

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Estomatología III (Medicina y Cirugía
Bucofacial)



**Detección y cuantificación de bacterias de origen
oral en bacteriemias tras procedimientos de higiene oral
no profesionales.**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

TUTOR

Dra. Elena Figuero Ruiz

AUTOR

Marta Rodrigo Pérez-Tabernero

Madrid, 2014

Índice

I.	INTRODUCCIÓN.....	4
II.	JUSTIFICACIÓN	15
III.	HIPÓTESIS.....	16
IV.	OBJETIVOS	17
V.	MATERIAL Y MÉTODOS	18
VI.	RESULTADOS.....	26
VII.	DISCUSIÓN	34
VIII.	CONCLUSIONES	40
IX.	BIBLIOGRAFÍA.....	41
X.	ANEXOS.....	46

I. Introducción

1. Enfermedades periodontales

Las enfermedades periodontales son enfermedades de naturaleza infecciosa e inflamatoria. Según la clasificación de las enfermedades periodontales de Armitage en 1999, encontramos las enfermedades gingivales inducidas y no inducidas por placa, y la periodontitis, entre otras entidades (Armitage, 1999). En primer lugar, la gingivitis es la presencia de inflamación sin pérdida de los tejidos de soporte del diente. Se trata de un estado reversible. En cambio, la periodontitis es una enfermedad en la que hay inflamación y migración apical de los tejidos y pérdida de hueso alveolar y tejido conectivo. En la mayoría de los casos, la formación de bolsas acompaña al desarrollo de la periodontitis. Tanto la gingivitis como la periodontitis son las enfermedades más frecuentes dentro de las enfermedades periodontales (Armitage, 2004).

La periodontitis se considera un problema mayor de salud pública porque es muy común, reduce la calidad de vida, disminuye la calidad de la función masticatoria, empeora la estética, y causa pérdida dentaria. Es la causa de la mayor parte de casos de edentulismo y disfunción masticatoria (Tonetti and Van Dyke, 2013).

a. Etiopatogenia

La destrucción de los tejidos de soporte del diente se produce debido a una interacción compleja entre las bacterias y el hospedador. La microbiota oral está formada por unas 1000 especies, de las cuales la mitad son cultivables. *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* parecen ser los patógenos periodontales más importantes (Claesson et al., 2011).

En los últimos años se han definido patógenos con clara asociación con el inicio y progresión de la periodontitis, y se han clasificado en grupos según su

asociación con la enfermedad o según las relaciones entre bacterias (Socransky et al., 1998, Haffajee et al., 2008).

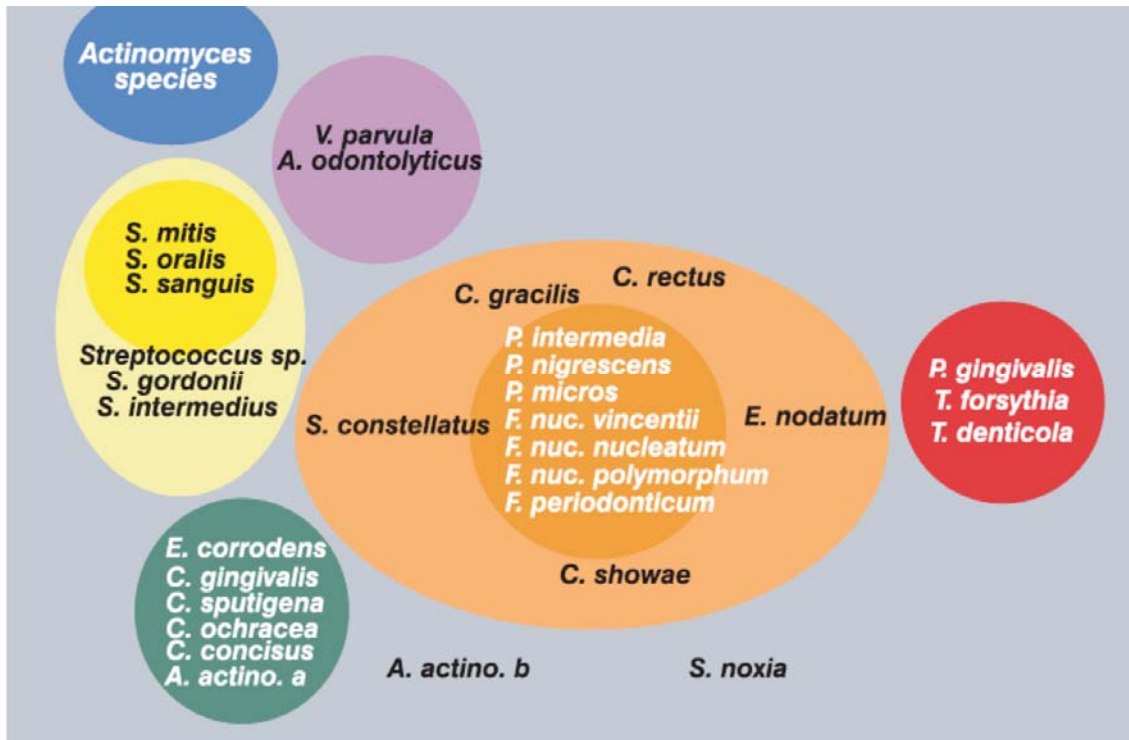


Fig. 1. Grupos de bacterias asociadas a enfermedades gingivales.

Socransky y colaboradores (1998) establecieron un diagrama (Fig 1) que representa las relaciones entre bacterias del biofilm. Las especies del complejo rojo están fuertemente asociadas con la profundidad de la bolsa. Es decir, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola* se encuentran en mayor número según aumenta la profundidad de bolsa. De la misma manera, los microorganismos del complejo naranja también muestran una asociación significativa con la profundidad de bolsa. *Actinomyces naeslundii* y *Streptococcus sanguis* son ejemplos de especies bacterianas que no se han visto asociadas de manera estadísticamente significativa con la profundidad de bolsa. En diversos estudios se vio que bolsas que contenían estas tres especies bacterianas eran más profundas que las que no las contenían (Socransky et al., 1998). Es importante recalcar que bolsas que contenían *P. gingivalis* solo o en combinación con las otras dos especies mostraron la mayor profundidad de sondaje. El complejo rojo también está muy asociado con el sangrado al sondaje (Socransky et al., 1998).

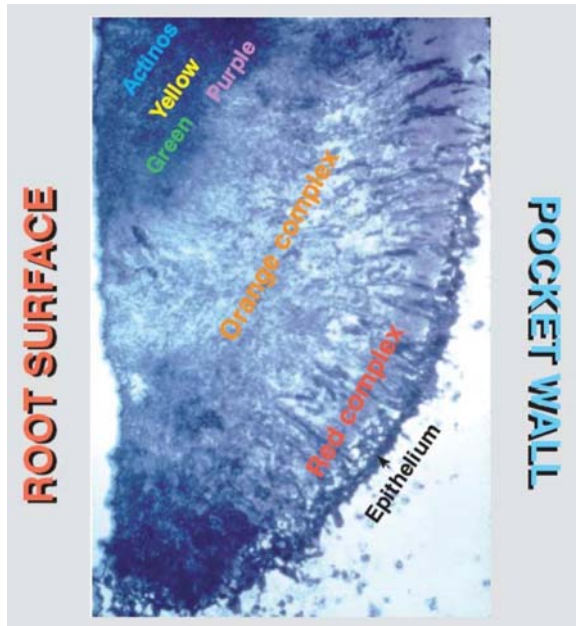


Fig 2. Organización de los grupos bacterianos en la bolsa periodontal.

Además, es necesaria una respuesta inmunológica que mediante la liberación de mediadores produzca la destrucción del tejido. Las bacterias por sí mismas no son capaces de producir una destrucción de los tejidos. A la interacción entre la infección bacteriana y la respuesta inmunológica del hospedador, se le unen unos factores de riesgo. El siguiente esquema representa los distintos factores que contribuyen a la iniciación y progresión de la periodontitis (Kornman, 2008).

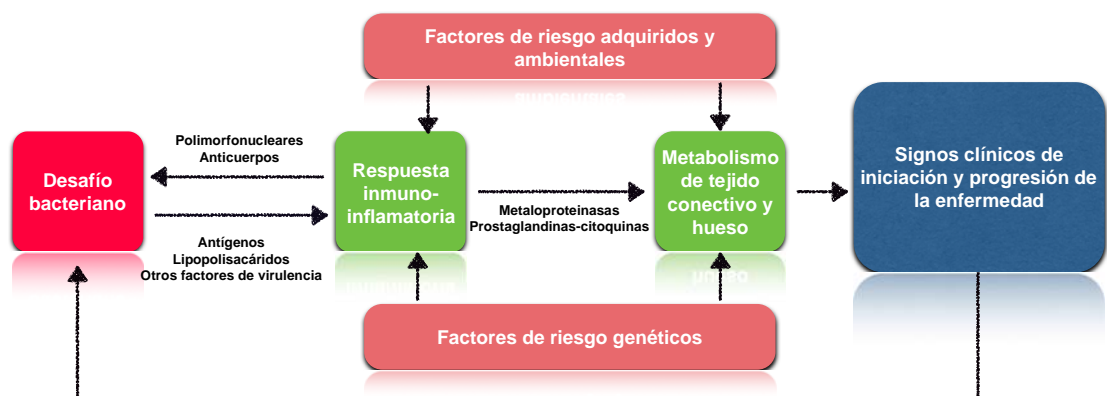


Fig 1. Factores que contribuyen a la iniciación y progresión de la periodontitis.

