

**EVALUACIÓN DEL LIMITE DE DETECCIÓN DEL HEMOCULTIVO PARA
IDENTIFICACIÓN DE *Porphyromonas gingivalis* BASADO EN DROPLET DIGITAL
PCR EN PACIENTES CON PERIODONTITIS.**

**Jessica Rocío González Méndez
Luisa Fernanda Murillo Mora**

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE
PROGRAMA DE ODONTOLOGÍA - FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
BOGOTÁ D.C. MAYO 2019**

HOJA DE IDENTIFICACIÓN

Universidad	El Bosque
Facultad	Odontología
Programa	Odontología
Título:	Evaluación del límite de detección del hemocultivo para identificación de <i>Porphyromonas gingivalis</i> basado en DROPLET digital PCR en pacientes con periodontitis.
Grupo de investigación	Unidad de Investigación Básica Oral- UIBO
Línea de investigación:	Microbiología Oral
Institución participante:	Facultad de Odontología - Universidad El Bosque
Tipo de investigación:	Pregrado/Docente
Estudiantes:	Jessica Rocío González Méndez Luisa Fernanda Murillo Mora
Director:	Dra. Diana Marcela Castillo Perdomo
Codirector:	Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil
Asesor Estadístico:	Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

HERNANDO MATIZ CAMACHO	Presidente del Claustro
JUAN CARLOS LOPEZ TRUJILLO	Presidente Consejo Directivo
MARIA CLARA RANGEL G.	Rector(a)
RITA CECILIA PLATA DE SILVA	Vicerrector(a) Académico
FRANCISCO FALLA	Vicerrector Administrativo
MIGUEL OTERO CADENA	Vicerrectoría de Investigaciones.
LUIS ARTURO RODRÍGUEZ	Secretario General
JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS	División Postgrados
MARIA ROSA BUENAHORA	Decana Facultad de Odontología
MARTHA LILILIANA GOMEZ RANGEL	Secretaria Académica
DIANA ESCOBAR	Directora Área Bioclínica
MARIA CLARA GONZÁLEZ	Director Área comunitaria
FRANCISCO PEREIRA	Coordinador Área Psicosocial
INGRID ISABEL MORA DIAZ	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología

“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

Agradecimientos

Agradecemos en primer lugar a Dios no solo por permitirnos finalizar este trabajo sino también por acompañarnos durante todo el proceso de nuestra formación académica, por darnos la fortaleza y el optimismo para culminar correctamente cada uno de los propósitos que nos planteamos a lo largo de nuestra carrera universitaria y por darnos ese empujoncito cuando creíamos que no sería posible alcanzar esta meta.

A la Facultad de Odontología de La Universidad El Bosque por brindarnos la oportunidad de pertenecer a esta institución en la que nos desarrollamos como seres humanos integrales, sin duda cerramos este ciclo siendo personas completamente diferentes, con actitudes y comportamientos adecuados para enfrentar cada una de las situaciones que se nos presenten en nuestro ámbito personal y profesional.

A la Unidad de Investigación Básica Oral (UIBO), por permitirnos hacer parte de este proyecto, por poner a nuestra disposición las instalaciones y los equipos necesarios para el desarrollo del mismo; a su líder y nuestra asesora metodológica la **Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil** por el acompañamiento y conocimientos brindados a nosotros los estudiantes desde IV semestre en *Metodología de la investigación* y por alentarnos y encaminarnos al aprendizaje autónomo. Asimismo, agradecemos a las Dras. Yormaris Castillo, Nathaly Delgadillo y Yineth Neuta por apoyarnos e involucrarse en nuestro proyecto y por la amabilidad de explicarnos y aclarar cuantas veces fuera necesario las dudas que se nos presentaban.

A nuestras amigas, Ángela Algarra y Valentina Escobar por brindarnos su amistad sincera, por permitirnos conocerlas y compartir esta etapa de nuestra vida con ellas, por abrir sus corazones y hacernos partícipes de sus alegrías y de sus tristezas, por estar al pendiente, por preocuparse por el avance de este trabajo y por colaborarnos de alguna manera en la culminación del mismo.

