

## DETECCIÓN DE ESPECIES DE BACILOS ANAEROBIOS GRAM NEGATIVOS EN PACIENTES CON PERIODONTITIS CRÓNICA

Recibido para arbitraje: 11/07/2005

Aceptado para publicación: 24/10/2005

- **Guilarte C.** Profesor Agregado. Cátedra de Microbiología.
- **Perrone, M.** Profesor Titular. Instituto de Investigaciones Odontológicas "Raúl Vicentelli"

Facultad de Odontología. Universidad Central de Venezuela.

### RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de especies de bacilos Gram Negativos en pacientes con periodontitis crónica. Las muestras de los sacos periodontales de los pacientes con periodontitis fueron tomadas con conos de papel y transportadas en el medio de Caldo Tioglicolato pre-reducido y luego sembradas en Agar Sangre Base Schaedler para el aislamiento de anaerobios. La identificación se realizó a través de las pruebas enzimáticas RAPID ID 32A. Las especies detectadas en este estudio fueron: *Prevotella intermedia* (36,66%), *Prevotella melaninogenica* (6,66%), *Prevotella loescheii* (16,66%), *Porphyromonas gingivalis* (30,99%), *Fusobacterium nucleatum* (3,33%) y *Bacteriodes sp.* (3,33%).

**Palabras claves:** periodontitis crónica, *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella loescheii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* y *Bacteriodes sp.*

### ABSTRACT

The objective of this study was to determine the presence of Gram Negative rods anaerobic species in patients with chronic periodontitis. The periodontal pocket samples the patients with periodontitis were taken by means of paper cones and transported in pre-reduced Thioglycolate Broth and them were streaked on blood agar Schaedler base in order isolate anaerobic bacteria. The identification was carried out by RAPID ID 32A enzymatic system. *Prevotella intermedia* (36,66%), *Prevotella melaninogenica* (6,66%), *Prevotella loescheii* (16,66%), *Porphyromonas gingivalis* (30,99%), *Fusobacterium nucleatum* (3,33%) y *Bacteriodes sp.* (3,33%) were the species identified in this studied.

### INTRODUCCIÓN

La periodontitis constituye un conjunto de alteraciones de los tejidos de soporte del diente, debido a que se afectan el ligamento periodontal, cemento y el hueso alveolar (1,2). Algunos investigadores definen a la periodontitis como un proceso infeccioso relacionado con la acumulación de placa y cálculo dental, así como también con la presencia de microorganismos patógenos, siendo las Bacterias Anaerobias Gram Negativas, las principalmente involucradas en esta entidad (3,4,5,6,7).

De los tipos de periodontitis, la Periodontitis Crónica, es la más frecuente, la cual se inicia en el adulto joven y progresa durante toda la vida del individuo, siendo clínicamente significativa a partir de los 35 años de edad. Esta enfermedad se caracteriza por presentar diversos grados de inflamación, por la formación de sacos periodontales y por la pérdida activa del hueso alveolar. La encía puede sangrar al ser examinada y/o presentar exudado purulento y en etapas más avanzadas hay retracción de la misma, movilidad dentaria con aumento en el espacio interdental (2,7). Existen una serie de factores de riesgo que pueden predisponer a los individuos a desarrollar esta enfermedad, tales como sexo, raza, edad, hábito de fumar, inadecuada higiene bucal, desnutrición, estrés, y el nivel socioeconómico de los individuos; algunas enfermedades sistémicas, como: Diabetes Mellitus, trastornos de la función de los neutrófilos, estados de inmunosupresión (SIDA, leucemias) y otras enfermedades como Síndrome de Down, Síndrome de Papillon Lefevre, Síndrome de Chédiak-Higashi, enfermedad de Addison, entre otras, también favorecen el desarrollo de esta enfermedad (2,8,9,10).

Algunas investigaciones evidencian, que ciertas bacterias como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella loescheii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacterioides forsythus* (reclasificada como *Tannerella forsythensis*), *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens* y *Treponema sp.*, han sido comúnmente relacionadas con la periodontitis crónica y son consideradas como indicadores de riesgo para la progresión de dicha enfermedad (2,6,7,9,11,12). No obstante, dentro de este grupo de bacterias, *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia*, constituyen los microorganismos más asociados en la etiología de esta enfermedad. Por otra parte, estudios realizados por Slots (1979), Timmerman y col. (2001), reportaron, que la presencia de la placa dental, junto con cualquier otro factor de riesgo aceleran el desarrollo de la periodontitis crónica (3,13).

La mayoría de la información obtenida acerca de la microbiota de la periodontitis crónica, ha emergido de estudios realizados en EEUU y Europa (3,14,15,16). Solo recientemente se ha investigado sobre la microbiota periodontal en países en vías de desarrollo y los resultados han indicado diferencias significativas, cuando se compara con la comúnmente percibida en otros países (17,18,19).

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente trabajo fue detectar especies de Bacilos Anaerobios Gram Negativos en muestras de sacos periodontales en un grupo de pacientes con periodontitis, que acudieron a consulta en la Facultad de Odontología de la Universidad Central de Venezuela; así como también investigar la relación existente entre algunos parámetros de esta enfermedad y los microorganismos detectados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Población a estudiar:** Para la realización de este trabajo, se seleccionaron, cuarenta y cinco (45) pacientes adultos que asistieron a consulta odontológica, tanto de pregrado como de postgrado, en la Facultad de Odontología de la Universidad Central de Venezuela. De ellos, 30 pacientes adultos, entre 20 y 69 años de edad, de uno u otro sexo, con diagnóstico clínico y radiográfico de periodontitis, sin haber recibido tratamiento antimicrobiano, conformaron el Grupo Experimental, y 15 pacientes adultos periodontalmente sanos conformaron el Grupo Control. No se incluyeron en el estudio pacientes con cuadros periodontales agudos como abscesos periodontales y gingivitis ulcero necrozante (GUN), ni pacientes que estaban bajo tratamiento con medicamentos antimicrobianos o inmunosupresores, para evitar variaciones en la microbiota presente en la cavidad bucal de los mismos.