2. Enfermedades sistémicas

Se han estudiado una serie de enfermedades o estados sistémicos que podrían guardar relación uni o bidireccional con las enfermedades periodontales. Numerosos estudios han intentado dar una explicación a esta relación. En 1989, científicos finlandeses publicaron un estudio en el que concluyeron que las infecciones de origen oral estaban directamente relacionadas con el infarto cerebral y el infarto agudo de miocardio, lo que podría ser desencadenado por la existencia de bacterias en sangre, que dañaban el endotelio, alteraban la coagulación sanguínea y el metabolismo de lipoproteínas. Además la existencia de estas bacterias alteraba la función y síntesis de plaquetas y la síntesis de prostaglandinas. En conjunto, estos episodios favorecen la aparición de infarto agudo de miocardio e incluso muerte súbita (Mattila et al., 1989).

a. Embarazo

Se ha descrito una interacción entre periodontitis y embarazo. Las complicaciones en el embarazo, están generalmente asociadas con elevadas cantidades de mediadores de la inflamación a nivel tanto local como sistémico, y con infecciones intra-uterinas. Los últimos datos afirman que las complicaciones se originan en infecciones ascendentes desde la vagina o por propagación vía sanguínea. La periodontitis materna supone una fuente de microorganismos que entran al torrente sanguíneo y afectan directa o indirectamente a la salud del feto (Sanz and Kornman, 2013).

Sin embargo, no existe consenso en cuanto a la relación entre periodontitis y problemas en el embarazo. En la última revisión sistemática al respecto, publicada en 2013, se ha encontrado mucha variabilidad entre los estudios, y se han observado resultados contradictorios. Por esta razón, se puede afirmar que son necesarios más estudios en este campo para poder asegurar una relación, aunque a día de hoy sí se han encontrado casos en los que esta relación parece existir (Ide and Papapanou, 2013).

b. Diabetes Mellitus

Tanto la *diabetes mellitus* como la enfermedad periodontal son enfermedades crónicas, multifactoriales que se dan en la población, sobretodo en mayores de 60 años, y están relacionadas. Los datos obtenidos hasta la fecha indican que la diabetes es un factor de riesgo para la gingivitis y la periodontitis (Stanko and Izakovicova Holla, 2014). Son muchos los mecanismos por los que la diabetes puede afectar negativamente al periodonto, y por los que la periodontitis puede modificar los parámetros de una diabetes controlada. El periodonto es un órgano muy vascularizado, así la acumulación de AGEs (*advanced glycation end products*) y su efecto en las interacciones celulares, aumenta el estrés oxidativo de los tejidos, altera la función de las células endoteliales y aumenta la actividad de las metaloproteinasas. Cambios similares se ven en los tejidos periodontales de pacientes diabéticos. En humanos, altos niveles de AGEs están asociados con la severidad de la periodontitis en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Sin embargo, el periodonto se diferencia de otros tejidos en que está constantemente sometido a una alta carga bacteriana.

La diabetes también provoca cambios en la función de las células del sistema inmunológico (neutrófilos, monocitos y macrófagos). La adherencia de los neutrófilos, la quimiotaxis y la fagocitosis están dañados, permitiendo que las bacterias persistan en las bolsas periodontales, lo que lleva a una mayor destrucción. Además, los pacientes con diabetes tienen aumentada la apoptosis, lo que está asociado con un retraso en la cicatrización. El eje monocito-macrófago se puede encontrar en un estado de hiper respuesta contra antígenos bacterianos en diabéticos, por lo que habría un significativo aumento de producción de citoquinas y mediadores de la inflamación. Por otro lado, la presencia de alguna enfermedad periodontal puede tener un impacto sobre el estado metabólico de la diabetes, es decir, la periodontitis está asociada con un mayor riesgo de sufrir complicaciones en personas diabéticas (Stanko and Izakovicova Holla, 2014).

c. Enfermedades cardiovasculares

La endocarditis infecciosa (EI) es una patología inflamatoria del endocardio parietal y/o valvular secundaria a fenómenos infecciosos, la cual puede tener consecuencias graves para el individuo. Se caracteriza por la presencia de vegetaciones compuestas de plaquetas, fibrina, microorganismos y células inflamatorias. La patogénesis de esta enfermedad engloba una secuencia de eventos: el flujo sanguíneo turbulento presente en algunas enfermedades cardíacas produce un daño endotelial, que causa un depósito de plaquetas y fibrina, llevando a la formación de una endocarditis trombótica no bacteriana. Si en este momento se produce una bacteriemia, las bacterias pueden adherirse a esta lesión y proliferar, dando lugar a una vegetación, la lesión típica de la endocarditis infecciosa. Los factores de riesgo más frecuentes incluyen el prolapso de la válvula mitral, la enfermedad valvular degenerativa, el uso de drogas intravenosas, la prótesis valvular y las anomalías congénitas del corazón como defectos valvulares o septales (Bascones-Martinez et al., 2012).

En el 90% de las ocasiones, los microorganismos causantes de la EI son estafilococos, estreptococos o enterococos. En la boca, la mayor parte de la flora bacteriana cultivable pertenece a los estreptococos del grupo viridans, y estas bacterias pueden acceder al torrente sanguíneo tras un procedimiento dental. Por tanto, la EI de origen dental se debe fundamentalmente al grupo de *Streptococcus viridans*; pudiendo originarse una bacteriemia tanto en el curso de un procedimiento dental como en ausencia del mismo, al existir una solución de continuidad epitelial que permita el paso de las bacterias al torrente circulatorio. (Farbod et al., 2009).

En la cavidad oral existen muchas infecciones polimicrobianas que pueden tener un papel relevante en la génesis de una bacteriemia de origen dental. Las infecciones odontogénicas son aquellas originadas a partir de los dientes o de los tejidos que los rodean íntimamente, progresando a través del periodonto hasta el ápice, afectando al tejido óseo periapical y diseminándose posteriormente a través del hueso y periostio hacia estructuras próximas o distantes. Su importancia radica

en que pueden ser un foco de transmisión de la infección a distancia y producir complicaciones graves con manifestaciones sistémicas que pueden, en último término, poner en peligro la vida del paciente (Bascones-Martinez et al., 2012).

Por otro lado, se han estudiado otras enfermedades cardiovasculares como el infarto agudo de miocardio y enfermedad cerebrovascular. En un estudio publicado en los últimos años se considera la periodontitis como un factor de riesgo para estas enfermedades, pero reconocen que no se puede afirmar en todos los grupos de la población, por lo que más estudios son necesarios (Dietrich et al., 2013).

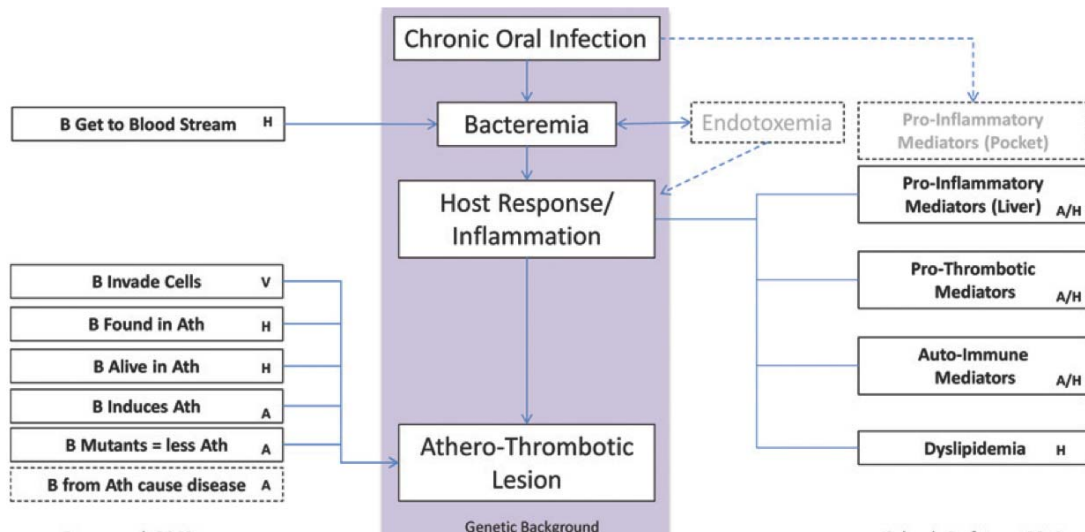


Fig 4. Mecanismos de plausibilidad biológica: periodontitis y el elevado riesgo de formación de placas de ateroma. (Ath: ateroma; B: bacteria; H: estudios en humanos; A: estudios en animales; V: estudios in vitro)

3. Bacteriemia de origen oral

La bacteriemia de origen oral es el paso de bacterias de la cavidad oral al torrente sanguíneo (Poveda-Roda et al., 2008). Ésta se puede producir tras un procedimiento invasivo y puede aumentar en presencia de una infección, por ejemplo la periodontitis. Esto es debido a la permeabilidad del epitelio que rodea la interfase diente-tejido, y a los valores de prostaglandinas en la circulación local, que incrementan el número de leucocitos y de valores de fibrinógeno,

desacelerando la circulación en estos casos, lo que favorece el paso de bacterias a sangre (Bascones-Martinez et al., 2012, Offenbacher et al., 1996).

