

José M. Tejerina Lobo¹
José J. Echeverría²
Francisco Martos³
Juan J. Palacios⁴

Sondas ADN. Método de diagnóstico microbiológico accesible al clínico

- 1 Profesor Asociado de Periodoncia, Universidad de Oviedo
 - 2 Profesor asociado de Periodoncia, Universidad de Barcelona
 - 3 Periodoncia Exclusiva, Madrid
 - 4 Microbiólogo, Hospital General de Asturias.
- Aceptado para publicación: Junio 1989.

Correspondencia:

Dr. José María Tejerina Lobo,
C/ Paseo de Begoña 24-6ºB
33205 Gijón, ASTURIAS.

RESUMEN

El papel en la Patogénesis en la Enfermedad Periodontal, de determinadas bacterias gram-negativas (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* y *Bacteroides intermedius*) ha sido comentado en numerosos estudios. La presencia de estos patógenos en formas agresivas o avanzadas de la enfermedad podría llevarnos a conocer zonas de actividad, emitir un pronóstico al poder conocer la respuesta al tratamiento utilizándolas como marcadores. Partiendo de esta hipótesis, hemos comparado el papel alternativo o complementario que puede tener la utilización de sonda ADN en el diagnóstico de estos tres patógenos frente a métodos microbiológicos tradicionales.

PALABRAS CLAVES

Pruebas de detención de ADN; Microbiología; Actividad.

ABSTRACT

*The role of the pathogenesis in the periodontal disease of some gram-negatives bacteria (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides intermedius* and *Bacteroides intermedius*) has been treated in a lot of studies. The presence of these pathogens in aggressive or advanced types could lead us to know actively areas, or make a prediction using them as markers. Starting with hypothesis, we have compared the alternative or complementary role that can have the using of the DNA probe detection in the diagnostic of these three (pathogens) compared with other microbiological traditional methods.*

KEY WORDS

DNA Probe detection; Microbiology; Activity.

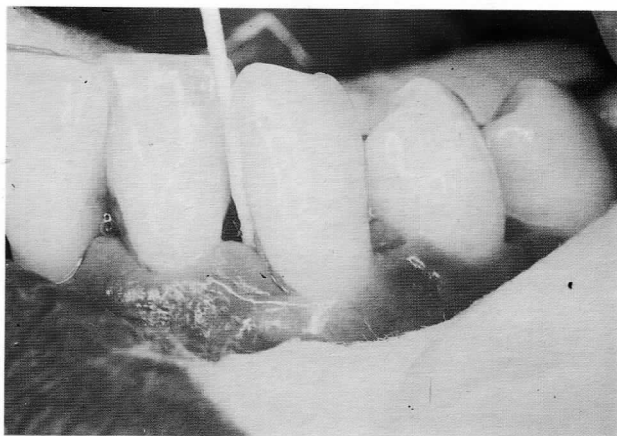


Figura 1. Introducción de la punta de papel en el espacio subgingival para la obtención de la muestra.

INTRODUCCION

La periodontitis de Rápida Progresión, es una forma particularmente destructiva de enfermedad periodontal, con fases de inactividad y otras de recidiva. El papel en la patogénesis de determinadas bacterias gram-negativas (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *bacteroides gingivalis* y *bacteroides intermedius*) han sido comentado en numerosos estudios^(1,2,3,4,5). Los rasgos clínicos no pueden separar por sí mismos infecciones periodontales diferentes, ni asegurar la actividad o inactividad de determinadas lesiones. El estudio de estos patógenos presentes en las formas agresivas o avanzadas de la enfermedad podría llevarnos a conocer las zonas de actividad, condicionando su presencia una terapéutica específica con antimicrobianos además del tratamiento actual: la emisión de un pronóstico al poder conocer la respuesta al tratamiento utilizándolos como marcadores; la utilización en campañas de profilaxis general al detectar en fases procesos las personas con riesgo de desarrollar enfermedad en el futuro.

