

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



TRABAJO DE FIN DE MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
2011-2012

***BACTERIEMIAS SECUNDARIAS AL CEPILLADO DENTAL:
COMPARACIÓN DE CUATRO MÉTODOS DE ESTUDIO***

Alumno: Denisse A. Hernández Fortuño
Tutor: David Herrera González

Máster Universitario en Ciencias Odontológicas
2011/2012

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	3
IUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	9
HIPÓTESIS	9
OBJETIVOS	10
MATERIAL Y MÉTODO	11
TIPO DE ESTUDIO:	11
DISEÑO DEL ESTUDIO:	11
PACIENTES:	11
TOMA DE LAS MUESTRAS:	13
TOMA DE MUESTRAS SUBGINGIVALES:	14
TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE:	14
MUESTRAS DE SANGRE	15
ANÁLISIS:	15
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO HEMOCULTIVOS MARCA BACTEC.	16
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO MEDIANTE LISIS-CENTRIFUGACIÓN	16
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO POR CULTIVO, ESPECÍFICOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PERIODONTOPATÓGENOS (MUESTRAS DE SANGRE)	17
IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN BACTERIANA DE LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS MEDIANTE PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (QPCR)	18
ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS SUBGINGIVALES	20
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO POR CULTIVO ESPECÍFICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PERIODONTOPATÓGENOS A NIVEL SUBGINGIVAL	20
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	20
RESULTADOS	21
DISCUSIÓN	23
BIBLIGRAFÍA	28
ANEXO I- FIGURAS	34
ANEXO II - TABLAS	35

INTRODUCCIÓN

Desde Hunter, en 1910, que asoció las infecciones orales con enfermedades crónicas, o incluso antes, hace ya más de un siglo, se ha considerado que diversos procesos infecciosos extraorales pueden desarrollarse por la diseminación hematógena de focos infecciosos orales y/o son consecutivos a determinadas manipulaciones odontológicas. Desde 1955, numerosos Comités de Expertos han elaborado diferentes regímenes profilácticos para la prevención de la infección focal de origen oral (especialmente, la endocarditis bacteriana), para ser aplicados en determinados pacientes considerados “de riesgo”, ante la práctica de determinadas manipulaciones dentales consideradas “de riesgo” (Roberts et al., 1998; Loza Fernández de Bobadilla et al., 2003).

La bacteriemia de origen oral se define como la presencia de bacterias orales viables en el torrente sanguíneo tras la realización de procedimientos terapéuticos dentales o actividades cotidianas orales (Carmona et al., 2002). Una característica única para el biofilm subgingival, es su cercanía con tejidos altamente vascularizados. Cualquier pérdida de la integridad del epitelio subgingival, podría producir una bacteriemia (Parahitiyawa et al., 2009). Esto puede llevar a la colonización de diferentes microorganismos en distintos órganos, dando como resultado por ejemplo infecciones a distancia como la endocarditis infecciosa (EI) (Carmona et al., 2002).

En las últimas guías publicadas por la Sociedad Británica de Antimicrobianos y quimioterapia (Gould et al., 2006), la Asociación Americana del Corazón (AHA) (Wilson et al., 2007), el Instituto Nacional para la Salud y Excelencia Clínica (NICE) del Reino Unido (Instituto Nacional para la Salud y la Excelencia Clínica 2008), y la Sociedad Europea de Cardiología (2009), no sólo consideran importantes las bacteriemias post tratamientos, sino también las bacteriemias acumuladas todos los días por actividades orales (B-EOA).

La B-EOA, por cepillado y por la masticación, también puede desempeñar un papel importante en el desarrollo de EI y enfermedades cardiovasculares mediante la promoción de la formación de placas ateroscleróticas en los vasos sanguíneos (Drangsholt 1998, Olsen 2008). La evidencia de estudios epidemiológicos y de intervención sugieren que las infecciones periodontales se asocian a una forma independiente de enfermedad vascular aterosclerótica y el tratamiento periodontal generalmente tiene un resultado favorable sobre los efectos de marcadores subclínicos de esta enfermedad (Kebuschull et al. 2010, Sanz et al 2010). Bacterias orales se han detectado en placas ateroscleróticas, válvulas cardíacas y aneurismas aórticos principalmente *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola* y *Porphyromonas gingivalis* (Pucar et al. de 2007, Gaetti-Jardim et al. 2009, Nakano et al. 2009, Castillo et al. 2011). Estudios in vitro e in vivo, han establecido la plausibilidad de un enlace entre las infecciones periodontales y aterogénesis identificando los procesos biológicos por los cuales pueden ser producidos (Kebuschull et al. 2010).

Todos los días las actividades orales pueden provocar bacteriemias posiblemente por pequeños movimientos del diente en el alveolo, causando presiones intermitentes que permiten que los microorganismos puedan tener acceso al torrente sanguíneo (Roberts 1999). Estudios de B-EOA en niños y adultos se han centrado principalmente en bacteriemias posteriores al cepillado (Parahitiyawa et al. De 2009, Diz Dios et al. 2011). Distintos estudios han estimado las prevalencias de la bacteriemia tras actividades cotidianas, por ejemplo:

- Tras el cepillado dental es de 0-62% (Kinane et al. 2005, Forner et al. 2006, Lockhart et al. 2009),
- Uso de seda dental es 0-41% (Crasta et al. 2009),
- La masticación tiene la menor prevalencia, con un rango de 0-20% (Corner et al. 2006, Murphy et al. 2006)

La duración de B-EOA no suele superar los 15 min (Kinane et al. 2005, Lockhart et al. 2009) y las bacterias más frecuentemente aisladas en hemocultivos positivos post-cepillado son *Streptococcus* spp. (45%), seguido por anaerobios estrictos (19%) y *Staphylococcus* spp. (15%) (Diz Dios et al. 2011). En general, B-

EOA es de baja intensidad: el nivel medido en la mayoría de los estudios publicado hasta la fecha es de 0,97 UFC / ml (Rango: 0,01-32 UFC / ml), aunque esta intensidad es considerablemente mayor que la bacteriemia basal reportado en los mismos estudios, el nivel medido basal de bacteriemia en la mayoría de los estudios publicados hasta la fecha, es de 0,02 UFC / ml, rango: 0,01- 0,05 UFC / ml (Diz Dios et al. 2011). La muestra de sangre basal, es un estándar metodológico característico de los estudios de bacteriemias orales de bajo grado, para poder evaluar el efecto de las distintas actividades que la producen. British Cardiac Society Clinical Practice Committee & Royal College of Physicians (2004)

En la actualidad, la importancia clínica de B-EOA se basa en el concepto de la exposición acumulativa de bacteriemias (Gutheroth 1984, Roberts 1999). Gutheroth (1984) estima una exposición colectiva de 5370 min. de bacteriemia, en un 1 mes, como un resultado de las actividades cotidianas orales en comparación con sólo 6 min. de la bacteriemia asociada a la extracción de un diente. Otros autores han estimado que el riesgo acumulativo de cepillarse los dientes dos veces por día tiene 154,219 veces mayor riesgo que con una extracción dental (Roberts 1999).

