

**Microorganismos inusuales en placa subgingival de pacientes con periodontitis crónica**

**Unusual microorganisms in subgingival plaque of patients with chronic periodontitis**

**Dr. Carlos Martín Ardila M; Dra. Isabel Cristina Guzmán Z**

Facultad de Odontología. Universidad de Antioquia. Colombia.

**RESUMEN**

**Fundamento:** en ambientes subgingivales de pacientes con periodontitis crónica se han encontrado microorganismos inusuales que incluyen bacilos entéricos gramnegativos y levaduras. En estos pacientes la terapia mecánica o antimicrobiana puede ser ineficiente para tratar o controlar la enfermedad periodontal. La característica que comparten los microorganismos inusuales es la de ser patógenos oportunistas, ya que aprovechan las condiciones de inmunodepresión para originar o agravar una enfermedad.

**Objetivo:** presentar la prevalencia de microorganismos inusuales en placa subgingival de pacientes con periodontitis crónica en una población colombiana.

**Método:** se evaluaron 76 pacientes sistémicamente sanos que asistieron a las clínicas odontológicas de la Facultad de Odontología de la Universidad de Antioquia. Las muestras subgingivales se procesaron mediante cultivo.

**Resultados:** se observaron bacilos entéricos gramnegativos en 20 (26.31 %) pacientes y levaduras en 10 (13.2 %).

**Conclusiones:** estos hallazgos tienen implicaciones terapéuticas importantes que deben tenerse en cuenta para el manejo de los pacientes con enfermedades periodontales.

**DeCS:** PERIODONTITIS CRÓNICA; BACILOS GRAMNEGATIVOS ANAEROBIOS FACULTATIVOS; LEVADURAS; ENFERMEDADES PERIODONTALES .

**ABSTRACT**

**Background:** subgingival environment of patients with chronic periodontitis have been found unusual microorganisms including *Gram-negative enteric bacilli* and yeasts. Mechanical or antimicrobial therapy in these patients may be inefficient to treat or to

control periodontal disease. The common feature unusual microorganisms share is to be opportunistic pathogens, taking advantage of immunosuppression conditions to cause or aggravate the disease.

**Objective:** to present the prevalence of unusual microorganisms in subgingival plaque of patients with chronic periodontitis in a Colombian population.

**Method:** 76 systemically healthy patients who were presented in the dental clinic at the Dental School of Antioquia University were evaluated. Subgingival samples were processed by cultivation.

**Results:** *enteric Gram-negative bacilli* in 20 patients and yeasts in 10 were observed.

**Conclusions:** these findings have important therapeutic implications that must be taken into account for patients management with periodontal diseases.

**DeCS:** CHRONIC PERIODONTITIS; GRAM-NEGATIVE FACULTATIVELY ANAEROBIC RODS; YEASTS; PERIODONTAL DISEASES

## INTRODUCCIÓN

Se ha documentado extensamente el papel de la microflora subgingival en la causa de la periodontitis crónica.<sup>1</sup> Diferentes estudios han observado similitudes en los periodontopatógenos, al encontrar que en los pacientes con periodontitis crónica están presentes y en forma conjunta la mayoría de los siguientes microorganismos: *Porphyromona gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus*, *Peptoestreptococo micros*, *Treponema denticola* y *Prevotella intermedia*.<sup>2, 3</sup> Sin embargo, algunas investigaciones demostraron que la frecuencia relativa de cada microorganismo varía entre poblaciones de diferentes orígenes geográficos, concluyendo que la prevalencia de patógenos periodontales específicos cambia entre individuos del mismo ambiente y entre distintas etnias y países.<sup>4- 6</sup>

Además de los ya mencionados, en los ambientes subgingivales de algunos pacientes con periodontitis crónica se han identificado microorganismos inusuales que incluyen bacilos entéricos gramnegativos y levaduras. No obstante, la frecuencia de este fenómeno también es diversa entre diferentes regiones del mundo.<sup>4- 7</sup> La característica que comparten los microorganismos inusuales es la de ser patógenos oportunistas, ya que se consideran parte de la microbiota normal en determinados sitios anatómicos, pero aprovechan las condiciones de inmunodepresión para originar o agravar una enfermedad. La prevalencia de los bacilos entéricos gramnegativos difiere alrededor del mundo con un rango que varía desde el 14 % en los Estados Unidos<sup>7</sup> hasta el 92 % en Sudán.<sup>5</sup> Estos microorganismos persisten con frecuencia después de la terapia mecánica o quirúrgica periodontal,<sup>8</sup> pues presentan además menos sensibilidad a la clorhexidina<sup>9</sup> y resistencia

in vitro a la mayoría de antibióticos que se emplean como terapia adjunta para tratar la periodontitis.<sup>6, 7, 11</sup> Poseen también diversos factores de virulencia que impide la unión de los anticuerpos a la bacteria y algunas enzimas líticas como las hemolisinas que tienen efecto sobre los eritrocitos y los leucocitos.<sup>12</sup>

