

Asociación de *Prevotella intermedia/nigrescens*, bacilos entéricos gram-negativos y parámetros clínicos en periodontitis crónica¹

Association of *Prevotella intermedia/nigrescens*, gram-negative enteric rods and clinical parameters in chronic periodontitis

ARDILA MEDINA CM*
ALZATE VEGA J**
GUZMÁN ZULUAGA IC***

Ardila Medina CM, Alzate Vega J, Guzmán Zuluaga IC. Asociación de *Prevotella intermedia/nigrescens*, bacilos entéricos gram-negativos y parámetros clínicos en periodontitis crónica. Av Periodon Implantol. 2013; 25, 3: 165-170.

RESUMEN

Introducción: La relación entre *Prevotella intermedia/nigrescens* y bacilos entéricos gram-negativos presentes en placa subgingival de pacientes con periodontitis ha recibido muy poca atención en la literatura.

Objetivo: Investigar la asociación de *Prevotella intermedia/nigrescens* y bacilos entéricos gram-negativos con parámetros clínicos de pacientes con periodontitis crónica.

Materiales y métodos: Se estudió la prevalencia de *P. intermedia/nigrescens* y de bacilos entéricos gram-negativos en 76 pacientes con periodontitis crónica. Se utilizaron las pruebas de chi cuadrado y Mann-Whitney para evaluar las diferencias clínicas de los pacientes con presencia y ausencia de los microorganismos estudiados. También se usó la prueba no paramétrica de Spearman para determinar la correlación entre *P. intermedia/nigrescens* y bacilos entéricos gram-negativos con las variables clínicas ($p < 0,05$).

Resultados y conclusiones: El 46,7% y 26,31% de los pacientes presentaron *P. intermedia/nigrescens* y bacilos entéricos gram-negativos, respectivamente. En el 22% de los sujetos se observaron simultáneamente los microorganismos estudiados. Se encontró una correlación positiva estadísticamente significativa entre *P. intermedia/nigrescens* y bacilos entéricos gram-negativos ($r = 0,286$, $p < 0,0001$). La presencia de los microorganismos estuvo positivamente correlacionada con profundidad de sondaje (PS), nivel de inserción clínica y presencia de sangrado ($r = 0,362$; $0,358$; $0,079$; $p < 0,0001$, respectivamente). Igualmente, los pacientes que presentaron *P. intermedia/nigrescens* y bacilos entéricos gram-negativos mostraron un promedio de PS y de pérdida de inserción clínica significativamente mayor. Los parámetros clínicos adversos observados en presencia de estos microorganismos podrían tener implicaciones en la patogénesis de la periodontitis y un posible impacto en los resultados de la terapia periodontal.

PALABRAS CLAVE: Periodontitis crónica, *Prevotella intermedia/nigrescens*, bacilos entéricos gram-negativos.

SUMMARY

Introduction: The relationships between *Prevotella intermedia/nigrescens* and gram-negative enteric rods in subgingival plaque of patients with periodontitis has received little attention in the literature.

¹ Investigación financiada por la Facultad Nacional de Salud Pública y el Grupo de Epidemiología de la Universidad de Antioquia.

* Profesor Asociado. Facultad de Odontología. Universidad de Antioquia. Grupo de Epidemiología. Universidad de Antioquia.

** Odontóloga. Universidad de Antioquia.

*** Periodoncista. Universidad de Chile. Profesora Asistente. Facultad de Odontología. Universidad de Antioquia.

Objective: The objective of this study was to explore the relationships between *P. intermedia/nigrescens*, gram-negative enteric rods and clinical parameters of patients with chronic periodontitis.

Materials and Methods: Clinical parameters and occurrence of *P. intermedia/nigrescens* and gram-negative enteric rods were examined in 76 patients with chronic periodontitis. Chi-square and Mann-Whitney tests were used to determine differences in clinical variables versus the presence or absence of both microorganisms. Correlations among microorganisms studied and clinical data were determined using Spearman rank correlation coefficient.

Results and conclusions: *P. intermedia/nigrescens* and gram-negative enteric rods were detected in 46.7% and 26.31% individuals, respectively. A total of 22% of patients harbored the microorganisms studied. There were significantly positive correlations between *P. intermedia/nigrescens* and gram-negative enteric rods ($r=0.286$, $p<0.0001$). The microorganisms studied were significant and positively correlated with probing depth (PD), clinical attachment level and bleeding on probing ($r=0.362$; 0.358 ; 0.079 ; $p<0.0001$). The mean PD (mm) and clinical attachment loss of the sampled sites was significantly higher in patients with presence of *P. intermedia/nigrescens* and gram-negative enteric rods. The adverse clinical parameters observed in presence of these microorganisms could have implications in the pathogenesis of periodontal disease and a possible impact on outcomes after treatment.

