

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGIA**



**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Porphyromonas gingivalis* Y
Prevotella intermedia EN PACIENTES CON GINGIVITIS Y PERIODONTITIS
CRONICA**

YEIMY YISED AVILA TORRES

**TRABAJO DE GRADO
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OPTAR AL TÍTULO DE BACTERIÓLOGA.**

BACTERIOLOGIA

BOGOTÁ, D. C.

29 DE NOVIEMBRE DE 2012

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Porphyromonas gingivalis* Y
Prevotella intermedia EN PACIENTES CON GINGIVITIS Y PERIODONTITIS
CRONICA**

YEIMY YISED AVILA TORRES.

Dra. Ingrid schuler Bio. PhD
Decana Académica

Dra. Diana Patiño C.,MSc.
Director Del Programa académico

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución No13 de julio de 1946.

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia".

DEDICATORIA

Este proyecto va dedicado especialmente a Dios por haberme dado salud y sabiduría para lograr la primer meta que me había propuesto en mi vida y a mis padres Nohemy Torres y Reyes Cruz que fueron los autores principales de este trabajo por que pusieron lo mas importante en la elaboración de un proyecto que es el amor y comprensión . También lo dedico a mis hermanos a quienes adoro con todo mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

Antedato le doy gracia a Dios y a mis padres por el apoyo, colaboración y paciencia en este sueño y anhelo de ser Bacterióloga, que ante las dificultades que se me presentaron , ellos siempre estuvieron ahí dándome animo de no caer y seguir adelante con este proyecto que me había propuesto.

A mi hermano Alexander le doy las gracias por haber sido mi amigo y hermano incondicional en el transcurso de mi carrera.

A mis amigos especialmente a Andrés córdoba, William Gahona y Isabel Jiménez por brindarme su amistad y demostrarme que siempre iban a poder contar con ellos para lo que necesitara con tal de que yo pudiera lograr este anhelo de mi corazón de ser bacterióloga.

Le doy gracias a mi novio John Edison Díaz, por el amor, el ánimo, las fuerzas y los buenos deseos que siempre me brindo.

Gracias a mi amiga Karen por su compañía y su ayuda en esas largar horas que pasamos y compartimos juntas en el laboratorio.

De corazón le doy gracias al Dr. Fredy Gamboa por su paciencia, apoyo y conocimiento que me brindo. Nunca olvidare todos los consejos que me dio para lograr ser una gran profesional. De nuevo gracias doctor por ayudarme en este proyecto, la cual era el paso final para lograr mi titilo como Bacterióloga porque sin ayuda no abría logrado esta meta.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag
1. INTRODUCCION.....	9
2. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	10
3. MARCO TEÓRICO.....	11
3.1 ENFERMEDAD PERIODNTAL.....	11
3.2 GINGIVITIS.....	11
3.3 PERIODONTITIS.....	12
3.4 PERIODONTITIS CRONICA	12,13
3.5 PERIODONTOPATOGENOS.....	14
3.5.1 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	14,15
3.5.2 <i>Prevotella intermedia</i>	16,17,18
3.6 MECANISMOS DE PATOGENICIDAD.....	18
3.7 EPIDEMIOLOGIA.....	19
3.8 TRATAMIENTO.....	19
4. OBJETIVOS GENERALE.....	20
4.1 OBJETIVOS ESPECIFICICOS.....	20
5. MATERIALES Y METODO.....	21
5.1 POBLACION A ESTUDIAR.....	21
5.2 PROCESAMIENTO.....	21
5.2.1 RECOLECCION DE LAS MUESTRAS.....	21
5.2.2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	22,23,24
6. RESULTADOS.....	25,26,27,28
7. DISCUSIONES.....	29,30
8. CONCLISIONES.....	31
9. BIBLIOGRAFIA.....	32,33,34
10. ANEXOS.....	35,36,37,38,39

RESUMEN

Introducción: El principal agente etiológico de la periodontitis crónica son bacterias periodontopatógenas anaerobias gram-negativas la cual varían de una población a otra, debido a la presencia de factores genéticos, ambientales y biológicos. Por esto es importante que cada país o ciudad establezca su propio perfil microbiológico con el fin de poder implementar medidas de prevención y control.

Objetivo: Aislar e identificar *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia* en pacientes con diagnóstico de gingivitis y periodontitis crónica que asisten a consulta a la Facultad de Odontología de la PUJ de la ciudad de Bogotá.

Materiales y Métodos: Se recolectaron 19 muestras donde participaron 10 pacientes con periodontitis crónica y 9 con gingivitis. De cada paciente se tomó muestra de cuatro sitios con sacos periodontales mayores a 4mm de profundidad. Cada muestra fue procesada en el laboratorio para la identificación de los periodontopatógenos.

Resultados y conclusiones: *P. gingivalis* fue la especie con mayor frecuencia en los pacientes con periodontitis crónica y predominando en el sexo masculino, y se aisló en bolsas periodontales de menor profundidad, mientras *P. intermedia* se encontró en un porcentaje muy bajo en estos pacientes y se halló en sacos periodontales de profundidades mayores de 6-7 mm.

PALABRAS CLAVE: Gingivitis, Periodontitis crónica, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, periodontopatógenos, placa supragingival y Subgingival.

Abstract

Introduction: The main etiologic agent of chronic periodontitis are anaerobic gram-negative periodontal bacteria which vary from population to population, due to the presence of genetic, environmental and biological factors. Therefore it is important that each country or city establishes its own microbiological profile in order to implement prevention and control measures.

Objective: To isolate and identify *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in patients diagnosed with gingivitis and chronic periodontitis attending consultation with the Faculty of Dentistry at the Pontificia Universidad Javeriana of Bogotá.

Materials and Methods: It has been collected 19 samples which included 10 patients with chronic periodontitis and 9 with gingivitis. It was collected 4 different site samples from each patient with periodontal pockets larger than 4mm deep. Each sample was processed in the laboratory to identify periodontal pathogens.

Results and conclusions: *P. gingivalis* was the species with the higher frequency in patients with chronic periodontitis and predominantly in males, and isolated shallower periodontal pockets, while *P. intermedia* was found in a very low percentage in these patients and was found in periodontal pockets of deeper than 6-7 mm.

KEYWORDS: Gingivitis, chronic Periodontitis, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, periodontal pathogens, supragingival and subgingival plaque.

1. INTRODUCCION.

En relación a las enfermedades más difundidas y comunes a nivel mundial se encuentran las periodontales, considerándose un problema de salud pública en diversos países, y ocasionan pérdida dentaria afectando al 48% de la población adulta ^(1,2,3). Entre las enfermedades periodontales se encuentra la gingivitis y la periodontitis, siendo la primera la forma más leve y la periodontitis el proceso más severo de enfermedad periodontal ^(1,3).

La gingivitis se caracteriza por presentar inflamación y no hay alteración en el periodonto, y la periodontitis es la unión de diversos tipos de alteraciones presente en el tejido del soporte de los dientes, y dentro de esta patología la periodontitis crónica es la más frecuente en la población y se desarrolla durante toda la vida del ser humano; siendo más frecuente a partir de los 35 años, y prevaleciendo en el sexo masculino según estudios realizados anteriormente en Colombia ^(2,4,5).

La periodontitis crónica tiene una etiología multifactorial en la que intervienen factores genéticos, ambientales y biológicos ^(3,6). El principal agente etiológico es bacteriano y corresponden a microorganismos que habitan en la cavidad oral, ⁽⁶⁾ como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, *Treponema sp*, *Tannerella forsythensis*, *Eikenella corrodens*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* entre otros. ^(2,4,5,6) Estas bacterias han sido comúnmente relacionadas con esta patología y son consideradas como indicadores de riesgo para el desarrollo de dicha enfermedad, ^(2,7) y dentro de este grupo de bacterias, *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia*, son los microorganismos que se han encontrado más asociados en la etiología de esta patología ^(2,4,5,7).