*Por ultimo pero no menos importante, a la **DRA. DIANA MARCELA CASTILLO PERDOMO**, nuestra asesora temática, quién desde que manifestamos nuestro interés en realizar nuestro trabajo de grado con ella nos ha orientado y llevado de la mano con todo el amor posible, nos ha tenido toda la paciencia que un docente requiere para guiar a un estudiante, por halarnos las orejas cuando fue necesario y por dedicar y hacer espacio en su apretada agenda para colaborarnos, gracias también por estar atenta e interesarse por nuestro bienestar personal, por motivarnos y brindarnos su confianza.*

Dedicatoria

Este trabajo lo dedicamos a nuestros padres, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes hemos logrado llegar hasta aquí y convertirnos en lo que somos. A nuestros hermanos por estar siempre presentes, acompañándonos y apoyándonos a lo largo de este camino.

De igual manera queremos dedicarle y agradecerle a la Dra. Diana Castillo por su apoyo en este proceso, por guiarnos y compartir con nosotras su conocimiento y así poder culminar esta etapa de la mejor manera.

TABLA DE CONTENIDO

Resumen

Abstract

Lista de tablas

Lista de figuras

1.	Introducción.....	1
2.	Marco teórico	2
2.1	Enfermedad periodontal.....	2
2.2	Bacteremia después de tratamientos orales.....	2
2.2.1	Bacteremia.....	3
3.	Planteamiento del problema.....	6
4.	Justificación	8
5.	Situación Actual en el área de investigación.....	9
6.	Objetivos.....	10
6.1	Objetivo general.....	10
6.2	Objetivos específicos.....	10
7.	Metodología del Proyecto.....	11
7.1	Tipo de estudio.....	11
7.2.	Población y muestra	11
7.2.1	Criterios de inclusión	11
7.2.2	Criterios de exclusión	11
8.	Materiales y métodos	12
8.1.	Protocolo clínico de cepillado dental.....	12
8.2.	Cultivo de muestras de sangre periférica (hemocultivo).....	12
8.3.	Cuantificación de los microorganismos presentes en bacteremia.....	12
9.	Consideraciones éticas.....	15
10.	Resultados	16
11.	Discusión.....	20
12.	Conclusiones.....	22
13.	Referencias bibliográficas	23

RESUMEN

Antecedentes: Se ha descrito que uno de los principales agentes etiológicos que contribuye a la progresión de la periodontitis es la *Porphyromonas gingivalis*, además de la asociación con enfermedades sistémicas asociado al paso del microorganismo a la sangre. Se han utilizado diferentes técnicas moleculares como la PCR y los hemocultivos para la identificación de este periodontopatógeno en sangre. Sin embargo, el hemocultivo presenta desventajas frente a los métodos moleculares en cuanto a su sensibilidad, recientemente se desarrolló la ddPCR que reporta sensibilidades de hasta una copia de DNA. **Objetivo:** Comparar la detección de *Porphyromonas gingivalis* por hemocultivo y ddPCR a partir de sangre periférica en pacientes con periodontitis crónica después de cepillado dental. **Métodos:** Se incluyeron 34 pacientes con periodontitis con previo consentimiento informado. Se realizó cepillado supervisado durante 2 minutos en cuatro tiempos diferentes (antes T0, inmediatamente terminado T1, a los 15 min posteriores T2 y una hora después T3) en los cuales se tomó una muestra de sangre periférica para la realización del hemocultivo, la detección y cuantificación mediante la ddPCR. **Resultados:** En un total de 34 pacientes la detección de *P. gingivalis* por hemocultivo fue del 2,34% mientras que por ddPCR fue del 79,41% hasta T2. En 28 pacientes se realizó el análisis hasta el T3 en donde la detección de *P. gingivalis* por hemocultivo fue del 3,6% mientras que para ddPCR fue del 78,6%. De manera interesante a la hora del cepillado la cantidad de *P. gingivalis* disminuye hasta el 67,9%. En cuanto a la cuantificación la bacteremia alcanzó recuentos más altos en el T2 con una mediana de 6,25 copias/ μ L y un IQR: 2,5-39, mientras que para el análisis hasta el T3 los recuentos alcanzaron una mediana de 14 copias/ μ L IQR=0-86). **Conclusiones:** Se demostró que para la detección de *Porphyromonas gingivalis* de pacientes con periodontitis a partir de sangre periférica la ddPCR es más sensible y rápido en comparación con el hemocultivo. Además, permite realizar la cuantificación de la bacteria.