En condiciones inflamatorias como la gingivitis y periodontitis crónica, la irrigación periodontal prolifera y se dilata, produciendo una mayor superficie y facilitando la entrada de microorganismos en el torrente sanguíneo (Parahitiyawa et al. 2009). En consecuencia, se supone que los pacientes con enfermedad periodontal pueden tener un riesgo mucho mayor de desarrollar B-EOA y, por lo tanto, enfermedades sistémicas de origen oral (Gendron et al. de 2000, Li et al. 2000, Carmona et al. 2002; Sakamoto et al. 2007, Olsen 2008, Bolger 2009). Aunque en un reciente meta-análisis se observó que las mayores prevalencias de bacteriemias están más asociadas a la cantidad de placa bacteriana presente y al grado de inflamación gingival, más que el diagnóstico periodontal (Tómas et al 2012). Incluso algunos expertos Directrices del Comité estuvieron de acuerdo con la premisa: "El mantenimiento de una óptima higiene oral y salud periodontal puede reducir la incidencia de B-EOA y es más importante que antibióticos profilácticos para un procedimiento de examen dental para reducir el riesgo de EI" (Wilson et al. De 2007, el Instituto Nacional para la Salud y la Excelencia Clínica

2008). Sin embargo, hay información limitada con respecto al impacto de la higiene bucal, gingival o el estado periodontal en la B-EOA y los resultados son inconsistentes (Schlein et al. 1991, Lockhart et al. 2009). Es más, la predicción de pacientes más susceptibles a sufrir bacteriemias, no es comparable entre los menores de 15 años y los adultos, (Bhanji et al. 2002, Kinane et al. 2005)

Los métodos tradicionales usados en la identificación de Bacteriemias son cultivos bacterianos diseñados para el cultivo de muestras sanguíneas: análisis microbiológico por hemocultivo marca BACTEC y lisis centrifugación que consisten en:

- Análisis microbiológico por hemocultivos (hemocultivo-BACTEC):

Este es un método cualitativo en el que la sangre se cultiva en frascos con medio bifásico. El sistema de lectura automatizado BACTEC 9420 detecta CO₂ y variaciones de pH por fluorescencia en fase sólida y VITAL en fase líquida (tecnología fluorescente homogénea), como expresión de crecimiento bacteriano (desechos bacterianos). La eficacia de esta técnica para detectar bacteriemias de origen oral ya ha sido contrastada previamente (Tomás et al, 2007).

- Análisis microbiológico mediante lisis-centrifugación (cultivo Lisis-centrifugación):

Esta técnica consiste en inocular la sangre en un tubo de ensayo específico para extraer sangre venosa al vacío (tipo vacutainer) con saponinas que rompen las células hemáticas; la sangre se centrifuga y el sedimento se siembra directamente en placas de cultivo.

Con ambos métodos, una vez que se obtiene la presencia de bacterias, se pueden aislar para poder identificarlas. Esto hace que el proceso sea largo y susceptible de error o contaminación.

Los métodos de análisis microbiológico específico para la identificación de patógenos periodontales son el cultivo en medios enriquecidos y en ambiente anaerobio específico y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

- El cultivo bacteriano específico para patógenos periodontales tiene la ventaja, de detectar múltiples especies y bacterias inesperadas. En lo referente a sus limitaciones, se encuentran: la necesidad de preservar la viabilidad bacteriana y la incapacidad de detectar niveles bajos de bacterias (con un margen de 10^3 - 10^4 células bacterianas). (Atieh 2008, García et al 1998, Jervøe-Storm et al. 2005, Sanz et al. 2004).

El problema fundamental del cultivo es que sólo un 50% de las especies subgingivales, son cultivables, y menos de 10 especies relacionadas con la progresión de la enfermedad se pueden identificar. Por estos motivos, ha sido muy útil el desarrollo de la amplificación e identificación de ADN bacteriano mediante la reacción en cadena de la polimerasa del ADN ribosomal del gen16s (Sakamoto et al. 2005, Santos et al. 2004.).

- La PCR a tiempo real (qPCR) es la amplificación enzimática de una secuencia específica de ADN in vitro, por lo tanto, no necesita que el microorganismo esté viable para su identificación. El proceso usa múltiples ciclos a diversas temperaturas para lograr la desnaturalización del ADN y el posterior acople y elongación de los primers. Se trata de un proceso exponencial en el que los productos amplificados en cada ciclo sirven de plantilla para los siguientes, lo que le confiere gran sensibilidad y especificidad. (Atieh 2008, Sakamoto et al. 2005) Con éste principio de amplificación puede identificar un número menor de bacterias y cuantificar la cantidad de ADN presente en la muestra, debido a que la suma de las nuevas moléculas sintetizadas por la PCR es directamente dependiente a la suma de las moléculas que sirven como plantilla, datos que se recogen en la fase exponencial de amplificación (Jervøe-Storm P, et al 2005.). Es la forma más sensible de detectar patógenos periodontales, llegando a detectar valores tan bajos como 10 bacterias en una muestra. Además el resultado se puede obtener en un tiempo mucho menor que el cultivo (Atieh MA, 2008.).

Los objetivos de este estudio fueron evaluar las bacteriemias secundarias al cepillado dental, realizando cuatro técnicas diagnósticas (hemocultivo-BACTEC, cultivo por lisis-centrifugación, cultivo específico para periodontopatógenos y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) para la identificación de bacteriemias orales, y específicas por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*, tras el cepillado dental. De manera adicional, se trató de comparar las bacteriemias con las características periodontales del paciente; la concordancia con las bacterias subgingivales y comparar las distintas técnicas utilizadas.

JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Las bacteriemias de bajo grado, como las que se producen tras al cepillado dental, se consideran tanto o más importantes en su repercusión sistémica que las bacteriemias secundarias a procedimientos dentales invasivos. Los métodos clásicos para el diagnóstico de bacteriemias (hemocultivo y lisis centrifugación) son procedimientos, que no han sido desarrollados específicamente para la identificación de bacteriemias por patógenos periodontales. La identificación de este tipo de bacterias a través de estos métodos se hace difícil, larga y engorrosa, haciendo que sea necesario introducir, otras técnicas utilizadas específicamente para la identificación de periodontopatógenos, como el cultivo bacteriano y la identificación del DNA bacteriano mediante qPCR.

HIPÓTESIS

El estímulo producido por el cepillado dental, puede producir una bacteriemia de bajo grado por bacterias presentes en la placa bacteriana, que puede ser identificada a través de distintos métodos diagnósticos.

OBJETIVOS

Realizar cuatro técnicas de laboratorio para diagnosticar bacteriemias secundaria al cepillado dental (hemocultivo-BACTEC, cultivo lisis-centrifugación, cultivo para periodontopatógenos y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real)

Calcular la prevalencia de bacteriemias orales en la muestra seleccionada.

Comparar la prevalencia de las bacteriemias para los distintos diagnósticos periodontales.

Comparar la prevalencia de las bacteriemias para los distintos métodos diagnósticos.

Evaluar la presencia de las bacterias a nivel subgingival y en la sangre.

MATERIAL Y MÉTODO

Tipo de estudio:

Estudio descriptivo transversal.

Estudio realizado en colaboración con la Universidad de Santiago de Compostela.

Diseño del estudio:

Análisis comparativo preliminar con 39 pacientes, a los que se sometieron a la práctica de un cepillado dental. Se eligió este número de pacientes debido a que estudios similares tienen un tamaño de este orden (Kinane et al 2005, 30 pacientes; Forner et al 2006, 60 pacientes; Crasta et al 2009, 30 pacientes)

El cepillado dental lo efectuó el paciente, durante 2 minutos, con un cepillo de dureza media, aplicando la técnica de Bass, tras recibir instrucciones estandarizadas. Todos los pacientes practicaron esta actividad bajo supervisión. Antes y después del cepillado se les tomó una muestra sanguínea para la determinación de la bacteriemia (British Cardiac Society Clinical Practice Committee & Royal College of Physicians 2004).

Pacientes:

Los pacientes del estudio acudieron a primera visita a la Facultad de Medicina y Odontología (Odontología) de la Universidad de Santiago de Compostela entre Septiembre de 2010 y Marzo de 2012. Tras un examen inicial, en que se seleccionó aquellos que cumplían los requisitos de inclusión, fueron remitidos al Máster de Periodoncia de la misma Facultad para realizar el diagnóstico completo. Todos estos pacientes constan de historia clínica médico-odontológica completa.

