

Myriam Lucrecia Medina*,
 Marcelo Gabriel Medina**,
 Luis Antonio Merino**.

Identificación de bacterias periodontopatógenas mediante métodos diagnósticos moleculares

Identification of periodontal pathogen bacteria using molecular diagnostic methods

Fecha de aceptación: junio 2010

Resumen

Aunque en la enfermedad periodontal no está demostrada una relación causa-efecto directa entre bacterias específicas y enfermedad, es sabido que las bacterias juegan un papel importante en la iniciación y perpetuidad del proceso de inflamación. Es por ello que su identificación se hace necesaria para definir la etiología e instaurar el tratamiento adecuado. La aplicación de métodos moleculares para la identificación de patógenos periodontales, siempre en estrecha relación con otros métodos empleados para el diagnóstico de la enfermedad periodontal, posibilita un mejor manejo y seguimiento de los pacientes. Ningún tratamiento único será eficaz para todos los individuos, por lo que las pruebas microbiológicas deberán conseguir la eficacia terapéutica de acuerdo al perfil microbiano específico del paciente. Así, los dentistas tratan de lograr una estabilidad clínica prolongada con tratamientos específicos dirigidos a los microorganismos directamente involucrados en los procesos infecciosos, sobre todo cuando los agentes patógenos están incrustados en las biopelículas. Las técnicas de biología molecular se basan en la aplicación de métodos para la detección e identificación de microorganismos de la biopelícula supra y subgingival. El diagnóstico molecular ha demostrado ser seguro, rápido, reproducible y discriminatorio, siempre que las técnicas utilizadas hayan sido cuidadosamente estandarizadas y controladas.

Palabras clave: *técnicas moleculares, patógenos periodontales*.

Abstract

Although in the periodontal disease a direct relationship between specific bacteria and disease is not demonstrated, it is known that bacteria play an important role in the initiation and perpetuation of the inflammatory process. That is why a correct identification is needed to define the etiology and apply an appropriate therapy. The application of molecular methods for identification of periodontal pathogens enables a better management and monitoring of patients, always in close relation with other methods used for diagnosis of periodontal disease. No single treatment is effective for all individuals, so that microbiological tests should be performed in order to achieve therapeutic efficacy according to patient-specific microbial profile; thus, dentists seek to achieve a prolonged clinical stability with specific treatments targeted on microorganisms directly involved in infectious processes, especially when pathogens are embedded in the biofilms. Molecular biology techniques are based on the application of methods for detection and identification of microorganisms in the supra and subgingival biofilm. Molecular diagnostics has proven to be safe, fast, reproducible, and discriminatory if the methodologies are carefully standardized and controlled.

Keywords: *Molecular techniques, periodontal pathogens*

*Facultad de Odontología;

** Facultad de Medicina. Universidad Nacional del Nordeste.

Corrientes, Argentina.

Correspondencia:

Luis A. Merino

Profesor Titular de Microbiología e Inmunología en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina. San Lorenzo 534. Resistencia.

Chaco. C.P. 3.500

E-mail: lamerino@gigared.com

Introducción

Durante años, el diagnóstico de la enfermedad periodontal se ha basado en las mediciones clínicas y radiográficas. Los parámetros de evaluación como: inflamación de los tejidos, profundidad del surco gingival y evidencias radiográficas de pérdida de hueso alveolar, permanecen como bases en el diagnóstico clínico de la enfermedad.¹

Algunos autores definen a la periodontitis como un proceso infeccioso relacionado con la acumulación de placa dentobacteriana y con la presencia de microorganismos patógenos, siendo las bacterias anaerobias las más involucradas.^{2,4} Se han realizado diferentes estudios con el objetivo de mejorar las técnicas para cultivar, reconocer y enumerar dichos patógenos; así, se encontró que había microorganismos específicos en la placa subgingival de pacientes con periodontitis, diferentes a los microorganismos de la placa subgingival de pacientes periodontalmente sanos.⁵ Adicionalmente, se determinó que las infecciones son polimicrobianas, dominadas por especies de bacilos anaerobios, para lo que se han desarrollado técnicas microbiológicas especiales con el fin de identificar el limitado número de bacterias específicas que se encuentran en la placa dental subgingival de pacientes con la enfermedad.³ Hasta ahora se considera que la mayoría de las especies bacterianas implicadas en las diversas formas de periodontitis son saprófitos comunes de la cavidad oral, que sólo expresan su capacidad patógena en huéspedes genéticamente susceptibles y/o cuando se producen determinadas circunstancias exógenas de riesgo; es decir, que si bien en la enfermedad periodontal no está demostrada una relación directa causa-efecto entre bacterias específicas y enfermedad, las bacterias son importantes, aunque insuficientes, para el desarrollo de ésta.