Palabras Clave: *Porphyromonas gingivalis*, hemocultivo, PCR

ABSTRACT

Background: One of the main ethiological agents contributing to the progression of periodontitis is the *Porphyromonas gingivalis*, in addition to the association with systemic diseases due to the micro-organism's transit through the bloodstream. Several molecular techniques have been used, such as PCR and haemo-cultures for identification of this periodonto-pathogen. However, the culture presents disadvantages in sensitivity with regards to molecular methods. Recently, ddPCR has been developed which reports sensitivities up to one DNA copy. **Objective:** to compare the detection of *Porphyromonas gingivalis* with haemo-culture and ddPCR in peripheral blood after brushing from patients with chronic periodontitis. **Methods:** The sample consisted of 34 patients with periodontitis, who had signed an informed consent. A brushing was carried out for two minutes during four different times (before T0, immediately after T1, after 15 minutes T2 and one hour after T3), after which a peripheral blood sample was taken for the culture, detection and quantification by ddPCR. **Results:** The detection of *P. gingivalis* by haemo-culture among the 34 patients was of 2.34% and with ddPCR was 79.41% up to T2. The analysis was done on 28 patients up to T3, where detection of *P. gingivalis* by culture was 3.6% and ddPCR was 78.6%. The level of *P. gingivalis* diminishes with brushing up to 67.9% and bacterial quantification reached highest levels during T2 with a median of 6.25 copies/ μ L IQR: 2.5-39 and analysis for T3 reached a median count of 14 copies/ μ L IQR=0-86. **Conclusions:** detection of *Porphyromonas gingivalis* from peripheral blood with ddPCR is more sensitive and faster compared to the haemo-culture. Additionally, it allows bacterial quantification.

Key words: *Porphyromonas gingivalis*, haemo culture, PCR

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. <i>P. gingivalis</i> identificada en muestras de sangre periférica por hemocultivo y ddPCR en diferentes tiempos de evaluación n=34.....	16
Tabla 2. <i>P. gingivalis</i> identificada en muestras de sangre periférica por hemocultivo y ddPCR en diferentes tiempos de evaluación n=28.....	17
Tabla 3. Frecuencia (%) de identificación de <i>P. gingivalis</i> por hemocultivo y por ddPCR n=34.....	17
Tabla 4. Frecuencia (%) de identificación de <i>P. gingivalis</i> por hemocultivo y por ddPCR n=28.....	17
Tabla 5. Análisis cuantitativo ddPCR n=34.....	18
Tabla 6. Análisis cuantitativo ddPCR n=28.....	19

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *Diagrama de caja cuantificación ddPCR n=34*.....18

Figura 2. *Diagrama de caja cuantificación ddPCR n=28*.....19

LISTA DE ABREVIACIONES

Abreviatura	Término
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
<i>P. gingivalis</i>	Porphyromonas gingivales
ddPCR	Droplet Digital PCR

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal comprende un conjunto de infecciones originadas por microorganismos que penetran el tejido periodontal, afectan la unión del tejido conectivo y el hueso alveolar, y consecuentemente conducen a la pérdida de las estructuras dentales. La periodontitis ha sido durante mucho tiempo un problema de salud pública que aqueja a la población en general y es por esto que es un reto para el odontólogo abordarla de la forma correcta.

