



Identificación molecular de bacterias en salud y enfermedad periodontal

José Daniel Corona Martínez,* Elvia Pérez Soto,[§] Virginia Sánchez Monroy[§]

* Escuela Militar de Graduados de Sanidad. Centro Militar de Ciencias de la Salud. Secretaría de la Defensa Nacional, Ciudad de México.

[§] Laboratorio de Biomedicina Molecular I, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía; Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México.

^{||} Secretaría de Investigación y Postgrado, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México.

RESUMEN

El estudio de la microbiota bacteriana asociada con periodontitis es esencial para desarrollar herramientas de diagnóstico y eficacia en las terapias, por esta razón el objetivo de este estudio fue identificar bacterias asociadas con periodontitis. Nosotros amplificamos el gen 16S rARN por reacción en cadena de polimerasa (PCR) y secuenciamos para investigar y comparar muestras subgingivales obtenidas de individuos sanos y pacientes con periodontitis moderada y severa. Identificamos *Stenotrophomonas maltophilia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus* sp., *Aggregatibacter* sp. y *Prevotella intermedia*. *P. gingivalis* y *F. nucleatum* se asociaron con ambas periodontitis y *Aggregatibacter* sp. se asoció con periodontitis severa. Los resultados presentados aquí podrían contribuir en la toma de decisiones clínicas de la periodontitis.

Palabras clave: Periodontitis, PCR, secuenciación, ARN ribosomal 16S.

INTRODUCCIÓN

La periodontitis es la principal causa relacionada con la pérdida de dientes en adultos, se inicia a partir de las bolsas periodontales que forman una biopelícula polimicrobiana que interactúa con células del huésped y puede conllevar la inflamación crónica del periodonto, la destrucción del hueso alveolar, la pérdida de la masa ósea,¹⁻³ e incluso se ha asociado con varias patologías sistémicas.^{2,4}

En principio, la composición cualitativa de la microbiota oral está asociada con el estado de salud del huésped, el periodonto se mantiene sano, en gran parte debido a los numerosos mecanismos de protección del huésped que operan en la cavidad oral y la simbiosis de las bacterias comensales que inducen una respuesta inmune proporcionada a la biomasa escasa, resolviendo la inflamación;⁴ sin embargo, algunas bacterias patógenas, como las que forman parte del complejo rojo (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*), evaden el

sistema inmune y se ocasiona una respuesta inmune desregulada a causa de los factores de virulencia y los patrones moleculares asociados a daño (DAMP), lo que ocasiona la disbiosis franca patogénica e hiperinflamación por la alteración de procesos como estrés oxidativo, secreción de citocinas proinflamatorias, prostaglandinas y metaloproteinasas (MMP), eso provoca fallo en la resolución de la inflamación y la pérdida de la homeóstasis, lo que conlleva un daño al tejido conectivo, el hueso y la periodontitis crónica.^{1,4,5}

El papel que juegan la comunidad de la biopelícula polimicrobiana y la perpetuidad del proceso inflamatorio es de vital importancia,⁵⁻⁷ por lo que la identificación y clasificación bacteriana es importante para definir la microbiota en pacientes sanos y/o enfermos, lo que ayudará a instaurar un tratamiento adecuado.⁸ Dentro de las bacterias odontopatógenas involucradas en la periodontitis, se encuentra *Porphyromonas gingivalis*, que orquesta el desarrollo de la enfermedad periodontal convirtiendo una comunidad microbiana benigna en una disbiótica.⁹ Desafortunadamente, algunas de esas especies bacterianas Gram negativas, anaeróbicas subgingivales, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, son resistentes a algunos antibióticos como la clindamicina.⁷ Por ello, la eliminación mecánica habitual de todos los depósitos bacterianos de las superficies bucales no descamativas es un requisito fundamental para prevenir enfermedades.¹⁰

Por lo anteriormente expuesto, el estudio de la comunidad microbiana involucrada en la periodontitis

Recibido: 18 Abril 2018.

Acceptado: 08 Enero 2019.