Muchos autores han estudiado la prevalencia, duración y etiología de la bacteriemia tras una extracción dental y la influencia de factores como la edad, el género, el estado de salud, la dificultad quirúrgica y el número de extracciones (Coulter et al., 1990, Tomas et al., 2007). A día de hoy, la bacteriemia debida a extracciones dentarias encontrada en niños sigue siendo inferior respecto a la encontrada en adultos (Heimdahl et al., 1990, Roberts et al., 1998) lo que corrobora que la prevalencia aumenta con la edad (Okabe et al., 1995, Lockhart et al., 2004). Muy pocos autores han estudiado la influencia del género en el porcentaje de bacteriemia debido a extracciones dentales, y los resultados son contradictorios (Tomas et al., 2007, Okabe et al., 1995). La influencia del estado de salud oral en la prevalencia de bacteriemia es distinto según diversos autores (Coulter et al., 1990, Roberts et al., 1998, Roberts, 1999). Algunos autores han encontrado mayor porcentaje de cultivos positivos para bacterias de origen oral en niños con gingivitis que en individuos periodontalmente sanos (Roberts et al., 1998). Por el contrario, en otro estudio, no se ha encontrado una relación significativa entre los índices de placa y la inflamación gingival y la prevalencia e intensidad de la bacteriemia (Coulter et al., 1990). De la misma manera, algunos autores afirman que la existencia de bacteriemia en adultos fue independiente de su estado de salud oral (Lockhart, 1996, Coulter et al., 1990, Takai et al., 2005, Barbosa et al., 2010).

Actividades diarias, tales como comer, masticar chicle, cepillarse los dientes, o utilizar cepillos interproximales pueden inducir bacteriemia detectable en cultivos de sangre en un porcentaje de sujetos (Forner et al., 2006).

El cepillado dental dos veces al día en niños podría causar 154.000 veces más de exposiciones a bacteriemias que una sola extracción dental (Hupp, 2009). Este mismo autor extiende este cálculo para la exposición a bacteriemias durante un año y encuentra la cifra de 5,6 millones de veces más riesgo de sufrir

bacteriemias debidas al cepillado dental que a una extracción dentaria (Roberts, 1999).

De un modo similar, Guntheroth había señalado anteriormente que el simple hecho de masticar la comida sumado a la higiene oral diaria acumulan 5.370 minutos de bacteriemia potencial durante un mes, en comparación a los 30 minutos de duración de una bacteriemia tras una extracción dentaria (Guntheroth, 1984). En esta línea, Lockhart y colaboradores (Lockhart et al., 2008) mostraron que las técnicas de cepillado dental producen una bacteriemia importante; y aunque lo hacen con una tasa menor que las extracciones dentales, debido a la mayor frecuencia de ocurrencia de las primeras, éstas deberían considerarse una amenaza mayor para los pacientes de riesgo que las extracciones dentarias.

Así, incluso la masticación puede causar bacteriemias de origen oral. Forner y colaboradores (Forner et al., 2006) observaron, en pacientes con periodontitis, bacteriemias durante 30 minutos después de masticar chicle, mientras que en pacientes periodontalmente sanos no había bacterias en las muestras de sangre.

También se ha mostrado recientemente que el uso de hilo dental, tanto en pacientes periodontales como en pacientes sanos, puede producir bacteriemias similares a las producidas en tratamientos dentales, en los cuales se recomienda profilaxis antibiótica. (Crasta et al., 2009)

Lockhart y colaboradores (Lockhart et al., 2009) llevaron a cabo un estudio clínico controlado aleatorizado a doble ciego que demostró que existe una asociación de la bacteriemia producida tras el cepillado dental tanto con la mala higiene oral como con el sangrado gingival tras el cepillado.

Autor	Método de exposición a bacteriemia	Tiempo de exposición	Prevalencia de bacteriemia
Guntheroth, 1984	Extracción dental	NR	3,60%
	Masticación	NR	38%
Lockhart, 2008	Cepillado dental	2 min	23%
	Extracción dental + amoxicilina	NR	33%
	Extracción dental		60%
Forner, 2006	Masticar chicle	10 min	20% de los pacientes con periodontitis
	Cepillado dental	2 min	5% de los pacientes con periodontitis
	Profilaxis	NR	10% de los pacientes sanos; 20% de los pacientes con gingivitis; 75% de los pacientes con periodontitis
Crasta, 2009	Uso del hilo dental	2 min	40%

Tabla 1. Artículos que analizan la prevalencia de bacteriemias tras procedimientos de la vida cotidiana. (NR: no refiere).

Resultan de interés las técnicas de laboratorio utilizadas a día de hoy para la detección de periodontopatógenos. Los **métodos de cultivo** se han usado desde hace muchos años, por ello se ha convertido en el método de referencia. Es útil en la identificación de patógenos de la microflora oral. Normalmente, las placas con muestras de placa subgingival se cultivan en anaerobiosis, y se usan medios selectivos o no selectivos, para facilitar la identificación de patógenos. La ventaja principal de este método radica en la posibilidad de realizar el recuento de las especies cultivadas, además, es el único método que permite identificar nuevas especies bacterianas y evaluar la susceptibilidad de los patógenos a distintos antibióticos. Sin embargo, con este método solo se identifican bacterias cultivables, por lo que las condiciones de transporte y toma de muestras deben ser óptimas. Patógenos como *Treponema sp.* y *T. forsythia* se cultivan con mucha dificultad. La

sensibilidad de los métodos de cultivo es menor que la de otros métodos, siendo los límites de detección 10^3 – 10^4 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml especialmente en medios no selectivos (Sanz et al., 2004).

El método de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ha surgido como una herramienta muy potente para la amplificación de genes. Permite obtener una gran cantidad de ADN. Es una técnica que consiste en el aislamiento del ADN, y posteriormente, en la separación de sus hebras complementarias mediante un aumento de la temperatura, que servirán como molde para la secuencia de nucleótidos nueva *in vitro*. Entonces, la amplificación de ADN continúa gracias a la polimerasa, la cual requiere un “primer” o oligonucleótido corto que corresponderá al inicio de la cadena que se amplificará. Un segundo “primer” se situará en el lado opuesto de la cadena cuando ésta alcance la longitud que se requiere. Ésta amplificación puede repetirse varias veces, cada amplificación se denomina ciclo. En cada ciclo se da un aumento exponencial de la cantidad de ADN. A lo largo de todo el ciclo la temperatura es crucial para la desnaturalización y la estabilidad de la hibridación (Sanz et al., 2004).

Esta técnica es considerada como una de las más sensibles, siendo capaz de detectar hasta una copia de ADN, pero tiene ciertas limitaciones (Greenstein, 1988). Son necesarios varios componentes a las concentraciones correctas, la temperatura ha de ser la adecuada, así como el medio en el que se encuentre la muestra de ADN, para que se lleve a cabo la reacción. También es muy común la contaminación (Sanz et al., 2004).

II. Justificación

Teniendo esto en cuenta, parece de interés la utilización de ambas técnicas (cultivo y RT-PCR) en un estudio y así averiguar que técnica es más adecuada a la hora de detectar la presencia de bacteriemia tras un estímulo, como el uso de cepillos interproximales por parte del profesional, tanto en pacientes sanos periodontalmente como en pacientes con periodontitis.

III. Hipótesis

En pacientes con periodontitis hay mas riesgo de detectar bacteriemia tras medidas de higiene oral, en concreto el uso de cepillos interproximales, en comparación con pacientes sanos periodontalmente. Los resultados obtenido mediante RT-PCR son comparables a los obtenidos mediante cultivo.

IV. Objetivos

El objetivo primario de este estudio fue comparar la prevalencia de bacteriemia tras pasar el cepillo interproximal en pacientes con periodontitis y en pacientes periodontalmente sanos.

De forma secundaria se comparó la detección de bacterias que se encontró con la técnica de cultivo, y la técnica de PCR.

V. Material y métodos

Se diseñó un estudio transversal. Se seleccionaron pacientes con diagnóstico de periodontitis crónica generalizada moderada-avanzada que no habían recibido tratamiento periodontal previo y pacientes periodontalmente sanos, que acudieron a la Clínica del Posgrado de Periodoncia de la Facultad de Odontología (Universidad Complutense, Madrid) de acuerdo a los criterios de inclusión/exclusión especificados.