Debido a que esta patología es originada primordialmente por estos microorganismos periodontopatógenos, se puede decir que el mejor método para tratar esta enfermedad podría ser controlando la placa supragingival y subgingival ⁽⁸⁾. Por esto es importante conocer la frecuencia de estos microorganismos en cada área geográfica debido a que su desarrollo y frecuencia no es la misma en todas las poblaciones, ⁽⁵⁾ según resultados arrojados en diferentes estudios sobre la microbiota periodontal en diferentes países, que al ser comparados se han notado estas diferencias ⁽⁴⁾.

2. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad periodontal es un proceso patológico de alta prevalencia en los seres humanos, que afecta al 80% de población a nivel mundial⁽¹⁹⁾. Según la Tercera Encuesta de Salud Bucal (ENSAB III) realizada en Colombia, en 1998, reporto que el 50.2% de la población Colombiana presenta enfermedad periodontal con pérdida de inserción, afectando al 32.8% de las personas entre 15 a 19 años; cifra que aumenta a medida que pasan los años de vida a 87% en personas mayores de 55 años. Esta patología es mas frecuente en hombres (52.6%) que en mujeres (47.6%) en dicha población.^(5,9,10) De las 5 formas clínicas que se presenta la enfermedad periodontal (pérdida de inserción periodontal localizada, generalizada, leve, moderada y severa) las mas frecuente en Colombia y Bogotá son la forma localizada y leve, donde la forma localizada afecta al 42 % a población colombiana y 46.8% a los Bogotanos y la leve se encuentra en el 41.1% en Colombia y 52.3% en Bogotá.⁽¹⁰⁾ Con relación a la gingivitis, según la literatura reporta que puede aparecer en población mayor de 19 años en un 50% y va disminuyendo a medida que aumenta los años.⁽¹¹⁾

A pesar de la alta prevalencia de gingivitis y periodontitis, y la relación con múltiples enfermedades, en Colombia no existe un plan adecuado de salud publica que prevenga la enfermedad periodontal⁽¹⁾. Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente y la importancia que tiene esta enfermedad y la alta frecuencia que presentan los diferentes periodontopatogenos, la cual varia de una población a otra, incluso entre personas de la misma área geográfica.⁽²⁾ Por esto es importante que cada país o ciudad establezca su propio perfil microbiológico de las especies causantes de la gingivitis y periodontitis crónica, porque de esta manera se podrá conocer la frecuencia de estas bacterias y la susceptibilidad a los antimicrobianos, y de esta manera se podrá establecer medidas de prevención y control⁽⁵⁾. Por estos motivos el propósito de este trabajo tuvo como fin aislar e identificar dos microorganismos periodontopatogenos *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia*. Debido a que son los principales agentes etiológicos en la periodontitis crónica según estudios realizados anteriormente en Colombia y otros países a nivel mundial^(2,4,5). Estos dos microorganismos se aislaron de muestras de pacientes con diagnostico de gingivitis y periodontitis crónica que asistieron a consulta en la Facultad de Odontológica de la PUJ de la ciudad de Bogotá; con el propósito de conocer la frecuencia de estos microorganismos en dicha población, porque hasta el momento no se tiene ningún reporte, y por esto no se ha podido implementar ninguna medida de prevención y control, la cual se esperan poder implementar a futuro.

3. MARCO TEÓRICO.

3.1 ENFERMEDAD PERIODONTAL

La enfermedad periodontal es la infección de los dientes, la encía y el hueso que rodea el diente. Esta infección es causada al inicio por la placa supragingival que son bacterias gram- negativas y sustancias pegajosas de la comida que se adhieren al diente formando el biofilm o placa bacteriana. Este biofilm debe eliminarse todos los días, y si no se hace se formara el sarro o cálculos, y este calculo debe ser eliminado con ayuda profesional, por que al no ser removido empezara a multiplicarse y expandirse por el surco gingival, formando la placa subgingival que esta compuesto por bacterias gram-negativas y estas bacterias producen toxinas que junto con el sistema inmune del hospedero destruyen el hueso que rodea el diente ^(6,12,13).

Esta patología se incrementa por factores de riesgo como fumar tabaco, enfermedades sistémicas como la diabetes, hipertensión, embarazo, consumo de algunos medicamentos, factores genéticos, mala colocación de puentes, apiñamiento dental ⁽³⁾ entre otras.

Dentro de esta enfermedad se encuentran dos grandes cuadros clínicos la gingivitis y la periodontitis. Estas dos patologías pueden ser causadas por los mismos agentes etiológicos debido a que una depende de la otra ^(1,3).

3.2 GINGIVITIS

Es la forma más leve de la enfermedad periodontal y presenta alta prevalencia en la población a nivel mundial, lo que la hace una de las enfermedades de preocupación de salud pública, siendo importante no por su gravedad sino por su incidencia en los seres humanos. Esta patología varía en el sexo, la edad y etnia, y presenta una frecuencia del 50% en personas mayores de 19 años, y a medida que aumenta los años este valor va disminuyendo⁽¹¹⁾. La gingivitis tiene una etiología multifactorial donde se encuentran factores como la placa bacteriana, virus, hongos, factores sistémicos, consumo de algunos medicamentos, mal nutrición, la pubertad y factores genéticos entre otros⁽¹¹⁾. En relación al agente etiológico bacteriano, la mayoría de las veces es causada por biofilm supragingival y subgingival. Estas bacterias se acumulan en la superficie dentaria la cual va descendiendo al tejido gingival llamada comúnmente encía, y esto hace que la encía cambie sus características estructurales y físicas, por ello se observan cambios en la forma, posición, en la textura de la gingiva, en el color (roja/ azul violeta), y hay presencia de sangrado gingival al sondaje ^(3,11). Esta patología puede prevenirse y controlarse con el cepillado y el uso del hilo dental a diario. Algo importante de esta enfermedad periodontal es que no ocasiona pérdida del hueso ni del tejido que sostiene los dientes solo se observa inflamación ⁽¹³⁾ pero si no hay un adecuado hábito de higiene oral, de diagnóstico, ni de tratamiento

oportuno, suele avanzar hasta llegar a ser periodontitis ^(11,14).

3.3 PERIODONTITIS

Es el segundo cuadro clínico más severo de la enfermedad periodontal, que afecta al 30% de la población estadounidense ⁽³⁾. Esta enfermedad se caracteriza por un proceso inflamatorio de tipo infeccioso específico, que afecta los tejidos de soporte dentario, que lo conforman los ligamentos, cemento y hueso alveolar. Esta afección se debe en parte al sobrecrecimiento de bacterias principalmente anaerobios en la placa subgingival, ⁽¹³⁾ que si no se eliminan se adhieren alrededor de los diente, desplazándose por debajo de la encía, y luego de estar en la encía migra a través de la raíz del diente hasta formar bolsas o sacos periodontales de 4mm a 12 mm de profundidad, y si no se controla puede llegar a destruir el hueso que sujeta a los dientes. ^(14,15) la pérdida ósea se debe a toxinas bacterianas y a la respuesta inmune del hospedero que lucha contra las bacterias cada vez que estas se van duplicando por el surco gingival, ⁽¹⁴⁾ y este sobrecrecimiento desencadena un desequilibrio en el surco gingival que puede afectar un número variable de dientes que conlleva a que se presente diferentes velocidades de progresión en la destrucción dentaria ⁽¹³⁾. Las velocidades de destrucción se pueden clasificar en dos fases: la primera es la periodontitis crónica que es la más común y se caracteriza por ser de evolución lenta, la segunda fase es la periodontitis agresiva que se caracteriza por ser de muy rápida evolución en la destrucción de los tejidos y en el tiempo que transcurre desde su inicio hasta la pérdida del diente. La velocidad del avance de esta patología es la que determina su gravedad ^(5,15).