Se ha descrito que *Porphyromonas gingivalis* es uno de los principales agentes etiológicos que contribuye a la progresión de esta enfermedad; factores estructurales como las fimbrias proporcionan su adhesión a los tejidos periodontales y de la misma forma los factores de secreción como las proteasas hidrolizan los componentes de este tejido originando así daño tisular y pérdida de soporte (Cardozo *et al.*, 2015), de manera que la detección de este microorganismo es de gran relevancia para realizar un diagnóstico y planificación de tratamiento apropiado.

Existen diversos métodos de estudio de microorganismos, la utilización de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y también los hemocultivos han permitido la detección de este periodontopatógeno; a pesar de que la primera es una técnica sensible y específica que precisa de menor tiempo, la segunda ha sido la técnica convencional y de mayor uso en los laboratorios para la identificación de estos microorganismos en sangre; sin embargo algunos autores afirman que la necesidad de utilizar medios de enriquecimiento podrían disminuir la cuantificación y por lo tanto reducir la fiabilidad de su sensibilidad (Castillo *et al.*, 2011).

En referencia a lo anterior, este trabajo se realizará con el fin de evaluar la presencia de *Porphyromonas gingivalis* en muestras de sangre de pacientes con periodontitis severa previo y posterior a realizar raspaje y alisado radicular por medio de PCR digital y hemocultivo.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Enfermedad periodontal

La periodontitis es una de las enfermedades orales que más afecta a los individuos y hoy en día la prevalencia mundial según la Organización Mundial de la Salud es de 80% y en Colombia según el Estudio Nacional De Salud Bucal (ENSAB IV), la mayor parte de la población (61.8%) evidencia periodontitis en sus diferentes grados de severidad, siendo la más frecuente la periodontitis moderada, presente en el 43.46% de los sujetos, seguida por 10.62% con periodontitis avanzada, con un 38,20% de los sujetos que se clasifican como sin periodontitis y se define como una enfermedad inflamatoria crónica. Su etiología se basa principalmente en la acumulación de bacterias periodontales ubicadas dentro de la placa subgingival estableciendo así una microbiota que da lugar a la destrucción de los tejidos de soporte del diente (Yashima *et al.*, 2009, Castillo *et al.*, 2011).

2.2 Bacteremia después de tratamientos orales

Los microorganismos más encontrados en el torrente sanguíneo relacionados con la periodontitis son: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus* estos se encuentran presentes en grandes cantidades en bolsas periodontales profundas y en condiciones periodontales severas (Castillo *et al.*, 2011, Lafaurie *et al.*, 2007b).

Este conocimiento hizo posible definir datos microbiológicos útiles de la terapia periodontal y reforzó el concepto de que la eficacia clínica está asociada con la supresión de patógenos periodontales y la recolonización por especies compatibles con el hospedador (Carvalho *et al.*, 2005).

La erradicación de este tipo de infección suele no ser efectiva solamente con el uso de antibióticos, debe haber una eliminación de la placa supragingival, sobre todo en los pacientes que presentan un control de placa bacteriana deficiente, ya que sin el retiro de esta no se logran cambios clínicos; por lo que es necesario realizar la eliminación de la biopelícula mediante desbridamiento mecánico (Yashima *et al.*, 2009, Carvalho *et al.*, 2005).

El raspaje y alisado radicular es el tratamiento periodontal más común y varios estudios han demostrado una mejora en los signos clínicos con el uso de esta terapia tiene. El objetivo de esta es la eliminación tanto del cálculo y el cemento contaminado como la remoción bacteriana adherida a las superficies radiculares y las bolsas periodontales mediante la instrumentación. La disminución de la microbiota bacteriana con la primera sesión de este procedimiento es considerablemente positiva aun sin la supresión completa de los depósitos de cálculo subgingivales (Bollen *et al.*, 1996. Carvalho *et al.*, 2005, Toshiya *et al.*, 2010).