Partiendo de esta hipótesis valoramos el papel alternativo o complementario que puede tener la utilización de sondas de ADN en el diagnóstico de estos tres patógenos frente a los métodos microbiológicos tradicionales⁽⁶⁻⁸⁾.

Buscando manejo sencillo de la muestra por parte

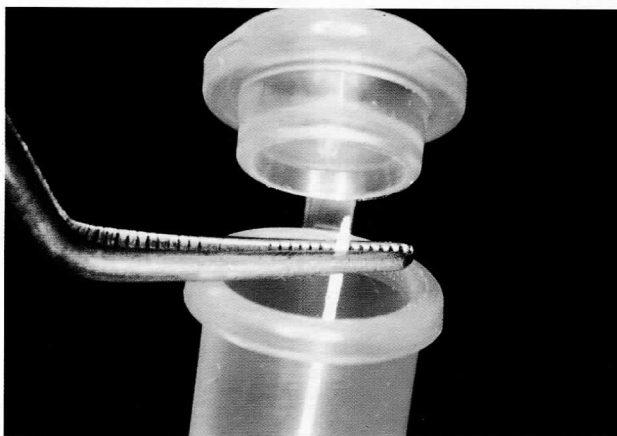


Figura 2. Receptáculo para su transporte.

del clínico, fiabilidad en los estudios cuantitativos y sobre todo especificada en el diagnóstico microbiológico y rapidez en el procesamiento y obtención de resultados, tratamos de comprobar la reproductibilidad del uso de sondas de ADN como test diagnóstico de este tipo de proceso.

Las sondas de ADN, son pequeños fragmentos de ácidos nucleicos con capacidad de unirse a otras secuencias complementarias de ADN para formar la doble hélice estructural⁽⁹⁾. Por medio de unos enzimas, las endonucleasas, el ADN de estas bacterias puede ser "cortado" en localizaciones concretas (secuencias especie-específicas) que serán los usados en los estudios de complementariedad. Para identificar el fragmento complementario las sondas son marcadas con isótopos radiactivos o bien con un sistema enzimático avidina-biotina. La muestra clínica en el laboratorio es desnaturalizada para formar cadenas simples y posteriormente incubada con la sonda para permitir la unión, si es que existe complementariedad, siendo posteriormente revelada.

MATERIAL Y METODOS

Nuestro estudio fue realizado utilizando el test DMDx (Biotechnica¹ diagnóstics, Inc.) para periodontitis. Las muestras se toman de uno o varios sitios seleccionados, después de que la placa supragingival y la saliva se hayan quitado, una punta de papel es colocada en el espacio subgingival (Fig. 1) y tras 10

¹ Biotechnica Diagnostics, INC
Moulton street, Cambridge, MA

328



Figura 3. Paciente.

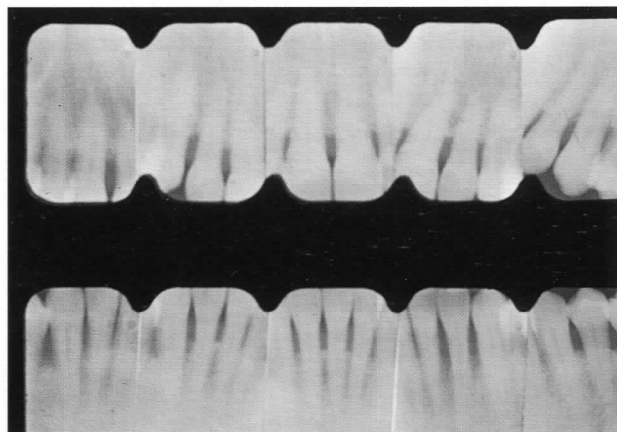


Figura 4. Estudio radiográfico del grupo anterior del paciente valorado.