Cuando la periodontitis no se trata como debe ser, los tejidos dentarios se destruyen ocasionando pérdida de los dientes y esto trae consecuencias no solo estéticas sino fisiológicas y hasta psicológicas en los pacientes ⁽¹⁴⁾.

De las dos fases de la periodontitis se hará énfasis en la forma crónica.

3.4 PERIODONTITIS CRONICA

Es el tipo de periodontitis mas frecuente, e inicia a partir de los 35 años, progresando durante toda la vida en el ser humano ⁽⁴⁾. Esta enfermedad se caracteriza por presentar diversos grados de progresión inflamatoria, que va acompañada por formación de sacos y pérdida del hueso alveolar ⁽⁴⁾. Esta patología puede demorar años en relación al tiempo que transcurre el inicio de la enfermedad hasta que se llegue a perder los dientes, igualmente la periodontitis crónica puede pasar por períodos de mayor actividad y rapidez en la destrucción ⁽¹⁶⁾.

Al ser examinada la encía con la sonda puede haber presencia de sangrar, deformación del periodoncio, espacio entre los dientes y las lesiones pueden ser tan graves que puede haber pérdida dentaria, cual hace que haya deterioro en las funciones masticatorias. ^(2,4).



Fig (1) Paciente con periodontitis crónica.
Escudero N, *et al.* 2008 (16)

Existen una serie de condiciones o factores de riesgo que pueden predisponer a los individuos a desarrollar esta enfermedad, entre ellos tenemos verdaderos factores de riesgo (tabaco, diabetes y algunas enfermedades sistémicas), indicadores de riesgo(estrés, osteoporosis, obesidad, higiene oral, mala colocación de puentes dentales, apiñamiento dental, embarazo y el uso de anticonceptivos), determinantes de riesgo (edad, genero, raza, estatus socioeconómicos) y factores productores de riesgo como sangrado al sondaje. ^(4,14,16)

Los signos y síntomas no suelen ser visibles hasta que la enfermedad está avanzada, se caracteriza por presentar encías rojas o inflamadas, encías muy sensibles o sangrantes, dolor al masticar, dientes flojos, dientes sensibles y mal aliento entre otros .Todas estas circunstancias pueden afectar a un número variable de dientes en función de cada individuo, con tasas variables de progresión ^(14,16).

Con relación al diagnostico de esta patología se dice que en el estado periodontal se evalúan parámetros clínicos como la profundidad de los sacos, el grado de inflamación y la perdida de inserción, y exámenes radiológicos para observar la perdida ósea⁽¹⁶⁾.

Respecto al agente etiológico según la literatura se indica que más de 500 especies diferentes de bacterias son capaces de colonizar la biopelícula oral y solo unas 20 se consideran como potenciales patógenos periodontales ⁽¹³⁾.Por esta razón se dice que las

especies bacterianas proteolíticas, asacarolíticas y de débil fermentación⁽¹³⁾ son las que se encuentran en mayor presencia en el Biofilm dental subgingival, y por ello se constituyen como los principales agentes etiológicos de las patologías periodontales.⁽¹⁷⁾

Diferentes investigaciones periodontal han encontrado reportes similares en los periodontopatogenos hallados en los pacientes con periodontitis crónica, presentándose *P. gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythensis*, *Tanerella forsythia*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus*, *Peptoestreptococo micros*, *Treponema denticola*, *P. nigrescens* y *Prevotella intermedia* entre otras.^(2,4,5,17,18) Estas especies se han encontrado de una forma conjunta debido a que esta patología es multibacterial. De todos estos microorganismos aislados en periodontitis crónica los mas prevalentes según la literatura y estudios realizados anteriormente se encuentran *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia*^(2,4,17,18).

3.5 PERIODONTOPATOGENOS

3.5.1 *Porphyromonas gingivalis* (P.g)

Es un bacilo corto o cocobacilo gram negativo inmóvil, no esporulado, anaerobio estricto y de metabolismo fermentativo, por eso se llama asacarolítico; mide aproximadamente 0.5-0.8 µm x 1-3.5 µm y forma colonias uniformes de pigmentación verdosa, pardas o negras debido a la hemina que almacena en la superficie celular^(13,17,19). Esta bacteria es considerada un comensal en la cavidad oral, por este motivo se dice que es un microorganismo periodontopatogeno, que aprovecha las condiciones que da el huésped para generar mayor daño.⁽¹³⁾ Se caracteriza además por colonizar sitios donde no existe una buena higiene oral, y una vez que se encuentre en las condiciones adecuadas de oxidoreducción, la cual favorece su capacidad de invadir células periodontales, y de esta manera crea protección contra el sistema de defensa del huésped^(13,19). Aparte de contar con esta capacidad también presenta una diversidad de factores de virulencia como capsula, endotoxinas, LPS, hemaglutininas, fimbrias y proteínas cisteinproteasas entre otros, (Tabla 1) que rompe la homeostasis en el surco generando una destrucción continua y agresiva de los tejidos de sostén del diente, llegando a degradar hueso y tejidos blandos. Esta destrucción va a generar signos clásicos como enrojecimiento, incremento de la profundidad del surco gingival, sangrado al estímulo, movilidad de diversos grados, que con la cronicidad de la lesión puede conducir a la pérdida de la pieza dentaria.

Tabla 1.Principales factores de virulencia de *P. gingivalis*.

FACTOR DE VIRULENCIA	ACCION PERIODONTAL
Capsula	Evasion del sistema inmune del huésped
Endotoxinas	Penetran las celulas ocasionando inflamacion periodontal
Vesícula de la membrana externa	Produce daño de las celulas periodontales y neutrofilos
Hemaglutininas	Promoción de colonización bacteriana
Fimbrias	Capacidad de unirse a superficies epiteliales y a diferentes sustratos
Proteinasas caseinolíticas	Actividad proteolítica, destrucción de ligamentos periodontales, destrucción de glóbulos rojos para la obtención de hierro y hemina
Metanolitos tóxicos	Aumentan permeabilidad de mucosa oral, producción indol
Moléculas antibacterianas	Bacteriocinas implicadas en las interrelaciones bacterianas en cavidad bucal.

Ramos D. (17) Mancin.S, Castillo.L (15).

P. gingivalis es considerada como una de las especies más aisladas en pacientes con periodontitis crónica, y usualmente está entre los más tardíos colonizadores de la cavidad oral ⁽¹³⁾, debido a que suele encontrarse en zonas con inflamación, pobre higiene oral y en sitios que presenten colonización por placa bacteriana Gram-positiva ⁽²⁰⁾ que establecen las condiciones medioambientales necesarias, para su adherencia y el suministro de sustratos para que crezca y sobreviva. ⁽¹³⁾

Figura 2. Colonias de *P.gingivalis* con pigmento negro.



Gajardo M .*et al* (13)

Este microorganismo se ha identificado, como un factor de riesgo en infecciones pulmonares, parto, bajo peso al nacer, y el causante de incremento en el riesgo de infarto del miocardio⁽¹⁷⁾.

3.5.2 *Prevotella intermedia*

Son bacilos cortos pleomorficos, gram-negativo, anaerobio estricto, no móvil y no formador de espora, con un tamaño de 0.4 μm por 0.6 a 1 μm , productor de colonias de color marrón oscuro a negro. Esta bacteria forma parte de la flora natural gingival y esta asociada con diferentes infecciones periodontales^(19, 21).

Este periodontopatógeno tiene factores de virulencia como la capsula que la protege contra la fagocitosis y de la destrucción de los leucocitos, enzimas protectoras contra el oxígeno que le proporciona el ambiente anaeróbico para su supervivencia y la enzima proteasa que es uno de los principales factores responsables para el progreso de la enfermedad periodontal.(Tabla 2) Además por el rico contenido proteico del surco gingival se desarrolla una inflamación subgingival y efectos de deterioro de la integridad y en los mecanismos de defensa del huésped⁽²¹⁾.