KEY WORDS: Chronic periodontitis, *Prevotella intermedia/nigrescens*, gram-negative enteric rods.

Fecha de recepción: 25 de febrero de 2010.

Aceptado para publicación: 12 de mayo de 2010.

INTRODUCCIÓN

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica que comienza con una infección microbiana seguida por una destrucción de los tejidos blandos mediada por el huésped y causada por la hiperactividad de los leucocitos y la generación de citoquinas, eicosanoides y matriz metaloproteínasa, que a su vez producen destrucción significativa del tejido conectivo y hueso de soporte (1). La infección periodontal es de etiología microbiana mixta. Microorganismos como *Prevotella intermedia* y *Prevotella nigrescens* son periodontopatógenos que juegan un papel fundamental en el establecimiento y desarrollo de enfermedades periodontales polimicrobianas (2). Además, se caracterizan por su capacidad para adherirse e invadir las células epiteliales gingivales, fibroblastos y células endoteliales (3). Por otra parte, se desconoce la función que cumplen los bacilos entéricos gram-negativos en la patogénesis de la enfermedad periodontal, pero algunos investigadores han sugerido que estos microorganismos pueden tener un impacto sobre el progreso y tratamiento de la enfermedad periodontal (4). Adicionalmente, son especies patógenas en el hombre que poseen características invasoras y toxigénicas que le permiten iniciar un proceso infeccioso (5).

Desde los sitios periodontales infectados, estos patógenos pueden entrar al torrente sanguíneo, induciendo septicemias en pacientes con leucemia aguda (6). Los bacilos entéricos gram-negativos persisten con frecuencia después de terapias mecánicas y quirúrgicas (7), presentando además resistencia in vitro a la mayoría de antibióticos adjuntos usados para tratar la periodontitis (8-11).

La invasividad tisular que caracteriza tanto a *P. intermedia/nigrescens* como a bacilos entéricos gram-negativos puede ser una de las razones por las cuales se documenta mala respuesta al tratamiento mecánico convencional de las infecciones periodontales (12).

No se conocen investigaciones que estudien la relación entre *P. intermedia/nigrescens* y bacilos entéricos gram-negativos. Diferencias geográficas relacionadas con la presencia de estos microorganismos podrían tener impacto sobre los parámetros clínicos periodontales y sobre la respuesta al tratamiento, permitiendo de esta forma, el establecimiento de estrategias terapéuticas específicas. Así, el objetivo del presente estudio es evaluar la relación entre *P. intermedia/nigrescens* y bacilos entéricos gram-negativos con parámetros periodontales de sujetos con periodontitis crónica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos

Se invitaron a participar en este estudio 76 sujetos sistémicamente sanos (45 mujeres y 31 hombres) que asistieron a las clínicas odontológicas de la Facultad de Odontología de la Universidad de Antioquía entre Octubre de 2008 y Marzo de 2009. Cada participante firmó un consentimiento informado. El Comité de Ética de la Sede de Investigación Universitaria de la Universidad de Antioquía aprobó el diseño del estudio teniendo en cuenta la Declaración de Helsinki sobre experimentación que involucra seres humanos. Se consideraron candidatos para participar en esta investigación pacientes con diagnóstico de periodontitis crónica. Los criterios de exclusión fueron embarazo, lactancia, presencia de diabetes o cualquier enfermedad sistémica que alterara el curso de la enfermedad periodontal, terapia periodontal en el último año, y utilización de antimicrobianos o antiinflamatorios no esteroides en los seis meses previos al examen clínico y a la toma de muestras microbiológicas.

Evaluación clínica

A cada paciente se le realizó una historia clínica, además de un examen clínico y radiográfico completo. Uno de los autores (CA) realizó todos los exámenes clínicos. La profundidad de sondaje (PS) y el nivel de inserción clínica (NIC) se midieron en seis sitios (mesiobucal, bucal, distobucal, distolingual, lingual y mesiolingual) usando una sonda periodontal calibrada (UNC-15, Hu-Friedy, Chicago, IL). El diagnóstico de periodontitis crónica se realizó según los criterios recomendados por la Academia Americana de Periodoncia (AAP) (13).