© 2019 Universidad Nacional Autónoma de México, [Facultad de Odontología]. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Este artículo puede ser consultado en versión completa en <http://www.medigraphic.com/facultadodontologiaunam>

ha tenido gran avance durante los últimos años,^{4,6,10} incluyendo las técnicas de cultivos estandarizados y el desarrollo de cultivos anaeróbicos, la microscopia de fuerza atómica¹¹ y las técnicas de diagnóstico molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la pirosecuenciación y secuenciación de Sanger;^{3,10,12} esta última es una técnica de diagnóstico molecular sensible y específica que analiza la secuencia del ARN ribosómico 16S que detecta gran cantidad de especies bacterianas presentes en las muestras de pacientes sanos o enfermos.^{1,3,10,12}

El objetivo de este trabajo fue identificar bacterias asociadas con la enfermedad periodontal empleando un marcador genético para 16S de la subunidad ribosomal bacteriana.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio

El presente estudio fue realizado en las clínicas interdisciplinarias en la Unidad de Especialidades Odontológicas de la Secretaría de la Defensa Nacional, en el periodo comprendido de septiembre de 2015 a junio del 2016. El estudio incluyó a 80 pacientes entre 20 y 70 años de edad, todos los participantes autorizaron ser parte del estudio y firmaron un consentimiento informado. El Comité Institucional de Investigación y Ética de la Unidad de Especialidades Odontológicas y de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad aprobaron el protocolo de estudio y consentimiento informado. Los pacientes fueron divididos en tres grupos de estudio, dos grupos que presentaron enfermedad periodontal, clasificados con base en el diagnóstico clínico utilizando la escala de Russell, un grupo inclu-

yó 30 pacientes diagnosticados clínicamente con bolsa periodontal de 4 a 6 mm (periodontitis moderada), otro incluyó 20 pacientes diagnosticados clínicamente con bolsa periodontal ≥ 7 mm (periodontitis severa) y un grupo de 30 pacientes periodontalmente sanos (grupo control).

Examinación clínica y toma de muestra

La examinación clínica se llevó a cabo por un periodoncista calibrado, quien determinó la profundidad de las bolsas periodontales sin generar sangrado de forma espontánea, con base en la escala de Russell y empleando sonda periodontal sencilla Williams calibrada como se muestra en la *figura 1*. Una vez evaluada la profundidad de la bolsa, se tomó la muestra de las bolsas periodontales más profundas. La toma de muestra para pacientes sanos se obtuvo con un Microbrush estéril considerando la muestra suficiente de la profundidad del surco gingival. Una vez tomadas las muestras, fueron colocadas en un tubo de polipropileno con 1 mL de *buffer* de fosfatos y se almacenaron a -70 °C en el Laboratorio de Biología Molecular hasta su análisis.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- Pacientes con periodontitis, clasificados con base en los criterios del índice periodontal de Russell; es de decir, la presencia de bolsas periodontales con una profundidad de sondeo ≥ 4 mm, así como pacientes periodontalmente sanos (o que presenten bolsas periodontales).
- Pacientes derechohabientes de la Unidad de Especialidades Odontológicas.



Figura 1. Examinación clínica y toma de muestra. **A)** Exploración clínica intraoral con sonda periodontal. **B)** Toma de muestra en pacientes con bolsas periodontales. **C)** Almacenamiento de la muestra con PBS1X.

Clinical examination and sample taking. A) Intra-oral exploration with periodontal probe; B) sample collection in patients with periodontal pockets; C) sample stored in PBS1X.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- Pacientes bajo tratamiento médico con antibióticos.
- Pacientes fumadores y que presenten manifestaciones sistémicas de alguna enfermedad que podrían afectar el estado periodontal.

Extracción de ADN, amplificación de ARNr 16S, secuenciación e identificación

La extracción de ADN se realizó utilizando un kit comercial (DNeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen®). La concentración y la pureza del ADN fueron determinadas con el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). La evaluación de la integridad del ADN se realizó con la amplificación del gen β-globina. La amplificación de la ADNr 16S se llevó a cabo utilizando los cebadores universales DG74: 5' AGGAGGTGATCCAACCGCA3' y RW01 5' AACTGGAGGAA-GGTGGGGAT3',¹³ en un volumen final de 25 µL que contenía 5 µL de ADN (aproximadamente a 50 ng/µL), 0.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen), 1 mM de cada cebador, 3.75 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP y *buffer* de Taq polimerasa. La amplificación se llevó

a cabo en un termociclador Amp PCR System 9700 (*Applied Biosystems*) usando las siguientes condiciones de reacción: una desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 62 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 30 s. Finalmente, se llevó a cabo una extensión a 72 °C por 5 min. Se utilizó como control positivo de bacteria el ADN de *Helicobacter pylori* (ATCC 43504). Los amplicones se purificaron usando ExoSAP-IT (USB) y se secuenciaron con un secuenciador automático ABI PRISM 3130 (*Applied Biosystems*) usando el kit de secuencia ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 (*Applied Biosystems*). Las secuencias fueron comparadas usando la aplicación del BLAST de la base de datos GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.