Se han establecido tres categorías de estas especies consideradas "marcadores de periodontitis": las muy patógenas, como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia* (previamente denominada *Bacteroides forsythus*); las patógenas, como *Prevotella intermedia* y *Treponema denticola*; y las menos patógenas, como *Fusobacterium nucleatum* y *Campylobacter rectus*.

Teniendo en cuenta el papel que juegan las bacterias en la iniciación y perpetuidad del proceso de inflamación, su identificación se hace necesaria para definir la etiología e instaurar un tratamiento adecuado.^{3,5}

Métodos moleculares

Los métodos que utilizan fragmentos de ADN para la detección de periodontopatógenos son pruebas rápidas, sensibles y específicas, en comparación con los que utilizan medios de cultivo. Sin embargo, de acuerdo a la revisión, se encuentran disponibles sólo para unos cuantos patógenos, no permiten conocer la sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos y requieren de equipos muy costosos, por lo que se utilizan principalmente en laboratorios especializados de investigación.⁶

La aplicación de métodos de laboratorio para la identificación de patógenos periodontales, siempre en estrecha relación con otros métodos empleados para el diagnóstico

de la enfermedad periodontal, posibilita un mejor manejo y seguimiento de los pacientes. Ningún tratamiento único será eficaz para todos los individuos, por lo que las pruebas microbiológicas deberán conseguir la eficacia terapéutica de acuerdo al perfil microbiano específico del paciente para lograr una estabilidad clínica prolongada.⁷

El diagnóstico microbiológico es una valiosa herramienta en el tratamiento de la periodontitis ya que la composición de la flora subgingival y los niveles de especies patógenas difieren entre individuos así como de un sitio a otro. Es necesario conseguir tratamientos específicos dirigidos a los microorganismos implicados directamente en los diferentes procesos y a su resistencia fenotípica cuando están integrados en los biofilms. Las técnicas de biología molecular se basan en la aplicación de métodos de análisis genéticos para la detección e identificación de microorganismos de la biopelícula supra y subgingival. Por medio del análisis del material genético único (DNA o ARN) de los microorganismos, es posible distinguir e identificar cepas con base en las diferencias de sus genotipos. El diagnóstico molecular ha demostrado ser seguro, rápido, reproducible y discriminitorio, siempre que las técnicas hayan sido cuidadosamente estandarizadas y controladas. La mayor ventaja de estas pruebas es que no utilizan microorganismos vivos.⁸

Toma de la muestra⁸

El primer paso para realizar un diagnóstico molecular es la obtención y preparación de las muestras. La detección e identificación de los microorganismos se puede realizar en sangre, saliva, líquido crevicular, placa dental y mucosa oral.

Deben emplearse condiciones que garanticen la calidad de la muestra: recolección, conservación y transporte.

Puede partirse de cultivos puros de microorganismos, si el objetivo es la identificación o caracterización del aislamiento, o su comparación genética.

Para la toma de la muestra microbiológica se procede igual que para la toma de muestra para cultivo, pero las puntas se colocan en un tubo Eppendorf de plástico que contiene Buffer, se mantiene a -70°C para luego ser enviada al laboratorio.

Procesamiento de la muestra

En líneas generales el procedimiento debe incluir:⁸

- Liberar el ácido nucleico del organismo de estudio, a partir de la ruptura enzimática o mecánica de la pared celular, purificación del material genético mediante tratamiento con cloroformo, fenol y etanol, proteinasa K y eventualmente RNasa.
- Prevenir la degradación del material genético liberado.
- Eliminar cualquier sustancia inhibitoria de la técnica molecular a utilizar. La presencia de inhibidores de ADN polimerasa, enzima empleada en algunas de estas reacciones, debe ser considerada en la preparación de la muestra y los procedimientos deben involucrar pasos que permitan remover o neutralizar sus potenciales inhibidores.