Muestreo microbiológico

Se tomaron muestras microbiológicas de los pacientes en sitios con una profundidad de sondaje ≥ 5 mm. Para el muestreo se seleccionaron las seis bolsas periodontales más profundas. Después de aislar la zona con algodón y remover la placa supragingival con cureta, se insertaron conos de papel estéril en cada bolsa periodontal durante 20 segundos. Las muestras de cada paciente se depositaron en 2 mL de medio de transporte (Viability Medium Göteborg Anaerobically III: VMGA III) (14) y se llevaron al laboratorio de microbiología de la Facultad de Odontología de la Uni-

versidad de Antioquía para procesarlas dentro de las dos horas siguientes. Las muestras fueron analizadas utilizando técnicas de cultivo para la presencia de periodontopatógenos de acuerdo a Slots (15). Brevemente, para la identificación de *Prevotella intermedia/nigrescens*, se realizaron cinco diluciones en base 10 a partir del medio VMGA III, se sembraron 100 μ L de las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} en agar brucella sangre enriquecido con hemina y menadiona (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD) y se llevaron a incubación a 36°C en atmósfera de anaerobiosis (Anaerogen, Oxoid, Hampshire, England) durante siete días. Se realizaron además pruebas bioquímicas y enzimáticas confirmatorias para los microorganismos estudiados utilizando los sistemas de identificación comercial Rapid ANA II (Remel™, Apogent) y API ZYM (Biomerieux® Francia).

Para el aislamiento de bacilos entéricos gram-negativos se utilizó agar MacConkey para incubarse luego a una atmósfera aeróbica a 37°C por 24-48 horas. Sobre las colonias que crecieron en agar MacConkey se empleó tinción de gram para verificación.

Después de la incubación se calculó el número total de unidades formadoras de colonias por mililitro de cada muestra a partir de los medios de cultivo. El porcentaje relativo de recuperación de cada microorganismo se calculó a partir del total de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml).

Análisis estadístico

Para describir las variables relacionadas con los sujetos y los dientes se realizó un análisis exploratorio sobre la distribución de los índices PS y NIC, utilizando medidas de tendencia central y de dispersión. Se obtuvieron frecuencias y proporciones de cada uno de los microorganismos estudiados. Para las variables placa bacteriana, sangrado al sondaje, y supuración se calcularon frecuencias y proporciones. Se utilizó la prueba de chi-cuadrado para evaluar la diferencia entre presencia de sangrado versus la presencia o ausencia de *P. intermedia/nigrescens* y bacilos entéricos gram-negativos. Se usó la prueba de Mann-Whitney para determinar las diferencias en la PS y el NIC en presencia o ausencia de *P. intermedia/nigrescens* y bacilos entéricos gram-negativos. Se utilizó la prueba no paramétrica de Spearman para determinar la correlación entre las variables clínicas con la presencia de *P. intermedia/nigrescens* y bacilos entéricos gram-negativos ($p < 0,05$). Se tuvieron en cuenta para el aná-

lisis solamente los sitios que presentaron simultáneamente profundidad de sondaje y nivel de inserción clínica \geq a 4 mm. Se usó un programa estadístico para todos los análisis (SPSS, versión 15, Chicago, IL).

RESULTADOS

La tabla 1 presenta las características clínicas de los pacientes evaluados. Se estudiaron 31 hombres (41%) y 45 mujeres (59%) con periodontitis crónica (edad: $46 \pm 8,08$ años), de los cuales el 22% eran fumadores.

TABLA 1.- PARÁMETROS CLÍNICOS DE 76 PACIENTES CON PERIODONTITIS CRÓNICA	
Parámetro clínico	Promedio DE
PS (mm \pm DE)	5,14 \pm 1,33
NIC (mm \pm DE)	5,61 \pm 1,83
% S (% \pm DE)	70 \pm 16
% IP (% \pm DE)	56 \pm 19
% SUP (% \pm DE)	4,3 \pm 3,1

PS: profundidad de sondaje; NIC: nivel de inserción clínica; S: porcentaje (%) de sitios con sangrado; IP porcentaje (%) de sitios con placa; SUP: porcentaje (%) de sitios con supuración; mm: milímetros; DE: desviación estándar.

El 46,7% y 26,31% de los 76 pacientes evaluados presentaron *P. intermedia/nigrescens* y bacilos entéricos gram-negativos, respectivamente. En el 22% de los sujetos se observaron simultáneamente los microorganismos estudiados. La presencia de *P. intermedia/nigrescens* en las bolsas periodontales estuvieron positiva y significativamente correlacionadas con bacilos entéricos gram-negativos ($r=0,286$, $p<0,0001$). La presencia de los microorganismos estuvo positivamente correlacionada PS, NIC y presencia de sangrado (Tabla 2). Igualmente, los pacientes que presentaron *P. intermedia/nigrescens* y bacilos entéricos gram-negativos mostraron un promedio de PS y de pérdida de inserción clínica significativamente mayor (Tabla 3). La presencia de sitios con sangrado al sondaje fue mayor en los pacientes con presencia de *P. intermedia/nigrescens* y bacilos entéricos gram-negativos (Tabla 3).

