periodontal?**

Los primeros estudios que analizaron bacteriemias tras procedimientos periodontales, tales como la higiene bucodental o una profilaxis profesional, datan de los años 1970 (Sconyers y cols., 1973, Madsen, 1974, Silver y cols., 1977). Para ello, se trasladó todo el conocimiento de estudios de bacteriemia a nivel hospitalario para analizar los episodios de bacteriemia tras procedimientos periodontales. El objetivo inicial de estos estudios era, principalmente, corroborar episodios de bacteriemia a nivel cualitativo tras diferentes manipulaciones periodontales, reparando principalmente en analizar la prevalencia y, de modo muy genérico, el tipo de bacterias encontradas, sin profundizar específicamente en la detección de bacterias patógenas periodontales ni en que pacientes serían más susceptibles a estas bacteriemias. Los resultados de estudios científicos en este campo, avalan el paso de patógenos periodontales a sangre (Tomas y cols., 2012, Horliana y cols., 2014). Sin embargo, aquellos estudios que detectan bacterias patógenas periodontales lo hacen con poca prevalencia, y pocos son los estudios que analizan la magnitud de esas bacteriemias (Zhang y cols., 2013, Balejo y cols., 2017). A pesar de ello, estos resultados son positivos y confirmarían que las bacterias patógenas periodontales son capaces de pasar al torrente sanguíneo y alcanzar localizaciones distantes al ámbito subgingival, dando robustez así a la vía directa entre la relación de la periodontitis con diferentes patologías sistémicas.

Se ha descrito que no sólo es importante valorar qué procedimientos conducen a un episodio de bacteriemia, sino que el estado periodontal de esos pacientes tiene influencia en esos episodios. Se ha observado que la inflamación periodontal está directamente relacionada con mayores prevalencias en bacteriemia (Tomas y cols., 2012, Daly y cols., 2001). A su vez, se ha descrito que los pacientes con periodontitis presentan mayores recuentos y presencias de bacterias patógenas periodontales a nivel subgingival. En ello radica la relevancia de la hipótesis de que los pacientes con periodontitis, con mayores recuentos de bacterias patógenas periodontales, puedan sufrir con más frecuencia eventos de bacteriemia, que serían más duraderos, con mayor cantidad de bacterias, y siendo las especies involucradas más patógenas. Sería interesante, por tanto, valorar si la carga bacteriana o perfiles específicos a nivel subgingival estarían relacionadas con episodios más severos de bacteriemias. Además, el correlacionar lo encontrado en sangre y a nivel subgingival, da lugar a la valoración de un posible umbral de

bacteriemia. Hasta la fecha sólo un número reducido de estudios de bacteriemia de origen periodontal analizan muestras subgingivales de esos pacientes; y los que lo hacen no tratan de establecer correlaciones, sino que solo describen los resultados (Padilla y cols., 2007, Morozumi y cols., 2010, Castillo y cols., 2011, Balejo y cols., 2017).

Por ello, teniendo en cuenta lo que sabemos de microbiología periodontal para la identificación de bacterias patógenas periodontales clave, gracias a los avances en las técnicas, sería apropiado utilizar métodos más específicos para la detección y cuantificación de bacteriemias de origen periodontal. Así, a su vez, este campo de investigación iría un paso más allá, dándole más importancia a analizar la magnitud de patógenos periodontales que pueden pasar al torrente sanguíneo y como este hecho estaría relacionado con el ambiente disbiótico subgingival de esos pacientes. Con ello, se reforzaría aún más la vía directa de relación entre la periodontitis y las enfermedades sistémicas. Por tanto, los resultados de la presente investigación sugieren la utilización del cultivo anaerobio directo y la qPCR como técnicas de elección para la detección y cuantificación de bacterias periodontopatógenas en estudios de bacteriemias de origen periodontal.

Así pues, el objetivo de esta memoria de investigación ha sido validar y optimizar técnicas cuantitativas de referencia a nivel de microbiología periodontal, para su uso a nivel de estudios de bacteriemia de origen periodontal. Por un lado, una de las ventajas de utilizar estos métodos sería la posibilidad de utilizar las mismas técnicas cuantitativas para el análisis de muestras, tanto de sangre como subgingival, en un mismo paciente. Por otro lado, la utilización de estos métodos, sobre todo los moleculares como qPCR, mostrarían como ventajas una mayor rapidez de procesado y un menor volumen de muestra necesario.