Cuadro 1
Resumen de las principales características
y aplicaciones de las técnicas moleculares

Técnica	Características y aplicaciones
PCR	Amplificación en cadena de la polimerasa. Alta sensibilidad y especificidad. El producto final de esta reacción exponencial es un ácido nucleico de doble cadena que puede ser analizado en tamaño, secuencia y cantidad o servir para otras técnicas moleculares. Se utiliza para la búsqueda de material genético de un agente infeccioso en una muestra clínica y para la identificación de aislamientos.
PCR tiempo real	La PCR a tiempo real es una variante de la PCR convencional que se emplea para la cuantificación de ácidos nucleicos, tanto de ADN como de ARN mensajero en una muestra. Permite cuantificar proporciones de <i>P. gingivalis</i> , <i>P. intermedia</i> y <i>A. actinomycetemcomitans</i> , y debido a su gran rapidez y sensibilidad son de gran utilidad en los estudios epidemiológicos. La presencia o ausencia de la bacteria puede ser insuficiente para evaluar los efectos terapéuticos de algún tratamiento, por lo que la cuantificación de los niveles o proporciones de las especies en el biofilm proporciona un mejor resultado.
PCR aleatoria	Esta técnica es similar a la PCR, pero utiliza cebadores (primers) aleatorios. La amplificación aleatoria del ADN se utiliza para desarrollar marcadores genéticos en distintas especies y para discriminar entre variedades y aislamientos de microorganismos patógenos. Constituye una herramienta epidemiológica para la investigación de fuentes de infección o vías de transmisión.
Southern Blot	Transferencia de fragmentos de ADN originados por endonucleasas de restricción y posterior hibridación con una sonda marcada. Permite la comparación de patrones genéticos.
Dot Blot	Técnicas de hibridación. Detección cualitativa de un agente infeccioso en muestras de sangre, heces, esputos, etcétera.
Sondas	Las muestras subgingivales son sometidas a la digestión enzimática del ADN bacteriano, estos fragmentos desconocidos son expuestos a sondas marcadas complementarias y bajo determinadas condiciones de temperatura e ionización, se permite su hibridación en un sustrato de nitrocelulosa. El ADN puede ser detectado por radiomarcado o reacción calorimétrica. Las sondas de ADN permiten identificar secuencias de nucleótidos específicos para especies bacterianas concretas. Permiten detectar bacterias específicas de la placa subgingival en niveles de 10^3 . Esta técnica se utiliza para identificar de forma rápida las especies de micobacterias aisladas.
Microarrays	Es una nueva técnica que combina el método molecular de la hibridación con sondas de ADN, con la tecnología de los biochips o chip microelectrónico. Un array es un conjunto de sondas moleculares fijadas en forma ordenada a un soporte sólido, que pueden llegar a ser de hasta más de 100 000 sondas, lo que supone posibilidades casi infinitas de detección simultánea de diferentes genes, ya sea de un solo microorganismo o de numerosas especies. Esta tecnología permite identificar no sólo los posibles patógenos implicados, sino también conocer sus características de patogenicidad, epidemiológicas y de resistencia a los antimicrobianos.
Secuenciación	Interrupción controlada de la síntesis de una hebra complementaria durante una replicación <i>in vitro</i> . Se utiliza para relacionar filogenéticamente aislamientos microbianos. Detección y caracterización de secuencias de ADN por su tamaño en muestras clínicas o en aislamientos. Se emplea para: bacterias no cultivables presentes en muestras clínicas, bacterias cuyas características bioquímicas no se adaptan a las de ningún género o especie reconocida, bacterias fastidiosas por sus requerimientos nutricionales o su crecimiento lento. Actualmente, se usa para la detección de las principales especies periodontopatógenas.
Análisis proteómico	Esta técnica ofrece el perfil de proteínas totales de una célula o un microorganismo. Como método de estudio de la Proteómica se usa la electroforesis en gel bidireccional para separar las proteínas, identificándose las mismas mediante espectrometría de masas.
Cariotipificación	Separación electroforética de cromosomas. Utilizada como arma epidemiológica para comparar genéticamente cepas pertenecientes a una misma especie o a diferentes especies. Utilidad en epidemiología molecular.
Restricción (FRLP)	Digestión del material genético con enzimas de restricción. Utilizada para generar patrones electroforéticos de aislamientos pertenecientes a una misma especie o a especies diferentes. Utilidad en epidemiología molecular.

Electroforesis

Su aplicación más común es la separación de fragmentos de ADN de doble cadena. Se basa en la capacidad de iones y macromoléculas cargadas para desplazarse en un campo eléctrico con velocidad proporcional a su carga e inversamente proporcional a su tamaño. Para analizar fragmentos de ácidos nucleicos de doble cadena de hasta 20 kpb a pH neutro, pueden emplearse, como soporte o matriz, geles de agarosa en concentraciones entre 0.8 y 2%; y para fragmentos de menor tamaño, geles de poliacrilamida.

La solución tampón o buffer de electroforesis es imprescindible para favorecer una conductividad adecuada en el medio. Las soluciones más comúnmente empleadas son: tris-acetato-EDTA (TAE) y tris-borato-EDTA (TBE). En estas condiciones la molécula cargada negativamente se dirige hacia el ánodo positivo.