Los criterios de inclusión aplicados para la selección de los grupos de estudio fueron:

- NO estar recibiendo o NO haber recibido antibióticos sistémicos en los 3 meses previos
- NO estar utilizando o NO haber utilizado antisépticos de forma rutinaria en los 3 meses previos
- NO padecer algún tipo de inmunodeficiencia congénita o adquirida, o cualquier otra enfermedad que facilite la aparición de infecciones
- NO padecer cualquier tipo de enfermedad que facilite la aparición de complicaciones hemorrágicas
- Presentar al menos 20 dientes naturales.

Criterios de exclusión:

- Que el paciente se niegue a participar del estudio y/o se niegue a dar el consentimiento informado.
- Que por distintas causas el paciente no pueda realizar el cepillado dental que se propone en el estudio.
- Que no se pueda obtener la muestra de sangre basal o a los 60 segundos.

Para determinar el grado de salud periodontal, a cada paciente se le realizó una exploración intraoral entre 7 y 15 días antes de la toma de muestras de sangre, recogiendo información acerca de: depósitos de placa y de cálculo, presencia de sangrado gingival, profundidad de bolsa, nivel de inserción clínico y grado de movilidad dentaria. Para cuantificar estas variables se emplearon índices estandarizados de depósitos de placa y de cálculo (Índice O'Leary) presencia de sangrado gingival (cara vestibular: mesial, centro y distal; cara palatina o lingual: mesial, centro y distal), profundidad de bolsa, nivel de inserción clínico y grado de movilidad dentaria. El estudio radiográfico se realizó mediante ortopantomografía y serie radiográfica periapical convencional, que permitió determinar la pérdida ósea radiográfica. Las exploraciones fueron realizadas por 2 odontólogos con formación posgraduada en Periodoncia, en la Universidad de Santiago de Compostela, que se sometieron a un proceso previo de calibración. Aplicando criterios clínicos previamente definidos, se establecieron 3 diagnósticos sobre el

estado periodontal: salud periodontal, gingivitis y periodontitis crónica moderada-avanzada (Armitage GC. 1999).

Salud Periodontal:

- Menos de tres localizaciones con bolsas mayores de 3 mm. y pérdida de inserción mayor de 2 mm.
- Sin evidencia de pérdida ósea radiográfica.
- Índice gingival inferior a 1.

Criterios de Gingivitis:

- Menos de tres localizaciones con bolsas mayores de 3 mm y pérdida de inserción mayor de 2 mm.
- No hay evidencia de pérdida ósea radiográfica.
- Índice gingival superior a 1.

Criterios de Periodontitis crónica moderada-avanzada:

- Al menos una localización por cuadrante con bolsa de 5 ó más mm y sangrado al sondaje, con pérdida de inserción de 3 ó más mm.
- Hay pérdida ósea radiográfica generalizada superior al 30%.

En todos los casos, se solicitó el consentimiento informado por escrito para participar en el estudio de acuerdo con la Declaración de Helsinki, el Convenio del Consejo de Europa, la Declaración Universal de la UNESCO y los requisitos de la legislación española, todos referidos al ámbito de la investigación biomédica. El proyecto cuenta con la aprobación ética del Departamento de Medicina Legal, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Santiago de Compostela y es financiado por "Cátedra Johnson & Johnson de promoción de la salud oral de la Universidad de Santiago de Compostela"

Toma de muestras:

Toma de muestras subgingivales:

Las muestras subgingivales se tomaron, de cada paciente, en 4 localizaciones, 1 por cuadrante, las cuales variaron según el diagnóstico del paciente de la siguiente forma:

- Pacientes sanos periodontalmente: mesio-vestibular de los primeros molares y en ausencia de estos, en los segundos molares (la siguiente alternativa serían los segundos premolares y a partir de ahí, los dientes presentes en sentido mesial)
- Pacientes con Gingivitis o Periodontitis se tomarán muestras subgingivales de las 4 localizaciones de cada cuadrante con mayor profundidad de bolsa y/o presencia de sangrado al sondaje.

En cada localización seleccionada se procedió a:

- Eliminar la placa y cálculo supragingival con una cureta (para evitar contaminación por placa supragingival)
- Aislar con rollos de algodón o gasas (para evitar contaminación de saliva)
- Secar con bolitas de algodón.
- Se introdujo una punta de papel estéril con una pinza, lo más profundamente que se pudo en la bolsa. Se mantuvo allí durante 10 segundos, y acto seguido se retiró, y depositó en el vial que contiene medio RTF, y se colocó otra punta en la misma localización otros 10 segundos. Se abrió el vial justo antes de insertar una punta y se cerró inmediatamente después. El vial fue enviado por mensajero al Laboratorio en Madrid para ser procesado en un plazo de 24 horas. Hasta su envío, se conservó en la nevera a 4°C.

Toma de muestras de sangre:

De cada paciente se recogieron muestras de sangre venosa periférica en condiciones basales (de 22 mL).

Para determinar la prevalencia de las bacteriemias post-cepillado, se recogió una muestra sanguínea (22 mL) a los 30 segundos después de concluir la actividad.

Distribución de los 22 mL de muestra sanguínea (Figura 1, página 33):

- 10 mL para hemocultivo, marca BACTEC , modelo 9420 (Bactec Plus, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)
 - 5 mL en hemocultivo anaerobio
 - 5 mL en hemocultivo aerobio.
- 10 mL para cultivo por técnica de lisis – centrifugación

- 2 mL para métodos específicos para periodontopatógenos
 - 1mL para cultivo anaerobio (cultivo para patógenos periodontales)
 - 1mL para qPCR

La recogida de muestras de sangre para la obtención de hemocultivos, su manipulación y transporte, se efectuó aplicando las recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. (Cercenado y Cantón 2004)

Muestras de Sangre

De los 22 ml de sangre, 20 ml fueron procesadas en los Laboratorios asociados a la Universidad de Santiago de Compostela (USC). Los 2 ml restantes fueron recibidos en el laboratorio de la UCM, a través de un mensajero. En total, 78 muestras de sangre (39 basal y 39 post cepillado) en tubos tipo vacutainer, con EDTA, como anticoagulante, conservados a temperatura ambiente, y 39 muestras de puntas de papel en medio RTC de muestras subgingivales. (fig 1, pag 33)

Análisis:

Análisis microbiológico hemocultivos marca BACTEC 9420.

10 ml de la muestra de sangre venosa periférica, se inocularon a partes iguales en 2 frascos de hemocultivo con medios de cultivo aerobio y anaerobio (BACTEC Plus, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) y se enviaron al laboratorio. Todo el proceso de manipulación y transporte de las muestras se efectuó aplicando las recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (Loza Fernández de Bobadilla et al, 2003). Los frascos de hemocultivo se procesaron en el BACTEC 9240 (Becton Dickinson). A cada hemocultivo positivo se le realizó una tinción de Gram. los hemocultivos positivos inoculados en medio aerobio se subcultivaron:

- en agar sangre y agar chocolate en atmósfera de CO₂ al 5-10%, y
- en agar MacConKey en aerobiosis.

A los hemocultivos positivos inoculados en medio anaerobio se les aplicó el mismo protocolo, incluyendo el subcultivo en agar Schaedler e incubación en atmósfera de anaerobiosis.

Finalmente se procede a la identificación de las bacterias aisladas aplicando pruebas bioquímicas convencionales. A los hemocultivos positivos inoculados en medio anaerobio se les aplicó el mismo protocolo, incluyendo el subcultivo en agar Schaedler e incubación en atmósfera de anaerobiosis. Las bacterias aisladas en los hemocultivos positivos se identificarán aplicando la batería de pruebas bioquímicas proporcionada por el sistema Vitek (bioMérieux, Inc, USA) para bacterias Gram positivas, anaerobias y *Neisserias* spp./*Haemophilus* spp.

La criopreservación de los aislamientos se efectuaron en medios adecuados a -80 °C.