### Procedimiento del estudio microbiológico:

**1. Toma de la muestra:** A cada paciente del grupo experimental se le tomó una muestra de los sacos periodontales (4 mm) formados alrededor de los dientes superiores e inferiores, en tanto que a los pacientes del grupo control se les tomó una muestra de placa subgingival de los dientes superiores e inferiores. Las muestras de los sacos periodontales, conteniendo el fluido crevicular, fueron tomadas con tres conos de papel esterilizados N°30, durante un minuto, de los cuales, dos se colocaron en el medio de transporte Caldo Tioglicolato pre-reducido y el otro en Agar Anaeróbico Schaedler con suplemento 107. Las muestras de placa subgingival se tomaron con curetas periodontales previamente esterilizadas y fueron colocadas en los mismos medios mencionados anteriormente.

### **2. Procesamiento de las muestras:**

**2.1. Aislamiento de bacterias anaerobias:** Los procedimientos realizados para el aislamiento de bacterias anaerobias en este estudio, estuvieron basados en criterios de Gabaldón y Nieves, complementando con el Manual Sistemático de Bacteriología Bergey's (20,21). El medio de transporte Caldo Tioglicolato pre-reducido y Agar Anaeróbico Schaedler, conteniendo la muestra obtenida, fueron trasladados inmediatamente al Laboratorio de Microbiología. A partir del Caldo Tioglicolato se efectuó la siembra de la suspensión en los medios Agar Sangre Base Schaedler con suplemento 107 y el Agar Sangre Base Schaedler con suplemento 108 (OXOID). Las condiciones de anaerobiosis se proporcionaron mediante la jarra anaeróbica (Gaspak) y el sobre generador de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>; dichas jarras se incubaron a una temperatura de 37 °C durante 7 a 10 días, al cabo de los cuales, se observó el crecimiento bacteriano en los cultivos primarios. Luego se subcultivaron las colonias características pigmentadas y no pigmentadas para su purificación en Caldo Schaedler y Agar Sangre Base Schaedler, bajo las mismas condiciones de anaerobiosis anteriormente descritas. A partir de las colonias aisladas, se procedió a confeccionar los extendidos en láminas portaobjetos, los cuales fueron teñidos con la coloración de Gram y observados al microscopio óptico, para así visualizar la morfología bacteriana.

**2.2. Identificación de bacterias anaerobias:** Una vez purificadas las colonias se procedió a efectuar la detección de bacterias anaerobias mediante pruebas enzimáticas estandarizadas y miniaturizadas del sistema Rapid ID 32A (BIOMERIEUX). Este sistema consiste en galerías, cada una de ellas compuesta por 32 cúpulas, de las cuales 29 contienen substratos deshidratados que las bacterias son capaces de utilizar, evidenciándose esta reacción mediante un cambio de color en el medio. El procedimiento mediante el cual se realizó la identificación de bacterias anaerobias fue el siguiente: 1) Selección de las colonias: a partir de las colonias puras, se realizaron subcultivos en Agar Sangre Base Schaedler y se incubaron a 37°C por 48 horas en anaerobiosis. 2) Preparación del inóculo: con ayuda de un hisopo estéril, se tomó todo el cultivo del Agar Sangre Base Schaedler y se preparó una suspensión en la ampolla (Suspensión Medium) con una turbidez N° 30 del densitómetro. 3) Inoculación de la galería: seguidamente se homogeneizó la ampolla y se procedió a inocular la galería, distribuyendo 55 µl de suspensión por cúpula con la pipeta electrónica ATB. Luego se cubrió el test URE con dos gotas de aceite de parafina, se taparon las galerías y se incubaron a 37°C durante 4 horas en aerobiosis. 4) Lectura: después de 4 horas, se revelaron las reacciones enzimáticas de la galería, utilizando los reactivos: NIT1, NIT2, JAMES y FB, y se procedió a la lectura de las mismas, mediante el Sistema Computarizado ATB. Finalmente el lector del sistema ATB, registró las reacciones de color para cada cúpula e inmediatamente fueron interpretadas por el programa de identificación.

## RESULTADOS

En este estudio, los resultados expresan las especies de Bacterias Anaerobias Gram Negativas detectadas en pacientes con periodontitis crónica. Del total de pacientes adultos con periodontitis crónica estudiados, 8 (26,7%) correspondían al sexo masculino y 22 (73,3%) al sexo femenino, con edades comprendidas entre 20 y 69 años, siendo 45 años la edad promedio de los mismos. Se observó que todos los pacientes (100%) presentaban inflamación, sacos periodontales entre 4 y 10 mm, así como sangramiento, exudado purulento, y movilidad dentaria. Todos los pacientes fueron encuestados para conocer sus hábitos de higiene bucal y si padecían de otras enfermedades. Del total de pacientes encuestados, 16 (53,30%) refirieron mantener una higiene bucal deficiente y 14 (46,70%) una higiene bucal regular. Así mismo, 25 (83,3%) pacientes afirmaron no padecer de alguna enfermedad predisponente; sólo 1 (3,3%) confirmó padecer de Diabetes Mellitus, 2 (6,7%) Hepatitis B y 2 (6,7%) Hipertensión.

A partir de las muestras de los sacos periodontales de los pacientes cultivadas en el Agar Sangre Base Schaedler, el crecimiento bacteriano, fue claramente evidenciado en el cultivo primario por la aparición de colonias negras o marrón oscuro, lisas, brillantes, convexas, de bordes regulares y pequeñas, diferenciándose de otras colonias no pigmentadas. Luego del subcultivo de las colonias características en Agar Sangre Base Schaedler, las colonias negras fueron recuperadas evidenciándose la presencia de hemólisis en el medio de cultivo, dichas colonias fueron consideradas como cepas sospechosas de Bacilos Anaerobios Gram Negativos productoras de pigmentos (Foto 1). Al realizar las observaciones microscópicas de las colonias, en los extendidos teñidos con Gram, se visualizaron Bacilos Gram Negativos pleomórficos.