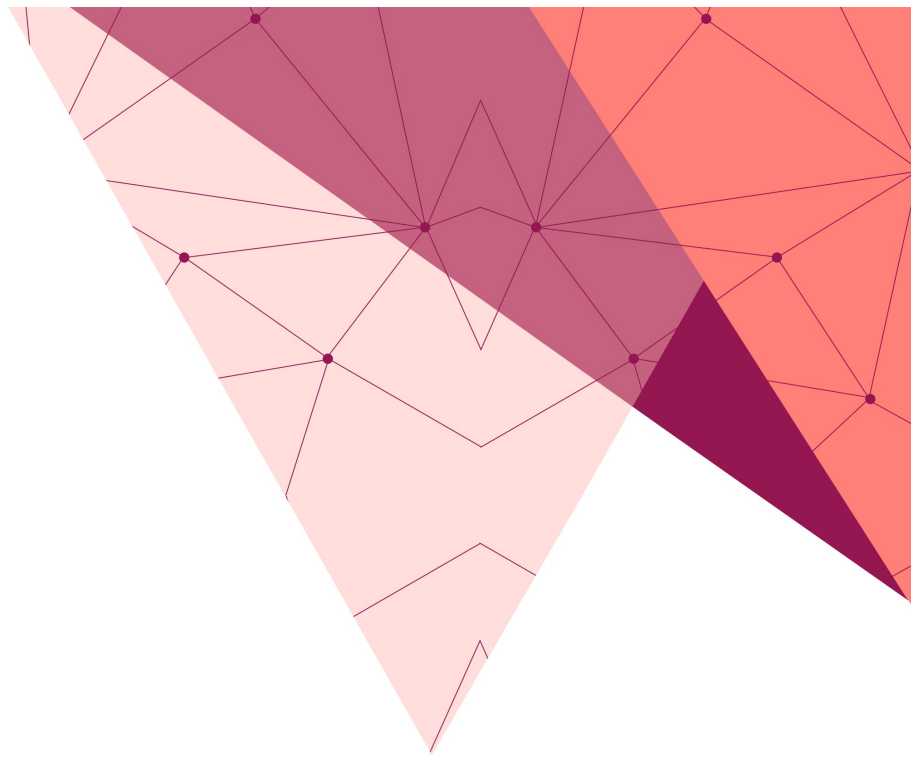
## **5. Limitaciones, puntos fuertes e implicaciones**

A pesar de los resultados prometedores de esta memoria de investigación, existen ciertas limitaciones a tener en cuenta a la hora de interpretar todos los resultados. Por un lado, las validaciones realizadas han sido en estudios *in vitro* o *in vivo* con un número limitado de muestras y con muestras de conveniencia. Por ello, el poder extrapolar estos

resultados para así conseguir una validez externa, es complicado. Además, sólo se han utilizado tres bacterias patógenas periodontales, siendo interesante el poder validar más bacterias periodontopatógenas y, también, aquellas de nueva aparición asociadas con periodontitis.

Sin embargo, cabe destacar que no hay estudios previos analizando este tipo de validaciones en el ámbito de la microbiología periodontal, pudiendo así explicar muchos de los resultados negativos que se observan en diferentes publicaciones, respecto a la detección de estas bacterias tanto a nivel de sangre como en muestras subgingivales. Por ello, como punto fuerte de este trabajo, se puede resaltar que, para futuros estudios de bacteriemias de origen periodontal, la utilización de las técnicas de microbiología validadas en esta investigación debe ser recomendado.

Además, la correcta detección de estas bacterias haría aún más plausible la vía directa de la relación entre la periodontitis y ciertas enfermedades sistémicas. Sería interesante por ello ampliar la validación de estas técnicas a futuros estudios clínicos de bacteriemia, con estímulos periodontales más potentes como el raspado y alisado radicular.



## **VII. CONCLUSIONES**

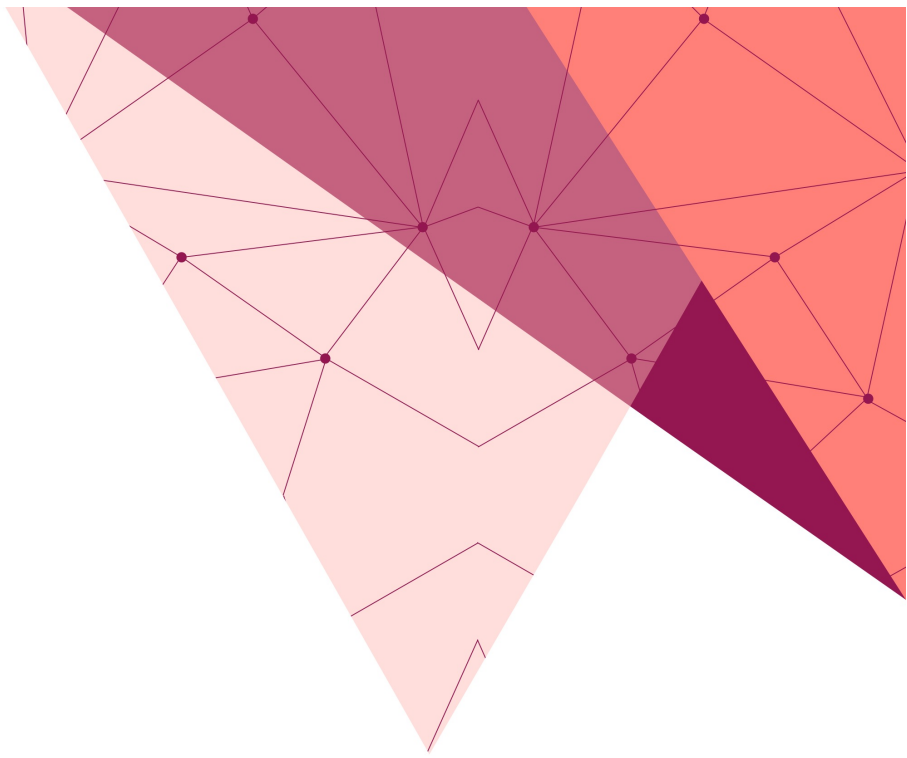


De manera general, se puede concluir que tras la validación de diferentes técnicas microbiológicas para la detección y cuantificación de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *T. forsythia*, tanto en muestras de sangre como en muestras subgingivales, se sugiere que el cultivo anaerobio directo y la qPCR son las técnicas más relevantes para la utilización en futuros estudios sobre bacteriemia de origen periodontal.