Criterios de inclusión

1. Mayores de 30 años.
2. Presencia de al menos 3 dientes por cuadrante.
3. Grupo con periodontitis: profundidades de sondaje superiores a 5mm y pérdida ósea marginal superior al 30% en al menos el 50% de los dientes) (Tonetti et al. 2007).
4. Grupo periodontalmente sano: sangrado al sondaje inferior al 25% sin pérdida de inserción.

Criterios de exclusión

1. Pacientes que hayan recibido tratamiento periodontal en el último año.
2. Toma de antibióticos en los 3 meses previos al estudio.
3. Fumadores de 10 o más cigarrillos al día.
4. Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.
5. Enfermedades crónicas como la diabetes, que puedan afectar a la periodontitis.
6. Enfermedades periodontales necrosantes.
7. Infección por VIH.
8. Toma crónica de AINEs.

1. Visitas del estudio

a) Visita de selección

Se realizó una exploración periodontal completa para determinar si el paciente cumplía los criterios de inclusión/exclusión señalados. Aquellos pacientes que cumplieron los criterios de inclusión, recibieron información sobre el objetivo del estudio y se les invitó a participar mediante la firma de un consentimiento informado.

Todas las variables clínicas fueron registradas mediante la sonda periodontal CPC-12 (Hu-Friedy Europa, Rotterdam, Holanda) por un único examinador entrenado y calibrado, en seis localizaciones por diente, en todos los dientes excepto en los terceros molares. Las variables clínicas registradas fueron:

- Profundidad de sondaje (PS) y recesión en milímetros. El nivel de inserción clínica se calculó mediante la suma de la profundidad de sondaje y la recesión.
- Índice de placa (IP), detectable visualmente o con sonda periodontal como presente/ausente.
- Sangrado al sondaje (BOP), detectado como presente/ausente 30 segundos después del sondaje.
- Número de dientes presentes.
- Además se determinó el grado de pérdida ósea (<30%, 30-50%, >50%) mediante radiografía panorámica que todos los pacientes que acuden a tratamiento a la Facultad de Odontología reciben.

Estos datos se emplearon para establecer el diagnóstico periodontal de cada sujeto.

b) Visita 1

Se realizó, al menos, una semana después de la visita de selección. Ese día se pidió a los pacientes que no realizaran ningún procedimiento de higiene

bucodental (incluido el cepillado) antes de la cita y que ingirieran sólo alimentos líquidos durante la comida previa a la cita.

La toma de muestras de sangre se realizó antes de iniciar los procedimientos de higiene bucal y un 1 minuto después de haber finalizado el procedimiento de higiene bucal interproximal, consistente en el paso de los cepillos interdetales (Interprox®, Dentaïd, Cerdanyola, España) más gruesos para cada espacio interproximal en todos los espacios interproximales existentes distales al canino durante un tiempo de 2 minutos, por parte de un único investigador entrenado, para todos los casos.

La toma de muestras de fluido crevicular gingival (FCG) mediante puntas de papel y posterior almacenamiento en fluido de transporte (RTF) se realizó después de haber tomado las muestras de sangre a los 10 minutos del procedimiento.

2. Toma de muestras

a) Muestras de sangre

Todos los procedimientos fueron realizados en el quirófano de implantes de la Clínica del Posgrado de Periodoncia de la Facultad de Odontología (Universidad Complutense, Madrid).

Se tomó una vía en la vena antecubital que permitió la toma repetida de muestras de sangre periférica mediante técnica convencional (Vacutainer™, Becton Dickinson, San Agustín de Guadalix, Madrid, España) según las recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (Loza Fernández et al. 2003).

Se tomaron dos muestras de sangre de 2ml, una antes de los procedimientos de higiene oral interproximal y otra un minuto después. Ambas muestras fueron recogidas en viales con EDTA (BD Vacutainer, K3E 3.6 mg, San Agustín de Guadalix, Madrid, España). De cada muestra, 1ml se empleó para cultivo, y 1ml para PCR.

b) Muestras de fluido crevicular gingival

En los pacientes con periodontitis se seleccionó la localización más accesible con la mayor profundidad de sondaje y sangrado al sondaje de cada cuadrante (Mombelli et al. 1991). En los pacientes sanos, se seleccionó la localización más accesible con sangrado al sondaje de cada cuadrante, y en caso de no haber sangrado, en mesiovestibular de los primeros molares.

Tras la eliminación cuidadosa de los depósitos de placa supragingival, se aislaron las zonas de interés mediante rollos de algodón y secado con aire. Se introdujeron dos puntas de papel estériles (tamaño medio, Maillefer, Ballaigues, Suiza) de forma consecutiva en la profundidad de la bolsa o del surco periodontal y se dejaron en esa posición durante 10 segundos. Las puntas de papel de las cuatro localizaciones seleccionadas se introdujeron en un único vial con 2ml de RTF (Sanz et al. 2000) y se enviaron al laboratorio para su análisis.

3. Procesado de las muestras

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

Cada muestra se analizó mediante cultivo y PCR. El análisis mediante cultivo se realizó en las 2 horas siguientes a su toma. El análisis mediante PCR requirió de la extracción inmediata del ADN bacteriano.

Las muestras de ADN fueron congeladas a -80°C y conservados hasta su posterior análisis mediante PCR en tiempo real (RT-PCR).

a) Análisis mediante cultivo

1. Procesado de las muestras de FCG.

Las puntas de papel se vortearon durante 30 segundos y se prepararon diluciones seriadas 1:10 en PBS (phosphate-bufferedsaline). De cada dilución se plaquearon 100µl en medio agar no selectivo (Oxoid no 2; Oxoid, Basingstoke, UK), suplementado con sangre de caballo al 5%, hemina (5mg/l) y menadiona (1mg/l) para la determinación del recuento total de anaerobios y para la identificación de los patógenos bacterianos específicos (*P. gingivalis*).

Para el recuento de *A. actinomycetemcomitans*, las muestras también se plaquearon en placas de medio Denta-1 (Alsina et al. 2001).

Las placas de agar sangre fueron examinadas tras 7 y 14 días de incubación anaeróbica (80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂ at 37°C). Las placas Denta-1 necesitaron entre 3 y 5 días de incubación a 37°C en aire con 5% de CO₂.

Los recuentos totales de anaerobios se realizaron en las placas de agar. La presencia y la cantidad de los patógenos periodontales *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *T. forsythia*, *Parvimonas micra*, *Campylobacter rectus* y *Fusobacterium nucleatum*, además de cualquier otra especie que crezca de manera relevante en el medio, se realizó en las placas de agar no-selectivo. La identificación de las especies bacterianas seleccionadas se basó en la tinción Gram y en la morfología celular, aerotolerancia, producción de catalasa y se confirmó mediante el empleo de test bioquímicos estándar (RapID™ ANA II System; Remel, Lenexa, KS, EE.UU.).

Se recontaron las colonias en la placa con la dilución más adecuada, aquella con 30-300 colonias, y se calculó el porcentaje que supone cada patógeno respecto a la flora total. Los recuentos totales de *A. actinomycetemcomitans* se realizaron en las placas de Denta-1. La identificación se basó en la típica morfología de su colonia (estructura interna de estrella), su reacción catalasa positiva y al uso de una serie de enzimas específicos (RapID™ NH System, Remel, Lenexa, KS, EE.UU.).

2. Procesado de las muestras de sangre.

Las muestras de sangre para cultivo fueron analizadas de forma inmediata tras su recogida.

Las muestras recibieron los siguientes procedimientos:

- a) 500µl de sangre fueron plaqueados directamente en placas de agar sangre no selectivas por duplicado.
- b) 500µl de sangre fueron plaqueados directamente en placas Dentaaid-1 por duplicado.
- c) 100µl de sangre fueron plaqueados directamente en placas de agar sangre no selectivo cinco veces.
- d) 100µl de sangre fueron plaqueados directamente en placas Dentaaid-1 cinco veces.

El resto del procedimiento y el modo de recuentos fue el mismo que el descrito para las muestras de FCG.

b) Análisis mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

1. Extracción de ADN bacteriano.

La extracción de ADN de las muestras de sangre y de FCG se realizó el mismo día de su recogida mediante el kit comercial MoIYsis Complete5 (MolzymbGmbH & Co.KG. Bremen, Alemania) específico para extracción de ADN bacteriano.

En el caso de las muestras de FCG, las puntas de papel inmersas en RTF fueron vorteadas durante 2 minutos y el sobrenadante fue recogido y transferido a un vial de 1,5ml estéril. Las muestras fueron después centrifugadas a 13.000rpm durante 2 minutos y el pellet resultante fue empleado en el proceso de extracción. En el caso de las muestras de sangre, el proceso de extracción se realizó a partir de 1ml de la sangre recogida en cada momento.

El ADN de ambos tipos de muestras fue conservado a -80°C hasta su posterior análisis.