Foto 1. Cepas puras de colonias características de Bacilos Anaerobios Gram Negativos Pigmentados.

Con respecto a las especies de Bacilos Anaerobios Gram Negativos detectadas a partir de las colonias aisladas de muestras de sacos periodontales provenientes de los 30 pacientes con periodontitis, en 11 de éstos (36,66%) *P. intermedia* fue la especie más frecuente aislada, en 9 (30,00%) la especie hallada fue *P. gingivalis*, en 5 (16,66%) se aisló *P. loescheii*, en 2 (6,66%) *P. melaninogenica*, en 1 (3,33%) *F. nucleatum* y en otro (3,33%) *Bacteroides* sp. (Figura 1). Cabe destacar que la asociación bacteriana más frecuente estuvo representada por *P. intermedia* y *P. gingivalis* en 5 pacientes. Otras asociaciones fueron *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *F. nucleatum* en un paciente, *P. gingivalis* y *Bacteroides* sp. en otro. Con respecto al grupo control, sólo a 4 pacientes se les observó crecimiento de colonias características de Anaerobios Gram Negativos Pigmentados, identificándose como *Prevotella* sp.

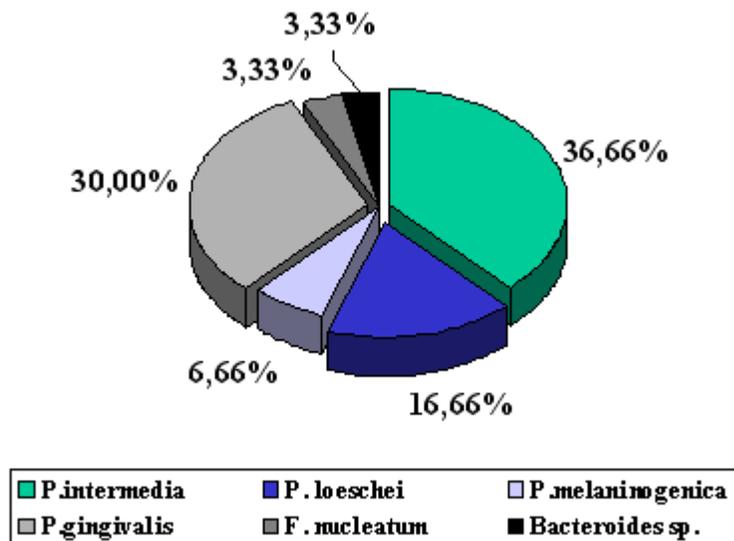


Figura 1. Especies de Bacilos Anaerobios Gram Negativos detectadas en muestras de sacos periodontales de pacientes con periodontitis.

En relación a la detección de especies de Bacilos Anaerobios Gram Negativos en los pacientes con periodontitis crónica y el sexo de los mismos, es importante destacar que *P. intermedia* fue la especie que se halló con mayor frecuencia, ya que se pudo encontrar en 8 (26,66%) de los 22 pacientes del sexo femenino y 3 (10,00%) de los 8 pacientes del sexo masculino, seguido de *P. gingivalis*, especie que se detectó en 7 (23,33%) del sexo femenino y en 2 (6,66%) pacientes del sexo masculino. Las otras especies identificadas, se encontraron en una proporción más baja, *P. loeschei* se encontró en 5 (16,66%) pacientes y *P. melaninogenica* en 2 (6,66%) pacientes del sexo femenino, mientras que *F. nucleatum* (3,33%) y *Bacteroides sp.* (3,33%) fueron detectados en 1 paciente masculino respectivamente (Gáfico1). Así mismo, se observó que la mayor frecuencia de Bacilos Anaerobios Gram Negativos Pigmentados fueron detectadas en el sexo femenino con 17 casos (56,67%) y 5 (16,67%) casos fueron observados en el sexo masculino (Gáfico1).

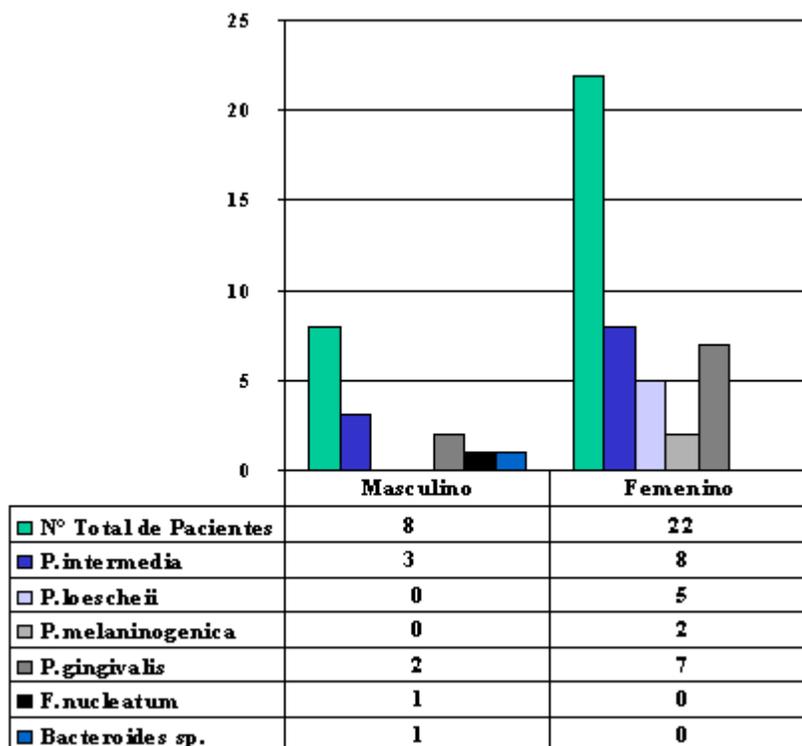


Gráfico 1. Relación entre las especies de Bacilos Anaerobios Gram Negativos detectados en pacientes con periodontitis y sexo.