Análisis estadístico

Se comparó la frecuencia de las bacterias en los grupos de estudio con la χ² y la asociación se determinó con la razón de momios utilizando el programa SPSS versión 23. El valor de p < 0.05 se consideró estadísticamente significativo para los análisis.

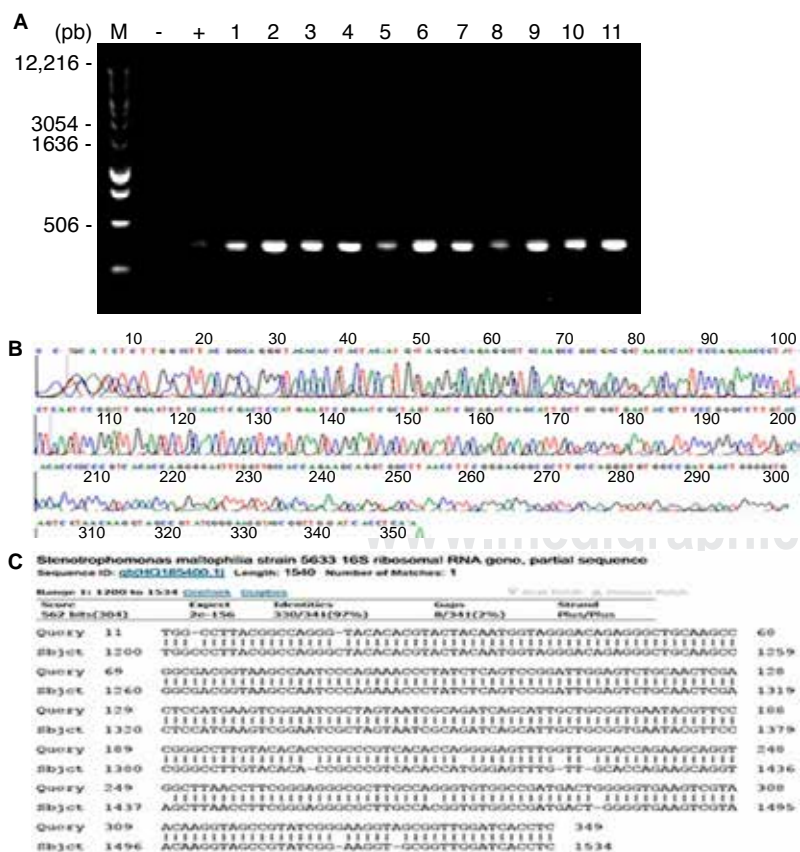


Figura 2.

Resultados moleculares representativos. **A)** Gel de agarosa al 2%, M representa el marcador de tamaño molecular 1 Kb, (-) blanco de reactivos, (+) control positivo de *H. pylori* (ATCC 43504) y 1-11 muestras representativas de pacientes con periodontitis. **B)** Electroferograma de secuenciación. **C)** Identidad reportada en NCBI/BLAST Assembled Genomes del 97% para *S. maltophilia*.

Representative molecular results. **A)** 2% agarose gel, M represents the molecular size marker 1 Kb, (-) white of reagents, (+) *H. pylori* (ATCC 43504) positive control, and 1-11 representative samples of patients with periodontitis; **B)** sequencing electropherogram; **C)** 97% identity reported for *S. maltophilia* through the NCBI/BLAST Assembled Genomes.

Cuadro I. Frecuencia y distribución de las bacterias en los grupos de estudio.

Bacteria	Sanos n = 30 (%)	Periodontitis moderada n = 30 (%)	Periodontitis severa n = 20 (%)	p
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	6 (20)	9 (30)	3 (15)	0.423
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	5 (16.6)	13 (43.3)	4 (20)	0.047*
<i>Pseudomonas</i> sp.	1 (3.3)	3 (10)	2 (10)	0.548
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	0	13 (43.3)	5 (25)	< 0.001*
<i>Haemophilus</i> sp.	0	4 (13.3)	0	0.03*
<i>Aggregatibacter</i> sp.	0	3 (10)	6 (30)	0.004*
<i>Prevotella intermedia</i>	0	2 (6.6)	0	0.181

* Significancia estadística entre los grupos.