Análisis microbiológico mediante lisis-centrifugación

Se inoculó un volumen de 10 ml de sangre en un tubo Isolator[®] (Oxoid Limited, Basingstoke, Hants, UK), se agitó, y se dejó reposar (20 minutos), se centrifugó (1500 rpm durante 30 min), se descartó el sobrenadante, se vorteo el pellet (aproximadamente 2 ml) durante 10 segundos, para resuspender la muestra y a continuación se sembró en duplicado. Para ello se realizaron 15-20 estrías con el

inóculo de sangre (500 µl/placa) en 2 placas de agar chocolate y en 2 placas de agar Schaedler. Las primeras se incubaron a 37°C, en CO₂ durante 7 días, mientras que las de ágar Schaedler se incubaron a 37°C, en anaerobiosis durante 10 días. Si se observa crecimiento en las placas, después de efectuar varios pases y subcultivos, se procedió a su identificación aplicando pruebas bioquímicas convencionales.

Esta técnica ya ha sido aplicada previamente con éxito por otros autores para detectar bacteriemias de origen oral (Roberts et al, 1998).

Análisis microbiológico por cultivo, específicos para la identificación de periodontopatógenos (muestras de sangre)

1 ml de cada muestra de sangre se analizó de forma inmediata tras su recogida.

Las muestras recibieron los siguientes procedimientos:

- 100 µl de sangre fueron plaqueados directamente en placas de agar sangre no selectivas por duplicado.
- 100 µl de sangre fueron plaqueados directamente en placas Dentaid-G1 por duplicado.
- Se prepararon diluciones seriadas (1:10) en PBS y se plaquearon tanto en placas de agar como en placas Dentaid-1 (Alsina et al. 2001).

Las placas de agar sangre se examinaron tras 7 y 14 días de incubación anaeróbica (80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂ a 37°C). Las placas Dentaid-1 necesitaron entre 3 y 5 días de incubación a 37°C en aire con 5% de CO₂. Los recuentos totales de anaerobios se realizaron en las placas de agar. La presencia y la cantidad de los patógenos periodontales *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Parvimonas micra*, *Campylobacter rectus* y *Fusobacterium nucleatum*, además de cualquier otra especie que crezca de manera relevante en el medio, se realizó en las placas de agar no selectivo. La identificación de las especies bacterianas seleccionadas se basó en la tinción Gram y en la morfología celular, aerotolerancia, producción de catalasa y se confirmó mediante el empleo

de test bioquímicos estándar (RapID™ ANA II System; Remel, Lenexa, KS, EE.UU.).

Se recontaron las colonias en la placa con la dilución más adecuada, aquella con entre 30 y 300 colonias, y se calculó el porcentaje que supone cada patógeno respecto a la flora total. Los recuentos totales de *A. actinomycetemcomitans* se realizaron en las placas de Dentaid-1. La identificación se basó en la típica morfología de su colonia (estructura interna de estrella), su reacción catalasa positiva y al uso de una serie de enzimas específicos (RapID™ NH System, Remel, Lenexa, KS, EE.UU.).

Identificación y cuantificación bacteriana mediante *PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)*

Extracción de ADN bacteriano de muestras de sangre

El ADN bacteriano de 1 ml de cada una de las muestras de sangre fue extraído inmediatamente a la recepción de la muestra, empleando un kit comercial específicamente diseñado para este fin y siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante (MolYsis Complete5. Molzym GmbH & Co.KG. Bremen, Alemania). El ADN extraído fue resuspendido en 10µl de agua estéril y congelado a -20°C, hasta su análisis por qPCR.

Amplificación mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

Secuencia de Primers y sonda en qPCR para *Porphyromonas gingivalis*

- 1) Primer 1 (forward): 5-GCGCTCAACGTTTCAGCC-3
- 2) Primer 2 (reverse): 5_-CACGAATTCCGCCTGC-3
- 3) Sonda Taqman: 5-CACTGAACTCAAGCCCGGCAGTTTCAA-3 (pares de base 634 a 660) (Boutaga et al. 2003)

La secuencia de los Primers y sonda en qPCR para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* son:

- 1) Primer 1 (forward): 5-GAA CCT TAC CTA CTC TTG ACA TCC GAA-3;
- 2) Primer 2 (reverse): 5-TGC AGC ACC TGT CTC AAA GC-3;
- 3) Sonda Taqman: 5-AGA ACT CAG AGA TGG GTT TGT GCC TTAGGG-3
(Boutaga et al. 2005).

Ambas sondas empleadas están marcadas con los fluorocromos 6-carboxyfluoresceína (FAM) en el extremo 5' y 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA) en el extremo 3'.

Condiciones de realización de qPCR

La concentración óptima de primers forward, reverse y sonda en la mezcla de PCR fue de:

- 300nM, 300nM y 100 nM, respectivamente, para *A. actinomycetemcomitans*,
- 300nM, 300nM and 300 nM, respectivamente, para *P. gingivalis*.

Ensayo PCR cuantitativa a tiempo real

Las reacciones de PCR se realizaron por duplicado en un volumen total de 20 µl. La mezcla de reacción contenía 10 µl de 2x TaqMan master mixture (LightCycler® 480 Probes Master Roche), concentraciones óptimas de primers y sonda (300 nM, 300 nM and 100nM para *A. actinomycetemcomitans*, and 300nM, 300nM and 300 nM, para *P. gingivalis*), y 5 µl de DNA de la muestra correspondiente. El control negativo consiste en 5 µl de agua estéril.

Las muestras fueron sometidas a un ciclo inicial de amplificación de 95°C durante 10 minutos, seguidas de 40 ciclos de amplificación a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Los datos se analizaron mediante el termociclador LightCyclerR 480 (Roche). Cada muestra fue analizada por duplicado.

Límite de detección de qPCR en muestras de sangre

El límite de detección de la PCR a tiempo real se estableció a partir de la determinación de los valores de Ct de diluciones seriadas de ADN genómico de la cepa *P. gingivalis* (cepa ATCC 33277) y *A. actinomycetemcomitans* (cepa DSM 8324). Para ello, en cada experimento se realizó una curva estándar con estas diluciones. El límite de detección de la PCR a tiempo real en muestras de sangre se situó en:

- 10 UFC/microl para *A. actinomycetemcomitans*
- 10 UFC/microl para *P. gingivalis*

Análisis de las muestras subgingivales

Análisis microbiológico por cultivo específico para la identificación de periodontopatógenos a nivel subgingival

Las puntas de papel se vortearon durante 30 segundos y se prepararon diluciones seriadas 1:10 en PBS (phosphate buffered saline). De cada dilución se plaquearon 100 µl en medio agar no selectivo (Oxoid no 2; Oxoid, Basingstoke, UK), suplementado con sangre de caballo al 5%, hemina (5mg/l) y menadiona (1mg/l) para la determinación del recuento total de anaerobios y para la identificación de los patógenos bacterianos específicos (*P. gingivalis*). Para el recuento de *A. actinomycetemcomitans*, las muestras también se plaquearon en placas de medio Dentaid-1 (Alsina et al. 2001).

El resto del procedimiento y el modo de recuentos es el mismo que el descrito para las muestras de sangre.

Análisis estadístico

Se realizó una estadística descriptiva con los resultados obtenidos de las distintas técnicas.

RESULTADOS

1.-Descripción de la muestra:

De los 39 pacientes del estudio, 3 de ellos quedaron excluidos (2 por desmayos tras la primera toma y 1 no se pudo canalizar la vía). Las muestras a analizar corresponden a 36 pacientes, 17 de ellos periodontalmente sanos, 10 con gingivitis y 9 con periodontitis.

2.- Descripción muestras subgingivales

Se analizaron 35 muestras subgingivales (se perdió una por razones técnicas)

Del total de las muestras se encontró a nivel subgingival *P gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Eikenella Corrodens*, etc. (Tabla 2) no se encontró *A actinomycetemcomitans* ni *T forsythia* .