2. Amplificación mediante Real Time-PCR

La secuencia del primer 1 (*forward*) de *P.gingivalis* fue 5-GCGCTCAACGTTTCAGCC-3. La secuencia del primer 2 (*reverse*) fue 5-CACGAATTCCGCCTGC-3; y la secuencia de la sonda Taqman fue 5-CACTGAACTCAAGCCCGGCAGTTTCAA-3 (pares de bases 634 a 660) (Boutaga et al. 2003).

La secuencia del primer 1 (*forward*) de *A. actinomycetemcomitans* fue 5-GAA CCT TAC CTA CTC TTG ACA TCC GAA-3; la secuencia del primer 2 (*reverse*) fue 5-TGC AGC ACC TGT CTC AAA GC-3; y la secuencia de la sonda Taqman fue 5-AGA ACT CAG AGA TGG GTT TGT GCC TTAGGG-3 (Boutaga et al. 2003).

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

La cuantificación se logró mediante el empleo de diluciones seriadas desde 10^1 a 10^9 UFC/ml de ADN genómico purificado de *P. gingivalis* cepa ATCC 33277 y *A. actinomycetemcomitans* cepa DSM 8324. En cada experimento se usaron curvas estándar con estas diluciones.

Las muestras se analizaron por duplicado en un volumen final de 20µl, en una solución de master mix que contiene of 2x TaqMan master mix (Taqman Gene Expression Master Mix; AppliedBiosystems), concentraciones óptimas de "primers" y sondas (300, 300 y 100nM para *A. actinomycetemcomitans*, y 300, 300 y 300 nM, para *P. gingivalis*), y 5 µl de ADN de las muestras. Los controles negativos consistieron en 5µl de agua estéril.

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

4. Análisis de los datos

El análisis estadístico se realizó mediante el programa IBM® SPSS® Statistics 19.0.

Como variable respuesta primaria se tomó la prevalencia de bacteriemia en las muestras de sangre tras el uso de cepillos interproximales.

Como variables respuesta secundarias se utilizaron: recuentos (UFC/ml) y proporciones de bacterias periodontales en la muestra de sangre basal y tras el paso de cepillos interproximales, prevalencia, recuentos (UFC/ml) y proporciones de bacterias periodontales en FCG, la profundidad de sondaje, recesión, sangrado al sondaje e índice de placa tanto global como de las localizaciones específicas que se utilizaron para la toma de muestras de FCG.

Se estableció la significación estadística con una $p < 0,05$. Se compararon las medias de las variables cuantitativas con los test t-student o U de Mann-Whitney; y para las variables categóricas se utilizaron los test de Fisher o Chi-cuadrado. Se tuvo en cuenta la normalidad de las muestras a la hora de decidir los test estadísticos.

VI. Resultados

I. DESCRIPCION DE LA MUESTRA

En la siguiente tabla se resumen las variables clínicas registradas en los pacientes:

	PERIODONTALMENTE SANOS Media (DE)	PERIODONTITIS CRONICA Media (DE)	p
Nº de sujetos	11	11	
Sexo	V: 5 H: 6	V: 3 H: 8	>0,05
Edad	42,59 (11,75)	50,31(7,60)	0,08
IP (%)	17,19 (12,15)	75,88 (29,17)	0,001
PS (mm)	1,82 (0,28)	3,78 (0,72)	<0,001
BOP (%)	9,43 (4,49)	63,47 (29,56)	<0,001
REC (mm)	0,03 (0,05)	0,96 (0,79)	<0,001

Tabla 1. Variables clínicas. (IP: índice de placa; PS: profundidad de sondaje; BOP: sangrado al sondaje; REC: recesión; V: varón; M: mujer).

Como se refleja en la tabla 1 los valores de sangrado al sondaje, de índice de placa y la recesión fueron mayores en el grupo de pacientes con periodontitis crónica en comparación con los pacientes periodontalmente sanos, siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

En la tabla 2 se resumen las variables clínicas de las localizaciones usadas para la toma de muestras de fluido crevicular gingival (FCG).

	PERIODONTALMENTE SANOS Media (DE)	PERIODONTITIS CRONICA Media (DE)	p
IP (%)	11,36 (17,18)	88,64 (30,33)	<0,001
PS (mm)	2,54 (0,74)	6,06 (1,32)	<0,001
BOP (%)	15,91 (16,85)	95,45 (10,11)	<0,001
REC (mm)	0,09 (0,16)	0,61 (0,74)	0,83
SUP (%)	-	6,8 (16,16)	0,148
MOV (%)	-	34,09 (57,3)	0,032

Tabla 2. Variables clínicas de localizaciones muestras FCG. (IP: índice de placa; PS: profundidad de sondaje; BOP: sangrado al sondaje; REC: recesión; SUP: supuración; MOV: movilidad)

Observamos que para las variables de sangrado al sondaje, profundidad de sondaje e índice de placa existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, siendo siempre superiores en el grupo de pacientes con periodontitis crónica.

II. FLUIDO CREVICULAR GINGIVAL

a. Cultivo

Los resultados del **recuento (UFC/ml) de patógenos** se resumen en la tabla 3:

RECUENTOS (UFC/ml)	PERIODONTALMENTE	PERIODONTITIS	p
	SANOS	CRONICA	
	Media (DE)	Media (DE)	
Flora bacteriana total	4,03E5 (3,64E5)	1,18E7 (1.01E7)	0,004
<i>Aa</i>	1,92E3 (6,39E3)	6,76E4 (1,85E5)	0,223
<i>Pg</i>	5,00E3 (8,13E3)	5,69E6 (6,51E6)	0,002
<i>Pi</i>	6,18E3 (1,19E4)	5,94E5 (8,25E5)	0,001
<i>Tf</i>	9,09E2 (1,81E3)	7,36E5 (1,19E6)	<0,001
<i>Pm</i>	1,00E3 (3,31E3)	3,72E4(1,20E5)	0,306
<i>Cr</i>	2,72E3 (7,53E3)	0,00E0 (0,00E0)	0,317
<i>Fn</i>	2.3E4 (2,66E4)	2,64E5(4,35E5)	0,003
<i>Capn</i>	9,09E1(3,01E2)	2,72E4 (6,46E4)	0,375
<i>Ec</i>	1,81E3 (4,04E3)	9,09E2 (3,01E3)	0,621

Tabla 3. Recuento individual y total de cada patógeno. (*Aa*: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Pg*: *Porphyromonas gingivalis*; *Pi*: *Prevotella intermedia*; *Tf*: *Tannerella forsythia*; *Pm*: *Parviromonas micra*; *Cr*: *Campylobacter rectus*; *Fn*: *Fusobacterium nucleatum*; *Capn*: *Capnocytophaga*; *Ec*: *Eikenella corrodens*; UFC/ml: unidad formadora de colonia/mililitro; DE: desviación estándar)

En los pacientes periodontalmente sanos se observó un recuento menor de patógenos anaerobios en comparación con el grupo de pacientes con periodontitis crónica, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Respecto al recuento individual de cada patógeno se encontraron diferencias estadísticamente significativas en *P. gingivalis* ($p=0,002$), *P. intermedia* ($p=0,001$), *T. forsythia* ($p<0,001$) y *F. nucleatum* ($p=0,003$) siendo más abundantes en pacientes con periodontitis. Encontramos que la bacteria que más se encuentra

en los pacientes sanos fue *F. nucleatum*, mientras que en los pacientes con periodontitis crónica fue *P.gingivalis*.

El porcentaje de cada bacteria respecto al total esta reflejado en la tabla 4.

Porcentajes (%)	PERIODONTALMENTE SANOS	PERIODONTITIS CRONICA	p
	Media (DE)	Media (DE)	
<i>Aa</i>	0,05 % (0,43%)	1,01 % (4,32%)	0,500
<i>Pg</i>	0,31% (1,01%)	1,39 % (3,787%)	0,306
<i>Pi</i>	1,77% (3,12%)	38,69% (26,49%)	0,002
<i>Tf</i>	4,61% (9,07%)	5,59% (5,62%)	0,069
<i>Pm</i>	0,46% (1,00%)	9,03% (8,64 %)	0,001
<i>Cr</i>	0,98% (3,25%)	0,42% (1,38%)	0,354
<i>Fn</i>	2,23% (7,39%)	0,00% (0,00%)	0,317
<i>Capn</i>	6,56% (7,711)	3,03% (3,128)	0,375
<i>Ec</i>	0,08% (0,27%)	0,09% (0,20%)	0,621

Tabla 4. Porcentaje de cada patógeno. (*Aa*: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Pg*: *Porphyromonas gingivalis*; *Pi*: *Prevotella intermedia*; *Tf*: *Tannerella forsythia*; *Pm*: *Parviromonas micra*; *Cr*: *Campylobacter rectus*; *Fn*: *Fusobacterium nucleatum*; *Capn*: *Capnocytophaga*; *Ec*: *Eikenella corrodens*; DE: desviación estándar).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en el porcentaje de *P. micras* (p=0,002) y *P. intermedia* (p=0,001), siendo mayores los valores encontrados en pacientes con periodontitis crónica.