RESULTADOS

Los datos moleculares permitieron identificar bacterias con identidad alta (mayor del 80%) en las muestras analizadas como se observa en la *figura 2*.

Las bacterias detectadas en este estudio fueron: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus* sp., *Aggregatibacter* sp. y *Prevotella intermedia*, las cuales tuvieron una distribución diferente entre los grupos de estudio (*Cuadro I* y *Figura 3*), encontrando asociación entre la presencia de *P. gingivalis* y el grupo de periodontitis moderada (OR = 3.8, IC = 1.2-12.7, p = 0.02) y periodontitis severa (OR = 11.6, IC = 3.0-45.2, p < 0.001). Igualmente, se asoció la presencia de *F. nucleatum* con periodontitis moderada y (OR = 47.1, IC = 2.6-841, p = 0.008) y periodontitis severa (OR = 21.6, IC 1.1-417, p = 0.04). Asimismo, se asoció la presencia de *Aggregatibacter* sp. con periodontitis severa (OR = 27.3, IC 1.4-519, p = 0.02).

DISCUSIÓN

La comunidad microbiana oral representa la mejor asociación con la especie humana, ya que se ha encontrado una fuerte correlación entre la composición cualitativa de la microbiota oral y los pacientes sanos o enfermos.⁴

Normalmente, el periodonto se mantiene saludable debido a los numerosos mecanismos de protección del huésped que operan en la cavidad oral, habiendo una relación simbiótica entre las bacterias y el huésped.¹

Los resultados en la identificación bacteriana en general mostraron bacterias reportadas por otros autores tanto en pacientes sanos como enfermos;⁶ sin embargo, la frecuencia de ellas y sus asociaciones fueron características en cada grupo de estudio, sugiriendo como está descrito en la patología que un desbalance de microorganismos puede conducir a enfermedad.⁴

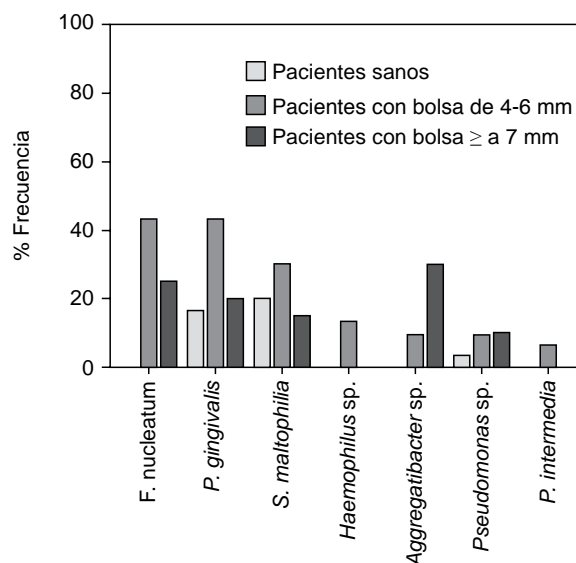


Figura 3. Distribución de frecuencias de bacterias en los grupos de estudio.

Frequency distribution of bacteria in the study groups.

Cabe destacar que en los tres grupos de estudio fue detectada *P. gingivalis*, una bacteria que conforma el denominado complejo rojo con *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*, el cual se ha asociado con periodontitis agresiva;³ sin embargo, la frecuencia de esta bacteria fue más alta en el grupo de pacientes con periodontitis moderada y su presencia se asoció con los dos grupos de periodontitis.

Curtis y Darveau, en 2011, mencionan que en pacientes sanos se ha encontrado a *P. gingivalis*, lo que indica que su presencia sola no es la responsable de la enfermedad,³ otros grupos han descrito que *P. gingivalis* puede interactuar con *Streptococcus gordonii*, y favorecer la colonización de otros patógenos conduciendo a la enfermedad.¹⁴ En este

estudio, se observó que *P. gingivalis* y *F. nucleatum* fueron detectadas con mayor frecuencia en pacientes con periodontitis moderada y se asociaron con los dos tipos de periodontitis. Esta evidencia sugiere que la asociación de estas bacterias podría estar favoreciendo la colonización de otros patógenos, tales como *Aggregatibacter* sp., la cual predominó y se asoció a periodontitis severa, como se ha documentado en otros reportes.¹⁵ En periodontitis severa también predominó y se asoció *F. nucleatum*, lo que también podría sugerir que la asociación entre *Aggregatibacter* sp. y *F. nucleatum* es idónea para sobrevivir y florecer en el periodonto y progresar a una periodontitis crónica destructiva en la que se da una desregulación del proceso inflamatorio que a su vez proporciona nuevos nutrientes para las bacterias, los cuales son derivados de la destrucción del tejido, como lo han reportado otros autores.^{9,16}