Las características mecánicas de estos geles hacen aconsejable la realización de la electroforesis en forma horizontal y submarina. La muestra se aplica en pocillos practicados dentro del gel y el avance del frente de electroforesis se sigue con colorantes, como azul de bromofenol y xileno cianol, añadidos a la muestra. Los geles de agarosa, teñidos a la muestra con bromuro de etidio, son una opción para el análisis de ADN.

El bromuro de etidio es un agente intercalante, su fluorescencia naranja, al observarse con luz UV, aumenta cuando se une al ADN. Una forma de determinar el peso molecular de los fragmentos de ADN es compararlos con un patrón de peso molecular en el mismo gel de corrida.⁸

Electroforesis en campo pulsante

Esta técnica se basa en la separación electroforética de grandes moléculas de ADN inmersas en gel de agarosa alternando la orientación del campo eléctrico. Es útil para resolver fragmentos de ADN de longitudes superiores a 20-40 kpb en geles de agarosa a 1%. El cambio periódico de orientación del campo eléctrico aplicado logra que las grandes moléculas avancen en conformación extendida a través del soporte de agarosa. La separación de cromosomas o cariotipificación que se realiza con esta metodología se emplea no solamente para comparar genéticamente cepas pertenecientes a una misma especie, sino también para diferenciar cepas pertenecientes a especies distintas. Como arma epidemiológica proporciona resultados comparables a otras técnicas, pero requiere una preparación más elaborada de la muestra y de equipo especializado.⁸

En los últimos años, se han empleado métodos moleculares para la detección de periodontopatógenos, a través de fragmentos específicos de ADN de las bacterias, en numerosos estudios. Estas pruebas incluyen: técnicas de amplificación, técnicas de hibridación de sondas de ADN, secuenciación del ARNr 16S, análisis proteómico y análisis de endonucleasas de restricción (cuadro 1).⁹⁻¹¹

Métodos de análisis del ADN bacteriano:

- a. Técnicas de amplificación
 - 1. PCR (copia de secuencias de ADN diana)
 - 2. PCR cuantitativa o a tiempo real
 - 3. Amplificación aleatoria
- b. Técnicas de hibridación

4. Sondas (ácidos nucleicos de microorganismos, diana)

- 5. Microarrays (sondas de ADN en biochips)
- c. Secuenciación del ARNr 16S
- d. Análisis proteómico
- e. Digestión del ADN utilizando enzimas de restricción
- a. Técnicas de amplificación

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Esta técnica se basa en sintetizar grandes cantidades de ADN *in vitro* de manera similar a como la célula lo realiza *in vivo*.⁸

Una reacción típica incluye como reactivos: la molécula de ADN de doble cadena o templado; una polimerasa termoestable (Taq); dos oligonucleótidos iniciadores o primers; una mezcla de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP); buffer de reacción, y magnesio. La reacción se efectúa en un aparato llamado termociclador, el cual permite cambios de temperatura en tiempos ínfimos. Esta técnica consta de las siguientes etapas:

- a. Desnaturalización o separación de las cadenas de doble hélice, del ácido nucleico por calentamiento a 90-95°C
- b. Annealing o hibridación. Se enfria la mezcla disminuyendo la temperatura a 40-60°C, y las cadenas sencillas se hibridan con los cebadores
- c. Extensión. Se eleva de nuevo la temperatura a 70-75°C y la polimerasa se comienza a extender a partir de los cebadores, usando como molde la cadena sencilla de ADN original, obteniéndose al final una cadena complementaria inicial

Los productos de cada ciclo se utilizan como moldes para el siguiente, por lo que el número de copias de ADN se duplica cada vez. Esto lo hace uno de los métodos con mayor sensibilidad y de los más eficaces hoy en cuanto a diagnóstico periodontal ya que es relativamente simple, rápido y capaz de detectar un solo microorganismo.