La siguiente tabla representa **la prevalencia** (porcentaje de sujetos positivos para cada bacteria) de cada bacteria (Tabla 5):

Prevalencia	PERIODONTALMENTE		p
	SANOS	PERIODONTITIS	
	%	CRONICA	
<i>Aa</i>	9,1	27,3	0,586
<i>Pg</i>	26,4	81,4	0,004
<i>Pi</i>	36,4	90,9	0,012
<i>Tf</i>	27,3	90,9	0,004
<i>Pm</i>	9,1	27,3	0,293
<i>Cr</i>	9,1	0	0,500
<i>Fn</i>	90,9	100	0,500
<i>Capn</i>	9,1	18,2	0,500
<i>Ec</i>	18,2	9,1	0,500

Tabla 5. Prevalencia de cada patógeno. (*Aa*: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Pg*: *Porphyromonas gingivalis*; *Pi*: *Prevotella intermedia*; *Tf*: *Tannerella forsythia*; *Pm*: *Parviromonas micra*; *Cr*: *Campylobacter rectus*; *Fn*: *Fusobacterium nucleatum*; *Capn*: *Capnocytophaga*; *Ec*: *Eikenella corrodens*)

Respecto a la prevalencia de cada patógeno, indicada como porcentaje de sujetos que presentan dicho patógeno, se observaron diferencias estadísticamente significativas en *P. gingivalis* ($P=0,004$) y *T. forsythia* ($p=0,004$), existiendo mayor prevalencia de las mismas en los pacientes que sufrían periodontitis crónica.

b. RT-PCR

En cuanto a los resultados obtenidos mediante el método de PCR cabe destacar que, ya que este método necesita unos “primers” específicos para cada bacteria, en nuestro estudio solo se hizo con “primers” para *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*. Las siguientes tablas (tablas 7 y 8) representan la diferencia en cuanto al recuento de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* que se encontraron con cultivo y con PCR.

	RECuento <i>Pg</i> CULTIVO (UFC/ml)	RECuento <i>Pg</i> PCR (UFC/ml)
PERIODONTALMENTE SANOS	5,50E+04	2,37E+07
PERIODONTITIS CRONICA	6,27E+07	1,11E+08

Tabla 6. Comparación recuento *P.gingivalis* con cultivo y con PCR. (*Pg: P.gingivalis*)

	RECuento <i>Aa</i> CULTIVO	RECuento <i>Aa</i> PCR
PERIODONTALMENTE SANOS	2,12E+04	1,15E+04
PERIODONTITIS CRONICA	6,47E+05	6,63E+05

Tabla 7. Comparación recuento *A.actinomycetemcomitans* con cultivo y PCR.

Como se observa en estas tablas, la PCR no siempre detectó mayor cantidad de patógenos que el cultivo. En cuanto a *P. gingivalis*, la PCR detectó una mayor cantidad de bacterias que el cultivo, tanto en pacientes periodontalmente sanos como en pacientes con periodontitis crónica.

Sin embargo, respecto a *A. actinomycetemcomitans*, podemos observar que ambas técnicas encontraron el mismo orden de bacterias, tanto en pacientes periodontalmente sanos como en pacientes con periodontitis crónica.

III. MUESTRAS DE SANGRE

a. Cultivo

Analizando las muestras de sangre de los 22 pacientes, 4 de ellos mostraron bacteriemia basal. En uno de los casos perteneciente al grupo de periodontitis se identificó *F. nucleatum*. En los demás casos las bacterias encontradas fueron no identificadas, blanco-pigmentadas no hemolíticas o beta hemolíticas, pero no relacionadas con la enfermedad periodontal.

En cuanto a la bacteriemia que se encontró después de los procedimientos de higiene interproximal solo se presentó en dos pacientes del grupo de periodontitis crónica, ninguno en pacientes periodontalmente sanos. En estos casos, los patógenos encontrados fueron bacterias blanco pigmentadas no hemolíticas no relacionadas con las especies bacterianas que se encuentran en la enfermedad periodontal.

En la siguiente tabla podemos observar la relación de casos que presentaron bacteriemia tanto en basal como después de la higiene interproximal, relacionado con la cantidad de bacterias que se encontraron en las muestras de FCG:

Paciente	Grupo	Recuento FCG UFC/ml	Recuento sangre basal UFC/ml	Recuento sangre post-cepillado UFC/ml
4	Periodontitis crónica	1,2x10 ⁷	100	0
5	Periodontitis crónica	7,7x10 ⁵	220*	155
7	Periodontitis crónica	1,3x10 ⁷	420	1045
19	Sano	2,1x10 ⁵	650	0

Tabla 8. casos con bacteriemia basal y/o post-cepillado. (1: grupo periodontitis crónica; 0: grupo pacientes periodontalmente sanos; *: paciente que presentó *F.nucleatum*; UFC/ml: unidades formadoras de colonias/mililitro)

b. RT-PCR

Esta técnica no detectó los patógenos que pretendía encontrar (*A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*) en las muestras de sangre pre y post cepillado. Dio valores iguales a 0 en todos los casos.

IV. Discusión

El objetivo primario del presente estudio fue ver si bacterias que se encuentran normalmente en la cavidad oral son responsables de bacteriemias después de haber realizado procedimientos de higiene oral mediante el uso de cepillos interproximales en pacientes con periodontitis crónica y en sujetos periodontalmente sanos.

En el FCG de pacientes con periodontitis, mediante la técnica de cultivo, se observó mayor número de bacterias anaerobias en comparación con los pacientes periodontalmente sanos. La bacteria con mayor recuento en el FCG de pacientes con periodontitis fue *P. gingivalis* ($5,6 \times 10^3$ UFC/ml) en comparación con el recuento encontrado en pacientes sanos ($5,0 \times 10^3$ UFC/ml). Sin embargo, en los pacientes periodontalmente sanos la bacteria con mayor recuento fue *F. nucleatum* ($2,3 \times 10^4$ UFC/ml), siendo el recuento de esta bacteria en enfermos de $2,64 \times 10^5$ UFC/ml. Respecto a la prevalencia de cada bacteria (porcentaje de pacientes positivos a cada bacteria) se observó que *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *T. forsythia* fueron las más prevalentes en el grupo con periodontitis crónica.

En cuanto a las muestras de sangre, también mediante la técnica de cultivo, cuando se usó el método de cultivo en medio general y selectivo, se observó una prevalencia global de bacteriemia tras el cepillado interproximal de 9,09% de los pacientes analizados y pertenecían al grupo de periodontitis. Además, también presentaron bacteriemia previa al cepillado interproximal, siendo en uno de ellos el recuento bacteriano tras el cepillado más del doble que el recuento previo al cepillado interproximal; y en otro el recuento previo al cepillado interproximal fue mayor que después de haber practicado la higiene interproximal. Éste es el caso en el que se encontró *F. nucleatum* en la muestra previa al cepillado, no apareciendo en la muestras posterior. En ninguno de los casos se identificaron *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* en las muestras de sangre.

En cuanto a los hallazgos mediante la técnica de PCR, en las muestras de sangre no se hallaron los patógenos periodontales para los que estaba diseñada la reacción, que eran *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*. Sin embargo, y como es de esperar, si se encontraron estos patógenos en las muestras de FCG. Cabe destacar que, haciendo una comparativa de los resultados obtenidos mediante las dos técnicas, fue la RT-PCR la que detectó mayor cantidad de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*.

Al comparar nuestros resultados de bacteriemias con cultivo con los estudios publicados donde analizan las bacteriemias tras actividades diarias rutinarias como los procedimientos de higiene oral, coincidimos con Maharaj y colaboradores (Maharaj et al., 2012), que encontraron una prevalencia del 10% inmediatamente después de los procedimientos de higiene (cepillado durante 5 minutos); Forner y colaboradores (Forner et al., 2006), que hallaron un 5% de prevalencia; y Kinane y colaboradores (Kinane et al., 2005), que obtuvieron un 13% de bacteriemia. También se acercaron a nuestros resultados Jones y colaboradores (Jones et al., 2010), con un 17% de prevalencia. Sin embargo la diferencia fue mayor con otros autores como Olsen y colaboradores (Olsen, 2008), que encontraron 43% estimulando la bacteriemia mediante cepillado durante 2 minutos. También encontraron mayor prevalencia de bacteriemia autores como Lockhart y colaboradores, que encontraron 40% (Lockhart et al., 2008); Madsen y colaboradores, que vieron un 54 % (Madsen, 1974); o Silver y colaboradores, que obtuvieron un 43% de prevalencia (Silver et al., 1977). Destaca que uno de los autores no encuentra bacteriemia tras procedimientos de higiene oral (Hartzell et al., 2005), al igual que ocurre en este estudio con la técnica de PCR.