De manera específica, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

1. El cultivo anaerobio directo y la q-PCR mostraron los mejores resultados para la identificación adecuada y la cuantificación de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* en muestras de sangre *in vitro*. Además, la técnica convencional de hemocultivo BACTEC® no es un método adecuado para identificar patógenos periodontales en estudios de bacteriemia.
2. En el estudio de bacteriemia tras cepillado interdental, se detectó *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* mediante q-PCR en pacientes con periodontitis. Además, se encontró una correlación positiva entre los niveles de *A. actinomycetemcomitans* en sangre y muestras subgingivales.
3. La técnica de q-PCR múltiple fue exitosa en la cuantificación simultánea de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, con un alto grado de sensibilidad y especificidad, tanto en muestras *in vitro* como en muestras subgingivales de pacientes periodontalmente sanos y con periodontitis.
4. La técnica de q-PCR múltiple es un método de diagnóstico sensible y específico para identificar y cuantificar simultáneamente patógenos bacterianos específicos de muestras subgingivales, con buena concordancia con el cultivo anaerobio para *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*. Sin embargo, para *T. forsythia*, se observó una mayor sensibilidad y un mayor valor predictivo, en comparación con el cultivo.





## **VIII. BIBLIOGRAFÍA**



- AAP 1996. Consensus report. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol*, 1, 926-32.
- Alsina, M., Olle, E. & Frias, J. 2001. Improved, low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol*, 39, 509-13.
- Arana, P., Salazar, D., Amaya, A., Medina, M., Moreno-Correa, S., Moreno, F., González, H. & Contreras, A. 2018. Microorganismos periodontales en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide. Revisión sistemática de la literatura 2017. *Rev Colomb Reumatol*, 25, 271-286.
- Armitage, G. C. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, 4, 1-6.
- Aruni, A. W., Mishra, A., Dou, Y., Chioma, O., Hamilton, B. N. & Fletcher, H. M. 2015. Filifactor alocis--a new emerging periodontal pathogen. *Microbes Infect*, 17, 517-30.
- Atieh, M. A. 2008. Accuracy of real-time polymerase chain reaction versus anaerobic culture in detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: a meta-analysis. *J Periodontol*, 79, 1620-9.
- Balejo, R. D. P., Cortelli, J. R., Costa, F. O., Cyrino, R. M., Aquino, D. R., Cogomuller, K., Miranda, T. B., Moura, S. P. & Cortelli, S. C. 2017. Effects of chlorhexidine preprocedural rinse on bacteremia in periodontal patients: a randomized clinical trial. *J Appl Oral Sci*, 25, 586-595.
- Billings, M., Holtfreter, B., Papapanou, P. N., Mitnik, G. L., Kocher, T. & Dye, B. A. 2018. Age-dependent distribution of periodontitis in two countries: Findings from NHANES 2009 to 2014 and SHIP-TREND 2008 to 2012. *J Clin Periodontol*, 45 Suppl 20, S130-S148.
- Boehm, T. K. & Scannapieco, F. A. 2007. The epidemiology, consequences and management of periodontal disease in older adults. *J Am Dent Assoc*, 138 Suppl, 26S-33S.
- Bolivar, A., Rojas, A. & Garcia-Lugo, P. 2014. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina*, 3, 25-33.
- Boutaga, K., Savelkoul, P. H., Winkel, E. G. & van Winkelhoff, A. J. 2007. Comparison of subgingival bacterial sampling with oral lavage for detection and quantification of periodontal pathogens by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol*, 78, 79-86.
- Boutaga, K., van Winkelhoff, A. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M. & Savelkoul, P. H. 2003. Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *J Clin Microbiol*, 41, 4950-4.
- Bravo, M., Almerich, J. M., Ausina, V., Avilés, P., Blanco, J., Canorea, E., Casals, E., Gómez, G., Hita, C., Llodra, J., Monge, M. A., Montiel, J. M., Palmer, P. & Sainz, C. 2016. Encuesta de Salud Oral en España 2015. *RCOE*, 21, 8-48.
- Brodala, N., Merricks, E. P., Bellinger, D. A., Damrongsri, D., Offenbacher, S., Beck, J., Madianos, P., Sotres, D., Chang, Y. L., Koch, G. & Nichols, T. C. 2005. *Porphyromonas gingivalis* bacteremia induces coronary and aortic