BDI BIOTECHNICA
 DIAGNOSTICS, INC.
 61 MOULTON STREET, CAMBRIDGE, MA 02138

DMDx TEST FOR PERIODONTITIS
TEST REQUEST FORM

Patient Name: _____ Birthdate: ____/____/____ Collection Date: ____/____/____ Overall Diagnosis: _____
 Treatment Status (Circle) Pretreatment / Post-scaling / Post-surgery / Recall / Other (Specify) _____
 Were Antibiotics Used: No Yes If so, Type: _____ Dose: _____ Frequency: _____ Duration: _____
 Dr. Name: _____ Address: _____ City/State: _____ Zip: _____
 Dr. Signature: _____

Specimen	Tooth Number:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
#1	Right	32	31	30	29	28	27	26	25	24	23	22	21	20	19	18	17
	Left																
Site:	1-Mesiobuccal																
	2-Distobuccal																
Pocket Depth (mm):	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	>10						
Clinical Comments:	Plaque Index:	No	Yes														
	Redness:	No	Yes														
Probe Bleeding:	No	Yes															
	Suppuration:	No	Yes														

Return Multicolor And White Copy With Sample—Pink Copy For Practitioner's File.

Figura 5. Impreso a cubrir que no es es facilitado por el laboratorio para la exacta toma de datos.

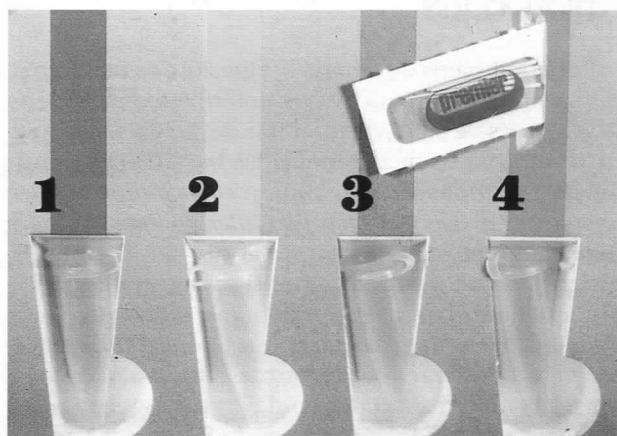


Figura 6. Capsulas codificadas de acuerdo con los colores del impreso.

segundos de exposición es retirada y colocada en el vial de plástico que servirá de contenedor (Fig. 2) para su envío al laboratorio por correo (resultado a vuelta de correo o telefónico).

El test DMDx mide los niveles individuales de los tres patógenos periodontales. Los resultados son informados como: negativo, bajo, moderado o alto nivel de cada microorganismo. El informe por medio de códigos de color ilustra de forma gráfica los niveles de riesgo:

-Negativo: patógenos $<0,1\%$ del total ó $<10^3$ células.

-Bajo: patógenos desde $0,1\%$ a $0,95$ del total ó 10^3 células.



Figura 7. Receptáculo para transporte y envío por correo de las cápsulas.

-Moderado: patógenos del 1% AL 99% del total ó 10^3 células.

-Alto: patógenos > 10% del total ó 10^5 células.

Aportamos un caso en el que consideramos útil un test de sensibilidad a los patógenos citados.

Se trataba de una mujer de 32 años que acude a la consulta de Periodoncia de la Escuela de Estomatología de la Universidad de Oviedo relatando como síntoma principal hemorragia e inflamación generalizada de sus encías.

La historia del paciente era normal.

Exploración periodontal y evaluación radiográfica

Inflamación de encías severa y generalizada, márgenes y papilas enrojecidas, hemorragia interdental generalizada. No existía recesiones localizada pero sí agrandamientos en algunas papilas (Fig. 3).

La profundidad de los sondajes era de 4 m.m a 8 m.m. Las piezas más afectadas eran los molares superiores e inferiores y el grupo incisivo inferior anterior. No existían problemas de invasión furcal.

Pérdida de hueso generalizada, moderada y localizada. Pérdida de densidad de la cresta y falta de definición de la lámina dura (Fig. 4).

Pensamos en este paciente que para confirmar los signos clínicos y ser objetivos en la terapéutica antibiótica a emplear usar algún tipo de prueba microbiológica.