En nuestro estudio observamos que la prevalencia de bacteriemia se da exclusivamente en pacientes con periodontitis, no apareciendo en pacientes sanos. Lo que podría indicar que la periodontitis facilite una mayor entrada de patógenos al torrente sanguíneo, pudiendo producir así patologías sistémicas. Hay autores que defienden que la presencia de bacteriemia esta más asociada a la inflamación gingival y a la placa bacteriana (Tomas et al., 2012). Los resultados de nuestro estudio coinciden con Kinane y colaboradores (Kinane et al., 2005) que hallaron

casos de bacteriemia solo en pacientes con periodontitis. Por el contrario, autores como Madsen y colaboradores hallan una prevalencia de 54% en pacientes con periodontitis, y un 19% en pacientes periodontalmente sanos. Esto puede ser debido a que algunos estudios consideran a los pacientes con gingivitis como pacientes periodontalmente sanos, y estos pueden dar positivo a bacteriemia.

En nuestro estudio, el **tiempo empleado** para los procedimientos de higiene oral fue de 2 minutos. Durante ese tiempo se pasó el cepillo interproximal por las localizaciones distales al canino, tanto por vestibular como por lingual o palatino. En algunos estudios, el tiempo empleado para las técnicas de higiene oral fue menor. En el caso de Hartzel y colaboradores, el tiempo empleado fue 1 minuto de cepillado dental rutinario. En este caso, la bacteriemia encontrada fue del 0% (Hartzell et al., 2005).

Por otro lado, muchos estudios establecieron en 2 minutos el tiempo durante el que se realizaron medidas de higiene oral (Jones et al., 2010, Olsen, 2008, Bahrani-Mougeot et al., 2008, Kinane et al., 2005, Forner et al., 2006) coincidiendo con nuestro estudio. En estos estudios, se encontró bacteriemia en muchos casos después de los procedimientos de higiene. En los estudios en los que se dedicó más tiempo a los procedimientos de higiene, se encontró bacteriemia de origen oral en un gran número de los casos. Se deduce que quizá el tiempo que se debe emplear para encontrar bacteriemia de origen oral ha de ser como mínimo de 2 minutos.

Además, entre los distintos estudios publicados se encuentran diferencias que pueden ser debidas **al momento de la toma de sangre** tras el procedimiento de higiene. Hay autores que toman las muestras de sangre justo después del procedimiento de higiene (Maharaj et al., 2012, Kinane et al., 2005), otros, toman la primera muestra de sangre a los 30 segundos de los procedimientos de higiene (Crasta et al., 2009, Forner et al., 2006). Se puede observar que los autores que toman la muestra justo después de los procedimientos de higiene registran una menor prevalencia que los que esperan 30 segundos o incluso 1 o 2 minutos (Jones et al., 2010, Olsen, 2008, Bahrani-Mougeot et al., 2008). En los estudios que toman

muestras de sangre a distintos tiempos después de los procedimientos de higiene oral se observa que la bacteriemia va disminuyendo con el tiempo. En el estudio de Maharaj y colaboradores se observa una prevalencia del 10,8% en las primeras muestras de sangre (2 y 5 minutos) mientras que no se observa bacteriemia en las muestras tomadas a los 15 y 30 minutos (Maharaj et al., 2012). En el estudio de Castillo y colaboradores observan que justo después del raspado y alisado radicular la bacteriemia era de un 21%, a los 15 minutos era de un 19%, y a los 30 minutos de 14,3% (Castillo et al., 2011). En el estudio de Crasta y colaboradores observan un 40% de prevalencia de bacteriemia a los 30 segundos, mientras que a los 10 minutos la prevalencia es del 27% (Crasta et al., 2009). De esto se deduce que la bacteriemia debido a procedimientos de higiene oral es transitoria. En nuestro caso, las tomas de sangre se realizaron 1 minuto después del uso de los cepillos interproximales, pero la prevalencia que encontramos es menor que la de los autores estudiados que realizan la toma en el mismo momento.

También puede ser una fuente de variabilidad importante entre los distintos estudios la **forma de provocar bacteriemia** que utilizan los autores. Algunos autores analizan bacteriemias tras procedimientos quirúrgicos (Maharaj et al., 2012, Olsen, 2008, Bahrani-Mougeot et al., 2008) encontrando prevalencia de bacteriemia mucho mayor que con procedimientos de higiene oral. Otros autores, utilizan como forma de provocar bacteriemia el raspado y alisado radicular, estos son Zhang y colaboradores, y Morozumi y colaboradores, que encuentran una prevalencia de alrededor de un 60% (Zhang et al., 2013, Morozumi et al., 2010). En cuanto a los autores que utilizan medidas de higiene oral, encontramos algunos que utilizan cepillos tradicionales (Kinane et al., 2005, Lockhart et al., 2008, Hartzell et al., 2005, Silver et al., 1977). Sin embargo, aquellos que utilizan medidas de higiene oral interproximal son los que encuentran mayor tasa de bacteriemia (Crasta et al., 2009, Madsen, 1974, Zhang et al., 2013). Autores como Zhang y colaboradores y Crasta y colaboradores (Zhang et al., 2013, Crasta et al., 2009) utilizan el hilo dental y encuentran prevalencia de bacteriemia de un 30 y un 40% respectivamente. Madsen y colaboradores (Madsen, 1974) utilizan palillos de dientes, encontrando una prevalencia del 54%. Estos resultados podrían ser

debidos a que es justo en el área interproximal donde más placa bacteriana se acumula.

En cuanto a la **técnica de análisis**, hay autores que utilizan las mismas técnicas que usamos nosotros, como son Kinane y colaboradores, que utilizaron PCR (Kinane et al., 2005); Maharaj y colaboradores y Jones y colaboradores, utilizan el cultivo para detectar bacterias (Maharaj et al., 2012, Jones et al., 2010). Además hay otros autores que utilizaron BACTEC (Crasta et al., 2009, Olsen, 2008, Bahrani-Mougeot et al., 2008, Maharaj et al., 2012). Aun así, ningún autor compara los métodos de cultivo y PCR, como es nuestro caso.

Cabe destacar que, en nuestro estudio, en los dos casos que presentaron bacteriemia post-cepillado interproximal coincidió con que tuvieron bacteriemia basal. En uno de los casos llama la atención que el recuento total de patógenos encontrados en la muestra pre-cepillado fue mayor que en la muestra post-cepillado, además coincide con ser el caso que presentó *F. nucleatum* en la muestra pre-cepillado. Sin embargo, en el segundo caso casi se triplicó el número de UFC/ml entre las dos muestras de sangre, presentó 420UFC/ml en la muestra pre-cepillado, y 1045 UFC/ml en la muestra post-cepillado.

El objetivo secundario de este estudio fue comparar dos técnicas para la detección de bacteriemias (cultivo y RT-PCR). Nuestros resultados sugieren que la técnica más sensible a la hora de detectar patógenos es el cultivo, ya que detectó más cantidad de bacterias que la técnica de RT-PCR. Hay que destacar que la PCR solo buscaba encontrar *A.actinomycetemcomitans* y *P.gingivalis*; mientras que el cultivo en agar sangre no era selectivo para ninguna bacteria, y no se encontró ninguna de las dos bacterias que se buscaban en la PCR.

Para las muestras de FCG fue la técnica de PCR la que detectó mayor cantidad de patógenos (*A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*) que la técnica de cultivo, aunque ésta nos dio información sobre otros patógenos periodontales que la PCR no es capaz de identificar con los “primers” que se utilizaron. Este hecho es debido a que la RT-PCR se hizo de manera que fuera específica para esos dos patógenos, mientras que los métodos de cultivo en medio general no son específicos para ningún patógeno en concreto.

Finalmente, en nuestro estudio nos encontramos con algunas limitaciones, entre las que se encuentran el pequeño tamaño muestral. Por esta razón, nuestros resultados no son estadísticamente significativos y serían necesarios más estudios al respecto.

V. Conclusiones

Teniendo en cuenta las limitaciones de este estudio piloto, podemos concluir que:

- i. Existe riesgo de sufrir una bacteriemia tras el uso de cepillos interproximales en pacientes con periodontitis.
- ii. La técnica de cultivo en medio general y en medio específico nos da más información a la hora de cuantificar patógenos que la técnica de RT-PCR, ya que es muy selectiva.