La distribución de los pacientes con respecto a la edad fue la siguiente: 1 (3,33%) ubicado en el grupo etáreo entre 20 y 29 años; 6 (20,00%) al grupo ubicado entre 30 y 39 años; 13 (43,33%) ubicados entre 40 y 49 años; 7 (23,33%) entre 50 y 59 años; y los otros 3 (10,00%) entre 60 y 69 años de edad (Gráfico 2). Referente a la relación entre las especies de Bacilos Anaerobios Gram Negativos detectados en los pacientes con periodontitis y la edad, hay que destacar que las especies de *Prevotella* estuvieron presentes en todos los grupos etáreos, siendo *P. intermedia* la especie más frecuentemente encontrada en todas las edades, ya que se detectó en 11 (36,66%) de los 30 pacientes, *P. loescheii* se detectó en 5 (16,66%) en edades comprendidas entre 30 y 49 años, y *P. melaninogenica* solo en 2 (6,66%) pacientes con edades entre 30 y 39 años. En cuanto a *P. gingivalis*, esta especie se evidenció en 9 (30,00%) pacientes mayores de 30 años, principalmente en el grupo de pacientes entre 40 y 59 años de edad, en tanto que *Bacteroides* y *F. nucleatum* fueron demostrados en una baja proporción de los pacientes mayores de 50 años (Gráfico 2). Se observó, que el mayor porcentaje de pacientes con periodontitis estuvo representado por adultos mayores de 30 años de edad, principalmente entre 40 - 49 años y por el sexo femenino, así como también, que las especies de *Prevotella* son las más frecuentes en todas las edades y las especies de *Porphyromonas*, *Bacteroides* y *Fusobacterium* se hallaron con mayor frecuencia en pacientes mayores de 40 años.

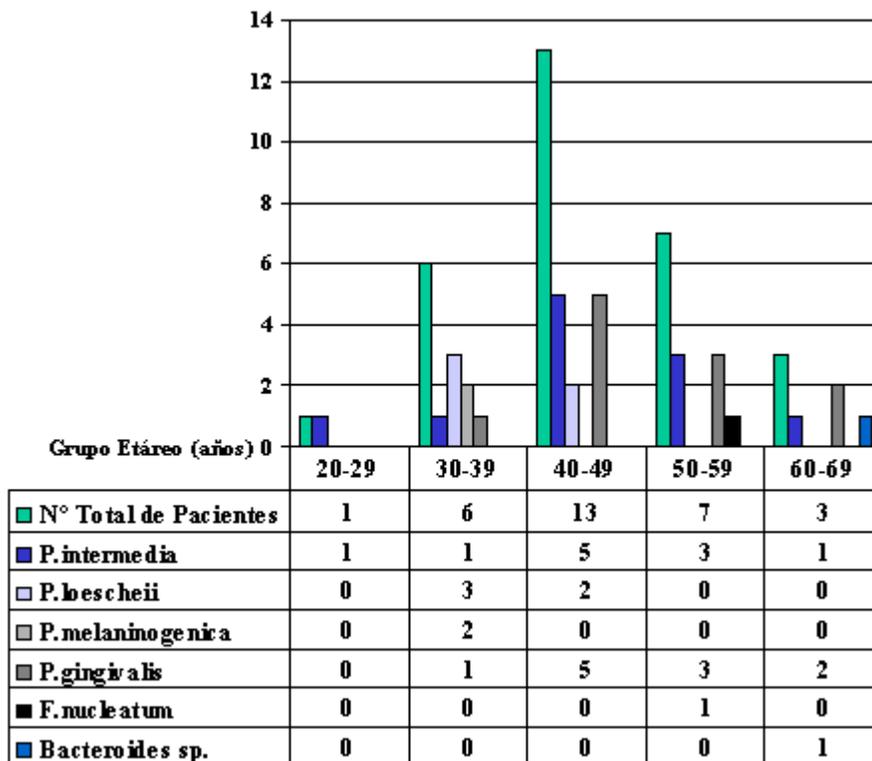


Gráfico 2. Relación entre las especies de Bacilos Anaerobios Gram Negativos detectados en pacientes con periodontitis y edad.

Al relacionar las especies de Bacilos Anaerobios Gram Negativos con la profundidad de los sacos periodontales de los pacientes, se encontró que las especies *P. intermedia*, *P. loescheii* y *P. melaninogenica* se aislaron con mayor frecuencia en sacos entre 4-5mm; *P. intermedia* se aisló en sacos hasta 8mm; *P. gingivalis* se encuentra en sacos mayores de 6mm; *F. nucleatum* y *Bacteroides sp.* en sacos mayores de 7mm junto con *P. gingivalis* (Gráfico3).

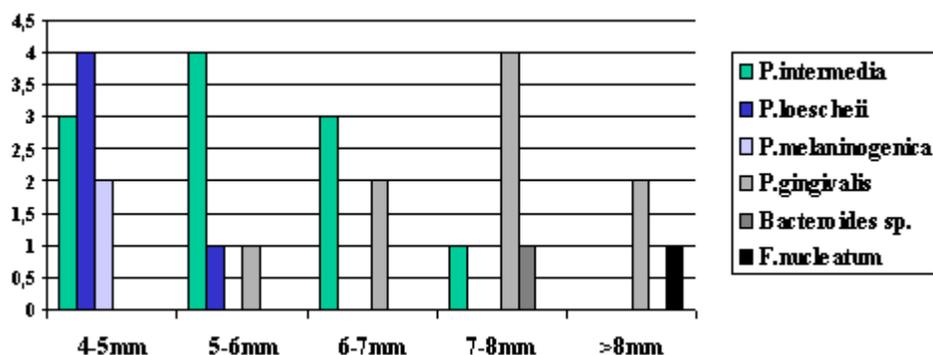


Gráfico 3. Relación entre las especies de Bacilos Anaerobios Gram Negativos detectados en pacientes con periodontitis y profundidad del saco periodontal.