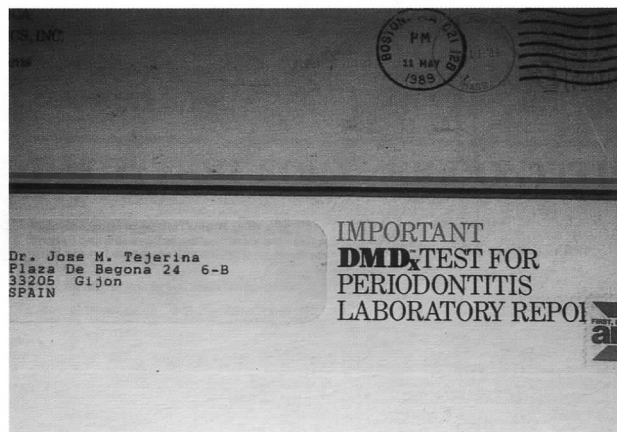


Figura 8. Recibido por correo aéreo el informe a los 15 días después de su envío.

No disponiendo de medios diagnósticos microbiológicos tradicionales decidimos usar el test DMD.

Para ello el Laboratorio Biotechnica de Boston nos envió el utillaje necesario para la toma de muestras, el cual costa de un formulario, puntas de papel estéril, cuatro cápsulas de plástico de diferente color y una caja de embalaje, preparada para el envío de las cápsulas.

Rellenamos el formulario que consta de 2 partes:

En la primera nos pide datos del paciente; nombre, edad, diagnóstico del tipo de enfermedad Periodontal, y fecha de la recogida de las muestras.

Información sobre la fase de tratamiento en que se hace la toma

Pretratamiento (Post Raspado y Alisado) Post Cirugía o en el Mantenimiento en

Relación con antibióticos:

-Uso: Sí o No

-Tipo

-Dosis

-Frecuencia

-Duración

La segunda parte del cuestionario está enfocada a precisar el lugar de la toma de placa subgingival.

Para ello, el impreso está dividido en cuatro apartados de diferentes colores (Fig. 5):

El primero de color rosa, el segundo amarillo, el tercero verde y el cuarto azul.

Existiendo una correspondencia con las cápsulas de

330

BIO-TECHNICA DIAGNOSTICS, INC.
61 MOULTON STREET, CAMBRIDGE, MA 02138

DMDx TEST FOR PERIODONTITIS TEST REQUEST FORM

Name: Juan J. Palacios Birthdate: 6/4/60 Collection Date: 5/1/89 Overall Diagnosis: PER

Treatment Status (Circle): Pretreatment / Post-scaling / Post-surgery / Recall / Other (Specify)

Antibiotics Used: No Yes If so, Type: Penicillin Dose: 250 mg Frequency: 4 times Duration: 7 days

Address: Plaza De Segura 24 6-B City/State: Gijón Spain/Zip: 33205

Signature: Juan J. Palacios

Tooth Number:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Right	32	31	30	29	28	27	26	25	24	23	22	21	20	19	18	17
Left																
Site:	1-Mesiobuccal				2-Distobuccal				3-Mesiolingual				4-Distolingual			
Pocket Depth (mm):	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	>10					
Clinical Comments:	Plaque Index: No Yes Redness: No Yes Probe Bleeding: No Yes Suppuration: No Yes															

BIO-TECHNICA DIAGNOSTICS, INC.

DMDx TEST FOR PERIODONTITIS

Report date: 05/11/89
Reference number: 8905105 TEJERI
Date sample taken: 04/24/89
Patient's name: Feraaage, Juan
Patient's birthdate: 6/4/60

Dr. Jose M. Tejerina
Plaza De Segura 24 6-B
33205 Gijón
SPAIN

		PATHOGEN LEVELS			
Sample 1	Actinobacillus actinomycetemcomitans		LOW		
Tooth # 7 DB	Bacteroides gingivalis				HIGH
Pocket depth 6MM	Bacteroides intermedius			MODERATE	
Sample 2	Actinobacillus actinomycetemcomitans		LOW		
Tooth # 14 MB	Bacteroides gingivalis				HIGH
Pocket depth 6MM	Bacteroides intermedius			MODERATE	