Tabla 2. Principales factores de virulencia de *P. intermedia*

FACTOR DE VIRULENCIA	ACCIÓN PERIODONTAL
Fimbrias, adhesinas,	Intervienen en la adhesión y congregación bacteriana
Acción tóxica	Degradación de inmunoglobulinas, acción toxica sobre los fibroblastos, actividad fibronilítica, estímulo de su crecimiento por hormonas esteroideas y progesterona
Epiteliotoxinas	Lesión del epitelio gingival
Efectos inmunosupresores	Inhibe proliferación de linfocitos B y inmunoglobulinas.
Proteasas	Degradación de proteínas
Fosfolipasas ácidas y alcalinas	Destrucción ósea alveolar.
Indol, Amonio, Ac. Propiónico,	Irritación periodontal.

Mancin.S(10), Aguilarte C . (19).

Este patógeno esta relacionado notablemente con la patogénesis de las enfermedades periodontales destructivas debido a los altos niveles en gingivitis ulcerativa-necrotizante aguda y algunas formas periodontales. Otros estudios han demostrado que esta bacteria parece tener algunas de las propiedades de virulencia exhibidas por *Porphyromonas gingivalis*⁽²¹⁾. Debido a todo lo dicho anteriormente se puede concluir que esta bacteria es un patógeno principal en la enfermedad periodontitis.

Tanto *P. gingivalis* como *P. intermedia* son catalasa negativa y oxidasa negativa, indol positivo. En la tabla N° 3 se encuentran las pruebas bioquímicas que permiten diferenciar *P. gingivalis* de *P. intermedia*.

Tabla 3. Pruebas de identificación que ayudan a diferenciar a *P. gingivalis* de *P. intermedia*

Parámetros	<i>P.gingivalis</i>	<i>P. intermedia</i>
Catalasa	-	-
oxidasa	-	-
indol	+	+
nitratos	-	-
glucosa	-	+
sucrosa	-	+
sacarosa	-	+
lactosa	-	-
maltosa	-	+
urea	-	-
lipasa	-	-
Fluorescencia 365 nm	+	+

3.6 MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

P. gingivalis y *P. intermedia* cuentan con un alto potencial patogénico debido a sus diferentes factores de virulencia que presenta cada una, que les permiten invadir diferentes tipos celulares y alterar el equilibrio gingival, lo que hace que el sistema inmune del huésped actúe frente a ellas, y debido a esa respuesta hay liberación de mediadores inflamatorios como citoquinas y prostaglandinas que provocan daño o destrucción de los tejidos periodontales. El desbalance que se establece entre los diferentes componentes del sistema inmune y los factores de virulencia son los que conllevan al desarrollo de la periodontitis crónica⁽¹³⁾.

3.7 EPIDEMIOLOGIA

La periodontitis se presenta con alta prevalencia en la población mundial, ⁽⁵⁾ esto lo demuestra un informe de la Organización Mundial de la Salud, donde establece que la periodontitis que conduce a la pérdida del diente se encontró entre el 5-15% en la mayoría de la población en todo el mundo ⁽²²⁾.

En Colombia, según el Estudio Nacional de Salud Oral (ENSAB III) realizado en 1998, se encontró que el 12% de los pacientes con enfermedad periodontal generalizada son menores a 35 años y va aumentando con pérdida de inserción a 42 % a medida que transcurre la edad y el 10% de los individuos presentan la forma avanzada ⁽⁵⁾.

Por esta razón se concluye que esta patología es considerada uno de los problemas de salud global mas prevalentes e importantes en términos de calidad de vida tanto en lo estético, psicológica y en salud.

3.8 TRATAMIENTO

En la actualidad el método de tratamiento de esta patología sigue siendo la remoción mecánica de la placa dental supragingival y subgingival ⁽¹⁵⁾, debido a que es el procedimiento más eficaz y menos perjudicial para el paciente. Y respecto al uso de agentes antimicrobianos solo se tiene en cuenta en pacientes donde el primer tratamiento no es efectivo, para evitar la resistencia bacteriana. Aunque este último tratamiento ha generado preocupación entre las autoridades de salud en América Latina por la alta resistencia de los periodontopatogenos a los antibióticos. Por esta razón es importante que cada población o comunidad tenga conocimiento sobre la frecuencia con que se presentan los agentes periodonpatogenos en cada población con el fin de poder determinar el grado de susceptibilidad de los antibióticos de estas especies, debido a que el perfil antimicrobiano varía de una población a otra. Además el análisis de estos microorganismos podría ayudar a identificar el tipo y el grado de afección que presentan los pacientes, de igual manera proporciona la buena elección de los agentes terapéuticos, y permite evaluar el funcionamiento de tratamientos anteriormente empleados en esos pacientes. ⁽⁹⁾

4. OBJETIVOS GENERAL.

Aislar e identificar *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia* en pacientes con diagnóstico de gingivitis y periodontitis crónica que asisten a consulta a la Facultad de Odontología de la PUJ de la ciudad de Bogotá.

4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Determinar la frecuencia de *P. gingivalis* y *P.intermedia* en cultivo de muestras obtenidas de pacientes con gingivitis y periodontitis crónica.
- Correlacionar la presencia de *P. gingivalis* y *P. intermedia* en pacientes con diagnóstico de periodontitis crónica que asisten a consulta a la Facultad de Odontología de la PUJ.

5. MATERIALES Y METODOS.

5.1 Población a estudiar

Se realizo un estudio observacional descriptivo transversal donde se recolectaron 19 muestras del surco gingival de pacientes con diagnostico de gingivitis (9) y diagnostico periodontitis crónica (10), que asistieron a consulta a la Faculta de Odontología de la PUJ de la Ciudad de Bogotá; desde el primero de septiembre hasta el 31 de octubre de 2012. Para el estudio se tuvieron en cuenta criterios de inclusión donde se eligieron pacientes con enfermedad periodontal activa como gingivitis o periodontitis, con mínimo 10 dientes en boca, sistémicamente sanos, mayores de 19 años y que no hayan recibido terapia periodontal previa mínimo 6 meses. Los criterios de exclusión involucraron: pacientes comprometidos sistémicamente, que previamente hayan recibido tratamiento periodontal, incluso profilaxis para diagnostico de ICDAS, que hayan consumido corticoides durante los últimos 3 meses, pacientes embarazadas o en periodo de lactancia y pacientes que consumen mas de 10 cigarrillos al día. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado.

5.2 Procedimiento

5.2.1 *Recolección de las muestras*

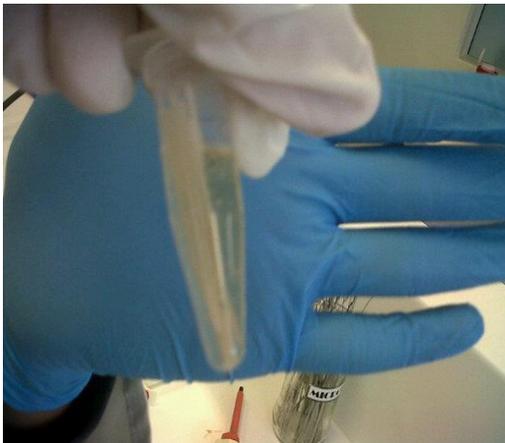
Lo primero que se realizo fue el sondaje periodontal con una sonda de 11 0 12 mm, se midieron 6 superficies de los dientes para seleccionar 4 que serian las que se incluirían en las muestras. Dentro de los parámetros clínicos se tuvo en cuenta la perdida de inserción, profundidad de las bolsas, y sangrado a sondaje, los cuales se utilizaron para calcular la severidad de la enfermedad periodontal. Para las personas con gingivitis se seleccionaron 4 sitios de bolsas menores de 4 mm y para los de periodontitis bolsas mayores a 4 mm de profundidad. Para la toma de la muestra de los pacientes con gingivitis se elimino con un algodón estéril la placa supragingival y se introdujo los conos de papel (New Stetic) por 1 minuto, y luego se colocaron en los tubos eppendorf que contenían 1 ml de caldo tioglicolato suplementado con hemina y Menadiona, y fueron llevados inmediatamente al laboratorio.