En la cavidad bucal las levaduras colonizan lengua, paladar, mucosa oral y saliva.<sup>13</sup> Específicamente, la *Candida albicans* se ha encontrado en gran cantidad en bolsas periodontales (7.1 - 26.9 %) de pacientes con periodontitis crónica.<sup>9, 14</sup> Algunos estudios sugieren que la colonización subgingival por levaduras puede estar favorecida en sujetos con periodontitis crónica,<sup>15, 16</sup> sin embargo, poca importancia ha recibido el papel de las levaduras en esta clase de periodontitis a pesar del carácter polimicrobiano de la enfermedad periodontal.<sup>14- 17</sup>

El objetivo de este artículo es presentar la prevalencia de microorganismos inusuales en placa subgingival de pacientes con periodontitis crónica en una población Colombiana.

## **MÉTODOS**

Fueron seleccionados 76 pacientes con periodontitis crónica (sin ninguna otra enfermedad sistémica) que asistieron a las clínicas odontológicas de la Facultad de Odontología de la Universidad de Antioquia entre octubre de 2008 y marzo de 2009, y que cumplieron los criterios de clasificación.

Cada participante firmó un consentimiento informado. El comité de ética de la sede de investigación universitaria de la Universidad de Antioquia aprobó el diseño del estudio al tener en cuenta la declaración de Helsinki.

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**

Se confeccionó una historia clínica para cada paciente, se realizó un examen clínico y radiográfico completo. Todos los exámenes clínicos fueron realizados por un solo examinador.

Antes de iniciar el estudio se evaluó la reproducibilidad intra-examinador (en seis sujetos con al menos 20 dientes), se valoró cada uno de los índices, mediante sondaje y examen clínico de la mitad de la boca, en dos oportunidades en la misma semana. Los coeficientes de correlación intra-clase para el promedio de la profundidad de sondaje y el nivel de inserción clínica fueron 0.92 y 0.91, respectivamente. La profundidad de sondaje

y el nivel de inserción clínica 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 de la Academia Americana de Periodoncia (AAP).

### **Muestreo microbiológico**

Se tomaron muestras microbiológicas de los pacientes en sitios con una profundidad de sondaje  $\geq 5$  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)<sup>16</sup> y se llevaron al laboratorio de microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Antioquia para procesarlas dentro de las dos horas siguientes.

Para el aislamiento de bacilos entéricos gramnegativos 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.

Para identificar las levaduras se subcultivó la colonia presuntiva en agar TSBV al agar sangre evaluándose el aspecto de la colonia y la morfología microscópica correspondiente a blastoconidias en la preparación con azul de lactofenol.<sup>16, 17</sup>

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 profundidad de sondaje y nivel de inserción, se utilizaron medidas de tendencia central y de dispersión.

Para las variables hábito de fumar, placa bacteriana, sangrado al sondaje, supuración, compromiso de furcaciones y movilidad dental se calcularon frecuencias y proporciones; así como también en cada uno de los microorganismos estudiados.

Se utilizaron pruebas de chi cuadrado y Mann-Whitney para determinar las diferencias de las variables clínicas ( $P < 0.05$ ). Se utilizó un programa estadístico para todos los análisis (SPSS, versión 15, Chicago, IL).

## **RESULTADOS**

Fueron estudiados 31 hombres (41 %) y 45 mujeres (59 %) con periodontitis crónica. Los hombres y mujeres examinados mostraron parámetros clínicos diferentes. Se

encontró mayor pérdida de inserción en los hombres y también porcentajes más elevados de placa, supuración, movilidad, y compromiso de furcación, comparado con las mujeres (diferencias estadísticamente significativas). Además se observó un mayor porcentaje de hombres fumadores ( $p < 0.001$ ). (Tabla 1)