Aggregatibacter actinomycetemcomitans es una bacteria que produce leucotoxina, la cual lisa los neutrófilos humanos, lo que ocasiona un desbalance en la respuesta inmune innata y, por otro lado, la respuesta inflamatoria persiste en el periodonto;¹⁷ sin embargo, el estado de salud en general del paciente, factores de riesgo como la falta de higiene oral, el tabaquismo, la obesidad, el estrés y las posibles asociaciones genéticas son importantes para el desarrollo de la patología.¹⁸

Con respecto al resto de las bacterias detectadas aquí, se reporta la presencia en este padecimiento, pero no como el principal causante, sino como bacterias que manejan una simbiosis con otras, o bien como oportunistas de otras bacterias responsables de la periodontitis como es el caso de *Stenotrophomonas maltophilia* que se ha reportado incluso como oportunista en gingivitis en pacientes con leucemia.¹⁹ Respecto a *Pseudomonas* sp., *Haemophilus* sp. y *Prevotella intermedia*, se han encontrado también en cavidad bucal de pacientes sanos; sin embargo, su frecuencia es mayor en pacientes con periodontitis.^{20,21}

Los hallazgos presentados aquí resaltan la importancia de realizar la exploración en las bolsas periodontales debido a la microbiota bacteriana relacionada con la patología, lo que conllevará dar un diagnóstico y tratamiento antimicrobiano más específico en pacientes con periodontitis.

Agradecimientos

Los autores agradecen la disposición para participar en el estudio a los pacientes atendidos en la Unidad de Especialidades Odontológicas de la Secretaría de la Defensa Nacional, Ciudad de México.

Conflicto de intereses

Los autores confirman que no existe conflicto de intereses y que el presente trabajo es derivado de la tesis para la Especialidad en Periodoncia del Cirujano Dentista José Daniel Corona Martínez.

Original research

Molecular identification of bacteria in healthy and diseased periodontium

José Daniel Corona Martínez,* Elvia Pérez Soto,^{§,||} Virginia Sánchez Monroy[§]

* Military School of Medical Graduates. Military Health Sciences Center. Secretariat of National Defense, Mexico City.

§ Laboratory of Molecular Biomedicine I, National School of Medicine and Homeopathy. National Polytechnic Institute, Mexico City.

|| Department of Research and Postgraduate Studies, National Polytechnic Institute, Mexico City.

ABSTRACT

The study of bacterial microbiota associated with periodontitis is essential to develop effective diagnostic tools and therapies. Hence, the aim of this study was to identify the bacteria associated with periodontitis. We used 16S rRNA gene amplification by polymerase chain reaction (PCR) and sequencing to identify and compare 80 subgingival samples from patients with healthy periodontium and patients with severe and moderate periodontitis. We identified the following bacteria: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus* sp., *Aggregatibacter* sp., and *Prevotella intermedia*. *P. gingivalis* and *F. nucleatum* were associated with both moderate and severe periodontitis, and *Aggregatibacter* sp. was associated with severe periodontitis. The results of this research can be useful in clinical decision-making for treatment of patients with periodontitis.

Key words: Periodontitis, PCR, sequencing, 16S ribosomal RNA.

INTRODUCTION

Periodontitis is the main cause of teeth loss in adults. It begins with periodontal pockets containing polymicrobial biofilm communities that interact with the host cells and can lead to chronic inflammation of the periodontium, the destruction of the alveolar bone, and the loss of bone mass.¹⁻³ This oral microbiota has even been partnered with several systemic pathologies.²⁻⁴

Initially, the qualitative composition of the oral microbiota is associated with the host health status. The periodontium is kept healthy mainly because of the many protection mechanisms of the host operating in the oral cavity and the symbiosis of the commensal bacteria that induce an immune response proportional to their low biomass, thus resolving inflammation.⁴ However, some pathogenic bacteria, such as those included in the Red complex (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola*) evade the immune system generating a deregulated immune response due to virulence factors and damage-associated molecular patterns (DAMPs). As a consequence overt pathogenic dysbiosis and hyperinflammation occur by the alteration of processes such as oxidative stress, secretion of proinflammatory cytokines, prostaglandins, and metalloproteases (MMPs), causing failure in the resolution of inflammation and loss of homeostasis. These abnormalities lead to damage to the connective tissue, bone, and chronic periodontitis.^{1,4,5}