Figura (3) toma de muestra con cono de papel estéril del surco gingival por vestibular. Cabrera M. *et al.*2004 (21)

5.2.2 Procesamiento de las Muestras

Después de obtenidas las muestras figura (2) se dejaron incubando a 36 °C en condiciones de anaerobiosis por un periodo de cuatro horas, y luego las muestras se sacaron de la jarra de anaeróbica y de colocaron por 30 segundos en el vortex para homogenizar la muestra Fig (3).



Fig(2) Muestra periodontal



Fig (3) muestra en vortex

Luego de haber obtenido una homogenización de la muestra se realizaron 3 diluciones en base 10 a partir del caldo tioglicolato donde se recolecto la muestra, tomándose de esta 100 µl para cada dilución, y se sembraron por aislamiento 20 µl de la muestra y de la diluciones 10^{-1} y 10^{-2} en agar Wilkins Chalgren enriquecido con sangre de cordero, hemina y menadiona. Estos medios se dejaron incubando a 36 °C en condiciones de anaerobiosis por 7 días. Pasado estos días se observo el crecimiento y se tomaron las diferentes colonias que presentaron una coloración oscura Fig (4) y las que produjeron una fluorescencia rojo ladrillo con la luz ultravioleta Fig(5). Estas colonias se aislaron en agar Wilkins chalgren y se dejaron en atmosfera anaeróbica por 7 días, pasado este tiempo se realizó una coloración de Gram a todas las colonias aisladas y luego se les realizo la prueba de aerotolerancia para descartas las bacterias facultativas y tomar solo las anaerobias estrictas, cocobacilos o bacilos Gram negativos Fig (6) y las que emitieron fluorescencia con luz UV, aunque también se tuvieron en cuenta las colonias que no produjeron esta fluorescencia y que fueron bacilos gram- negativos y anaerobios estrictos Fig (7). Por último a estos microorganismos se les realizaron pruebas bioquímicas y enzimáticas confirmatorias, para ello se utilizo el sistema de identificación comercial Rapid ANA II (Remel™, Apogent). Fig (8).



Fig (4) colonias negras *P. gingivalis*



Fig (5) colonias con fluorescencia rojo Ladrillo

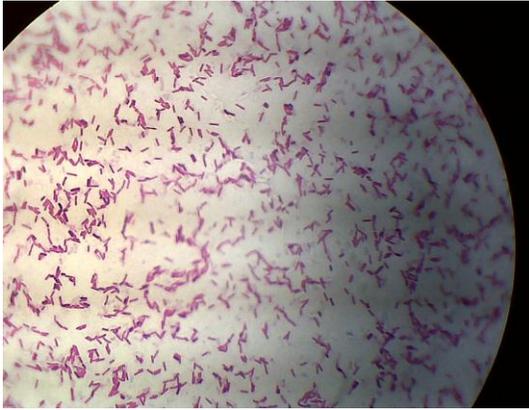


Fig (6) bacilos gram- negativos de *P.gingivalis*

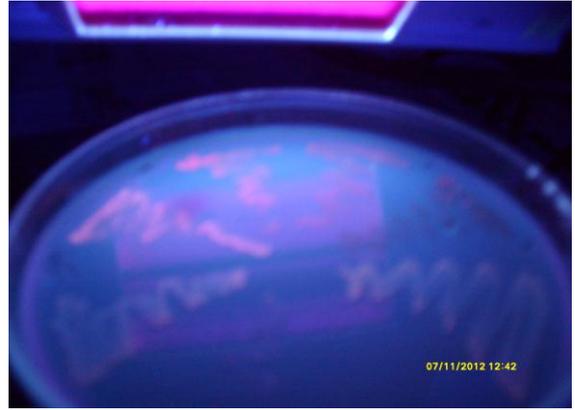


Fig (7) colonias fluorescentes de *P. gingivalis* y *P. intermedia*



Fig (8). *P. asaccharolyticus* Rapid ANA II (RemelTM, Apogent).

Para el procesamiento de los resultados se llevó un registro de cada muestra desde su recolección hasta la identificación del microorganismo de interés que en este caso fue *P. gingivalis* y *P. intermedia*. A cada colonia que se encontró en la muestra original y en las diluciones se les asignaron un numero para poderlas diferenciar una de otra y ese número se colocó en la tabla de registro de muestra. en el anexo 1 reposan todos los resultados de las 19 muestras,

6. RESULTADOS

Los resultados del presente estudio no proporcionan datos viables sobre la frecuencia de *P. intermedia* y *P. intermedia*, debido al tamaño de la muestra. Pero de igual manera ayudan a tener una perspectiva del comportamiento de estas especies en gingivitis y periodontitis crónica.

De los 19 pacientes estudiados, 9 (47%) presentaron gingivitis (6 mujeres y 3 hombres) y 10 (53%) periodontitis crónica (6 hombre y 4mujeres). En los 9 pacientes con gingivitis 2 presentaron *F. varium*, 2 *E. lentum*, 2 *C. gracilis*, 1 *F. nucleatum* y en 2 no se encontraron especies anaerobias; Figura(1) y en los 10 pacientes con periodontitis crónica 4 presentaron *P. gingivalis*, 3 *C. gracilis*, 2 *E. lentum*, 1 *P. intermedia* ,1 *P. asaccharolyticus* y *F. varium* en 1 paciente. Solo un paciente presento 3 especies (*P. gingivalis* , *E. lentum* y *F. varium*) Grafico (2).

En gingivitis no se encontró presencia de *P. gingivitis* y *P. intermedia*, solo se aislaron 4 especies anaerobias en el total de los pacientes 78% con mayor frecuencia en el sexo femenino y en edades de 19-24 años Figura (3,5,6) y en periodontitis crónica se encontró *P. gingivalis* en un 40% con predominancia en el sexo masculino y en edad de 27- 37 años y mayores de 56 años y *P. intermedia* se aisló en un 10% en hombres de 27-37 años y otras especies anaerobias se hallaron en el 70% con mayor frecuencia en el sexo masculino y en edad de 27 a 55 años .Figura (4,7,8).

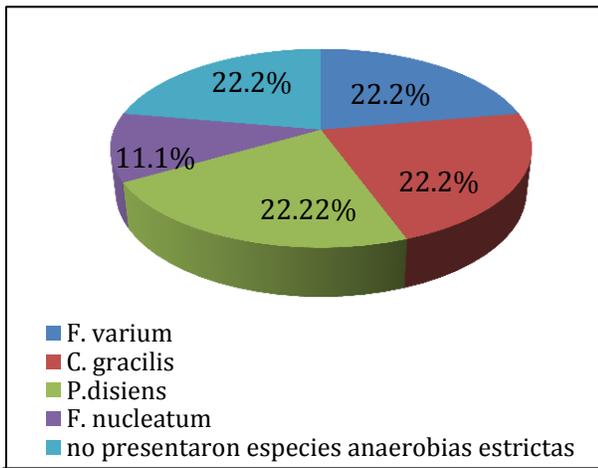


Figura 1. Especies bacterianas anaerobias detectadas en el total pacientes con gingivitis