- atherosclerosis in normocholesterolemic and hypercholesterolemic pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25, 1446-51.
- Calandrini, C. A., Ribeiro, A. C., Gonnelli, A. C., Ota-Tsuzuki, C., Rangel, L. P., Saba-Chujfi, E. & Mayer, M. P. 2014. Microbial composition of atherosclerotic plaques. *Oral Dis*, 20, e128-34.
- Camaro, M., Catalá, V., Gimeno, C., Martínez, R. & Olmos, P. 2013. 48. Validación y verificación de los métodos microbiológicos. *En: Cercenado, E. & Cantón, R. (eds.) Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. España.
- Carasol, M., Llodra, J. C., Fernandez-Meseguer, A., Bravo, M., Garcia-Margallo, M. T., Calvo-Bonacho, E., Sanz, M. & Herrera, D. 2016. Periodontal conditions among employed adults in Spain. *J Clin Periodontol*, 43, 548-56.
- Carmona, I. T., Diz Dios, P. & Scully, C. 2002. An update on the controversies in bacterial endocarditis of oral origin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 93, 660-70.
- Castillo, D. M., Sanchez-Beltran, M. C., Castellanos, J. E., Sanz, I., Mayorga-Fayad, I., Sanz, M. & Lafaurie, G. I. 2011. Detection of specific periodontal microorganisms from bacteraemia samples after periodontal therapy using molecular-based diagnostics. *J Clin Periodontol*, 38, 418-27.
- Caton, J. G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L. C., Jepsen, S., Kornman, K. S., Mealey, B. L., Papapanou, P. N., Sanz, M. & Tonetti, M. S. 2018. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol*, 89 Suppl 1, S1-S8.
- Cionca, N., Giannopoulou, C., Ugolotti, G. & Mombelli, A. 2010. Microbiologic testing and outcomes of full-mouth scaling and root planing with or without amoxicillin/metronidazole in chronic periodontitis. *J Periodontol*, 81, 15-23.
- Coffey, J., Choudhry, M., Shlossman, M., Makin, I. R. S. & Singh, V. K. 2016. Multiplex real-time PCR detection and relative quantification of periodontal pathogens. *Clin Exp Dent Res*, 2, 185-192.
- Costalonga, M. & Herzberg, M. C. 2014. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunol Lett*, 162, 22-38.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, 1318-22.
- Crasta, K., Daly, C. G., Mitchell, D., Curtis, B., Stewart, D. & Heitz-Mayfield, L. J. 2009. Bacteraemia due to dental flossing. *J Clin Periodontol*, 36, 323-32.
- Daly, C. G., Mitchell, D. H., Highfield, J. E., Grossberg, D. E. & Stewart, D. 2001. Bacteremia due to periodontal probing: a clinical and microbiological investigation. *J Periodontol*, 72, 210-4.
- Deshpande, R. G., Khan, M. & Genco, C. A. 1998. Invasion strategies of the oral pathogen porphyromonas gingivalis: implications for cardiovascular disease. *Invasion Metastasis*, 18, 57-69.

- Dewhirst, F. E., Chen, T., Izard, J., Paster, B. J., Tanner, A. C., Yu, W. H., Lakshmanan, A. & Wade, W. G. 2010. The human oral microbiome. *J Bacteriol*, 192, 5002-17.
- Dietrich, T., Webb, I., Stenhouse, L., Pattni, A., Ready, D., Wanyonyi, K. L., White, S. & Gallagher, J. E. 2017. Evidence summary: the relationship between oral and cardiovascular disease. *Br Dent J*, 222, 381-385.
- Dissick, A., Redman, R. S., Jones, M., Rangan, B. V., Reimold, A., Griffiths, G. R., Mikuls, T. R., Amdur, R. L., Richards, J. S. & Kerr, G. S. 2010. Association of periodontitis with rheumatoid arthritis: a pilot study. *J Periodontol*, 81, 223-30.
- Dominy, S. S., Lynch, C., Ermini, F., Benedyk, M., Marczyk, A., Konradi, A., Nguyen, M., Haditsch, U., Raha, D., Griffin, C., Holsinger, L. J., Arastu-Kapur, S., Kaba, S., Lee, A., Ryder, M. I., Potempa, B., Mydel, P., Hellvard, A., Adamowicz, K., Hasturk, H., Walker, G. D., Reynolds, E. C., Faull, R. L. M., Curtis, M. A., Dragunow, M. & Potempa, J. 2019. Porphyromonas gingivalis in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Sci Adv*, 5, eaau3333.
- Ferreira, M. C., Dias-Pereira, A. C., Branco-de-Almeida, L. S., Martins, C. C. & Paiva, S. M. 2017. Impact of periodontal disease on quality of life: a systematic review. *J Periodontal Res*, 52, 651-665.
- Figuro, E., Lindahl, C., Marin, M. J., Renvert, S., Herrera, D., Ohlsson, O., Wetterling, T. & Sanz, M. 2014. Quantification of periodontal pathogens in vascular, blood, and subgingival samples from patients with peripheral arterial disease or abdominal aortic aneurysms. *J Periodontol*, 85, 1182-93.
- Figuro, E., Sanchez-Beltran, M., Cuesta-Frechoso, S., Tejerina, J. M., del Castro, J. A., Gutierrez, J. M., Herrera, D. & Sanz, M. 2011. Detection of periodontal bacteria in atheromatous plaque by nested polymerase chain reaction. *J Periodontol*, 82, 1469-77.
- Forner, L., Larsen, T., Kilian, M. & Holmstrup, P. 2006. Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *J Clin Periodontol*, 33, 401-7.
- Gibbons, R. J. & Macdonald, J. B. 1960. Hemin and vitamin K compounds as required factors for the cultivation of certain strains of *Bacteroides melaninogenicus*. *J Bacteriol*, 80, 164-70.
- Gonzales-Marin, C., Spratt, D. A., Millar, M. R., Simmonds, M., Kempley, S. T. & Allaker, R. P. 2011. Levels of periodontal pathogens in neonatal gastric aspirates and possible maternal sites of origin. *Mol Oral Microbiol*, 26, 277-90.
- Guglielmetti, M. R., Rosa, E. F., Lourencao, D. S., Inoue, G., Gomes, E. F., De Micheli, G., Mendes, F. M., Hirata, R. D., Hirata, M. H. & Pannuti, C. M. 2014. Detection and quantification of periodontal pathogens in smokers and never-smokers with chronic periodontitis by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol*, 85, 1450-7.
- Hajishengallis, G., Darveau, R. P. & Curtis, M. A. 2012. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol*, 10, 717-25.