The role of the polymicrobial biofilm community and the perpetuation of the inflammatory process are of vital importance;⁵⁻⁷ therefore, bacterial identification and classification is essential to define the microbiota present in healthy and diseased individuals in order to establish an adequate treatment.⁸ Among the odontopathogenic bacteria involved in periodontitis are *Porphyromonas gingivalis*, which promotes the development of periodontal disease turning an otherwise benign microbial community in a dysbiotic one,⁹ and the Gram-negative, subgingival anaerobic *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, resistant to some antibiotics such as clindamycin.⁷ The presence of such bacteria makes the regular mechanical elimination of all bacterial deposits of buccal nonscaly surfaces a fundamental requirement to prevent oral diseases.¹⁰

The study of the microbial community involved in periodontitis has seen great advances in recent years.^{4,6,10} Some of the experimental improvements include standardized culture procedures and the development of anaerobic cultures, atomic force microscopy,¹¹ and molecular diagnostic techniques such as polymerase chain reaction (PCR), pyrosequencing, and Sanger sequencing.^{3,10,12} The latter is a technique of sensitive and specific molecular diagnostics that analyzes the sequence of ribosomal RNA 16S, allowing for detection of bacterial species present in the samples of healthy or sick persons.^{1,3,10,12}

The aim of this study was to identify the bacteria associated with periodontal disease using a genetic marker for bacterial ribosomal subunit 16S rRNA.

MATERIAL AND METHODS

Study population

This study was carried out in the interdisciplinary clinics of the Unit of Dental Specialties of the Secretariat of National Defense between September 2015 and June 2016. The study included 80 patients ages 20 to 70 years. All participants agreed to participate and signed an informed consent form. The Institutional Committees on Research and Ethics of the Unit of Dental Specialties and the Military School of Medical Graduates approved the study protocol and informed consent. The patients were divided into three study groups. Two groups included patients with periodontal disease classified according to clinical diagnosis using Russell's periodontal index (one group had 30 patients with moderate periodontitis, i.e. periodontal pocket of 4 to 6 mm; the other group had 20 patients with severe periodontitis, i.e. periodontal pocket ≥ 7 mm). The third group comprised 30 patients with healthy periodontium (control group).

Clinical examination and taking of samples

Clinical examination was performed by a standardized periodontist who determined the depth of periodontal pockets according to Russell's periodontal index without generating spontaneous bleeding using a simple Williams's periodontal probe (*Figure 1*). Once the pocket depth was determined, the sample was taken from the deepest periodontal pockets. Sampling for healthy patients was done with a sterile Microbrush from a gingival sulcus of some depth. After collection, the samples were placed in a polypropylene tube with 1 mL of phosphate buffer and stored at -70 °C in the Laboratory of Molecular Biology until analysis.

The inclusion criteria were the following:

- Patients with periodontitis, classified according to the criteria of the Russell's periodontal index, i.e., with presence of periodontal pockets of probe depth ≥ 4 mm, as well as patients with healthy periodontium presenting periodontal pockets.
- Patients affiliated to the Unit of Dental Specialties.

The exclusion criteria were as follows:

- Patients under medical treatment with antibiotics.
- Smokers and those with systemic manifestations of a disease that could affect the periodontal status.

DNA extraction, 16S rRNA amplification, sequencing, and identification

DNA was extracted using a commercial kit (DNeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen®). The concentration and purity of DNA was determined using the NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific). The integrity of DNA was evaluated through amplification of the gene β -globin. The amplification of 16S rRNA was performed using the DG74 universal primers: 5' AGGAGGTGATCCAACCGCA3' and RW01 5' AACTGGAGGAAGGTGGGGAT3',¹³ in a final volume of 25 μ L containing 5 μ L of DNA (about 50 ng/ μ L), 0.5 U of Taq polymerase (Invitrogen), 1 mM of each primer, 3.75 mM of MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, and Taq polymerase buffer. The amplification was done in a thermal cycler Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) with the following reaction conditions: an initial denaturation for 5 min at 94 °C, followed by 30 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, alignment to 62 °C for 30 s and extension at 72 °C for 30 s. Finally, an extension at 72 °C for 5 min was carried out. As positive control of bacteria, the DNA of *Helicobacter pylori* (ATCC 43504) was used. The amplicons were purified by ExoSAP-IT (USB) and were sequenced with an ABI PRISM 3130 automatic sequencer (Applied Biosystems), using the ABI PRISM BigDye Terminator sequence kit v3.1 (Applied Biosystems). The sequences were compared with the aid of the BLAST application of the GenBank database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.