La PCR ha demostrado ser superior al cultivo en términos de sensibilidad, especificidad y eficiencia, lo cual es de gran interés para la detección de microorganismos específicos en estudios epidemiológicos a gran escala.^{7,13} No obstante, pueden producirse reacciones falsas positivas o negativas, por lo cual resulta indispensable efectuar controles durante su ejecución.⁸ Los mayores inconvenientes de la PCR son su capacidad para identificar serotipos y su susceptibilidad frente a antibióticos, por lo que posiblemente no sea la técnica ideal para monitorizar clínicamente los resultados de la terapia periodontal.^{13,14}

Los factores que pueden alterar la eficacia y especificidad de la PCR incluyen: concentración de polimerasa y magnesio; concentración y pureza de ADN y primer; temperaturas de desnaturización, annealing y extensión; así como el número de ciclos empleados.⁸

PCR cuantitativa o a tiempo real

La técnica de PCR se utiliza en la detección de las principales bacterias periodontopatógenas. Sin embargo, presenta limitaciones para cuantificar las proporciones en que se presentan cada una de ellas en las muestras recogidas.⁸ En la actualidad este inconveniente se ha subsanado

mediante aplicación de la PCR cuantitativa o PCR a tiempo real, que permiten medir *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *A. Actinomycetemcomitans*; además de ser de gran utilidad en los estudios epidemiológicos debido a su gran rapidez y sensibilidad.⁷

La PCR a tiempo real es una variante de la PCR convencional que se emplea para la cuantificación de ácidos nucleicos, tanto de ADN como de ARN mensajero en una muestra; con ella se puede monitorizar el progreso de la PCR mientras ésta sucede. De este modo, los resultados son obtenidos a lo largo del proceso mucho antes de que termine, y no requiere de un análisis una vez finalizado.⁷

La PCR cuantitativa lleva los mismos reactivos que la PCR a tiempo final, más una sonda marcada con un fluorocromo, que en un termociclador equipado con sensores para detectar la fluorescencia emitida tras excitar el fluorocromo a la longitud de onda apropiada, permite ver la dinámica de las curvas de amplificación mediante un programa informático del propio termociclador de QPCR. La emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN que se va generando, permitiendo conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Así, el análisis de los datos y la cuantificación del producto se realizan en la fase exponencial de la PCR, donde exactamente el doble del producto se acumula en cada ciclo (precisamente cuando los componentes de la reacción aún no se han consumido). La reacción de PCR en la fase exponencial es muy específica y precisa lo que la diferencia de lo que sucede en la fase lineal y de saturación que es donde se analizan los productos de la PCR cualitativa en geles de agarosa con tinción de bromuro de etidio.

En la PCR a tiempo real se emplean dos tipos de sistemas de detección por fluorescencia: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos diseñadas de manera especial. Los agentes intercalantes son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a una molécula de ADN de doble hélice. El más empleado es el SYBR Green I. La fluorescencia emitida se incrementa de modo proporcional al ADN que se forma en cada ciclo de PCR. Este sistema tiene la ventaja de ser más barato que las sondas específicas; sin embargo, tiene como inconveniente su baja especificidad, puesto que se unen de manera indistinta a productos que se pueden generar inespecíficamente o a dímeros de los propios oligocebadores de la reacción.

Las sondas de hibridación específicas son sondas (pequeños cebadores) marcadas con dos tipos de fluorocromos: un donador y un acceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, también conocidas como sondas Taq-Man. Gracias a la alta especificidad de los cebadores y las sondas TaqMan es posible distinguir el patógeno de estudio entre las especies filogenéticamente más relacionadas en la cavidad bucal, por lo que su uso es el más extendido en la cuantificación de bacterias. Las sondas TaqMan son oligocebadores marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un acceptor o apantallador en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador.¹⁴ Esto ocurre mien-

tras las moléculas donadora y aceptadora están próximas, debido a que el espectro de emisión del primero se solapa con el espectro de absorción del segundo.

Durante la amplificación del ADN diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. De este modo, al estar separados el fluorocromo del apantallador (quencher) se incrementa la señal fluorescente del primero, la cual es captada por el lector del termociclador.

En los termocicladores de QPCR el programa informático va registrando el incremento de fluorescencia que es proporcional al incremento del ácido nucleico en cada ciclo, y esta información se refleja gráficamente en curvas de cinética de la reacción o de amplificación (amplificación Plot). Así, es posible registrar la amplificación en los primeros ciclos de la reacción, cuando la concentración de los reactivos todavía no es limitante y el efecto de la variabilidad en la eficiencia de amplificación es menos importante.¹⁵

El análisis cuantitativo de los datos se traduce en la evaluación de las curvas de cinética de la reacción, en las que se representa la fluorescencia detectada versus el número de ciclos de PCR. Para cada muestra el número de ciclos necesarios para interceptar el valor umbral se llama "ciclo umbral" o "threshold cycle (C_t)". Éste es inversamente proporcional al número de copias iniciales del ADN muestra. Por tanto, cuando realizamos una cuantificación absoluta y representamos gráficamente el logaritmo de la cantidad inicial de ADN de estándares de concentración conocida versus el ciclo umbral, el resultado es una línea recta. Se pueden analizar diferentes diluciones decimales del mismo estándar, preferentemente en triplicado, de esta manera construiremos una recta patrón para luego determinar la cantidad de ADN de cualquier muestra problema. Otro método es la cuantificación relativa que nos permite determinar cuántas veces (más o menos) de ácido nucleico de una muestra hay con respecto a un tejido o muestra de referencia; así, los resultados son expresados de manera relativa y no se necesita de una curva de calibración.⁷