VI. Bibliografía

- ARMITAGE, G. C. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, 4, 1-6.
- ARMITAGE, G. C. 2004. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 34, 9-21.
- BAHRANI-MOUGEOT, F. K., PASTER, B. J., COLEMAN, S., ASHAR, J., BARBUTO, S. & LOCKHART, P. B. 2008. Diverse and novel oral bacterial species in blood following dental procedures. *J Clin Microbiol*, 46, 2129-32.
- BARBOSA, M., CARMONA, I. T., AMARAL, B., LIMERES, J., ALVAREZ, M., CERQUEIRA, C. & DIZ, P. 2010. General anesthesia increases the risk of bacteremia following dental extractions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 110, 706-12.
- BASCONES-MARTINEZ, A., MUNOZ-CORCUERA, M. & BASCONES-ILUNDAIN, J. 2012. [Relationship between odontogenic infections and infective endocarditis]. *Med Clin (Barc)*, 138, 312-7.
- 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.
- CLAESSON, R., LAGERVALL, M., HOGLUND-ABERG, C., JOHANSSON, A. & HAUBEK, D. 2011. Detection of the highly leucotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in members of a Caucasian family living in Sweden. *J Clin Periodontol*, 38, 115-21.
- COULTER, W. A., COFFEY, A., SAUNDERS, I. D. & EMMERSON, A. M. 1990. Bacteremia in children following dental extraction. *J Dent Res*, 69, 1691-5.
- CRATA, 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., MITCHELL, D., GROSSBERG, D., HIGHFIELD, J. & STEWART, D. 1997. Bacteraemia caused by periodontal probing. *Aust Dent J*, 42, 77-80.
- DIETRICH, T., SHARMA, P., WALTER, C., WESTON, P. & BECK, J. 2013. The epidemiological evidence behind the association between periodontitis and incident atherosclerotic cardiovascular disease. *J Clin Periodontol*, 40 Suppl 14, S70-84.
- FARBOD, F., KANAAN, H. & FARBOD, J. 2009. Infective endocarditis and antibiotic prophylaxis prior to dental/oral procedures: latest revision to the guidelines by the American Heart Association published April 2007. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 38, 626-31.
- 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.
- GREENSTEIN, G. 1988. Microbiologic assessments to enhance periodontal diagnosis. *J Periodontol*, 59, 508-15.
- GUNTHEROTH, W. G. 1984. How important are dental procedures as a cause of infective endocarditis? *Am J Cardiol*, 54, 797-801.
- HAFFAJEE, A. D., SOCRANSKY, S. S., PATEL, M. R. & SONG, X. 2008. Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*, 23, 196-205.

- HARTZELL, J. D., TORRES, D., KIM, P. & WORTMANN, G. 2005. Incidence of bacteremia after routine tooth brushing. *Am J Med Sci*, 329, 178-80.
- HEIMDAHL, A., HALL, G., HEDBERG, M., SANDBERG, H., SODER, P. O., TUNER, K. & NORD, C. E. 1990. Detection and quantitation by lysis-filtration of bacteremia after different oral surgical procedures. *J Clin Microbiol*, 28, 2205-9.
- HUPP, J. R. 2009. Infective endocarditis--stop blaming the dentist. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 108, 145-6.
- IDE, M. & PAPAPANOU, P. N. 2013. Epidemiology of association between maternal periodontal disease and adverse pregnancy outcomes--systematic review. *J Clin Periodontol*, 40 Suppl 14, S181-94.
- JONES, D. J., MUNRO, C. L., GRAP, M. J., KITTEN, T. & EDMOND, M. 2010. Oral care and bacteremia risk in mechanically ventilated adults. *Heart Lung*, 39, S57-65.
- KINANE, D. F., RIGGIO, M. P., WALKER, K. F., MACKENZIE, D. & SHEARER, B. 2005. Bacteraemia following periodontal procedures. *J Clin Periodontol*, 32, 708-13.
- KORNMAN, K. S. 2008. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J Periodontol*, 79, 1560-8.
- LOCKHART, P. B. 1996. An analysis of bacteremias during dental extractions. A double-blind, placebo-controlled study of chlorhexidine. *Arch Intern Med*, 156, 513-20.
- LOCKHART, P. B., BRENNAN, M. T., KENT, M. L., NORTON, H. J. & WEINRIB, D. A. 2004. Impact of amoxicillin prophylaxis on the incidence, nature, and duration of bacteremia in children after intubation and dental procedures. *Circulation*, 109, 2878-84.
- 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.
- 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.
- MAHARAJ, B., COOVADIA, Y. & VAYEJ, A. C. 2012. An investigation of the frequency of bacteraemia following dental extraction, tooth brushing and chewing. *Cardiovasc J Afr*, 23, 340-4.
- 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.
- 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.

- OFFENBACHER, S., KATZ, V., FERTIK, G., COLLINS, J., BOYD, D., MAYNOR, G., MCKAIG, R. & BECK, J. 1996. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol*, 67, 1103-13.
- OKABE, K., NAKAGAWA, K. & YAMAMOTO, E. 1995. Factors affecting the occurrence of bacteremia associated with tooth extraction. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 24, 239-42.
- OLSEN, I. 2008. Update on bacteraemia related to dental procedures. *Transfus Apher Sci*, 39, 173-8.
- POVEDA-RODA, R., JIMENEZ, Y., CARBONELL, E., GAVALDA, C., MARGAIX-MUNOZ, M. M. & SARRION-PEREZ, G. 2008. Bacteremia originating in the oral cavity. A review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 13, E355-62.
- 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. *Pediatr Cardiol*, 20, 317-25.
- ROBERTS, G. J., WATTS, R., LONGHURST, P. & GARDNER, P. 1998. Bacteremia of dental origin and antimicrobial sensitivity following oral surgical procedures in children. *Pediatr Dent*, 20, 28-36.
- SANZ, M. & KORNMAN, K. 2013. Periodontitis and adverse pregnancy outcomes: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol*, 84, 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.
- 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.
- SOCRANSKY, S. S., HAFFAJEE, A. D., CUGINI, M. A., SMITH, C. & KENT, R. L., JR. 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, 25, 134-44.
- STANKO, P. & IZAKOVICOVA HOLLA, L. 2014. Bidirectional association between diabetes mellitus and inflammatory periodontal disease. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 158, 35-8.
- TAKAI, S., KURIYAMA, T., YANAGISAWA, M., NAKAGAWA, K. & KARASAWA, T. 2005. Incidence and bacteriology of bacteremia associated with various oral and maxillofacial surgical procedures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 99, 292-8.
- TOMAS, I., ALVAREZ, M., LIMERES, J., POTEL, C., MEDINA, J. & DIZ, P. 2007. Prevalence, duration and aetiology of bacteraemia following dental extractions. *Oral Dis*, 13, 56-62.
- 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. 2013. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol*, 84, S24-9.

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.

VII. Anexos

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estudio: *(Aquí pones el título del estudio)*

Yo, _____
(NOMBRE Y APELLIDOS)

He recibido la hoja de información
He podido hacer preguntas sobre el estudio
He recibido respuesta satisfactoria a mis preguntas
He recibido suficiente información sobre el estudio

He hablado con _____
(NOMBRE Y APELLIDOS DEL INVESTIGADOR)

Comprendo que mi participación es voluntaria.
Comprendo que puedo retirarme del estudio:
1º Cuando quiera
2º Sin tener que dar explicaciones
3º Sin que esto repercuta en mis cuidados dentales.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

_____, ___ de _____ de 20__

Firma del Participante



HOJA DE INFORMACION

Estudio: Detección y cuantificación de bacterias de origen oral en bacteriemias tras procedimientos de higiene oral no profesionales.

Investigadores:

Mariano Sanz, David Herrera, Elena Figuro, Estefanía Laguna, M^aJosé Marín,
María del Carmen Sánchez, Arancha Llama

Centro de la Investigación

Estudio Clínico: Clínica del Programa Máster de Periodoncia
Facultad de Odontología, Universidad Complutense,
Madrid

Estudio Microbiológico:

Servicio de Microbiología Oral y Biología Molecular
Facultad de Odontología, Universidad Complutense,
Madrid

INFORMACIÓN

Las periodontitis son un grupo de enfermedades de naturaleza infecciosa, caracterizadas por la destrucción del aparato de soporte del diente (periodonto). La principal consecuencia de las periodontitis, la pérdida de dientes, causa dificultades funcionales y estéticas; sin embargo, en los últimos años también se han asociado a problemas de salud sistémico.

El factor etiológico primario en las periodontitis es la presencia de bacterias específicas organizadas en forma de biofilm bajo la encía (subgingival). En España, *Porphyromonas gingivalis* es el patógeno más frecuentemente asociado a periodontitis. Esto hace que, junto con *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, que es una una de las bacterias con mayor capacidad patogénica, cobren una relevancia fundamental en el estudio de las periodontitis.

Debido a las características de las lesiones periodontales, las bacterias presentes en el biofilm subgingival, incluidos los patógenos mencionados, pueden pasar a la circulación sanguínea sistémica (bacteriemia).

En pacientes con periodontitis, existe un riesgo aumentado de sufrir bacteriemias repetidas, espontáneamente o tras maniobras habituales en la vida diaria, como el cepillado dental, masticar o tragar, etc. El paso de estas bacterias a sangre puede ser el posible nexo de unión que explique la asociación encontrada entre pacientes con periodontitis y determinadas enfermedades sistémicas, tales como enfermedades cardiovasculares.

Se le pedirá que acuda a dos visitas. El estudio consistirá en el registro de medidas clínicas y microbiológicas, en la administración de medidas de higiene oral (uso de cepillos interproximales) y en la toma de muestras de sangre inmediatamente antes y un minuto después.

Se me ha explicado que para la realización del tratamiento es imprescindible mi colaboración con unas medidas de higiene y alimentación previas a la cita de toma de muestras, siendo así que su omisión puede provocar resultados distintos a los esperados. A su vez, asumo que no debo de tomar ningún antibiótico ni antiséptico que pueda influir en los resultados del estudio, a no ser que sea estrictamente necesario y prescrito por un facultativo.

Cualquier duda que tenga, podrá ser resuelta por cualquiera de los miembros del equipo investigador.