La determinación de la actividad enzimática de los Bacilos Anaerobios Gram Negativos, mediante la utilización del sistema ATB ID32 A evidenció que: todas las especies son ureasa negativa; *P. intermedia*, *P. gingivalis* y *F. nucleatum* elaboran indol a diferencia de las otras especies; *P. gingivalis* produce las enzima Galactosidasa 6 Fosfato, N-acetil Glucosaminidasa y argininas en un 100% a diferencia de *P. intermedia* que produce Glucosidasa y Fucosidasa; *P. loescheii* produce Galactosidasa, Galactosidasa, Glucosidasa y N-acetil Glucosaminidasa en un 100%, al igual que *P. melaninogenica*, con la diferencia que ésta

especie produce además Galactosidasa 6 Fosfato, Fucosidasa y argininas pero no Glucosidasa, siendo la única especie que fermentó la Rafinosa. A excepción de *F. nucleatum*, todas las especies producen fosfatasa alcalina en un 100%. Se observó que *F. nucleatum* no muestra actividad enzimática en comparación con las Bacterias Anaerobias Gram Negativas Pigmentadas. Los resultados con perfil de buena identificación emanados del sistema automatizado permitieron evidenciar las especies de *Prevotella*, *Porphyromonas* y *Fusobacterium*, no obstante, el resultado de perfil dudoso en la actividad enzimática para *Bacteroides* solo permitió determinar el Género pero no la especie por este sistema.

## DISCUSIÓN

La periodontitis crónica en el adulto es una entidad que se caracteriza por presentar diversos grados de inflamación en los tejidos, formación de sacos periodontales, pérdida del hueso alveolar y en algunos casos pérdida progresiva de los dientes (1,2,7). Algunos autores definen esta enfermedad como un proceso infeccioso relacionado con la acumulación de placa y cálculo dental, siendo las Bacterias Anaerobias Gram Negativas, los microorganismos principalmente involucrados (3,4,5,6). Otros autores señalan que ciertas bacterias de la microbiota subgingival son indicadores de riesgo para la progresión de la periodontitis (2,6,9,11).

A pesar de que se ha demostrado en otros países, la frecuencia e importancia de estos microorganismos en la etiología de esta enfermedad, en nuestro país, aún, no existen suficientes reportes con relación a este aspecto, lo que motivó a realizar este estudio con la finalidad de detectar especies de Bacterias Anaerobias Gram Negativas en pacientes con periodontitis crónica. En el presente estudio, los microorganismos detectados en los pacientes con periodontitis crónica fueron *Prevotella intermedia* (36,66%), *Prevotella melaninogenica* (6,66%), *Prevotella loescheii* (16,66%), *Porphyromonas gingivalis* (30,99%), *Fusobacterium nucleatum* (3,33%) y *Bacteroides* sp. (3,33%).

*P. intermedia*, fue el microorganismo más frecuentemente aislado en los pacientes con periodontitis en todas las edades y en sacos periodontales moderados, observándose una frecuencia similar de este microorganismo en los estudios realizados por Ali y col. (17,18,19) en diferentes países. *P. gingivalis*, fue el segundo microorganismo aislado en frecuencia en los pacientes mayores de 30 años en este estudio, observándose un aumento significativo de este microorganismo en los sacos más profundos, tal observación coincide con los resultados reportados por otros autores (17,18,19,22,23). Esta situación podría contribuir más aún a la multiplicación de *P. gingivalis* dentro del saco periodontal debido a que este microorganismo es un anaerobio estricto. No obstante, en los pacientes estudiados predominaron los sacos de 5 a 6 mm, lo que podría explicar una baja frecuencia de aislamiento de este microorganismo en este estudio, frente a *P. intermedia* y con respecto a una mayor frecuencia de esta bacteria encontrada en otras poblaciones. Ambas especies, forman parte del grupo de Bacilos Gram Negativos que producen colonias pigmentadas en agar sangre. De estas especies, *P. gingivalis* es la más virulenta por poseer una batería de enzimas proteolíticas, y toxinas capaces de destruir los tejidos, así como también propiedades para la inactivación de los mecanismos de defensa del hospedero, sin embargo, se ha comprobado la capacidad de *P. intermedia*, para degradar inmunoglobulinas, su acción tóxica sobre fibroblastos, y su actividad fibrinolítica (24,25,26), lo cual podría contribuir a la patogénesis de la enfermedad.

*Bacteroides* sp. se aisló en este estudio en un solo paciente. Estos resultados concuerdan con los reportados por Ali y col. (13, 17,18,19,27) que tampoco han identificado *B. forsythus* (reclasificada como *Tannerella forsythensis*) (12) en elevadas proporciones en muestras de placa subgingival por técnicas de cultivos, sino a través de sondas de ADN. Al parecer los resultados con respecto a la prevalencia de este microorganismo en la periodontitis crónica depende mucho de la técnica de diagnóstico usada (19). Igualmente, *F. nucleatum* fue detectado en un solo paciente, resultado que coincide con el estudio de Nogueira y col. (28), mas no con los estudios reportados por Ali y col. (17,18,19), quienes han detectado este microorganismo tanto en medios de cultivos, como por técnicas de ADN en elevadas proporciones. Debido a que ambos microorganismos, *Bacteroides* sp. y *F. nucleatum*, se caracterizan por ser extremadamente exigentes y de difícil crecimiento, la falta de recuperación de estos periodontopatógenos en el presente trabajo podría deberse, a la pérdida de la viabilidad durante la toma de la muestra o el cultivo de la misma, al medio de transporte empleado y/o a la dificultad de visualizar las colonias en los medios de cultivos primarios. Por tales razones, se recomienda para la recuperación de estos microorganismos en futuros trabajos, cuidar estrictamente las condiciones de toma, transporte y cultivo de las muestras, así como también, estudiar un mayor número de pacientes probando otros medios de cultivos o técnicas moleculares más sensibles.