3.- Prevalencia de bacteriemias.

A) Bacteriemias basales

A.1 La prevalencia de bacteriemias basales fue de un 8,3% (3 de 36), al considerar todas las técnicas.

- a) Hemocultivo- BACTEC: 0%
- b) Lisis centrifugación: 1 paciente (2,9%)
- c) Cultivo 2 pacientes (5,6%)
- d) qPCR 0%

I

A.2 Con respecto al diagnóstico de los pacientes con bacteriemias basales positivas tenemos: (tabla1)

- a) Sanos 2 pacientes, 11,7% (1 de 17)de los pacientes sanos (identificados con cultivo)
- b) Gingivitis 1 paciente, 10% (1 de 10) de los pacientes con gingivitis, (identificado con lisis centrifugación)
- c) Periodontitis 0%

b) Bacteriemias post-cepillado

B.1 La prevalencia de bacteriemias post-cepillado fue de un 13,9% (5 de 36), al considerar todas las técnicas (Tabla 1).

- e) Hemocultivo- BACTEC: 0%
- f) Lisis centrifugación, 2 pacientes (5,6%)
- g) Cultivo, 3 pacientes (8,3%)
- h) qPCR 0%

B.2 Con respecto al diagnóstico de los pacientes con bacteriemias basales positivas tenemos: (Tabla 1)

- a) Sanos 1 paciente (5,9%) de 17, identificado con cultivo.
- b) Gingivitis 4 pacientes (40%) de 10, identificado 2 con cultivo y 2 con lisis centrifugación.
- c) Periodontitis 0%.

4 Comparación intra-sangre

- a) Técnicas: el método de lisis centrifugación (2,8% basal y 5,6% post-cepillado) y el cultivo (5,6% basal y 13,9% post-cepillado) lograron una mayor detección que el cultivo por BACTEC 0% y qPCR.0%
- b) Sangre y muestras subgingivales, de los 5 pacientes con bacteriemia positiva post-cepillado, 3 de ellos presentan *Fusobacterium nucleatum*, en la muestras de sangre y en el fluido gingival, los otros 2 pacientes, presentan bacteriemias supragingivales (Tabla1).

DISCUSIÓN

Los hallazgos más interesantes de este estudio son:

- la prevalencia de bacteriemias basales (8,3%) y post cepillado (13,9%).
- Los métodos que fueron capaces de detectar la presencia de estas bacteriemias fueron lisis centrifugación y cultivo, versus un 0% detectado a través de hemocultivo-BACTEC y qPCR.
- La presencia de *F nucleatum* en 3 de los 5 pacientes positivos para bacteriemias post-cepillado y que esta presente también en las muestras subgingivales

Se observan bacterias subgingivales en todos los pacientes (tabla 1), con una frecuencia específica de 0% para *A actinomycetemcomitans* y 22,86% para *P gingivalis*, esto tiene relación con el tipo de diagnóstico periodontal del paciente, donde la mayoría son pacientes sanos y con gingivitis, y se pueden presentar en poca concentración (Haffajee et al 2008). Sumado al hecho que en España no hay una gran prevalencia de *A actinomycetemcomitans* y si podemos encontrar más *P. gingivalis* (Sanz et al 2000).

La prevalencia de bacteriemias se calculó sumando los resultados de los cuatro métodos utilizados, ya que resultaron positivos para bacteriemias en distintos pacientes (Tabla 2).

La prevalencia de bacteriemias en condiciones basales (antes de iniciar el cepillado) fue de 8,33 %. Esta prevalencia resultó superior al 2% detectado previamente por el grupo de USC aplicando la técnica de hemocultivo-BACTEC (Barbosa et al, 2010). Muchos estudios muestran un bajo porcentaje de bacteriemias basales (0%-2%) (Schlein et al. 1991; Hartzell et al. 2005; Forner et al. 2006; Lockhart et al. 2009; Crasta et al. 2009), aunque se han reportado cifras de un 6% a un 8% de cultivos positivos (Kinane et al. 2005; Murphy et al. 2006).

La prevalencia de bacteriemias tras el cepillado dental (13,89%) se calculó sumando los resultados de los cuatro métodos utilizados, ya que resultaron positivos para bacteriemias en distintos pacientes (tabla 2). De forma semejante con lo que pasa en el estudio de Kinane et al. (2005) en el que compara técnicas de hemocultivo y técnica de PCR. Esto por que cada uno de los métodos tienen distintas formas de identificación de bacterianas, que pueden ser más o menos específicas, pudiendo ser técnicas mejores para identificación de bacteriemias orales de bajo grado en este caso lisis centrifugación y cultivo ya que obtuvimos con el cultivo, lisis centrifugación, hemocultivos-BACTEC y qPCR, una prevalencia de bacteriemias post-cepillado de 8,33%, 5,56%, 0% y 0% respectivamente.

Aunque en la literatura se describe un amplio rango de prevalencia de bacteriemias post-cepillado que oscila entre 0% y 62% (Bhanji et al. 2002; Hartzell et al. 2005), nuestros resultados parecen confirmar que éstas son infrecuentes y de escasa intensidad, como ya se ha sugerido previamente (Kinane et al 2005 y Forner et al, 2006).

La única bacteria periodontopatógena, observada en muestras subgingivales, basales, y tras cepillado es *F. nucleatum*, colonizador secundario de la placa bacteriana y muy importante en la agregación de placa bacteriana y presente tanto en sujetos sanos como enfermos (Haffajje 2008)

La ausencia de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* mediante qPCR, en muestras basales y tras cepillado dental, se puede deber el límite de detección logrado en el laboratorio es de 10 UFC/microlitro, si consideramos que la cantidad de bacterias de que encuentran en este tipo de bacteriemias, pueden ser 1 o 2 UFC, con métodos que utilizan 5 ml de sangre, (Diz et al 2006), para qPCR el encontrarlas en la pequeña porción (5microlitros) que se utilizan para el análisis es difícil aunque la muestra este homogénea, y sea el método más sensible para la identificación bacteriana (Boutaga et al 2005).

Las limitaciones de este estudio son:

- los pacientes y la toma de muestra de los pacientes se realiza en la universidad de Santiago de Compostela (USC), solo tuvimos acceso a los diagnósticos periodontales de los pacientes incluidos en el estudio, pero no a los datos demográficos ni índices periodontales realizados a los pacientes.
- Varias muestras positivas para los métodos de hemocultivo-BACTEC y lisis centrifugación tienen presencia de *Staphylococcus spp.* que nos obliga a sospechar en contaminaciones de origen cutáneo provocadas durante la maniobra de venopunción y estas muestras no fueron incluidas en el cálculo de prevalencia de bacteriemias de origen oral. Lisis centrifugación es el método que mostró ser más vulnerable a la contaminación (tabla1) y debe ser la forma en que se procesa la muestra, ya que los 500 microlitros, que se cultivan deben secar en un tiempo de 24 horas, para que se absorba la sangre, en una posición (de la placa de cultivo) que no es la más adecuada para evitar contaminaciones.
- En relación al cultivo hay una prevalencia de bacteriemia oral tras cepillado de 5,56%, pero no hay otros estudios que avalen esta técnica para muestras de sangre, solo se utiliza como medio de identificación una vez que hemocultivos-BACTEC es positiva por colorimetría para anaerobios (Lafaurie et al. 2007)
- La distancia y el tiempo entre la toma de muestra y el análisis a través qPCR las condiciones en que llegó (a temperatura ambiente durante el invierno) y quizás alguna reacción específica que pueda tener todos los componentes de la sangre pudo haber influido en los resultados negativos de qPCR.