La presencia o ausencia de la bacteria puede ser insuficiente para evaluar los efectos terapéuticos de algún tratamiento, por lo que la cuantificación de los niveles o proporciones de las especies en el biofilm proporciona un mejor resultado. La ventaja de cuantificar las concentraciones de las especies sobre la información acerca de su presencia o ausencia ha sido evidenciada por los autores. Con el empleo de la PCR a tiempo real y utilizando una sola copia de los genes por célula se puede medir una buena correlación entre la señal fluorescente y el número de células. Cabe señalar que uno de los principales inconvenientes de la QPCR es el coste que conlleva, sobre todo cuando se utilizan sondas TaqMan, ya que requiere la síntesis de diferentes secuencias.⁷

Amplificación aleatoria

La amplificación aleatoria del ADN se utiliza para desarrollar marcadores genéticos en distintas especies y para discriminar entre variedades y aislamientos de microorganismos patógenos. El fundamento de esta técnica es similar al de

la PCR, pero utiliza cebadores (primers) aleatorios que son secuencias de oligonucleótido de no más de 10 pb para la amplificación arbitraria del ADN.

No se busca ningún fragmento específico ya que el cebador se hibrida al azar. Es decir, en secuencias complementarias de ubicación desconocida. Los fragmentos de ADN generados se separan y detectan mediante electroforesis en gel de agarosa. La elección de un cebador adecuado posibilita la obtención de patrones de bandas, cuya comparación constituye una herramienta epidemiológica para la investigación de fuentes de infección o vías de transmisión. El número de fragmentos, la intensidad de amplificación y la reproductibilidad de los resultados dependen tanto de las condiciones de amplificación como de los componentes de la mezcla de reacción.⁸

Técnicas de hibridación

La formación de moléculas de doble cadena, cuyas hebras tienen distinto origen, recibe el nombre de hibridación. Esta técnica puede ser utilizada para demostrar la relación genética de diferentes aislamientos; en el diagnóstico microbiológico para la identificación y la confirmación de cultivos; o bien para la detección de microorganismos en materiales clínicos. Estos métodos altamente específicos son más sensibles cuando son utilizados junto con técnicas de amplificación.

Se trata de la formación de híbridos entre ADN y ARN o entre un ácido nucleico y un oligonucleótido natural o sintético, siempre que las secuencias sean total o parcialmente complementarias. Estos ensayos requieren de dos elementos básicos:⁸

- Secuencia diana de ácido nucleico
- Sonda: (un fragmento corto de ácido nucleico, de secuencia conocida y complementaria a la secuencia diana)

Las sondas son capaces de unirse o hibridarse con alta especificidad a secuencias complementarias de ácidos nucleicos, cuyas hebras han sido previamente separadas mediante desnaturización térmica. A su vez están marcadas con:

- Enzimas (fosfatasa alcalina o peroxidasa)
- Sustancias quimioluminiscentes
- Radioisótopos

Es posible encontrar métodos para la marcación de ácidos nucleicos disponibles comercialmente, como el caso de la marcación con biotina o digoxigenina.

Los ensayos de hibridación pueden clasificarse en:

- Hibridación en fase líquida:** emplea muestra de ADN o ARN en disolución, al igual que la sonda
- Hibridación en soporte sólido (*Dot blot* y *Southern blot*):** permite procesar varias muestras simultáneamente. Mediante la hibridación de ADN se hace una detección cualitativa del agente infeccioso en una muestra en estudio. Emplea un soporte sólido como membranas o filtros de nylon o nitrocelulosa.