**Tabla 1.** Características clínicas y demográficas de 76 pacientes con periodontitis crónica

Parámetro	Hombres	Mujeres	Valor P
Edad	47±9 años	45±8 años	0.5
Profundidad Bolsa	3.1±1.3 mm	2.9±1.2 mm	0.5
Nivel Inserción	3.8±1.2 mm	3.3±1.6mm	<0.001
Sangrado	74%	73%	0.5
Placa	56%	48%	<0.001
Supuración	17%	13%	0.006
Movilidad	25%	20%	0.014
Compromiso de furcaciones	19%	16%	0.05
Hábito de Fumar	29%	18%	<0.001

± = Desviación estándar

Se encontraron bacilos entéricos gramnegativos en 20 pacientes (26.31 %), y especies como *Enterobacteriaceae* en 16 (21.05 %) y *Pseudomonas aeruginosa* en 4 (5.26 %) de 20 aislamientos. Además se detectaron *Klebsiella pneumoniae* en 12 pacientes y *Serratia marcescens* en dos pacientes. Se identificaron también otras dos especies de *Enterobacteriaceae*. (Tabla 2)

**Tabla 2.** Especies de bacilos entéricos Gram-negativos aislados en 20 de 76 pacientes con periodontitis crónica.

Especie	Número	(%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12	60
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	20
<i>Serratia marcescens</i>	2	10
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	5
<i>Enterobacter sakazakii</i>	1	5

La prevalencia de levaduras en las bolsas periodontales de pacientes con periodontitis crónica fue de 13.2 % (10/76). En ocho sujetos hubo presencia de *Candida albicans* y dos pacientes con especies de *Candida* no específicas.

## DISCUSIÓN

Este estudio investigó la prevalencia de microorganismos inusuales en placa subgingival de 76 pacientes con periodontitis crónica en una población de Colombia. En la presente investigación se observaron condiciones clínicas más desfavorables en hombres que en mujeres corroborando los hallazgos de otros investigadores,<sup>5, 6</sup> quienes indicaron que pueden relacionarse con la menor demanda de asistencia odontológica por parte del sexo masculino.

Por otra parte, diferencias relacionadas con la exposición al tabaco, respuesta del huésped, hábitos de higiene oral y composición microbiana pueden ayudar a explicar estas discrepancias.<sup>3</sup> Desde hace casi dos décadas se ha descrito la asociación entre bacilos entéricos gramnegativos y periodontopatógenos.<sup>5</sup> Además de reconocerse como microorganismos superinfectantes se han asociado con resistencia antibiótica a la amoxicilina y metronidazol, antimicrobianos usados frecuentemente en el tratamiento de la periodontitis.<sup>3, 6, 7</sup>

Latinoamérica es conocida por la prescripción indiscriminada de antibióticos lo cual puede favorecer al crecimiento de estos patógenos en las bolsas periodontales.<sup>3</sup> Los bacilos entéricos gramnegativos observados en este estudio presentaron una prevalencia similar a la informada por otros investigadores en Colombia<sup>3</sup> y Brasil.<sup>6</sup> El papel de estos microorganismos en la patogénesis de la periodontitis es desconocido pero algunos investigadores han sugerido que estos organismos pueden tener un impacto sobre el progreso y tratamiento de la enfermedad periodontal.<sup>3, 5, 8</sup>

En el presente estudio las especies de entéricos observadas con mayor frecuencia fueron *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. Investigadores de Brasil y Colombia han documentado hallazgos similares.<sup>3, 6</sup> Estos microorganismos son invasivos tisulares, elaboran leucotoxinas extracelulares, suprimen la proliferación linfocitaria, inactivan los componentes del complemento, degradan la membrana basal y liberan potentes enterotoxinas y endotoxinas.<sup>12</sup>

Se requieren futuros estudios que clarifiquen el efecto de los entéricos sobre los parámetros clínicos y la respuesta al tratamiento periodontal.

La prevalencia de levaduras en esta investigación fue similar a la encontrada por Slots, et al,<sup>8</sup> quienes registraron 13-14 % de levaduras en bolsas periodontales de pacientes con periodontitis refractaria. Como en el presente estudio *C. albicans* fue la levadura más frecuente. Estos resultados son corroborados por otros estudios que también han encontrado una proporción mayor de *C. albicans* en pacientes con periodontitis crónica.

14- 16

*C. albicans* puede cumplir una función importante en la infraestructura de la placa subgingival y en su adherencia a los tejidos periodontales. Urzua, et al,<sup>17</sup> encontraron que *C. albicans* puede participar en la evasión inmune de la placa en las infecciones periodontales y puede penetrar el epitelio de la bolsa periodontal provocando inflamación

destruccion de los tejidos. El papel que desempeña *C. albicans* en la periodontitis crónica no es muy claro y se requieren más estudios para demostrar el significado clínico de sus hallazgos. Los resultados del presente trabajo soportan que *C. albicans* puede ser parte del proceso de la periodontitis crónica.