Sin embargo, en estos pacientes la literatura reporta que diferentes procedimientos odontológicos pueden llegar a provocar el paso de este tipo de bacterias periodontopáticas al torrente sanguíneo, entre algunos de ellos se encuentran exodoncias, retiro de suturas, endodoncias, sondaje, raspaje y alisado radicular; no obstante, la bacteremia, también puede ser causada en menos frecuencia por hábitos cotidianos como la masticación, el cepillado dental que ha reportado prevalencia de bacteremia del 0-62% y el uso de la seda dental del 02-41 % (Forner *et al.*, 2006, Toshiya *et al.*, 2010, Castillo *et al.*, 2011, Lafaurie *et al.*, 2007, Hartzel *et al.* 2005).

2.3 Bacteremia

Varios estudios han señalado que de los microorganismos asociados a enfermedades sistémicas como aterosclerosis, aneurisma aórtico abdominal y la enfermedad de Buerger; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis* son las bacterias que se encuentran con más frecuencia en muestras de sangre periférica (Forner *et al.*, 2006, Toshiya *et al.*, 2010, Castillo *et al.*, 2011, Lafaurie *et al.*, 2007).

Puede presentarse una considerable variabilidad debido a las técnicas utilizadas, el uso de un torniquete, los componente de la anestesia, el tiempo de recolección de muestras de sangre, el estado periodontal, la composición de la microbiota gingival y los métodos de identificación para el aislamiento de microorganismos (Toshiya *et al.*, 2010, Castillo *et al.*, 2011)

Adicionalmente, se reporta que la coagulación de la sangre, la función de las plaquetas, y síntesis de prostaglandinas puede verse afectada por los componentes de las bacterias que causan infecciones orales especialmente el lipopolisacárido, (Toshiya *et al.*, 2010).

Los tratamientos periodontales no quirúrgicos que causan bacteremia muy pocas veces afecta a personas sanas, debido a que las células fagocíticas eliminan estos microorganismos rápidamente del torrente sanguíneo. En pacientes con compromisos sistémicos este tipo de procedimientos podrían causar el desarrollo de endocarditis infecciosa e infección protésica articular y una variedad de otras infecciones del sitio distante (Toshiya *et al.*, 2010).

Lafaurie *et al.*, (2007) reportó que el 28,6% de todas las bacteremias son causadas por *Porphyromonas gingivalis*

“La endocarditis infecciosa es una enfermedad grave y potencialmente mortal”, esta puede afectar a pacientes con enfermedades de base como son: enfermedades congénitas, defectos endocárdicos adquiridos o prótesis valvulares, ya que las bacterias que pasan al torrente sanguíneo pueden propagarse rápidamente. Por lo anterior, es importante realizar un examen clínico y radiográfico exhaustivo previo a iniciar un tratamiento dental en pacientes con alto riesgo de desarrollar endocarditis infecciosa para así desarrollar un tratamiento adecuado (Daly *et al.*, 1997).

En el estudio realizado por Forner en el 2006 se evidenciaron diferencias entre los microorganismos de acuerdo a la condición periodontal que presentaban los participantes, se encontró entre los individuos que desarrollaron bacteremia que en aquellos que tenían gingivitis fueron aislados bacilos Gram positivos y *F. nucleatum* a diferencia de los que tenían periodontitis en los que la diversidad de especies fue mayor encontrando bacilos Gram negativos anaeróbicos como *P. intermedia*, *Prevotella buccae*, *F. nucleatum* y *P. gingivalis* lo que expresa que la flora bacteriana de esta última es mucho más compleja; indicando que estos pacientes constituyen un riesgo significativo de invasión tisular. (Forner *et al.*, 2006)

Con respecto, a los pacientes con el hábito de fumar, estos presentan menos sangrado gingival, que los pacientes que no fuman. Por esto, esta condición influye potencialmente la incidencia de bacteriemia. Sin embargo, el estudio realizado por Toshiya en el 2010 se mostró

que no hay una diferencia significativa entre fumadores y no fumadores en la tasa de incidencia de bacteremia después de raspaje y alisado radicular, explicando que esta situación pudo deberse a la cantidad y frecuencia de paquetes de cigarrillos consumidos por año.