- Hajishengallis, G. & Lamont, R. J. 2012. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol*, 27, 409-19.
- Haraszthy, V. I., Zambon, J. J., Trevisan, M., Zeid, M. & Genco, R. J. 2000. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol*, 71, 1554-60.
- Henry, N. K., Grewell, C. M., Van Grevenhof, P. E., Ilstrup, D. M. & Washington, J. A., 2nd 1984. Comparison of lysis-centrifugation with a biphasic blood culture medium for the recovery of aerobic and facultatively anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol*, 20, 413-6.
- Hirschfeld, J. & Kawai, T. 2015. Oral inflammation and bacteremia: implications for chronic and acute systemic diseases involving major organs. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 15, 70-84.
- Horliana, A. C., Chambrone, L., Foz, A. M., Artese, H. P., Rabelo Mde, S., Pannuti, C. M. & Romito, G. A. 2014. Dissemination of periodontal pathogens in the bloodstream after periodontal procedures: a systematic review. *PLoS One*, 9, e98271.
- Hujoel, P. P., White, B. A., Garcia, R. I. & Listgarten, M. A. 2001. The dentogingival epithelial surface area revisited. *J Periodontal Res*, 36, 48-55.
- Iniesta, M., Herrera, D., Montero, E., Zurbriggen, M., Matos, A. R., Marin, M. J., Sanchez-Beltran, M. C., Llama-Palacio, A. & Sanz, M. 2012. Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus reuteri*-containing tablets on the subgingival and salivary microbiota in patients with gingivitis. A randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*, 39, 736-44.
- Jervoe-Storm, P. M., AlAhdab, H., Semaan, E., Fimmers, R. & Jepsen, S. 2007. Microbiological outcomes of quadrant versus full-mouth root planing as monitored by real-time PCR. *J Clin Periodontol*, 34, 156-63.
- Jervoe-Storm, P. M., Koltzsch, M., Falk, W., Dorfler, A. & Jepsen, S. 2005. Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol*, 32, 778-83.
- Kassebaum, N. J., Bernabe, E., Dahiya, M., Bhandari, B., Murray, C. J. & Marcenes, W. 2014. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res*, 93, 1045-53.
- Katz, J., Chegini, N., Shiverick, K. T. & Lamont, R. J. 2009. Localization of *P. gingivalis* in preterm delivery placenta. *J Dent Res*, 88, 575-8.
- Kaur, S., White, S. & Bartold, P. M. 2013. Periodontal disease and rheumatoid arthritis: a systematic review. *J Dent Res*, 92, 399-408.
- Kinane, D. F., Riggio, M. P., Walker, K. F., MacKenzie, D. & Shearer, B. 2005. Bacteraemia following periodontal procedures. *J Clin Periodontol*, 32, 708-13.
- Kinane, D. F., Zhang, P., Benakanakere, M., Singleton, J., Biesbrock, A., Nonnenmacher, C. & He, T. 2015. Experimental gingivitis, bacteremia and systemic biomarkers: a randomized clinical trial. *J Periodontal Res*, 50, 864-9.