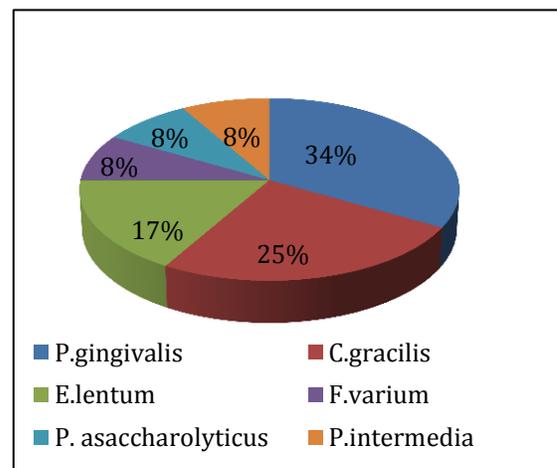


figura 2. Especies bacterianas anaerobias detectadas en la población con periodontitis

Tabla 1. Frecuencias individuales de cada especie anaerobia

microorganismos	gingivitis	Frecuencia %	Periodontitis crónica	Frecuencia %
<i>P.gingivalis</i>	0	0	4	40
<i>P.intermedia</i>	0	0	1	10
Otras especies anaerobias: ↓	7	78	7	70
<i>C. gracilis</i>	2	22.22	3	30
<i>E. lentum</i>	0	0	2	20
<i>F. varium</i>	2	22.22	1	10
<i>P. disiens</i>	2	22.22	0	0
<i>F.nucleatum</i>	1	11.11	0	0
<i>P. asaccharolitycus</i>	0	0	1	10
Pacientes que no presentaron especies anaerobias	2	22.22	0	0
Total pacientes	9		10	

Tabla 2. Parámetros clínicos

Parámetros	gingivitis	Periodontitis crónica
Genero (%)	F: 66,6 M: 33,4	F: 40 M: 60
Promedio Edad	25 años	43 años
Promedio Profundidad bolsa periodontal (mm)	No aplica	5.5

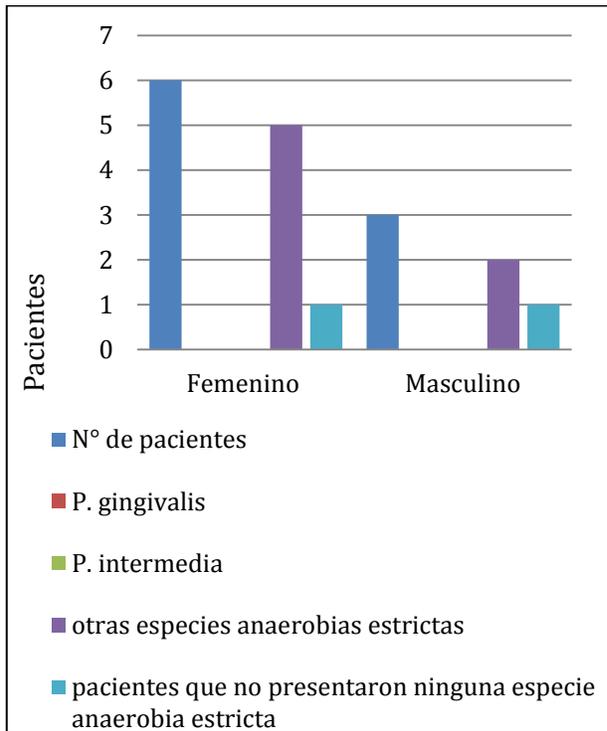


Figura 3. Relación del sexo y especies detectadas en pacientes con Gingivitis.

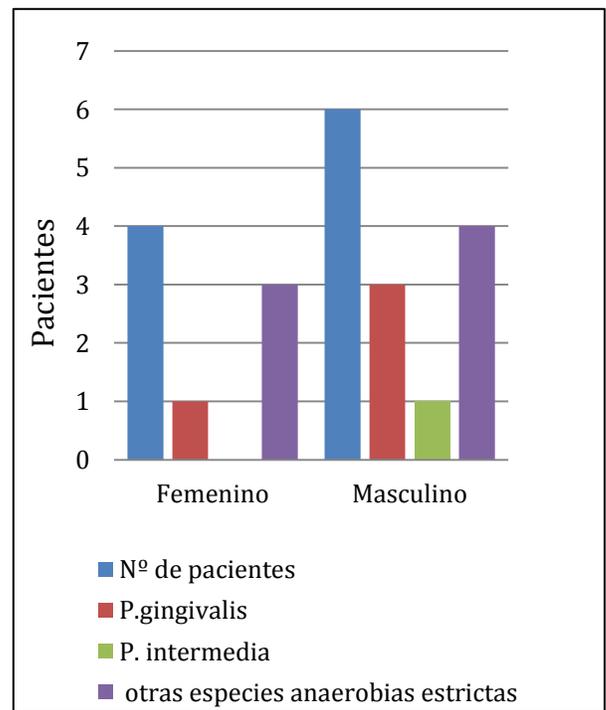


Figura 4. Relación del sexo y especies detectadas en pacientes con Periodontitis crónica.

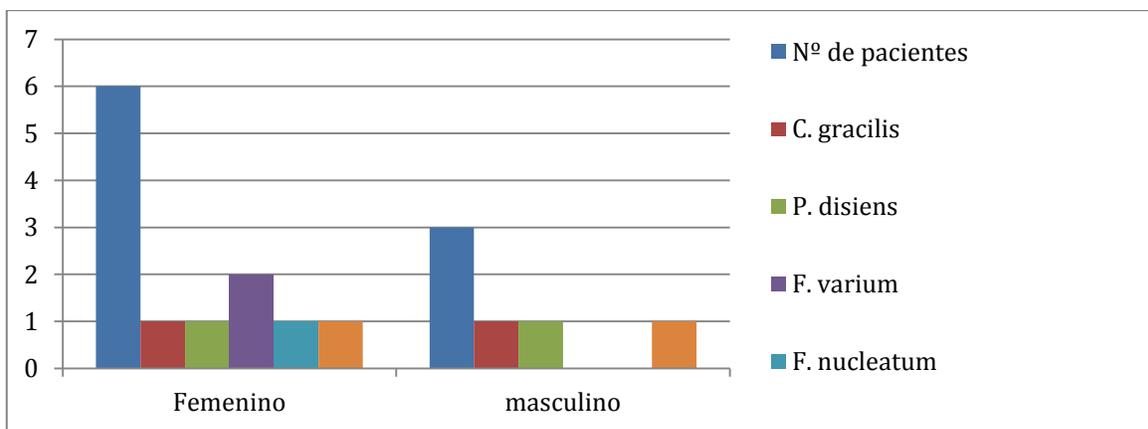


Figura 5. Relación género y especies anaerobias estrictas diferentes a *P. gingivalis* y *P. intermedia* detectadas en pacientes con gingivitis

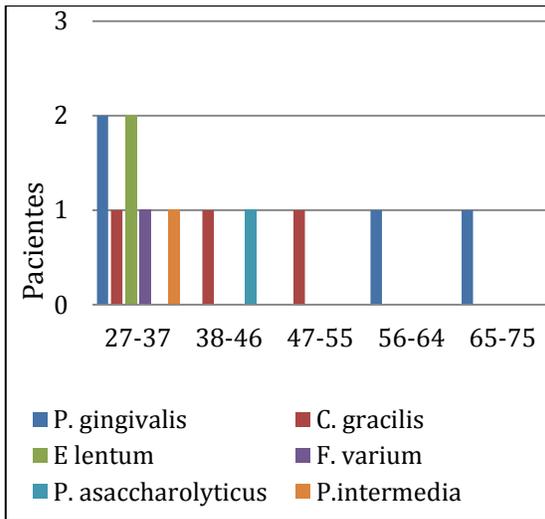


Figura 6. Relación entre la edad y especies anaerobias estrictas en pacientes con diagnóstico de periodontitis

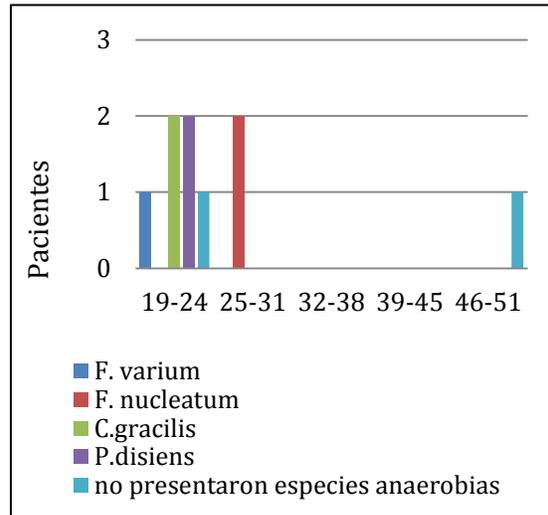


Figura 7. Relación entre otras especies anaerobias estrictas diferentes *P. gingivalis* y *P. intermedia* en ptes con gingivitis.