Si bien es cierto que, mucha de la información obtenida acerca de la microbiota de la periodontitis ha emergido de estudios realizados en países desarrollados (3,15,16,26), investigaciones realizadas en otros países han indicado diferencias cualitativas y cuantitativas cuando se compara con la comúnmente percibida (17,18,19). Estas variaciones observadas pueden ser debido a los diferentes patrones clínicos de periodontitis, al número de pacientes, sitios y/o muestras estudiadas o por los métodos de diagnósticos empleados en cada estudio.

Varios estudios reportan que, existen una serie de factores de riesgo, los cuales pueden predisponer a los individuos a desarrollar periodontitis desde edades muy tempranas, tales como sexo, edad, hábito de fumar, inadecuada higiene bucal, nutrición, estrés, ingesta de ciertos medicamentos, y el nivel socioeconómico de los individuos (8,9,10).

En cuanto al sexo, algunos autores reportan que el sexo no influye en la aparición de la periodontitis crónica. Sin embargo, Genco (1996), refiere que la enfermedad es más frecuente en hombres que en mujeres a edades comparables (9). Tal situación puede deberse a que los hombres muestran una escasa higiene bucal, en comparación con las mujeres; pero aún

cuando se corrigen los hábitos de higiene, se iguala el nivel socioeconómico y la edad de los individuos en los estudios, el sexo masculino sigue asociándose con enfermedad periodontal severa. Umeda y col. (1998), señalan que la alta prevalencia de *P. intermedia* y *P. nigrescens*, encontrada en el sexo masculino en su estudio, podría ser una posible explicación de las diferencias observadas en la severidad de la periodontitis con relación al sexo (10); resultados que no concuerdan con los de Schenkein y col. (1993), quienes reportaron no encontrar diferencia en la microbiota subgingival de hombres y mujeres en varios grupos étnicos (29). Sin embargo, algunos estudios indican que en el sexo femenino, se puede presentar una exagerada inflamación en el tejido durante los periodos de cambios hormonales, inducidos por el incremento de estrógenos y progesterona circulantes; al parecer niveles de hormonas femeninas estimulan el crecimiento de ciertos periodontopatógenos en esta enfermedad (8,30), lo que podría explicar en este estudio, la presencia de un mayor número de pacientes del sexo femenino en los cuales se encontró mayor frecuencia de detección de Bacilos Anaerobios Gram Negativos.

En relación con la edad, varios autores coinciden en señalar que la periodontitis crónica, afecta a individuos de diferentes edades, la cual puede iniciarse en el adulto joven y progresa durante toda la vida, pero en general es clínicamente significativa a partir de los 35 años (1,7,23,30). Estudios de prevalencia y epidemiológicos de la periodontitis crónica, evidencian más enfermedad en grupos de mayor edad cuando son comparados con los grupos más jóvenes. Genco (1996), refiere que ello se debe al grado de destrucción activa de los tejidos durante la vida más que a una edad relativa, factor intrínseco o anomalía que afecte la susceptibilidad periodontal; por lo que manifiesta, que la edad, no es un factor de riesgo, por lo menos hasta los 70 o 75 años (9). Por su parte, Gjermo (2000), señala que hay evidencias de que la tasa de destrucción periodontal se incrementa en individuos a partir de los 30-35 hasta 55-60 años aproximadamente y luego se estabiliza (31). Esta asociación puede deberse, a la destrucción del tejido periodontal o a los cambios ambientales acumulados durante la enfermedad, a la ocurrencia de diabetes, enfermedad cardiovascular u otras enfermedades frecuente en personas mayores, a la administración de drogas que pueden modificar la respuesta inmune en individuos de edad avanzada y, a la capacidad del hospedero de desarrollar una respuesta contra patógenos periodontales (31). En este estudio, el mayor porcentaje de pacientes con periodontitis crónica estuvo representado por adultos mayores de 30 años de edad, principalmente entre 40 y 49 años, dichos resultados concuerdan con los reportes, que señalan a la edad como un factor de riesgo que favorece el desarrollo de la periodontitis; a medida que se incrementa la edad, aumenta el número de individuos afectados y la severidad de la enfermedad (2,10,23). Por otra parte, Umeda y col. (1998), reportan que la asociación de la edad con la periodontitis crónica, posiblemente sea parte de la acumulación de bacterias, lo cual favorece la prevalencia de ciertos patógenos periodontales, como *P. gingivalis* (10). Tanaka y col. (2002), demostraron la frecuencia de especies de *Prevotella* y *Porphyromonas* en placa subgingival de pacientes con periodontitis, de diferentes edades, utilizando anticuerpos monoclonales, *P. intermedia* y *P. nigrescens*, se encontraron en una alta frecuencia en individuos entre 20 y 29 años, *P. gingivalis*, en individuos entre 30 y 49 años, junto con *P. intermedia*, y en una baja frecuencia se encontró *P. melaninogenica*, en todos los grupos etáreos. Ellos confirman que, la enfermedad periodontal esta asociada con la edad y con la presencia de patógenos periodontales (23). Posiblemente los resultados de este estudio tengan esta misma asociación, puesto que *P. intermedia* se aisló con frecuencia en pacientes con 20 años o más, *P. melaninogenica* y *P. loeschei* con baja frecuencia en pacientes entre 30-49 años y *P. gingivalis*, en pacientes mayores de 30 años.