La presencia de determinados patógenos periodontales o la asociación de periodontopatógenos con microorganismos superinfectantes deben estipular la selección de los antibióticos que se emplean como terapia adjunta al tratamiento periodontal convencional.<sup>3</sup> Por esta razón es fundamental conocer la composición de la microflora subgingival específica de cada región geográfica para determinar el protocolo terapéutico apropiado.

## CONCLUSIONES

La composición microbiana subgingival en pacientes con periodontitis crónica de la población estudiada demuestra altos niveles de bacilos gramnegativos entéricos y levaduras. Los resultados del presente estudio muestran que los pacientes con periodontitis crónica estudiados en esta investigación, presentan una microflora subgingival específica que puede estar ligada a factores geográficos y ambientales particulares. Este hallazgo tiene implicaciones terapéuticas importantes que deben tenerse en cuenta para el manejo de los pacientes periodontales.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Van Winkelhoff, Herrera D, Oteo A, Sanz M. Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in the Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol.* 2005; 32:893-8.
2. 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.
3. Herrera D, Contreras A, Gamonal J, Otero 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.
4. Boutaga K, Savelkoul PH, Winkel EG, Van Winkelhoff AJ. Comparison of subgingival bacterial sampling with oral lavage for detection and quantification of periodontal pathogens by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol.* 2007; 78:79-86.
5. Slots J, Feik D, Rams TE. Prevalence and antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae and Acinetobacter in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 1990; 5:149-54.

6. Barbosa FCB, Mayer MPA, Saba-Chuifi E, Cai S. Subgingival occurrence and antimicrobial susceptibility of enteric rods and pseudomonads from Brazilian periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol.* 2001; 16:306-10.
7. Souto R, Colombo AP. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Arch Oral Biol.* 2008; 53:155-60.
8. Slots J, Feik D, Rams TE. Age and sex relationships of superinfecting microorganisms in periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol.* 1990; 5:305-8.
9. Slots J, Rams TE, Listgarten MA. Yeasts, enteric rods and pseudomonads in the subgingival flora of severe adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 1988; 3:47-52.
10. Slots J, Rams TE, Schonfeld SE. In vitro activity of chlorhexidine against enteric rods, pseudomonads and acinetobacter from human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 1991; 6:62-4.
11. Ardila CM, Fernández N, Guzmán IC. Antimicrobial susceptibility of moxifloxacin against gram-negative enteric rods from colombian patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2010; 81:292-9.
12. Rowshan HH, Keith K, Baur D, Skidmore P. *Pseudomonas aeruginosa* infection of the auricular cartilage caused by "high ear piercing": a case report and review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008; 66:543-6.
13. Costa F, Manaia CM, Figueiral MH, Pinto E. Genotypic analysis of *Candida albicans* isolates obtained from removable prosthesis wearers. *Lett Appl Microbiol.* 2008; 46:445-9.
14. Kuzucu C, Durmaz R, Otlu B, Aktas E, Gulcan H, Cizmeci Z. Species distribution, antifungal susceptibility and clonal relatedness of *Candida* isolates from patients in neonatal and pediatric intensive care units at a medical center in Turkey. *New Microbiol.* 2008; 31:401-8.
15. Urzúa B, Hermosilla G, Gamonal J, Morales-Bozo I, Canals M, Barahona S, et al. Yeast diversity in the oral microbiota of subjects with periodontitis: *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* colonize the periodontal pockets. *Med Myco.* 2008; 46: 783-93.
16. Tsuzukibashi O, Takada K, Saito M, Kimura C, Yoshikawa T, Makimura M, et al. A novel selective medium for isolation of *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res.* 2008; 43:544-8.
17. Nawrot U, Skała J, Włodarczyk K, Fonteyne PA, Nolard N, Nowicka J. Proteolytic activity of clinical *Candida albicans* isolates in relation to genotype and strain source. *Pol J Microbiol.* 2008; 57:27-33.

Recibido: 30 de septiembre de 2011

Aprobado: 15 de marzo de 2012

*Dr. Carlos Martín Ardila M.* Ph.D en Epidemiología. Profesor Asociado Facultad de Odontología. Universidad de Antioquia. Colombia. [martinardila@gmail.com](mailto:martinardila@gmail.com)