Diferentes estudios han reportado que la infección local y la bacteriemia transitoria debida a bacterias periodontopáticas pueden estar relacionadas con la patogénesis de la asociación entre la enfermedad periodontal y la enfermedad cardiovascular y accidente cerebrovascular. (Toshiya *et al.*, 2010, Castillo *et al.*, 2011)

Para evaluar la presencia de microorganismos periodontopáticos presentes en sangre, el método diagnostico implementado con más frecuencia ha sido el hemocultivo. No obstante, la sensibilidad y la capacidad de detectar pequeñas cantidades de bacterias se ve disminuida, ya que esta requiere medios enriquecidos y no es totalmente confiable; por lo cual el uso de otras técnicas como la molecular puede hacer que tanto la sensibilidad como la especificidad aumenten. (Castillo *et al.*, 2011)

Dado que la bacteremia causada por procedimientos dentales puede causar endocarditis infecciosa y aunque no se tiene datos concretos Daly en su estudio de 1997 estima que se presenta entre el 15 y 40 % de casos en pacientes con lesiones cardiacas previas. Por lo tanto es conveniente hacer uso de profilaxis antibiótica. El estudio realizado por Morozumi en 2010 expuso que la administración de azitromicina como profilaxis antibiótica evidencia una reducción significativa en el riesgo de desarrollar endocarditis bacteriana por lo cual, se consideró efectiva en la bacteremia luego de realizar raspaje y alisado radicular. (Daly *et al.*, 1997, Toshiya *et al.*, 2010).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Descripción del problema

La etiopatogenia de la periodontitis se basa en la definición de periodontitis como enfermedad inflamatoria crónica causada por bacterias que residen en la biopelícula subgingival, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* han sido los patógenos específicos más frecuentemente asociados con esta enfermedad, están presentes en grandes cantidades en bolsas periodontales profundas y en condiciones periodontales graves (Dzink *et al.*, 1988, Ali *et al.*, 1996, Ashimoto *et al.*, 1996, Haffajee *et al.* 2008). En Colombia la prevalencia de periodontitis es alta, el 61,8 % según el ENSAB IV, por ende la bacteriemia asociada a periodonto patógenos también es de alta frecuencia ya que esta es causada generalmente por estímulos asociados a tratamientos periodontales (raspaje y alisado radicular) que reciben estos pacientes y también a actividades cotidianas como el cepillado.

Varios estudios han demostrado identificación de patógenos periodontales tales como *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* en muestras de sangre periférica (bacteriemia) en los pacientes con periodontitis severa mediante el uso de hemocultivo, sin embargo se han implementado técnicas moleculares como la PCR utiliza primers específicos amplificados para genes de ARN ribosomal 16S (Forner *et al.* 2006).

Para la detección de estas bacterias en sangre periférica se han utilizado dos métodos principalmente los cuales son hemocultivo y Nested-PCR. Algunos estudios afirman que el hemocultivo es el método más utilizado para la detección de bacterias en sangre periférica ya que detecta tasas altas inmediatamente después de la intervención periodontal, sin embargo, requiere el uso de medios enriquecidos que promueven el crecimiento y proliferación de bacterias lo que hace que su especificidad no sea confiable en los tiempos de muestras posteriores por lo cual no provee la cantidad exacta de microorganismos (Messini *et al.*, 1999, Forner *et al.*, 2006, Lafaurie *et al.*, 2007), por esto se propone utilizar la técnica de PCR digital que puede aumentar la sensibilidad y la especificidad de la detección de los patógenos periodontales al utilizar la técnica molecular para la detección de

microorganismos con cebadores específicos para ARN ribosomal 16s, que además permite cuantificar de manera absoluta las copias de DNA que pasan al torrente sanguíneo.