- Kornman, K. S. 2008. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J Periodontol*, 79, 1560-8.
- Kotsilkov, K., Popova, C., Boyanova, L., Setchanova, L. & Mitov, I. 2015. Comparison of culture method and real-time PCR for detection of putative periodontopathogenic bacteria in deep periodontal pockets. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29, 996-1002.
- Lafaurie, G. I., Mayorga-Fayad, I., Torres, M. F., Castillo, D. M., Aya, M. R., Baron, A. & Hurtado, P. A. 2007. Periodontopathic microorganisms in peripheral blood after scaling and root planing. *J Clin Periodontol*, 34, 873-9.
- Lamy, B., Dargere, S., Arendrup, M. C., Parienti, J. J. & Tattevin, P. 2016. How to Optimize the Use of Blood Cultures for the Diagnosis of Bloodstream Infections? A State-of-the Art. *Front Microbiol*, 7, 697.
- Lau, L., Sanz, M., Herrera, D., Morillo, J. M., Martin, C. & Silva, A. 2004. 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*, 31, 1061-9.
- Leira, Y., Dominguez, C., Seoane, J., Seoane-Romero, J., Pias-Peleteiro, J. M., Takkouche, B., Blanco, J. & Aldrey, J. M. 2017. Is Periodontal Disease Associated with Alzheimer's Disease? A Systematic Review with Meta-Analysis. *Neuroepidemiology*, 48, 21-31.
- Li, L., Messas, E., Batista, E. L., Jr., Levine, R. A. & Amar, S. 2002. *Porphyromonas gingivalis* infection accelerates the progression of atherosclerosis in a heterozygous apolipoprotein E-deficient murine model. *Circulation*, 105, 861-7.
- Lockhart, P. B., Brennan, M. T., Sasser, H. C., Fox, P. C., Paster, B. J. & Bahrani-Mougeot, F. K. 2008. Bacteremia associated with toothbrushing and dental extraction. *Circulation*, 117, 3118-25.
- Lockhart, P. B., Brennan, M. T., Thornhill, M., Michalowicz, B. S., Noll, J., Bahrani-Mougeot, F. K. & Sasser, H. C. 2009. Poor oral hygiene as a risk factor for infective endocarditis-related bacteremia. *J Am Dent Assoc*, 140, 1238-44.
- Loza, E., Planes, A. & Rodriguez, M. 2003. 3a Hemocultivos. *En: Cercenado, E. & Cantón, R. (eds.) Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. España.
- Madianos, P. N., Bobetsis, Y. A. & Offenbacher, S. 2013. Adverse pregnancy outcomes (APOs) and periodontal disease: pathogenic mechanisms. *J Clin Periodontol*, 40 Suppl 14, S170-80.
- Madsen, K. L. 1974. Effect of chlorhexidine mouthrinse and periodontal treatment upon bacteremia produced by oral hygiene procedures. *Scand J Dent Res*, 82, 1-7.
- Marcenes, W., Kassebaum, N. J., Bernabe, E., Flaxman, A., Naghavi, M., Lopez, A. & Murray, C. J. 2013. Global burden of oral conditions in 1990-2010: a systematic analysis. *J Dent Res*, 92, 592-7.
- Marsh, P. D. & Bradshaw, D. J. 1995. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol*, 15, 169-75.

- Martinez-Martinez, R. E., Abud-Mendoza, C., Patino-Marin, N., Rizo-Rodriguez, J. C., Little, J. W. & Loyola-Rodriguez, J. P. 2009. Detection of periodontal bacterial DNA in serum and synovial fluid in refractory rheumatoid arthritis patients. *J Clin Periodontol*, 36, 1004-10.
- Mattila, K. J., Nieminen, M. S., Valtonen, V. V., Rasi, V. P., Kesaniemi, Y. A., Syrjala, S. L., Jungell, P. S., Isoluoma, M., Hietaniemi, K. & Jokinen, M. J. 1989. Association between dental health and acute myocardial infarction. *BMJ*, 298, 779-81.
- Milne, T. J., Coates, D. E., Leichter, J. W., Soo, L., Williams, S. M., Seymour, G. J. & Cullinan, M. P. 2016. Periodontopathogen levels following the use of an Er:YAG laser in the treatment of chronic periodontitis. *Aust Dent J*, 61, 35-44.
- Mira, A., Simon-Soro, A. & Curtis, M. A. 2017. Role of microbial communities in the pathogenesis of periodontal diseases and caries. *J Clin Periodontol*, 44 Suppl 18, S23-S38.
- Molenkamp, R., van der Ham, A., Schinkel, J. & Beld, M. 2007. Simultaneous detection of five different DNA targets by real-time Taqman PCR using the Roche LightCycler480: Application in viral molecular diagnostics. *J Virol Methods*, 141, 205-11.
- Montero, E., Iniesta, M., Rodrigo, M., Marin, M. J., Figuero, E., Herrera, D. & Sanz, M. 2017. Clinical and microbiological effects of the adjunctive use of probiotics in the treatment of gingivitis: A randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*, 44, 708-716.
- Morillo, J. M., Lau, L., Sanz, M., Herrera, D., Martin, C. & Silva, A. 2004. Quantitative real-time polymerase chain reaction based on single copy gene sequence for detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol*, 31, 1054-60.
- Morillo, J. M., Lau, L., Sanz, M., Herrera, D. & Silva, A. 2003. Quantitative real-time PCR based on single copy gene sequence for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*, 38, 518-24.
- Morozumi, T., Kubota, T., Abe, D., Shimizu, T., Komatsu, Y. & Yoshie, H. 2010. Effects of irrigation with an antiseptic and oral administration of azithromycin on bacteremia caused by scaling and root planing. *J Periodontol*, 81, 1555-63.
- Olsen, I., Singhrao, S. K. & Potempa, J. 2018. Citrullination as a plausible link to periodontitis, rheumatoid arthritis, atherosclerosis and Alzheimer's disease. *J Oral Microbiol*, 10, 1487742.
- Padilla, C., Lobos, O., Jure, G., Matus, S., Descouvieres, C., Hasbún, S., Maragaño, P. & Núñez, L. 2007. Aislamiento de bacterias periodontopáticas desde hemocultivos y ateromas obtenidos de pacientes con aterosclerosis y periodontitis. *Rev Méd Chile*, 135, 1118-1124.
- Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., Flemmig, T. F., Garcia, R., Giannobile, W. V., Graziani, F., Greenwell, H., Herrera, D., Kao, R. T., Kebschull, M., Kinane, D. F., Kirkwood, K. L., Kocher, T., Kornman, K. S., Kumar, P. S., Loos, B. G., Machtei, E., Meng, H., Mombelli, A., Needleman, I., Offenbacher, S., Seymour, G. J., Teles, R. &