Specimen # **2**

Tooth Number: Right 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Left 32 31 30 29 28 27 26 25 24 23 22 21 20 19 18

Site: 1-Mesiobuccal 2-Distobuccal 3-Mesiolingual 4-Distolingual

Pocket Depth (mm): 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 >10

Clinical Comments: Plaque Index: No Yes Redness: No Yes Probe Bleeding: No Yes Suppuration: No Yes

Specimen # **3**

Tooth Number: Right 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Left 32 31 30 29 28 27 26 25 24 23 22 21 20 19 18

Site: 1-Mesiobuccal 2-Distobuccal 3-Mesiolingual 4-Distolingual

Pocket Depth (mm): 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 >10

Clinical Comments: Plaque Index: No Yes Redness: No Yes Probe Bleeding: No Yes Suppuration: No Yes

Specimen # **4**

Tooth Number: Right 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Left 32 31 30 29 28 27 26 25 24 23 22 21 20 19 18

Site: 1-Mesiobuccal 2-Distobuccal 3-Mesiolingual 4-Distolingual

Pocket Depth (mm): 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 >10

Clinical Comments: Plaque Index: No Yes Redness: No Yes Probe Bleeding: No Yes Suppuration: No Yes

Sample 2

Tooth # 14 MB

Pocket depth 6MM

Actinobacillus actinomycetemcomitans		LOW		
Bacteroides gingivalis				HIGH
Bacteroides intermedius			MODERATE	

Sample 3

Tooth # 19 MB

Pocket depth 5MM

Actinobacillus actinomycetemcomitans	NEGATIVE			
Bacteroides gingivalis	NEGATIVE			
Bacteroides intermedius		LOW		

Sample 4

Tooth # 28 ML

Pocket depth 8MM

Actinobacillus actinomycetemcomitans		LOW		
Bacteroides gingivalis				HIGH
Bacteroides intermedius			MODERATE	

PATHOGEN LEVEL INTERPRETATION

Negative: pathogens are less than 0.1% of total or fewer than 10³ cells.
Low: pathogens range from 0.1% to 0.9% of total or 10⁴ cells.
Moderate: pathogens range from 1.0% to 9.9% of total or 10⁵ cells.
High: pathogens are greater than 10% or 10⁶ cells.
Available data indicates that pathogen levels in the blue zone are indicative of a relatively stable periodontium. Levels in the pink and red zones suggest an increasingly higher risk of attachment and bone loss.^{1,2,3,4}

Please see reverse side for test result interpretation.

Bio-Technica Diagnostics, Inc. 61 Moulton Street, Cambridge, MA 02138

Figuras 9-10 y 11-12. Relación entre las tomas de datos y el diagnóstico microbiológico específico de las mismas.

plástico en donde introduciremos las puntas de papel obtenidas de los diferentes lugares (Fig. 6).

En cada uno de estos apartados figura una fórmula dentaria que sigue la nomenclatura americana, también datos para reflejar la profundidad del sondaje y comentarios clínicos de respuesta afirmativa o negativa, referentes a nivel de placa, enrojecimiento, sangrado y supuración.

Siguiendo los pasos anteriormente citados introduciremos la punta de papel en las áreas distobucal del doce; mesiobucal de dieciséis; distobucal de dieciséis; y mesiolingual del cuarenta y cuatro. Lugares en que coincidía la hemorragia con la pérdida de inserción. Previamente habíamos eliminado la placa supragingival y manteniendo la zona seca se tomaron las muestras de placa subgingival.

En el receptáculo de embalaje, facilitado por Bio-Technica, se enviaron las cápsulas a Boston (Fig. 7).

A los quince días recibimos los datos de TestDMD (Fig. 8).

Los niveles de patógenos de las cuatro tomas enviadas, en tres de ellos indicaban un alto grado de *Bacteroides gingivalis* y menor proporción de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Bacteroides intermedius*.

Sólo en uno de los sitios recibidos y relacionado con la zona mesiobucal del treinta y seis que fue la de menor profundidad en sondaje y hemorragia, se detectó niveles bajos de *Bacteroides intermedius*, y negativos de los otros dos Patógenos (Fig. 9,10,11,12).