DISCUSIÓN

En la presente investigación se estudió la asociación entre *P. intermedia/nigrescens* y bacilos entéricos gram-negativos con parámetros clínicos periodontales de sujetos con periodontitis crónica. La información proporcionada por el presente estudio puede tener implicaciones terapéuticas relevantes para el tratamiento de infecciones no orales causadas por patógenos orales. La diseminación de los patógenos periodontales a otros sitios del cuerpo puede ocurrir con frecuencia y causar enfermedades serias (16). Por estas razones, es pertinente estudiar la microbiota subgingival en una región geográfica particular, y así iden-

TABLA 2.- CORRELACIONES ENTRE <i>P. INTERMEDIA/NIGRESCENS</i> Y LOS BACILOS ENTÉRICOS GRAM-NEGATIVOS CON PROFUNDIDAD DE SONDAJE (PS), NIVEL DE INSERCIÓN CLÍNICA (NIC) Y PORCENTAJES DE SITIOS CON SANGRADO (S)		
Parámetro clínico	Presencia entéricos y <i>P. intermedia/nigrescens</i>	Estadístico
PS (mm; promedio)	$r= 0,362$	Spearman $p<0,0001$
NIC (mm; promedio)	$r= 0,358$	Spearman $p<0,0001$
S (% sitios)	$r= 0,079$	Spearman $p<0,0001$

TABLE 3.- COMPARACIÓN DE LOS DATOS CLÍNICOS

Parámetro	Presencia entéricos <i>P. Intermedia/nigrescens</i>	Ausencia entéricos <i>P. Intermedia/nigrescens</i>	Estadístico
PS (mm±DE)	5,47±1,4	5,03±1,3	Mann Whitney $p < 0,001$
NIC (mm±DE)	6,23±2	5,48±1,8	Mann Whitney $p < 0,001$
%S (%±DE)	77±14	62±16	χ^2 $p < 0,001$

PS: profundidad de sondaje; NIC: nivel de inserción clínica; S: porcentaje de sitios con sangrado; mm: milímetros; DE: desviación estándar.

tificar su posible impacto en los resultados después del tratamiento periodontal (17).

En este estudio se identificaron 20 (26.31%) pacientes con bacilos entéricos gram-negativos. En Latinoamérica la frecuencia de entéricos varía según la población estudiada, alcanzando una prevalencia de 17.6% en Chile (17) y 67% en Santo Domingo (4). Igualmente, en Brasil (8) y Colombia (9, 10), algunos investigadores han encontrado frecuencias similares a las observadas en el presente estudio. Los entéricos subgingivales persisten con frecuencia después de terapia periodontal mecánica y quirúrgica (4), y han mostrado resistencia in vitro a la mayoría de antimicrobianos usados como terapia adjunta al raspado y alisado radicular (7-12). Se requieren más estudios que permitan clarificar el efecto de los entéricos sobre los parámetros clínicos periodontales y sobre la respuesta al tratamiento.

En la presente investigación se observó *P. intermedia/nigrescens* en el 46.7% de los pacientes. Estos valores son similares a los observados por otros investigadores (9). Se ha propuesto que la invasión tisular realizada por *P. intermedia/nigrescens*, juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad periodontal (3). Además, su presencia se ha asociado a infecciones nasofaríngeas e intraabdominales (18). Futuros estudios deberán dilucidar la influencia de las múltiples especies subgingivales sobre la respuesta de los pacientes a la terapia periodontal.

En este estudio, se observó una correlación positiva altamente significativa entre *P. intermedia/nigrescens* y entéricos. Herrera y colaboradores (17), encontra-

ron en un estudio realizado en Suramérica, que la mitad de los pacientes en los que se aisló *P. intermedia/nigrescens*, se encontraron también bacilos entéricos. Resultados similares fueron observados en la presente investigación. Sin embargo, se requieren más investigaciones que estudien las correlaciones entre estos microorganismos.

Los parámetros clínicos de los pacientes estudiados en esta investigación, estuvieron incrementados significativamente en presencia de *P. intermedia/nigrescens* y entéricos. Esta evidencia indica que estos microorganismos están estrechamente asociados con la patogénesis de la periodontitis y podrían estar involucrados en el proceso de la destrucción periodontal. Diferencias relacionadas con la respuesta del huésped, hábitos de higiene oral, composición microbiana y acceso a la atención odontológica pueden ayudar a explicar estas correlaciones en la expresión clínica de la periodontitis de la población estudiada (19). Por esta razón es fundamental conocer la composición de la microflora subgingival específica de cada región geográfica para determinar el protocolo terapéutico apropiado. Además, se requieren futuros estudios que clarifiquen el efecto que tienen *P. intermedia/nigrescens* y los bacilos entéricos gram-negativos sobre los parámetros clínicos y la respuesta al tratamiento periodontal.