- Tonetti, M. S. 2018. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*, 45 Suppl 20, S162-S170.
- Parahitiyawa, N. B., Jin, L. J., Leung, W. K., Yam, W. C. & Samaranyake, L. P. 2009. Microbiology of odontogenic bacteremia: beyond endocarditis. *Clin Microbiol Rev*, 22, 46-64.
- Paster, B. J., Boches, S. K., Galvin, J. L., Ericson, R. E., Lau, C. N., Levanos, V. A., Sahasrabudhe, A. & Dewhirst, F. E. 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*, 183, 3770-83.
- Perez-Chaparro, P. J., Gracieux, P., Lafaurie, G. I., Donnio, P. Y. & Bonnaure-Mallet, M. 2008. Genotypic characterization of Porphyromonas gingivalis isolated from subgingival plaque and blood sample in positive bacteremia subjects with periodontitis. *J Clin Periodontol*, 35, 748-53.
- Poole, S., Singhrao, S. K., Kesavalu, L., Curtis, M. A. & Crean, S. 2013. Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-term postmortem Alzheimer's disease brain tissue. *J Alzheimers Dis*, 36, 665-77.
- Puenpa, J., Suwannakarn, K., Chansaenroj, J., Vongpunsawad, S. & Poovorawan, Y. 2017. Development of single-step multiplex real-time RT-PCR assays for rapid diagnosis of enterovirus 71, coxsackievirus A6, and A16 in patients with hand, foot, and mouth disease. *J Virol Methods*, 248, 92-99.
- Ratto-Tespestini, A., Pérez-Chaparro, P., Romito, G. A., Figueiredo, L., Favari, M., Carillo, H., Larcher, P. & Feres, M. 2016. Comparison of independent and dependent culture methods for the detection of transient bacteremia in diabetic subjects with chronic periodontitis. *Biomédica*, 36, 156-61.
- Reyes, L., Herrera, D., Kozarov, E., Roldan, S. & Progulske-Fox, A. 2013. Periodontal bacterial invasion and infection: contribution to atherosclerotic pathology. *J Clin Periodontol*, 40 Suppl 14, S30-50.
- Reyes, L., Phillips, P., Wolfe, B., Golos, T. G., Walkenhorst, M., Progulske-Fox, A. & Brown, M. 2018. Porphyromonas gingivalis and adverse pregnancy outcome. *J Oral Microbiol*, 10, 1374153.
- Riewe, S. D., Mans, J. J., Hirano, T., Katz, J., Shiverick, K. T., Brown, T. A. & Lamont, R. J. 2010. Human trophoblast responses to Porphyromonas gingivalis infection. *Mol Oral Microbiol*, 25, 252-9.
- Riviere, G. R., Riviere, K. H. & Smith, K. S. 2002. Molecular and immunological evidence of oral Treponema in the human brain and their association with Alzheimer's disease. *Oral Microbiol Immunol*, 17, 113-8.
- Roberts, F. A. & Darveau, R. P. 2015. Microbial protection and virulence in periodontal tissue as a function of polymicrobial communities: symbiosis and dysbiosis. *Periodontol 2000*, 69, 18-27.
- Sakamoto, M., Takeuchi, Y., Umeda, M., Ishikawa, I. & Benno, Y. 2001. Rapid detection and quantification of five periodontopathic bacteria by real-time PCR. *Microbiol Immunol*, 45, 39-44.
- Sanz, M., Beighton, D., Curtis, M. A., Cury, J. A., Dige, I., Dommisch, H., Ellwood, R., Giacaman, R. A., Herrera, D., Herzberg, M. C., Kononen, E., Marsh, P.

- D., Meyle, J., Mira, A., Molina, A., Mombelli, A., Quirynen, M., Reynolds, E. C., Shapira, L. & Zaura, E. 2017. Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 44 Suppl 18, S5-S11.
- Sanz, M., Kornman, K. & Working group 3 of joint, E. F. P. A. A. P. w. 2013. Periodontitis and adverse pregnancy outcomes: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Clin Periodontol*, 40 Suppl 14, S164-9.
- Sanz, M., Lau, L., Herrera, D., Morillo, J. M. & Silva, A. 2004. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol*, 31, 1034-47.
- Sanz, M., van Winkelhoff, A. J. & Working Group 1 of Seventh European Workshop on, P. 2011. Periodontal infections: understanding the complexity--consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*, 38 Suppl 11, 3-6.
- Sconyers, J. R., Crawford, J. J. & Moriarty, J. D. 1973. Relationship of bacteremia to toothbrushing in patients with periodontitis. *J Am Dent Assoc*, 87, 616-22.
- Silver, J. G., Martin, A. W. & McBride, B. C. 1977. Experimental transient bacteraemias in human subjects with varying degrees of plaque accumulation and gingival inflammation. *J Clin Periodontol*, 4, 92-9.
- Strydom, H. C., Chandler, A. B., Dinsmore, R. E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M. E., Schwartz, C. J., Wagner, W. D. & Wissler, R. W. 1995. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15, 1512-31.
- Suchett-Kaye, G., Morrier, J. J. & Barsotti, O. 2001. Clinical usefulness of microbiological diagnostic tools in the management of periodontal disease. *Res Microbiol*, 152, 631-9.
- Swati, P., Ambika Devi, K., Thomas, B., Vahab, S. A., Kapaettu, S. & Kushtagi, P. 2012. Simultaneous detection of periodontal pathogens in subgingival plaque and placenta of women with hypertension in pregnancy. *Arch Gynecol Obstet*, 285, 613-9.
- Teles, R., Teles, F., Frias-Lopez, J., Paster, B. & Haffajee, A. 2013. Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. *Periodontol 2000*, 62, 95-162.
- Temoin, S., Chakaki, A., Askari, A., El-Halaby, A., Fitzgerald, S., Marcus, R. E., Han, Y. W. & Bissada, N. F. 2012. Identification of oral bacterial DNA in synovial fluid of patients with arthritis with native and failed prosthetic joints. *J Clin Rheumatol*, 18, 117-21.