Estos datos del test, unidos a la exploración Periodontal, confirman nuestro criterio diagnóstico de Periodontitis de Rápida Progresión, relacionada con patóge-


BioTECHNICA DIAGNOSTICS

TEST CHARGES

DMDx[®] Test for Periodontitis

The basic charge for the DMDx Test for Periodontitis includes the sample collection kit, laboratory analysis and mailing costs. Up to four samples from one patient may be included in one mailer.

- First sample taken from a patient.
\$30.00
- Second sample taken from the same patient during that visit.
\$30.00
- Each additional sample for the patient during that visit.
\$25.00

PathoTekSM Pathogen Detection System

The charge for PathoTek Pathogen Detection System includes the sample collection kit, laboratory analysis and mailing costs for two pooled samples for one patient.

- Two pooled samples submitted from a single patient during one dental visit.
\$19.75

REIMBURSEMENT

To ensure that you have the most current information for your particular locale, we will gladly supply you with up-to-date submission information and codes.



Now Feel Confident that the Treatment of LJP is Complete...

THE PROOF IS IN THE TEST

Recent clinical studies have implicated *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a.) in the etiology and pathogenesis of Localized Juvenile Periodontitis, and confirm that the elimination of this virulent microorganism will aid in prevention of her periodontal breakdown.^{1,2}

Until now, there has been no convenient, accurate test to determine if the invasive pathogen has been eliminated, leaving determination of treatment success in doubt.

The DMDx[®] Test for Periodontitis you can routinely measure the presence and proportions of gingival A.a. along with *Bacteroides intermedius* and *Bacteroides gingivalis* (B.g.) in periodontal sites.³ The test will enable you to determine the levels of A.a. prior to treatment, quantitatively monitor the organism during therapy, and help to determine the successful endpoint of treatment.

Using advanced DNA-probe technology, BioTechnica Diagnostics provides you with an easy-to-use, non-invasive test for LJP.

Detects refractory cases—Patients with LJP should be monitored closely. The DMDx[®] Test will confirm even low levels of reinfection by A.a.,³ allowing you to provide earlier preventive therapy so that loss of periodontal attachment and alveolar bone can be avoided.⁵

Identifies high-risk patients—A.a. can be transmitted among family members.⁴ With the DMDx[®] Test you can test siblings and detect specific periodontal sites at risk.

DMDx[®] TEST FOR PERIODONTITIS

Figuras 13 y 14. Precios del test e información sobre el mismo.

nos específicos. Por lo cual, en esta paciente suplementamos la terapia Periodontal convencional con régimen de Tetraciclinas, de 21 días en tomas de 240 m.l.g. cada 8 horas.

DISCUSION

Los métodos clásicos de diagnóstico microbiológico no resultan prácticos para el que hacer clínico habitual por una serie de razones:

- Precisar de un laboratorio cercano dotado de la suficiente y compleja infraestructura necesaria para el diagnóstico de los microorganismos citados.

- Utilización de medios de transporte especiales para el envío de la muestra que tratan de minimizar la pérdida de microorganismos que en mayor o menor grado se produce al ser *Actinobacillus actinomycetem-*

comitans microaerofílico y *Bacteroides gingivalis* e *intermedius* anaerobios estrictos.

-Dificultades para la valoración cuantitativa de la muestra (porcentajes relativos de los diferentes microorganismos respecto al total) debido a la necesidad de utilizar medios de cultivo selectivos y enriquecidos que dificultan en unos casos y favorecen en otros el crecimiento de determinadas bacterias.

-El tiempo necesario para el cultivo inicial y subcultivos posteriores para aislar e identificar estos tres patógenos es a menudo largo, multiplicándose por la necesidad de hacer varias tomas a un mismo paciente. Todo ello hace incrementar el coste para el paciente.

-Muchas veces las inconsistencias fenotípicas en la identificación bioquímica de las bacterias implicadas dejan dudas sobre el porcentaje de fiabilidad de los resultados.