Otros factores que favorecen a la iniciación temprana de la enfermedad lo constituyen algunas enfermedades sistémicas, tales como, Diabetes Mellitus, trastornos de la función de los neutrófilos, estados de inmunosupresión como SIDA, leucemias, entre otras (8,9,11,30). En este estudio se encontró que la mayoría de los pacientes no padecía ninguna enfermedad predisponente asociada a la periodontitis crónica, sólo uno (3,33%) afirmó padecer de Diabetes Mellitus. Sin embargo, un estudio realizado por García Arocha y col. (1998), demostraron en una muestra de la población venezolana, que la manifestación bucal más frecuente en pacientes diabéticos es la periodontitis (32), lo cual coincide con otras investigaciones, que demuestran que los pacientes diabéticos son más susceptibles a presentar periodontitis que en sujetos sanos (9,33,34). Se ha establecido que la Diabetes Mellitus, enfermedad metabólica caracterizada por la mala utilización de la glucosa que ocasiona una hiperglicemia en el organismo, constituye un factor de riesgo importante en la progresión de la periodontitis, ya que estos pacientes presentan formación de sacos periodontales más profundos, pérdida de la inserción periodontal más rápida y pueden desarrollar abscesos periodontales (8,9,34). Al parecer los pacientes con un control deficiente de la diabetes son de alto riesgo para desarrollar periodontitis crónica y podrían sufrir complicaciones renales y cardiovasculares (35). En el presente estudio, otros factores de riesgo que pueden predisponer a dicha enfermedad independientemente a las condiciones clínicas del paciente tales como pocas visitas al odontólogo y escasa higiene bucal, pudieron haber influido para que los pacientes desarrollaran periodontitis, lo cual ha sido demostrado en otras poblaciones, donde no se practica una adecuada higiene bucal (8,10,11,18), condición frecuente en los estratos socioeconómicos de los pacientes que acuden a consulta en la Facultad de Odontología.

Según varios autores, los parámetros clínicos como sangramiento, supuración, profundidad del saco periodontal, movilidad dental y pérdida ósea; signos que permiten el diagnóstico de la periodontitis crónica y a su vez proveen información sobre la futura progresión de la enfermedad, están asociados con la presencia de patógenos periodontales (18,22,28,36). Los resultados en este estudio, posiblemente tengan esta misma relación al encontrarse frecuentemente *P. intermedia* en pacientes con sacos periodontales con una profundidad entre 4-6mm, *P. gingivalis* en sacos mayores de 6 mm, *P. intermedia* y *P. loeschei* en sacos entre 4-5mm. *P. gingivalis*, *F. nucleatum* y *Bacteroides* sp. son frecuentes en sacos profundos y podrían estar involucrados en la progresión de la enfermedad. Cabe destacar, un estudio realizado recientemente por Mombelli y col. (2000), en el cual señalan que, si después de aplicar la terapia periodontal mecánica a los pacientes con periodontitis crónica continúan sangrando, es de esperar un gran número de sitios positivos para *P. intermedia* y *P. nigrescens*, y si persisten sacos periodontales profundos, es de esperar la presencia de pruebas positivas para *P. gingivalis* (37). En lo que respecta a este punto, es importante considerar a este grupo de periodontopatógenos como posibles indicadores claves en las periodontitis

refractarias, así como también, a la hora de elegir e instaurar un tratamiento antimicrobiano.

Tomando en cuenta lo anteriormente expuesto, se puede inferir que la microbiota periodontal es un sistema ecológico complejo. Ciertamente, es posible que los valores de una especie en particular puedan encontrarse altos como consecuencia de los cambios ambientales causados por la enfermedad y podrían no ser necesariamente un agente causal. Es por ello que los estudios de asociación entre bacterias son necesarios en la identificación de los patógenos en la periodontitis crónica.

En conclusión, los microorganismos detectados en este estudio: *P. intermedia* (36,66%), *P. melaninogenica* (6,66%), *P. loescheii* (16,66%), *P. gingivalis* (30,00%), *F. nucleatum* (3,33%) y *Bacteriodes* sp. (3,33%), coinciden con otros reportes en cuanto a que estas bacterias son las más frecuentes en este proceso infeccioso y han sido identificadas en sacos periodontales a través de técnicas de cultivos convencionales, no así son comparables con los estudios que han utilizado técnicas moleculares, que evidencian una mayor frecuencia de estos microorganismos. Por otra parte, los resultados de este estudio coinciden con otros, en el hecho de que *P. gingivalis* y *P. intermedia*, están asociados comúnmente con periodontitis crónica. La prevalencia de éstos y otros importantes patógenos potenciales de esta enfermedad, varía según la bibliografía, como ya se ha comentado, pudiendo depender esto de las características de los sitios seleccionados así como también del método de detección utilizado. Es importante señalar, que muchas de las investigaciones recopiladas en sujetos con periodontitis crónica reportan frecuentemente especies de Bacilos Anaerobios Gram Negativos en proporciones significativas, independientemente de la técnica usada para la identificación de los microorganismos, no obstante, estas especies no son los únicos periodontopatógenos en todos los casos.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carranza, F.; Newman, M.: Periodontología Clínica. 8va Edición. Ediciones Mc Graw Hill Interamericana. Mexico. 1997.
2. Fleming, T. 1999: Periodontitis. Ann. Periodontol. 4(1): 32-37.
3. Slots, J. 1979: Subgingival microflora and periodontal disease. J. Clin. Periodontol. 6: 35-82.
4. Dahlén, G. 1993: Role of Suspected Periodontopathogens in Microbiological Monitoring of Periodontitis. Adv. Dent. Res. 7(2): 63- 164.
5. Listgarten, M., Wong, M., Lai, C. 1995: Detección de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Bacteroides forsythus* in positive Patient Population. J. Periodontol. 66: 58-164.
6. Lindhe, J. 2000: Is Periodontitis a unique disease entity. J. Clin. Periodontol. Suppl. 1. 27: 11
7. Marsh, P.; Martin, M. 2000: Oral Microbiology. Fourth edition. Wright. England.
8. Botero, L.; Alvear, F.; Echeverri, H. 1995: Factores de riesgo en enfermedad periodontal. Rev. Fac. Odont. Univ. Ant. 7 (1): 51-59.
9. Genco, R. 1996: Current View of Risk Factors for Periodontal Diseases. J. Periodontol. 67 (10): 1041- 1049.
10. Umeda, M.; Chen, C.; Bakker, I.; Contreras, A.; Morrison, J.; Slots, J. 1998: Risk Indicators for Harboring Periodontal Pathogens. J. Periodontol. 69: 1111-1118.
11. Wolff, L.; Dahlen, G. Aeppli, D. 1994: Bacteria as Risk Markers for Periodontitis. J. Periodontol. 64: 498 - 510.
12. Sakamoto, M., Suzuki, M., Umeda, M., Ishikawa, L., Benno, Y. 2002. Reclassification of *Bacteroides forsythus* as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. Int J Syst Evol Microbiol. 52: 841-849.
13. Timmerman, M.; Van der Weijden, G.; Arief, E.; Armand, S.; Abbas, F.; Winkel, E.; Van Winkelhoff, A.; Van der Velden, U. 2001. Untreated periodontal disease in Indonesian Adolescents. Subgingival microbiota in relation to experienced progression of periodontitis. J.