Es interesante la evaluación de la ausencia de *A actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, a través de los distintos métodos, ya que son estas dos bacterias, las que se han encontrado en órganos o alteraciones a distancia, como por ejemplo en placentas (Katz et al 2009) o las placas de ateroma (Pucar et al. de 2007, Gaetti-Jardim et al. 2009, Nakano et al. 2009, Castillo et al. 2011) pero hay que tener en cuenta que no había *A actinomycetemcomitans* y el porcentaje de pacientes con y *P. gingivalis* subgingival era de un 22,9%.

Es interesante de analizar la frecuencia de bacteriemias orales de bajo grado, tras el cepillado, con respecto al diagnóstico de los pacientes. Ya que los pacientes que presentan mayor prevalencia de bacteriemias son los pacientes con gingivitis 40% (4 de 10 pacientes), 1 paciente sano (5,9%) y ningún paciente con periodontitis. Al contrario de los que sucede en trabajos de Kinane et al. (2005), Forner et al. (2006) Lockhart et al. (2009). Esto se puede explicar quizás con los resultados obtenidos del meta-análisis de Tomás et al. (2012), el riesgo de tener una bacteriemia oral tras el cepillado no tiene relación con los índices de placa, índices gingivales ni diagnóstico periodontal. Habrá que seguir desarrollando investigación en los factores de riesgos relacionados.

El volumen de sangre se considera actualmente una de las variables más críticas para aumentar la sensibilidad de los hemocultivos. Dado que la mayoría de las bacteriemias son de baja magnitud (< 1 a 10 ufc/ml), a mayor volumen de muestra obtenido, mayor es la sensibilidad. Mermel y Maki (1993), demostraron una disminución significativa en los hemocultivos-BACTEC positivos cuando se obtenían en promedio 2,7 ml (69%) versus 8,7 ml (92%) de sangre.

Las bacterias más frecuentemente aisladas en hemocultivos positivos post-cepillado ha sido *Streptococcus* spp. (45%), seguido por anaerobios estrictos (19%) y *Staphylococcus* spp. (15%) (Diz Dios et al. 2011), en nuestro estudio la bacteria más prevalente fue *F. nuclaetum*, que pudiera estar incluida en porcentaje de anaerobios estrictos de los otros estudios.

Las limitaciones de este estudio son no poder contar con los datos clínicos y demográficos de los pacientes que nos permitan explicar de mejor forma los resultados obtenidos, (edad, fumadores, índices de placa, gingival). La falta de evidencia que avalen los métodos frente a identificación de patógenos periodontales. La dificultad que pone el tiempo y el traslado de la sangre hasta su procesamiento en UCM en muestras sensibles como la sangre.

Teniendo en cuenta las limitaciones del estudio, podemos concluir:

- Existe una falta de validación adecuada de las técnicas utilizadas en el diagnóstico de bacteriemias de origen oral, ya que los resultados obtenidos con los distintos métodos no son coincidentes.
- Este modelo para bacteriemias de origen oral tras el cepillado dental, puede ser inadecuado para estudios de intervención por su baja prevalencia.

Como sugerencias de investigación futuras se plantean:

- Realizar un estudio de validación de las distintas técnicas.
- Cuidar la toma de muestra desinfectando la zona con alcohol, usar guantes estériles y durante el procesamiento trabajar en zonas de esterilidad, para evitar contaminaciones.
- Para prevenir la contaminación por piel, se puede descartar los primeros 0.5 ml de sangre en un tubo cualquiera (Lucas 2008).
- Manejar mejor la forma de transporte de las muestras, manteniéndolas como lo recomienda la sociedad de microbiología a 37°C y con agitación constante. Además de realizar su procesamiento antes de 24 horas.
- Para optimizar el sistema de cultivo específico para periodontopatógenos en las muestras de sangre, usar tubo tipo vacutainer con saponina, que inhibe el sistema del complemento y lisa los eritrocitos (Forner et al. 2009) pudiendo mejorar la eficiencia de esta técnica.
- Para la técnica de qPCR realizar un doble secado del alcohol en la extracción de ADN previo a la dilución con agua, para eliminarlo completamente de las muestras, y así evitar que interfiera con la reacción.
- Valorar la eficacia de la extracción de ADN bacteriano de 5 ml de sangre, para aumentar la posibilidad de encontrar ADN bacteriano en la alícuota analizada.

BIBLIGRAFIA

Alsina M, Olle E, Frias J. Improved, low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol*. 2001 Feb;39(2):509-13.

Atieh MA. Accuracy of real-time polymerase chain reaction versus anaerobic culture in detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: a meta-analysis. *J Periodontol* 2008 09;79(9):1620-1629.

Bhanji, S., Williams, B., Sheller, B., Elwood, T. & Mancl, L. (2002) Transient bacteraemia induced by toothbrushing: a comparison of the Sonicare toothbrush with a conventional toothbrush. *Pediatric Dentistry* 24, 295–299.

Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls C, Savelkoul PHM. Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *J Clin Microbiol* 2003 11;41(11):4950-4954.

Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls C, Savelkoul PHM. Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005 08/01;45(2):191-199.

Carmona, I. T., Diz Dios, P. & Scully, C. (2002) An update on the controversies in bacterial endocarditis of oral origin. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology, and Endodontics* 93, 660–670.

Carroll, G. C. & Sebor, R. J. (1980) Dental flossing and its relationship to transient bacteraemia. *Journal of Periodontology* 51, 691–692.

Casserly P, Kieran S, Phelan E, Smyth E, Lacy P. Bacteremia During Adenoidectomy: A Comparison of Suction Diathermy Adenoid Ablation and Adenoid Curettage. *Annals of Otolaryngology & Rhinology* 2010. 119(8):526-529.

Cobe, H. M. (1954) Transitory bacteraemia. *Oral Surgery* 7, 609–615.

Crasta K, Daly CG, Mitchell D, Curtis B, Stewart D, Heitz-Mayfield LJA. Bacteraemia due to dental flossing. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 323-332.

Diz Dios, P., Tomás Carmona, I. & Limeres Posse, J. (2011) Bacteriemias producidas por intervenciones odontológicas (chapter no. 13). In: De Teresa, E. & Nogueroles, B. (eds). *Interacción entre la patología bucal y cardiovascular. Evidencia científica e implicaciones sanitarias*, pp. 159–169, Madrid: Editorial Médica Panamericana.

Drangsholt, M. T. (1998) A new causal model of dental diseases associated with endocarditis. *Annals of Periodontology* 3, 184–196.

Felix, J. E., Rosen, S. & App, G. R. (1971) Detection of bacteraemia after the use of an oral irrigation device in subjects with periodontitis. *Journal of Periodontology* 42, 785–787.

Fine DH, Furgang D, McKiernan M, Tereski-Bischio D, Ricci-Nittel D, Zhang P, Araujo MWB. An investigation of the effect of an essential oil mouthrinse on induced bacteraemia: a pilot study. *J Clin Periodontol* 2010; 37: 840-847.

García L, Tercero JC, Legido B, Ramos JA, Alemany J, Sanz M. Rapid detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* and *Porphyromona gingivalis* by multiplex PCR. *J Periodontal Res* 1998 01;33(1):59-64.

Gendron, R., Grenier, D. & Maheu-Robert, L. (2000) The oral cavity as a reservoir of bacterial pathogens for focal infections. *Microbes and Infection* 2, 897–906.

Gould, F. K., Elliot, T. S., Foweraker, J., Fulford, M., Perry, J. D., Roberts, G. J., Sandoe, J. A. & Watkin, R. W. & Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy (2006) Guidelines for the prevention of endocarditis: report of the Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57, 1035–1042.

Gutheroth, W. G. (1984) How important are dental procedures as a cause of infective endocarditis? *American Journal of Cardiology* 54, 797–801.

Haffajee AD, Patel M, Socransky SS. Microbiological changes associated with four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2008 04;23(2):148-157.