En relación a la profundidad de las bolsas periodontales y de las especies, se observó que la mayoría de las bacterias anaerobias se aislaron en bolsas con profundidades de 4 a 5 mm, donde se encontraron *P. gingivales* y otras especies anaerobias.

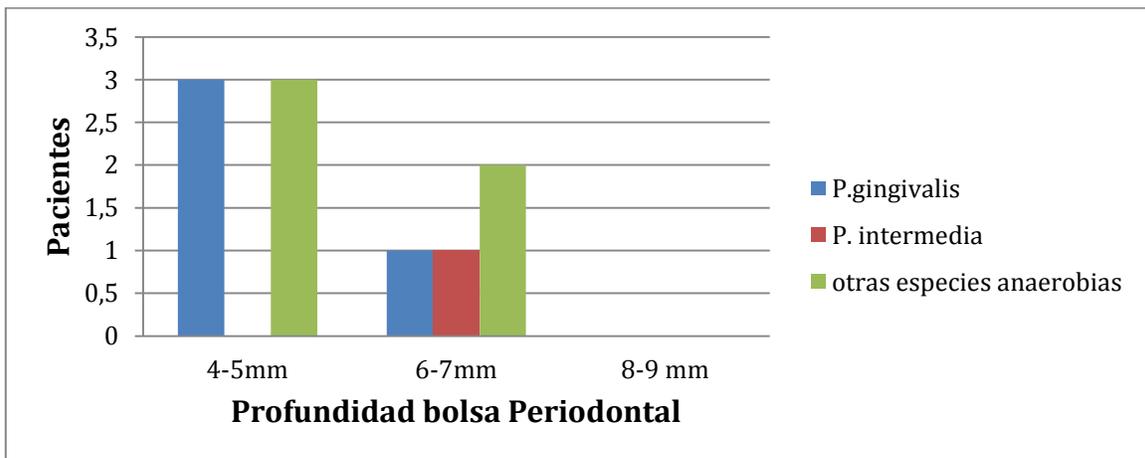


Figura 8. Relación entre el nivel de profundidad de bolsa periodontal con especies anaerobias estrictas en pacientes con diagnóstico de periodontitis crónica

7. DISCUSIONES

Este estudio investigo la frecuencia de *P.gingivalis* y *P. Intermedia* de placa subgingival de 19 pacientes con diagnóstico de periodontitis crónica y gingivitis, que asistieron a consulta a la Facultad de Odontológico de la PUJ de la ciudad de Bogotá, con el propósito de obtener datos para conocer el perfil microbiológico de esta población, y de esta manera poder implementar a futuro estrategias de prevención y control, debido a que diferentes estudios realizados a nivel mundial y en Colombia han demostrado variación en la frecuencia de estos periodontopatogenos.^(2,4,5)

En general se observo que *P. gingivalis* se encuentra en mayor proporción que *P. intermedia* en pacientes con periodontitis crónica, según datos obtenidos en diferentes investigaciones en Colombia y otros países. Ardila y colaboradores encontró 64% *P.gingivalis* y *P.intermedia* con 44.2%⁽²⁾ resultado que se pueden asociar con los obtenidos en este estudio. Pero teniendo en cuenta lo reportado por Mayorga y Guillarte que refiere mayor frecuencia de *P. intermedia* respecto a *P. gingivalis*^(4,5), resultados que no se relaciona con los de Ardila. Esta diferencia puede deberse a muchos factores, primero puede ser que estas especies cambien de una población a otra, y segundo se podría decir que se debe a problemas interlaboratorio, como el medio de transporte, el medio de cultivo, el tipo de diluciones, diferencia en el análisis microbiológico y la manera como se aíslan y se evalúan las presuntas colonias de *P. gingivalis* y *P. intermedia*. Por esta razón se debe hacer un seminario de trabajo donde se exponga la mitología para aislar estos periodontopatogenos y de esta manera crear un protocolo único o un Workshop de identificación de estas especies.

En relación a gingivitis, no se encontró presencia de *P.gingivalis* y *P. intermedia*, pero si aislaron otras especies anaerobias como *P. disiens*, *F.varium* y *C.gracilis* donde este ultimo periodontopatogeno también se hallo con una alta frecuencia en periodontitis crónica, lo que indica que esta bacteria es capaz de causar estas dos patologías. Al Correlacionar estos datos con la investigación de Mancini y colaboradores en México del 2010 donde hizo un estudio con estas dos patologías y encontró mayor proporción de especies de *P.intermedia*, *C.rectus*, *A.actinomycescomitans* y *Actinomyces sp* en gingivitis y de *P.gingivalis*, *T.forsythia*, *F.nucleatum* para periodontiti⁽¹⁵⁾, resultados que no se asemejan a los de este estudio. Por esta razón varios autores refieren que es importante que cada población o comunidad establezca su propio perfil microbiológico por que se han encontrado variaciones en los resultados al compararlos con investigaciones ya hechas anteriormente.

Respecto al genero, algunos autores dicen que el sexo no influye en la aparición de la periodontitis⁽¹⁴⁾.pero en diferentes investigaciones se ha observado que es mas frecuente en

hombres que en mujeres^(2,4,5,18). Datos que se asemejan a los de este estudio donde se halló mayor porcentaje de placa bacteriana en el sexo masculino. Mientras que en gingivitis se observó todo lo contrario respecto a los pacientes con periodontitis debido a que hubo mayor frecuencia de bacterias anaerobias en mujeres que en los hombres, resultados muy similares con los de Mancin y colaboradores donde se encontró un 77% en el sexo femenino sobre el 23% en el sexo masculino⁽¹⁵⁾.

Diferentes autores reportan que la periodontitis tiene más significado clínico en personas de 35 años, pero esto no indica que no se pueda presentar a cualquier edad^(4,16). En esta investigación se encontró que la edad promedio en periodontitis crónica fue de 43 años y más frecuente en paciente de 25 a 37 con una alta frecuencia en *P. gingivalis* y *E. lentum*, resultados que no se asemeja con los de Guilar y colaboradores en un estudio del 2005, donde se halló *P.gingivalis* en pacientes mayores de 40 años⁽⁴⁾. Según Matesanz y colaboradores reportan que la gingivitis es más frecuente en un 54 % en personas de 19 a 44 años⁽¹¹⁾ porcentaje que se encuentra en parte relacionado con lo encontrado en esta población donde fue más frecuente en adultos jóvenes de 19 a 31 año con una edad promedio de 25 años y predominando *P. disiens*.

En la profundidad de las bolsas periodontales se observó que *P. gingivalis* se aisló en sacos de menor profundidad de 4-5 mm y *P. intermedia* en bolsas de 6-7mm; resultados que no concuerdan en parte con los de Aguillar debido a que él halló a *P.gingivalis* en sacos mayores de 6 mm y a *P.intermedia* en bolsas de 4 a 8 mm. Aunque hay que tener en cuenta que el tamaño de la muestra en este estudio fue muy pequeño para lograr hacer una comparación objetiva.