La muestra se aplica gota a gota (*Dot blot*) sobre el filtro

- Hibridación *in situ*:** emplea los mismos principios aunque se realiza sobre el tejido infectado (biopsia). Una variante es la técnica *Southern blot*, la cual permite determinar el peso molecular de fragmentos de restricción separados por tamaños utilizando electroforesis en gel. Dicha separación electroforética es transferida a un soporte sólido o filtro para su hibridación con la sonda marcada

Sondas de ADN

Las sondas de ADN permiten identificar secuencias de nucleótidos específicos para especies bacterianas concretas. Son relativamente baratas y con ellas se pueden detectar bacterias específicas de la placa subgingival en niveles de 10.^{3,16}

Las muestras subgingivales son sometidas a la digestión enzimática del ADN bacteriano; los fragmentos desconocidos son expuestos a sondas marcadas complementarias y bajo determinadas condiciones de temperatura e ionización, se permite su hibridación en un sustrato de nitrocelulosa. El ADN puede ser detectado por radiomarcado o reacción calorimétrica y las pruebas detectan tanto la presencia como el número aproximado de bacterias.¹⁷

Existen distintos tipos de sondas en función de su empleo: ADN de ARN,¹⁸ secuencias de oligonucleótidos sintéticos que se hibridan con ácidos nucleicos de las bacterias diana. Para saber si existe un determinado microorganismo en una muestra, la pondremos en contacto con la sonda, y de existir ese microorganismo buscado, se producirá la hibridación entre la sonda y la diana.¹⁹

Esta técnica se utiliza para identificar de forma rápida las especies de micobacterias aisladas. Entre las desventajas se encuentran: la imposibilidad para identificar determinados patógenos, ya que existe número limitado de sondas disponibles; y que no dan información sobre la susceptibilidad de las bacterias frente a los distintos antibióticos, ya que se trabaja con bacterias no viables.²⁰

Microarrays

Es una nueva técnica que combina el método molecular de la hibridación utilizando sondas de ADN, con la tecnología de los biochips o chip microelectrónico. Un array es un conjunto de sondas moleculares fijadas en forma ordenada a un soporte sólido, que pueden llegar a ser de hasta más de 100 000 sondas, lo que supone posibilidades casi infinitas de detección simultánea de diferentes genes, ya sea de un solo microorganismo o de numerosas especies. Esta tecnología permite identificar no sólo los posibles patógenos implicados, sino también conocer sus características de patogenicidad, epidemiológicas y de resistencia a los antimicrobianos.

Secuenciación del ARNr 16S

El análisis de los ácidos nucleicos mediante la secuenciación permite relacionar filogenéticamente aislamientos microbianos.

Los métodos para secuenciar ácidos nucleicos son el químico y el enzimático. Ambos utilizan fragmentos del ADN original digeridos con enzimas de restricción. El ADN es marcado en forma radioactiva o con compuestos fluorescentes y

los fragmentos son separados mediante electroforesis. Frequentemente las muestras se amplifican en primera instancia mediante la técnica de PCR a fin de disponer de suficiente cantidad para secuenciar. El método enzimático recurre a la interrupción controlada de la síntesis de una hebra complementaria durante una replicación *in vitro*, catalizada por una ADN polimerasa. Este procedimiento emplea un cebador que es un oligonucleótido diseñado el cual se hibrida a la región a secuenciar.

La principal característica del método de secuenciación es el uso de didesoxinucleótidos que provocan la detención de la reacción de síntesis de ADN.⁸ Basado en el análisis del ARNr 16S (o del gen que lo codifica), permite la identificación molecular. La macromolécula presenta una serie de características con base en las cuales fue considerado un cronómetro molecular definitivo:

- a. Se trata de una molécula presente en todas las bacterias actuales. Constituye una diana universal para su identificación
- b. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios
- c. Los ARNr 16S contienen suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los próximos
- d. Resulta fácil secuenciar los ARNr 16S
- e. Una vez determinada la secuencia de nucleótidos se establecen comparaciones con las bases de datos de secuencias de especies ya conocidas. Será el grado de similitud entre secuencias de los ARNr 16S de las dos bacterias lo que indique su relación evolutiva
- f. La identificación basada en la secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S se centra en los siguientes casos:
 1. Bacterias no cultivables presentes en muestras clínicas
 2. Bacterias cuyas características bioquímicas no se adaptan a las de ningún género o especie reconocida

3. Bacterias fastidiosas por sus requerimientos nutricionales o su crecimiento lento.

La secuenciación del ARNr 16S constituye un método eficaz y rápido de identificación bacteriana. Actualmente, se usa la amplificación por PCR del ARNr 16S y su posterior hibridación con sondas para la detección de las principales especies periodontopatógenas.

Análisis proteómico

Esta técnica ofrece el perfil de proteínas totales de una célula o un microorganismo. Como método de estudio de la Proteómica se usa la electroforesis en gel bidireccional para separar las proteínas, identificándose las mismas mediante espectrometría de masas.