- 332 Por todo ello esta metodología no parece la más adecuada para la práctica clínica diaria.

Ventajas frente a la metodología microbiológica tradicional

-No precisan de la existencia de microorganismos vivos (ya que no vamos a necesitar cultivar microorganismos para recuperarlos de la muestra clínica. El material genético está en la muestra independientemente de la vitalidad o no de las bacterias).

-Detecta hasta niveles de mill microorganismos por muestra que no detectan los medios de cultivo.

-No es necesario el uso de medios de transporte especiales (un simple contenedor de plástico vacío va a ser utilizado).

-El envío de la muestra al laboratorio de referencia admite, entre otros, el correo habitual (no siendo un obstáculo insalvable la no existencia de laboratorios especializados en las proximidades de la zona de ejercicio profesional).

-Rapidez en el procesamiento por parte del laboratorio (se evitan cultivos iniciales, subcultivos para aislamiento, identificación, etc).

-Fiabilidad en el diagnóstico final tanto de presencia como de ausencia de los microorganismos buscados.

-Estudios cuantitativos directamente sobre la muestra (cantidad de bacterias específicas respecto al total de la muestra), al conocer el número de bacterias que saturan la punta de papel que se utiliza para la toma de la muestra aproximadamente 10 células bacterianas.

En el capítulo de desventajas está que la toma de muestras tenga que ser con punta de papel ya que en el momento actual, todos los autores prefieren que ésta sea con cureta que recoge una muestra más uniforme, ya que la punta de papel se va a saturar principalmente de bacterias de la placa no adherida, en donde predomina la flora gram-negativa y va a sobredimensionar principalmente a los *Bacteroides*, este criterio concuerda con el caso presentado en que los niveles más altos eran los de los *Bacteroides gingivalis*. La no introducción todavía en el mercado español de esta tecnología para uso habitual en los laboratorios de Microbiología, siendo necesario su procesamiento en los países donde se encuentra comercializado; o bien recurriendo a laboratorios de investigación en este área. También el precio (Fig. 13,14) considerando individualmente por paciente resulta caro al igual que los métodos tradicionales.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Slots, J. Subgingival microflora and periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* 1979, **6**: 351-382.
- 2 Slots, J., Bragg L., Wikstrom M., Dhlen G. The occurrence of actinobacillus actinomycetemcomitans, bacteroides gingivalis and bacteroides intermedium in destructive periodontal disease in adults. *J Clin Period* 1986, **13**: 570-577.
- 3 Zambon, J. Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease. *J Clin Period* 1985, **12**: 1-20.
- 4 Slots, J. Bacterial specificity in adult periodontitis. *J Clin Period* 1986, **13**: 912-917.
- 5 Bragg, L.; Dahlen, G.; Wikstrom, M.; Slots, J. The capability of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Bacteroides gingivalis and Bacteroides intermedium to initiate progressive periodontitis; a retrospective study. *J Clin Period* 1987, **14**: 95-99.
- 6 Savitt, E.D.; Strzempko, M.N.; Yaccaro, K.K.; Peros, W.J. and French, C.K. Comparison of cultural Methods and DNA probe Analyses for the detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Bacteroides gingivalis, and Bacteroides intermedium in subgingival plaque samples. *J Clin Period* 1988.
- 7 French, C.K.; Savitt, E.D.; Simon, S.L.; Eklund, S.M.; Chen M.C.; Klotz L.C.; Vaccaro, K.K.: DNA probe detection of periodontal pathogens. *Oral Microbiol Immunol* 1986, **1**:58-62.
- 8 Strzempko, M.N.; Simon, S.L.; French, C.K.; Lippke, J.A.; Raia, F.F.; Savitt, E.D. and Vaccaro, K.K. A cross-reactivity study of whole genomic DNA probes for Haemophilus actinomycetemcomitans, Bacteroides intermedium, and Bacteroides gingivalis. *J Dent Res* **66** **10**: 1.543-1.546, october, 1987.
- 9 Tenover F.C.: DNA probes for infectious diseases. *Clin Microbiol News* 1985, **7**: 105-112.