- Clin Periodontol. 28: 617-627.
14. Moore, C.; Holdeman, L.; Cato, E.; Smibert, R.; Burmeister, J.; Ranney, R. 1983: Bacteriology of moderate (chronic) periodontitis in mature adult humans. *Infect. Immun* 42: 510-515.
  15. Dzink, J.; Tanner, A.; Haffajee, A.; Socransky, S. 1985. Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. *J. Clin. Periodontology* 12: 648-659.
  16. Haffajee, A.; Socransky, S. 1994: Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology* 2000. 5: 78-111.
  17. Ali, R.; Bakken, V.; Nilsen, R.; Skaug, N. 1994: Comparative Detection Frequency of 6 Putative Periodontal Pathogens in Sudanese and Norwegian Adult Periodontitis Patients. *J. Periodontol.* 65: 1046 - 1052.
  18. Ali, R.; Velcescu, C.; Jivanescu, M.; Lofthus, B; Skaug, N. 1996: Prevalence of 6 putative periodontal pathogens in subgingival plaque samples from Romanian adult periodontitis patients. *J. Clin Periodontol.* 23: 133-139.
  19. Ali, R.; Johnnessen, A., Dahlen, G.; Socransky, S.; Skaug, N. 1997: Comparison of the subgingival microbiota of periodontally healthy and diseased adults in Northern Cameroon. *J. Clin Periodontol.* 24: 830-835.
  20. Gabaldon y Nieves, B. 1992: Diagnóstico de Infecciones por Bacterias Anaerobias. Universidad de Los Andes. Facultad de Farmacia, Mérida.
  21. Holt, J.; Krieg, N.; Sneath, P.; Staley, J. 1994: *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition. Williams & Wilkins. Baltimore, USA.
  22. Kamma, J.; Nakou, M.; Manti, F. 1994: Microbiota of Rapidly Progressive Periodontitis Lesions in Association With Clinical Parameters. *J. Periodontol.* 65: 1073 - 1078.
  23. Tanaka, S.; Murakami, Y.; Ogiwara, T.; Shoji, M.; Seto, K.; Nagasaki, M.; Fujisawa, S. 2002: Frequency of Reactivity for *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella* spp in Supra and Subgingival Plaques and Periodontal Clinical Parameters According to Subject Age. *J. Periodontol.* 73: 877-885.
  24. Slots, J.; Lisgarten, M. 1988: *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. *J. Clin Periodontol.* 15: 85-93.
  25. Liebana, J., Castillo, A., Alvarez, M. Enfermedades periodontales: Consideraciones microbiológicas. 2004. *Med Oral Patol Cir Bucal.* 9.Suppl: S75-91.
  26. Grenier, D.; Turgeron, J. 1994: Occurrence and identity of proteolytic bacteria in adult periodontitis. *J. Periodontol. Res.* 29: 365 - 370.
  27. Tanner, A.; Maiden, M.; Zambon, J.; Thoren, G.; Kent, R. 1998: Rapid chair side DNA probe assay of *Bacteroides forsythus* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodont. Res.* 33: 105-117.
  28. Noriega, M.; Fernández, C.; Furman, C.; Chiappe, M.; Marcantoni, H.; Bianchini. 2001: Estudio clínico y microbiológico de la enfermedad periodontal en el adulto. Trabajo de Ascenso. Universidad Nacional de Buenos Aires.
  29. Schenkein, H; Burmeister, J.; Koertge, T.; Brooks, C.; Best, A.; Moore, L.; Moore, W. 1993: The influence of race and gender on Periodontal Microflora. *J. Periodontol.* 64(4): 292-296.
  30. Kinane, D. 1999: Periodontitis Modified by Systemic Factors. *Ann. Periodontol* 4(1): 54-63.

31. Gjermo, P. 2000: The impact of age. *J.Clin.Periodontol. Suppl.1.27:9.*
32. Garcia, C.; Perrone, M.; Alvarez, M.; Schemell, M. 1998: Manifestaciones bucales de la Diabetes Mellitus en una muestra de la población venezolana. *AOV.36(2): 85-91.*
33. Cianciola, L.; Park, B.; Bruck, E.; Mosocic, L.; Genco, R. 1982: Prevalencia of Periodontal Diseases in insulin dependent diabetes. *J. Am.Dent. Assoc.104: 653-660.*
34. Bridges, R.; Anderson, J.; Saxe, S., Gregory, S.; Brides, S. 1996: Periodontal status of Diabetic and Non Diabetic Men: Effects of Smoking, Glycemic Control, and Socioeconomic Factors. *J. Periodontol. 67 (11): 1185 - 1192.*
35. Genco, R. 2000: Is periodontitis a risk for general health. *J.Clin.Periodontol. Suppl.1.27: 9.*
36. Monbelli, A.; Mc Nabb, H.; Lang, N. 1991.a: Black- pigmenting Gram-negative bacteria in Periodontal Disease. I Topografic distribution in the human dentition *J. Periodont. Res.26:301-307.*
37. Monbelli, A; Schmid, B; Rutar, A; Lang, N. 2000: Persistence Patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens* and *Actinobacillus actinomycetemscomitans* After Mechanical Therapy of Periodontal Disease. *J. Periodontol. 7(1): 14-21.*