Statistical analysis

The frequency of bacteria between the study groups was compared by χ^2 and the association was determined by odds ratio using the SPSS program version 23. The value of $p < 0.05$ was considered statistically significant for the analyses.

RESULTS

The molecular data allowed us to determine the presence of bacteria with high identity (greater than 80%) in the samples analyzed (Figure 2).

The bacteria detected in this study were *Stenotrophomonas maltophilia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus sp.*, *Aggregatibacter sp.*, and *Prevotella intermedia*. The bacteria had a different distribution in the study groups (Table I and Figure 3). An association was found between *P. gingivalis* and both the moderate periodontitis (OR = 3.8, 95%

CI = 1.2-12.7, $p = 0.02$) and the severe periodontitis (OR = 11.6, 95% CI = 3.0-45.2, $p < 0.001$) groups. Also, *F. nucleatum* was associated with the moderate periodontitis (OR = 47.1, 95% CI = 2.6-841, $p = 0.008$) and the severe periodontitis (OR = 21.6, 95% CI 1.1-417, $p = 0.04$) groups. An association was found between *Aggregatibacter sp.* and the severe periodontitis (OR = 27.3, 95% CI 1.4-519, $p = 0.02$) group as well.

DISCUSSION

The oral microbial community represents the best example of association with the human species; there is a strong correlation between the qualitative composition of the oral microbiota and oral health or disease in individuals.⁴

In normal conditions, the periodontium remains healthy because of many host protection mechanisms operating in the oral cavity, and a symbiotic relationship is established between the bacteria and the host.¹

The oral bacterial that we identified are in general the bacteria reported by other authors in both healthy and diseased persons,⁶ but the frequency of the bacteria and their associations were characteristic for each study group, suggesting that an imbalance of microorganisms can lead to disease, as described in the pathology of periodontitis.⁴

It is noteworthy that in the three study groups *P. gingivalis* was detected. This is one of the bacteria that constitute the red complex, together with *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola*. The red complex has been associated with aggressive periodontitis;³ however, the frequency of *P. gingivalis* was higher in the group of patients with moderate periodontitis, and its presence was associated with moderate and severe periodontitis.

P. gingivalis has been found in healthy persons, so the presence of the bacterium alone is not responsible for the disease.³ *P. gingivalis* also interacts with *Streptococcus gordonii*, thus promoting the colonization of other pathogens and leading to disease.¹⁴ In this study, *P. gingivalis* and *F. nucleatum* were detected most frequently in patients with moderate periodontitis and were associated with both moderate and severe periodontitis. This evidence suggests that the association of these bacteria could favor the colonization of other pathogens, such as *Aggregatibacter sp.*, which predominated and was associated with severe periodontitis, as documented in other reports.¹⁵ *F. nucleatum* also predominated in severe periodontitis, suggesting that the association between *Aggregatibacter sp.* and *F. nucleatum* is

ideal for survival and thriving in the periodontium, with an ensuing progression to destructive chronic periodontitis due to a deregulation of the inflammatory process. This in turn provides new nutrients for bacteria, derived from the destruction of the tissue.^{9,16}

Aggregatibacter actinomycetemcomitans is a bacterium that produces leucotoxin, which causes lysis in the human neutrophils and generates an imbalance in the innate immune response, with a persistent inflammatory response in the periodontium.¹⁷ However, the general health condition of the individual, together with risk factors such as poor oral hygiene, smoking, obesity, stress, and possible genetic associations is important for the development of the pathology.¹⁸

The remaining bacteria detected in our study were present in periodontitis, but not as the main cause but in symbiosis with other bacteria or as opportunistic, as is the case of *Stenotrophomonas maltophilia*, which has been reported as opportunistic in gingivitis in patients with leukemia.¹⁹ *Pseudomonas sp.*, *Haemophilus sp.*, and *Prevotella intermedia* have been found in the mouth of persons with healthy periodontium, but their frequency is higher in patients with periodontitis.^{20,21}

The findings presented here highlight the importance for exploration of the periodontal pockets given that the oral microbiota is associated with pathology. An appropriate examination will lead to a more specific diagnosis and anti-microbial treatment in patients with periodontitis.