Jervøe-Storm P, Koltzsch M, Falk W, Dörfler A, Jepsen S. Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 2005 07;32(7):778-783.

Kebschull, M., Demmer, R. T. & Papapanou, P. N. (2010) “Gum bug, leave my heart alone!” – epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. *Journal of Dental Research* 89, 879–902.

Kinane, D. F., Riggio, M. P., Walker, K. F., MacKenzie, D. & Shearer, B. (2005) Bacteraemia following periodontal procedures. *Journal*

Lafaurie GI, Mayorga-Fayad I, Torres MF, Castillo DM, Aya MR, Baroñ A, Hurtado PA. Periodontopathic microorganisms in peripheral blood after scaling and root planing. *J Clin Periodontol* 2007; 34: 873-879.

Lockhart P, Brennan M, Thornhill M, Michalowicz B, Noll J, Bahrani-Mougeot F, Sasser H. Poor oral hygiene as a risk factor for infective endocarditis-related bacteremia. *J Am Dent Assoc.* 2009. 140(10): 1238-1244.

Loza Fernández de Bobadilla E, Planes Reig A, Rodríguez M (2003). Procedimientos en Microbiología Clínica 3: Hemocultivos. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: España.

Lucas V, Gafan G, Dewhurst S, Roberts G. Prevalence, intensity and nature of bacteraemia after toothbrushing. *Journal of Dentistry* 2008; 36 : 481-487.

Madsen, K. L. (1974) Effect of chlorhexidine mouthrinse and periodontal treatment upon bacteraemia produced by oral hygiene procedures. *Scandinavian Journal of Dental Research* 82, 1–7.

Murphy AM, Daly CG, Mitchell DH, Stewart D, Curtis BH. Chewing fails to induce oral bacteraemia in patients with periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2006; 33: 730-736.

Parahitiyawa, N. B., Jin, L. J., Leung, W. K., Yam, W. C. & Samaranayake, P. (2009) Microbiology of odontogenic bacteraemia: beyond endocarditis. *Clinical Microbiology Reviews* 22, 46–64.

Pucar, A., Milasin, J., Lekovic, V., Vukadinovic, M., Ristic, M., Putnik, M. & Kenney, E. B. (2007) Correlation between atherosclerosis and periodontal putative pathogenic bacterial infections in coronary and internal mammary arteries. *Journal of Periodontology* 78, 677–682.

Roberts GJ, Watts R, Longhurst P, Gardner P. Bacteremia of dental origin and antimicrobial sensitivity following oral surgical procedures in children. *Pediatr Dent*. 1998 Jan-Feb;20(1):28-36.

Roberts, G. J. (1999) Dentists are innocent! “everyday” bacteraemia is the real culprit: a review and assessment of the evidence that dental surgical procedures are a principal cause of bacterial endocarditis in children. *Pediatric Cardiology* 20, 317–325.

Romagna C, Dufour L, Troisgros O, Lorgis L, Richard C, Buffet P, Soulat G,

Casillas JM, Rioufol G, Touzery C, Zeller M, Laurent Y, Cottin Y. Periodontal disease: a new factor associated with the presence of multiple complex coronary lesions. *J Clin Periodontol* 2012; 39: 38-44.

Sakamoto M, Umeda M, Benno Y. Molecular analysis of human oral microbiota. *J Periodontal Res* 2005 06;40(3):277-285.

Santos CFD, Sakai VT, Machado, Maria Aparecida de Andrade Moreira, Schippers DN, Greene AS. Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. *J Appl Oral Sci* 2004 03;12(1):1-11.

Sanz M, D' Aiuto F, Deanfield J, and Fernandez-Avilés F. European workshop in periodontal health and cardiovascular disease—scientific evidence on the association between periodontal and cardiovascular diseases. *European Heart Journal* 2010; 12 (Supplement B), B3-B12.

Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol* 2004 12;31(12):1034-1047.

Sanz M, van Winkelhoff AJ, Herrera D, DelleMijn-Kippuw N, Simon R, Winkel E. Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographic location. Comparison between Spain and The Netherlands. *Eur J Dent Sci* 2000;108:383-92.

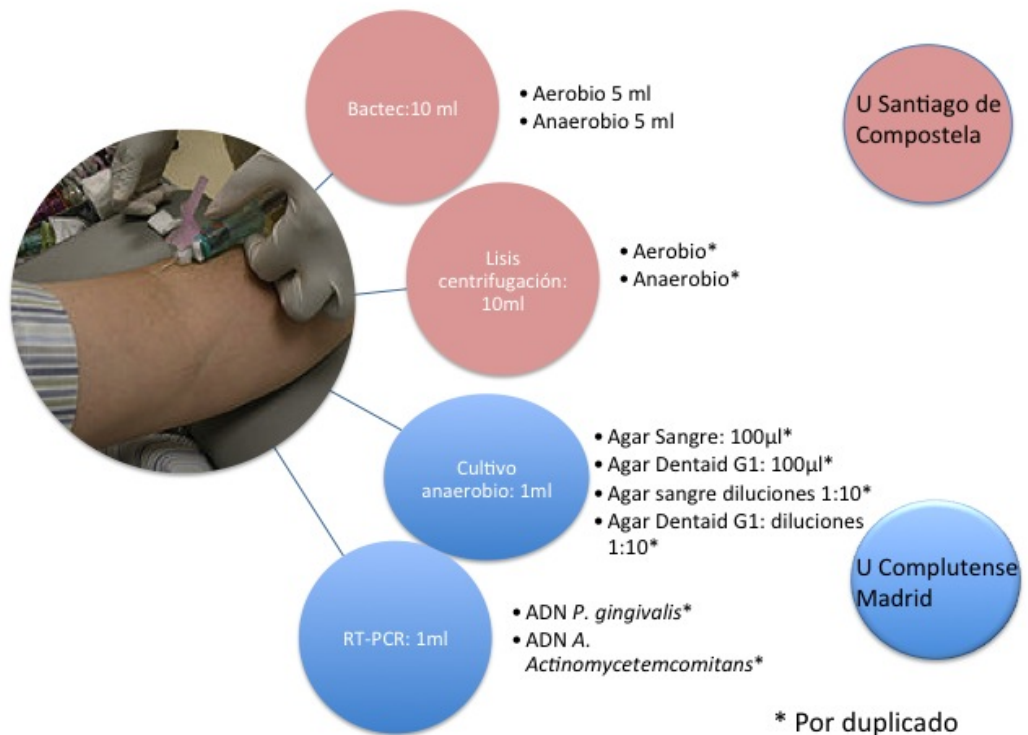
Toma's I, Diz P, Tobr'as A, Scully C, Donos N. Periodontal health status and bacteraemia from daily oral activities: systematic review/meta-analysis. *J Clin Periodontol* 2012; 39: 213–228.

Wilson, W., Taubert, K. A., Gewitz, M., Lockhart, P. B., Baddour, L. M., Levison, M., Bolger, A., Cabell, C. H., Takahashi, M., Baltimore, R. S., Newburger, J. W., Strom, B. L., Tani, L. Y., Gerber, M., Bonow, R. O., Pallasch, T., Shulman, S. T., Rowley, A. H., Burns, J. C., Ferrieri, P., Gardner, T., Goff, D. & Durack, D. T.

(2007) Prevention of infective endocarditis: guidelines from the American Heart Association. *Circulation* 116, 1736–1754.