Digestión del ADN utilizando enzimas de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP)

La técnica conocida como polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción o RFLP permite no sólo diferenciar especies, sino también variantes genotípicas mediante el análisis de patrones de productos de la degradación del ADN utilizando enzimas. Este método básico utiliza restrictas que rompen el ADN en dianas o secuencias específicas. La molécula de ADN es digerida en diferentes sitios y da lugar a fragmentos definidos de diferentes longitudes, que dan origen a los llamados patrones de restricción, cuando son analizados por electroforesis. La técnica permite identificar cepas a partir de los fragmentos de ADN obtenidos cuando esta molécula es digerida por una enzima de restricción en particular que reconoce secuencias concretas. Los fragmentos generados al cortar el ADN con una restrictasa pueden separarse fácilmente por electroforesis en gel de agarosa. La velocidad de corrida de los fragmentos depende de la longitud de éstos: los más pequeños migran más rápido que los más grandes. Los fragmentos de restricción no sufren daños por su paso por el gel y la tinción con colorante de ADN (bromuro de etidio) los revela como una serie de bandas. Las restrictas más útiles suelen ser las que producen pocos fragmentos fáciles de separar en geles de agarosa⁸.

Bibliografía

1. Carranza F, Newman M. *Periodontología Clínica*. 8va edición. Ediciones Mc Graw-Hill Interamericana. México. 1997.
2. Marsh P, Martin M. *Oral Microbiology*. 4th edition. Wright. England. 2000.
3. Dahlén G. "Role of suspected periodontopathogens in microbiological monitoring of periodontitis". *Adv Dent Res* 1993; 7:163-164.
4. Listgarten M, Wong M, Lai C. "Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Bacteroides forsythus* in an *A. actinomycetemcomitans*-positive patient population". *J Periodontol* 1995; 66: 58-164.
5. Loesche W. "Chemotherapy of dental plaque infections". *Oral Sci Rev* 1976; 9:65.
6. Kojima T, Yasui S, Ishikawa I. "Distribution of *Porphyromonas gingivalis* in adult periodontitis patients". *J Periodontol* 1993; 64:1231-1237.
7. Frías López MC, Uria Ovando V, Carasol Campillo M. "Métodos de diagnóstico microbiológico en la enfermedad periodontal". *Cient Dent* 2009; 6:93-101.
8. Negroni M. *Microbiología Estomatológica. Fundamentos y guía práctica*. Editorial Panamericana. 1999.
9. Ali RW, Johannessen AC, Dahlén G, Socransky SS, Skaug N. "Comparison of the subgingival microbiota of periodontally healthy and diseased adults in northern Cameroon". *J Clin Periodontol* 1997; 24:830-835.
10. Tanner A, Maiden M, Zambon J, Thoren G, Kent R. "Rapid chair-side DNA probe assay of *Bacteroides forsythus* and *Porphyromonas gingivalis*". *J Periodont Res*

- 1998; 33:105-117.
11. Komiya A, Kato T, Nakagawa T, Saito A, Takahashi J, Yamada S, Okuda K. "A rapid DNA probe method for detection of *Porphyromonas gingivalis* and *actinobacillus actinomycetemcomitans*". *J Periodontol* 2000; 71:760-767.
 12. Yuan K, Hsu PC, Tseng CC, Kiang D, Wang JR. "Detection rate of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* on the permanent 1st molars of primary school children in Taiwan by polymerase chain reaction". *J Clin Periodontol* 2001; 28:348-352.
 13. Loomer P. "Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases". *Periodontol* 2000 2004; 34: 49-56.
 14. Holland PM, Abranson RD, Watson R, Gelfand DH. "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase". *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:7276-7280.
 15. Costa J. "Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real". *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22:299-305.
 16. Listgarten MA. "Microbiological testing in the diagnosis of periodontal disease". *J Periodontol* 1992; 63:332-337.
 17. Carasol M, Alández FJ, Herrera JI, Sanz M. "El diagnóstico microbiológico de las enfermedades periodontales. III Nuevas tecnologías para la detección de patógenos". *Periodoncia* 1998; 8:12-18.
 18. Di Rienzo JM, Slots J, Sixon M, Sol MA, Harmon R, Mc Koy TL. "Specific antigenic variants of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* correlate with disease and health in a regional population of families with localized juvenile periodontitis". *Infect Immun* 1994; 62:3058-3065.
 19. Shah HN, Gharbia SE, Scully C, Finegold SM. "Oligonucleotide probes to the 16S ribosomal RNA: implications of sequence homology and secondary structure with particular reference to the oral species *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*". *Oral Dis* 1995; 1:32-36.
 20. Fine DH. "Incorporating new technologies in periodontal diagnosis into training programs and patient care: A critical assessment and a plan for the future". *J Periodontol* 1992; 63:383-393.