Los resultados obtenidos en este estudio tiene alguna similitud con estudios realizados anteriormente en nuestro país; aunque se debe tener presente que el número de pacientes estudiados fue muy pequeña para lograr obtener datos para el perfil microbiológico de esta población, pero de igual manera estos resultados aportan y ayudan a tener una perspectiva del comportamiento de estas bacterias en esta población.

Respecto a los métodos de identificación de microorganismos periodontopatogénicos no se debe olvidar la importancia de los medios de cultivo, el cual es menos sensible y específico pero es el método más utilizado en el estudio de esta patología⁽⁵⁾. Aunque sería muy interesante comparar este método de cultivo con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, por su alta sensibilidad y especificidad debido a que en muchas ocasiones por cultivo se pasa por desapercibidos muchos microorganismos de importancia clínica. Aunque ninguno de los dos métodos es suficientemente sólido, sería bueno unir

las 2 técnicas sobre todo en estudios de esta tipo para lograr obtener resultados más confiables y seguros.

8. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta que el tamaño de la muestra fue muy pequeño y por ende no permitió obtener una frecuencia viable de *P. gingivalis* y *P. intermedia*. Pero de igual manera se puede decir que el periodontopatogenos que más se aisló en esta población fue *P. gingivalis*, indicando que la población Colombia con esta patología presenta altos niveles de frecuencia en esta especie, según estudios realizados anteriormente en Colombia. Con relación a la diferencia de la frecuencia de estos periodontopatogenos en diferentes estudios, se puede concluir que esta variación puede ser por múltiples factores, como el tamaño de la muestra, los sitios periodontales estudiados y los métodos de cultivo y de identificación utilizados. Por esta razón es necesario crea un workshop para que todos los estudios periodontales de este tipo sean realizados bajo los mismos parámetros y de esta manera poder obtener datos más confiables, y así, si se podría afirmar que estas bacterias varían con relación a la frecuencia de una población a otra.

9. BIBLIOGRAFÍA.

1. Ramírez J, Contreras A. Is periodontal disease a public health issue in Colombia? Colomb Med 2007; 38,3: 181-182.
2. Ardila C, Arbeláez M, Guzmán ZI. Subgingival microbiological profile of patients with chronic periodontitis in a population of Colombia. Avances en Periodoncia. 2012;24,1: 47-53.
3. GarcíaConde -G, Espinosa I, Martínez-Arroniz F, Huerta-Herrera N, Islas-Márquez A, Medina-solis C. Periodontal treatment needs in adults from Mixteca rural area in Puebla State, Mexico. Salud pública 2010;12,4:647-657.
4. Guilarte C, Perrone M. Detección de especies de bacilos anaerobios gram negativos en pacientes con periodontitis crónica. Acta odontologica Venezolana.2007;45,1.
5. Mayorga I, Lafaurie G, Contreras A, Castillo D, Baron A, Aya M. Microflora subgingival en periodontitis crónica y agresiva en Bogotá, Colombia: un acercamiento epidemiológico. Biomédica.2007;27, 1: 21-33.
6. Dias A, Vivas R, Puertas L, Ahumado M, Cabrales R, Herrera A, Simancas M. Periodontitis, *Porphyromonas gingivalis* and its relation to quorum sensing expression. Cuban of stomatology.2010;47,4:404-416.
7. Diaz J, Yañez J, Melgar S, Alvares C, Rojas C, Vernal A. Virulence and variability on *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and their association to periodontitis. Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral. 2012;5,1:40-45.
8. Godoy C, Melej C, Silva N. Measurement of quantitative changes of the microbiota subgingival after to removal of bacterial plaque supragingival. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral. 2010;3,1:5-10
9. Botero A, Alvear F, Vélez M, Botero L, Velásquez H. Evaluation of the therapeutic approach of various types of periodontal disease. Part III: Enterobacteriaceae enteric rods and yeast species. Fac Odontol Univ Antioq 2008;20,1:72-86.
10. Alcaldía Mayor de Bogotá D.C. Secretaria de salud de Bogotá. Salud oral ,grupo de salud oral .2011

11. Matezan P, Matos R, Bascones A. Enfermedades gingivales: una revision de la literatura. Av Periodon Implantol. 2008;20, 1: 11-25.
12. Guiliarte C, Parrone M. Microorganismos de la placa dental relacionados con la etiologia de la periontitis. Acta odontol. Venez 2004;42,3:213-217.
13. Ignacio P ,Gajardo M, Pavez V, Montenegro G, Pizarro R, (2006).Actividad Biocida de un propolis chileno frente a *Prophyromonas gingivalis*: Estudio in vitro.Tesis(cirujano dentista)Santiago – Chile. Universidad de Chile.
14. National Institute of Dental and Craniofacial Research National Oral Health Information Clearinghouse.Enfermedad de las encias o enfermedad periodontal. Causas, sintomas y tratamiento.2004.
15. Macin S, Sanz M, Castrillon L, (2010).Tratamiento periodontal no quirúrgico en pacientes con gingivitis y periodontitis moderada.Tesis.(Odontologia) Madrid. Universidad Complutense de Madrid.
16. Escudero N, Perea M, Bascones A.Chronic periodontitis review. Evolution and clinic application.Avances en Periodoncia.2008;20,1:27-37.
17. Ramos D, Moromi H, Martínez E. *Porphyromonas gingivalis*:Patógeno importante en la periodontitis cronica.Odontol Sanmarquina 2011;14,1:34-38.
18. Ardila C, Álzate J, Guzmán I. Association of Aggregatibacter actinomycetemcomitans and red complex microorganisms with clinical parameters of patients with chronic periodontitis.AMC. 2010;14,3: 0-0.
19. Guilarte C,Perrone M. Bacterias Periodontopatogenas: bacilos anaerobios gram negativos como agente etiologico de las enfermedades periodontales. Acta Odontologica Venezolona.2003;43,2.
20. Bascones A, Caballero A. *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas Gingivales* como principales patógenos periodontales. Avances en Periodoncia. 2000;12,2:69-75.
21. Cabrera M, Martinez E. (2004).Estudio microbiologico de la bacteria *Prevotella intermedia* en el surco gingival de gestantes condiferentes grados de placa bacteriana- hospital nacional docente madres -niño San Bartolome.Tesis (Odontologia) Lima Peru. Universiada Nacional mayor de san marcos.

22. Buduneli N, Kinane D. Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*.2011;38:85-105.

TABLA DE IDENTIFICACION DE ESPECIES ANAEROBIAS DE PACIENTES CON GINGIVITIS.

Nº Mx	Nº colonia			Tensi on de Gram	fluor esce ncia	Morfología de colonias			Bioquímica														Microorganismo	% bioquímico		
	Mx (A) Nº colonia	Dil (B) 10 ⁻¹ Nº colonia	Dil (C) 10 ⁻² Nº colonia			Color	Aspect o	Forma	U R E	B L T S	α A R A	O N P G	β G L U	α G A L	α F U C	N A G 4	P O Y	L G Y	P R O	P A L	A R G	S E R			P I N D	
4		11		b-	si	transpa rente	cremo sa	Redonda Plana chiquita	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>Fusobacterium varium</i>	99.9 %
5		1		cb-	leve	transpa rente	cremo sa	Redonda Plana chiquita	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	<i>Fusobacterium varium</i>	99.9 %		
14		1		b-	si	Café amarill o	cremo sa	Redonda convexa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	93.48 %		
16		1		cb-	no	Café amarill o	cremo sa	Redonda pequeña	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	<i>Campylobacter gracilis</i>	99.99%		
17	1			cb-	no	Café amarill o	cremo sa	Redonda pequeña	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	<i>Campylobacter gracilis</i>	99.99%		
18	3,4,8			b-		Gris	cremo sa	pequena	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	<i>Prevotella disiens</i>	99.99%		
19	1			b-		Gris	cremo sa	pequena	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	<i>Prevotella disiens</i>	99.99%		