- Tomas, I., Diz, P., Tobias, A., Scully, C. & Donos, N. 2012. Periodontal health status and bacteraemia from daily oral activities: systematic review/meta-analysis. *J Clin Periodontol*, 39, 213-28.
- Tonetti, M. S., Van Dyke, T. E. & Working group 1 of the joint, E. F. P. A. A. P. w. 2013. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Clin Periodontol*, 40 Suppl 14, S24-9.
- Waghmare, A. S., Vhanmane, P. B., Savitha, B., Chawla, R. L. & Bagde, H. S. 2013. Bacteremia following scaling and root planing: A clinico-microbiological study. *J Indian Soc Periodontol*, 17, 725-30.
- Wang, Y. L., Liou, J. D. & Pan, W. L. 2013. Association between maternal periodontal disease and preterm delivery and low birth weight. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 52, 71-6.
- Weinstein, M. P. 1996. Current blood culture methods and systems: clinical concepts, technology, and interpretation of results. *Clin Infect Dis*, 23, 40-6.
- Williams, R. C. & Offenbacher, S. 2000. Periodontal medicine: the emergence of a new branch of periodontology. *Periodontol 2000*, 23, 9-12.
- Yoshida, A., Suzuki, N., Nakano, Y., Oho, T., Kawada, M. & Koga, T. 2003. Development of a 5' fluorogenic nuclease-based real-time PCR assay for quantitative detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol*, 41, 863-6.
- Zaremba, M., Gorska, R., Suwalski, P. & Kowalski, J. 2007. Evaluation of the incidence of periodontitis-associated bacteria in the atherosclerotic plaque of coronary blood vessels. *J Periodontol*, 78, 322-7.
- Zhang, W., Daly, C. G., Mitchell, D. & Curtis, B. 2013. Incidence and magnitude of bacteraemia caused by flossing and by scaling and root planing. *J Clin Periodontol*, 40, 41-52.

the 1990s, the number of publications on the topic has increased steadily, and the number of authors has increased from 1 to 100.

There are a number of reasons for the increase in research on the topic. First, the number of people who are interested in the topic has increased. This is due to the fact that the topic has become more relevant in the 1990s, as a result of the increasing number of people who are interested in the topic.

Second, the number of people who are interested in the topic has increased. This is due to the fact that the topic has become more relevant in the 1990s, as a result of the increasing number of people who are interested in the topic.

Third, the number of people who are interested in the topic has increased. This is due to the fact that the topic has become more relevant in the 1990s, as a result of the increasing number of people who are interested in the topic.

Fourth, the number of people who are interested in the topic has increased. This is due to the fact that the topic has become more relevant in the 1990s, as a result of the increasing number of people who are interested in the topic.

Fifth, the number of people who are interested in the topic has increased. This is due to the fact that the topic has become more relevant in the 1990s, as a result of the increasing number of people who are interested in the topic.

Sixth, the number of people who are interested in the topic has increased. This is due to the fact that the topic has become more relevant in the 1990s, as a result of the increasing number of people who are interested in the topic.

Seventh, the number of people who are interested in the topic has increased. This is due to the fact that the topic has become more relevant in the 1990s, as a result of the increasing number of people who are interested in the topic.

Eighth, the number of people who are interested in the topic has increased. This is due to the fact that the topic has become more relevant in the 1990s, as a result of the increasing number of people who are interested in the topic.

Ninth, the number of people who are interested in the topic has increased. This is due to the fact that the topic has become more relevant in the 1990s, as a result of the increasing number of people who are interested in the topic.

Tenth, the number of people who are interested in the topic has increased. This is due to the fact that the topic has become more relevant in the 1990s, as a result of the increasing number of people who are interested in the topic.

Eleventh, the number of people who are interested in the topic has increased. This is due to the fact that the topic has become more relevant in the 1990s, as a result of the increasing number of people who are interested in the topic.

Twelfth, the number of people who are interested in the topic has increased. This is due to the fact that the topic has become more relevant in the 1990s, as a result of the increasing number of people who are interested in the topic.