Acknowledgements

The authors thank the patients in the Unit of Dental Specialties of the Secretariat of National Defense, in Mexico City, for their willingness to participate in the study.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest related to this work, which originated from the thesis for Specialty in Periodontics of the surgeon dentist Jose Daniel Corona Martinez.

REFERENCIAS / REFERENCES

1. Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8 (7): 481-490.
2. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet.* 2005; 366 (9499): 1809-1820.
3. Curtis MA, Zenobia C, Darveau RP. The relationship of the oral microbiota to periodontal health and disease. *Cell Host & Microbe.* 2011; 10 (4): 302-306.
4. Kilian M, Chapple IL, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AM et al. The oral microbiome-an update for oral healthcare professionals. *Br Dent J.* 2016; 221 (10): 657-666.
5. Van der Velden U. What exactly distinguishes aggressive from chronic periodontitis: is it mainly a difference in the degree of bacterial invasiveness? *Periodontol 2000.* 2017; 75 (1): 24-44.
6. Deng ZL, Sztajer H, Jarek M, Bhujra S, Wagner-Döbler I. Transcriptome profiles of key oral microbes in periodontal pocket compared to single laboratory culture reflect synergistic interactions. *Front Microbiol.* 2018; 9: 124.
7. López-Píriz R, Aguilar L, Giménez MJ. Management of odontogenic infection of pulpal and periodontal origin. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2007; 12 (2): E154-E159.
8. Yoshimasu Y, Ikeda N, Sakai A, Yagi S, Hirayama Y, Morinaga S et al. Rapid bactericidal action of propolis against *Porphyromonas gingivalis*. *J Dent Res.* 2018; 97 (8): 928-300.
9. Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol.* 2012; 10 (10): 717-725.
10. Listgarten MA, Wong MY, Lai CH. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Bacteroides forsythus* in an *A. actinomycetemcomitans*-positive patient population. *J Periodontol.* 1995; 66 (2): 158-164.
11. Salavathi SS, Chintalapani S, Ramachandran R, Nagubandi K, Ramiseti A, Boyapati R. Atomic force microscopy: a three-dimensional reconstructive tool of oral microbiota in gingivitis and periodontitis. *J Indian Soc Periodontol.* 2017; 21 (4): 264-269.
12. Chiranjeevi T, Prasad OH, Prasad UV, Kumar AK, Chakravarthi VP, Rao PB et al. Identification of microbial pathogens in periodontal disease and diabetic patients of south Indian population. *Bioinformation.* 2014; 10 (4): 241-245.
13. Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.* 1994; 32 (2): 335-351.
14. Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. Streptococcus adherence and colonization. *Microbiol Mol Rev.* 2009; 73 (3): 407-450.
15. Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Vaeth M, Poulsen S, Kilian M. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet.* 2008; 371 (96D8): 237-242.
16. Hajishengallis G. The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota. *Mol Oral Microbiol.* 2014; 29 (6): 248-257.
17. Hajishengallis G. Immuno-microbial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and the host response. *Trends Immunol.* 2014; 35 (1): 3-11.
18. Stabholz A, Soskolne WA, Shapira L. Genetic and environmental risk factors for chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000.* 2010; 53: 138-153.
19. Soga Y, Saito T, Nishimura F, Ishimaru F, Mineshima J, Mineshima F et al. Appearance of multidrug-resistant opportunistic bacteria on the gingiva during leukemia treatment. *J Periodontol.* 2008; 79 (1): 181-186.
20. Chen WP, Chang SH, Tang CY, Liou ML, Tsai SJ, Lin YL. Composition analysis and feature selection of the oral microbiota associated with periodontal disease. *Biomed Res Int.* 2018; 2018: 3130607.
21. Zhang Q, Qin XY, Jiang WP, Zheng H, Xu XL, Chen F. Comparison of subgingival and peri-implant microbiome in chronic periodontitis. *Chin J Dent Res.* 2015; 18 (3): 155-162.

Dirección para correspondencia /
Mailing address:
Dra. Virginia Sánchez Monroy
E-mail: vickysm17@hotmail.com
vsanchezm@ipn.mx