CONCLUSIONES

La presente investigación confirma que la presencia de *P. intermedia/nigrescens* y los bacilos entéricos gram-negativos está relacionada con condiciones pe-

riodontales adversas. Estos resultados deben ser tenidos en cuenta en los protocolos de tratamiento de los pacientes que presenten estos microorganismos en placa subgingival con el fin de seleccionar la terapia periodontal adecuada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Friedewald VE, Kornman KS, Beck JD, Genco R, Goldfine A, Libby P, et al. The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology editors' consensus: periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease. *J Periodontol* 2009;80:1021-32.
2. Yamanaka T, Furukawa T, Matsumoto C, Yamane K, Sugimori C, Nambu T, et al. Gene expression profile and pathogenicity of bifilm-forming *Prevotella Intermedia* strain 17. *BMC Microbiol* 2009;16:9-11.
3. Gmür R, Thurnheer T. Direct quantitative differentiation between *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in clinical specimens. *Microbiology* 2002;148:1379-87.
4. Slots J, Rams TE, Feik D, Taveras HD, Gillespie GM. Subgingival microflora of advanced periodontitis in the Dominican Republic. *J Periodontol* 1991;62:543-7.
5. Lindberg AA. Vaccination against enteric pathogens: from science to vaccine trials. *Curr Opin Microbiol* 1998;1:116-24.
6. Greenberg MS, Cohen SG, McKitick JC, Cassileth PA. The oral flora as a source of septicemia in patients with acute leukemia. *Oral Surg* 1982;53:32-6.
7. Slots J, Feik D, Rams TE. In vitro antimicrobial sensitivity of enteric rods and pseudomonads from advanced adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1990;5:298-301.
8. Barbosa FC, Mayer MP, Saba-Chujfi E, Cai S. Subgingival occurrence and antimicrobial susceptibility of enteric rods and pseudomonads from Brazilian periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16:306-10.
9. Botero JE, Contreras A, Lafaurie G, Jaramillo A, Betancourt M, Arce RM. Occurrence of periodontopathic and superinfecting bacteria in chronic and aggressive periodontitis subjects in a Colombian population. *J Periodontol* 2007;78:696-704.
10. Lafaurie GI, Contreras A, Barón A, Botero J, Mayorga I, Jaramillo A, et al. Demographic, clinical, and microbial

aspects of chronic and aggressive periodontitis in Colombia: a multicenter study. *J Periodontol* 2007;78:629-39.

11. Ardila CM, Fernández N, Guzmán I. Antimicrobial susceptibility of moxifloxacin against Gram-negative enteric rods from Colombian chronic periodontitis patients. *J Periodontol* 2010;81:292-9.
12. Walker C, Karpinia K. Rationale for use of antibiotics in periodontics. *J Periodontol* 2002;73:1188-96.
13. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;4:1-6.
14. Slots J. Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol* 1982;15:606-9.
15. Slots J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. *Oral Microbiol Immunol* 1986;1:48-55.
16. Offenbacher S, Elter JR, Lin D, Beck JD. Evidence for periodontitis as a tertiary vascular infection. *J Int Acad Periodontol*. 2005;7:39-48.
17. Herrera D, Contreras A, Gamonal J, Oteo A, Jaramillo A, Silva N, et al. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *J Clin Periodontol*. 2008;35:106-13.
18. Fukui K, Kato N, Kato H, Watanabe K, Tatematsu N. Incidence of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* Carriage among Family Members with Subclinical Periodontal Disease. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3141-45.
19. Wara-aswapati N, Pitiphat W, Chanchaimongkon L, Taweechaisupapong S, Boch JA, Ishikawa I. Red bacterial complex is associated with the severity of chronic periodontitis in a Thai population. *Oral Dis* 2009;15:354-9.
20. Torrungruang K, Bandhaya P, Likittanasombat K, Grittayaphong C. Relationship between the presence of certain bacterial pathogens and periodontal status of urban Thai adults. *J Periodontol* 2009;80:122-9.

CORRESPONDENCIA

Carlos M. Ardila Medina
 Calle 64, Nº 52-59
 Medellín, Colombia.
 e-mail: martinardila@gmail.com