ANEXOS I – FIGURA 1

Figura 1 - Esquema de procesamiento de las muestras: basal y posterior al cepillado dental



ANEXO II – TABLAS 1 y 2

Sujeto	diagnóstico periodontal	USC								UCM								
		HEMOCULTIVO BACTEC				LISIS - CENTRIFUGACIÓN				CULTIVO SANGRE		q PCR				CULTIVOS MUESTRAS SUBGINGIVALES		
		basal		T1		basal		T1		basal	T1	basal		T1		subgingival	ufc-subgingival	ufc-subgingival
		AE	ANA	AE	ANA	CO2	ANA	CO2	ANA			Aa	Pg	Aa	Pg	%	total	por mL
p25	sano	0	0	0	0	0	0	0	0	total:165		0	0	0	0	0	124080	
p30	sano	0	0	0	0	0	0	0	0	total: 521,4		0	0	0	0	Fn (4,17%)	63360	Fn: 2640
p8	sano	0	0	0	0	0	0	0	0		Fn: 127; total: 3432	0	0	0	0	Fn (3,57%)	3696	Fn: 132
p11	Gingivitis	0	0	0	cocos gram (+) hemolíticos *	0	0	1 UFC/500 µL Bacillus spp. *	1 UFC/500 µL Bacillus spp.*			0	0	0	0	Fn (2,03%) Mm (0,51%)	130020	Mn: 660; Fn: 2640
p18	Gingivitis	0	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)*	0	0	0	0	0	0			0	0	0	0	Fn (4,76%)	55440	Fn: 2640
p29	Gingivitis	0	0	0	0	0	0	0	0		Fn: 19,8; total: 587,4	0	0	0	0	Mm (1,27%); (Fn 2,53%)	52140	Mn: 660; Fn: 1320
p31	Gingivitis	0	0	0	0	4 UFC/ 500 µL. Micrococcus spp., Moraxella spp. y Corynebacterium spp.	0	1 UFC/500 µL Corynebacterium spp	0			0	0	0	0	Pi (4,48%); Fn (0,76%); Cr (0,76%); Ec (2,29%)	864600	Pi: 39600; Fn: 6600; Cr: 6600; Ec: 19800
p34	Gingivitis	0	0	0	0	0	1 ufc/500 µL <i>Staphylococcus coagulasa</i> (-) *	0	1 ufc/500 µL <i>Fusobacterium nucleatum</i>			0	0	0	0	Fn (0,46%); Ec (0,46%)	285780	Fn: 1320; Ec: 1320
p38	Gingivitis	0	0	0	0	0	0	0	0		Total: 23760	0	0	0	0	Fn (0,32%); Ec (2,23%)	207240	Fn: 660; Ec: 4620
p13	Periodontal	<i>Staphylococcus capitis</i> *	0	0	0	0	0	0	0			0	0	0	0	Pg (8,9%); Mm 0,94%	69960	Pg: 5940; Mm: 660; Fn: 660

Basal	muestra de sangre tomada antes del cepillado	Ec	<i>Eikenella corrodens</i>
T1	muestra de sangre tomada después del cepillado	Pg	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
total	bacterias presentes en el cultivo, que no es periodontopatógeno y no fue identificado	Pi	<i>Prevotella intermedia</i>
Fn	<i>Fusobacterium Nucleatum</i>	*	contaminación
Mn	<i>Micromonas micros</i>		

Sujeto	Tipo Sujeto	aubgingival	TOTAL	A.a.	P.gingivalis	P.intermedia	M.micros	F.nucleatum	C.rectus	E.corrodens	T. forsythia	Capnoc. sp.	Eubacterium	Otros
p1	Periodontal	%		0.00	24.39	7.32	9.76	2.44	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	0	####	198000	264000	66000	0	0	0	0	0	0	0
p2	Periodontal	%		0.00	18.57	31.43	2.14	3.57	1.43	0.00	3.57	0.71	0.00	0.00
		ufc	9240000	0	1716000	2904000	198000	330000	132000	0	330000	66000	0	0.00
p3	Periodontal	%		0.00	4.72	10.38	7.55	2.83	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	6996000	0	330000	726000	528000	198000	0	0	0	0	0	0.00
p4	Control	%		0.00	12.83	56.98	0.75	3.40	0.00	2.26	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	1749000	0	2244000	996600	13200	59400	0	39600	0	0	0	0.00
p5	Periodontal	%		0.00	0.00	1.60	0.00	5.60	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	82500	0	0	1320	0	4620	0	0	0	0	0	0.00
p6	Periodontal	%		0.00	27.45	1.47	0.00	6.86	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	1346400	0	369600	19800	0	92400	0	0	0	0	0	0.00
p7	Control	%		0.00	0.00	0.00	0.00	3.48	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	759000	0	0	0	0	26400	0	0	0	0	0	0.00
p8	Control	%		0.00	0.00	0.00	0.00	3.57	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	3696	0	0	0	0	132	0	0	0	0	0	0.00
p9	Control	%		0.00	0.00	0.00	0.00	31.67	0.00	5.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	11880	0	0	0	0	3762	0	594	0	0	0	0.00
p10	Periodontal	%		0.00	34.67	2.67	0.00	1.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.33
		ufc	9900000	0	3432000	264000	0	132000	0	0	0	0	0	0
p11	Gingivitis	%		0.00	0.00	0.00	0.51	2.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	130020	0	0	0	660	2640	0	0	0	0	0	0.00
p13	Periodontal	%		0.00	8.49	0.00	0.94	0.94	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	69960	0	5940	0	660	660	0	0	0	0	0	0.00
p16	Gingivitis	%		0.00	0.00	0.00	0.00	1.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	38280	0	0	0	0	660	0	0	0	0	0	0.00
p17	Control	%		0.00	0.00	0.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	263340	0	0	660	0	0	0	0	0	0	0	0.00
p18	Gingivitis	%		0.00	0.00	0.00	0.00	4.76	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	55440	0	0	0	0	2640	0	0	0	0	0	0.00
p19	Periodontal	%		0.00	0.00	5.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	5280000	0	0	264000	0	0	0	0	0	0	0	0.00
p20	Control	%		0.00	0.00	0.00	0.00	1.35	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	4884	0	0	0	0	66000	0	0	0	0	0	0.00
p21	Control	%		0.00	0.00	0.00	0.00	11.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	8844	0	0	0	0	990	0	0	0	0	0	0.00
p22	Control	%		0.00	0.00	0.78	0.00	1.55	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	8514	0	0	66	0	1320	0	0	0	0	0	0.00
p23	Control	%		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	6600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
p24	Control	%		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	6.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
p25	Control	%		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	124080	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
p26	Control	%		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	34320	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
p27	Control	%		0.00	0.00	0.00	0.00	22.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	508.2	0	0	0	0	112.2	0	0	0	0	0	0.00
p28	Gingivitis	%		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	4026000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
p29	Gingivitis	%		0.00	0.00	0.00	1.27	2.53	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	52140	0	0	0	660	1320	0	0	0	0	0	0.00
p30	Control	%		0.00	0.00	0.00	0.00	4.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	63360	0	0	0	0	2640	0	0	0	0	0	0.00
p31	Gingivitis	%		0.00	0.00	4.58	0.00	0.76	0.76	2.29	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	864600	0	0	39600	0	6600	6600	19800	0	0	0	0.00
p32	Control	%		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	46200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
p34	Gingivitis	%		0.00	0.00	0.00	0.00	0.46	0.00	0.46	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	285780	0	0	0	0	1320	0	1320	0	0	0	0.00
p35	Periodontal	%		0.00	0.00	15.71	5.71	5.71	0.00	1.43	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	4620000	0	0	726000	264000	264000	0	66000	0	0	0	0.00
p36	Gingivitis	%		0.00	3.77	0.94	0.00	5.66	0.00	2.83	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	699600	0	26400	6600	0	39600	0	19800	0	0	0	0.00
p37	Gingivitis	%		0.00	0.00	0.00	0.00	21.82	4.55	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	726000	0	0	0	0	158400	33000	0	0	0	0	0.00
p38	Gingivitis	%		0.00	0.00	0.00	0.00	0.32	0.00	2.23	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	207240	0	0	0	0	660	0	4620	0	0	0	0.00
p39	Control	%		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		ufc	48840	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00