4. JUSTIFICACIÓN

Debido a la alta prevalencia de paso de periodonto patógenos a torrente sanguíneo (bacteremia) de pacientes con periodontitis después del cepillado dental, este trabajo es relevante, ya que si se demuestra el paso de estas bacterias al torrente sanguíneo comparando el método de hemocultivo y PCR digital, esto puede demostrar la frecuencia del paso de *Porphyromonas gingivalis* al torrente sanguíneo luego de este procedimiento. Además se puede identificar cual método de detección de *Porphyromonas gingivalis* en sangre periférica es de mayor utilidad y esto puede aportar para estudios posteriores que realicen investigaciones acerca del paso de periodontopatógenos a sangre periférica. Según el estudio Castillo *et al.*, 2011 reporta que la prevalencia de *Porphyromonas gingivalis* en placa subgingival es de 100% y de 28,6 % para sangre periférica en pacientes con periodontitis, es probable que por los métodos usados se estén subvalorando las frecuencias de este patógeno en sangre periférica, además este nuevo método permite cuantificar de manera absoluta.

5. SITUACIÓN ACTUAL EN EL AREA DE INVESTIGACIÓN

La bacteriemia se ha asociado a actividades diarias comunes como el cepillado de los dientes, el uso de hilo dental y la masticación, aunque la acumulación de placa y la inflamación gingival estaban significativamente correlacionadas con la bacteriemia debida al cepillado, no se encontraron tales correlaciones para la bacteriemia causada por el uso de hilo dental o la masticación.

También se ha asociado la bacteremia secundario a procedimientos odontológicos como el raspaje y alisado radicular en pacientes con periodontitis, que al igual que en el cepillado se correlaciona con acúmulos de placa dental e inflamación periodontal, ya que la bacteremia se produce cuando las bacterias que hay en boca pasan al torrente sanguíneo. Diversos estudios han descrito técnicas para detectar microorganismos en sangre periférica como el hemocultivo y PCR. (Zhang *et al.*, 2013)

A pesar de que se conoce que la bacteremia es transitoria, es importante tener en cuenta que los microorganismos en cavidad oral pueden causar infecciones distantes. Hoy en día la asociación de ésta con la patogénesis de la aterosclerosis ha sido un tema de interés debido a que la evidencia muestra que los componentes de estos microorganismos juegan un papel importante en la formación de trombos y por consiguiente conducir a infarto cerebral e infarto agudo de miocardio, esto porque en particular el lipopolisacárido afecta la coagulación de la sangre, la función de las plaquetas y la síntesis de prostaglandinas. (Alka *et al.*, 2013)

6. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

6.1 *Objetivo general*

Comparar la detección de *Porphyromonas gingivalis* por hemocultivo y PCR digital a partir de sangre periférica en pacientes con periodontitis crónica después de cepillado dental.

6.2 *Objetivos específicos*

- Establecer el promedio y los intervalos de confianza de la UFC detectadas por la ddPCR
- Establecer la concordancia para la identificación de *P. gingivalis* de hemocultivo y ddPCR
- Establecer el límite de detección del hemocultivo con base a ddPCR por curva ROC

7. ASPECTOS METODOLÓGICOS ESPECÍFICOS

7.1 Tipo de Estudio: Descriptivo de corte transversal

7.2 Población y muestra: 34 Pacientes con periodontitis a los que se les realizara una sesion supervisada de cepillado dental en diferentes tiempos.

7.3 Criterios de selección de la muestra:

- Pacientes que acepten participar en el estudio y firmen consentimiento informado
- Pacientes con diagnóstico de periodontitis de moderada a severa de acuerdo a los criterios de la Academia Americana de Periodoncia [AAP 1999].
- Cada paciente debía tener al menos 4 bolsas periodontales con profundidades al sondaje de 5 a 7 mm en cada cuadrante.
- Pacientes adultos mayores entre 18 y 65 años
- Pacientes sin enfermedad actual o con patologías crónicas en control médico que no afecta los procesos de cicatrización como: hipertensión controlada, hipotiroidismo controlado.
- Tabaquismo. Consumo de cigarrillos no mayores a 10/día.

7.4 Criterios de exclusión de la muestra:

- Pacientes con la cualquiera de las siguientes condiciones sistémicas
 - Defectos congénitos de las válvulas cardíacas
 - Cualquier condición de riesgo para endocarditis infecciosa.
 - Diabetes
 - Mujeres embarazadas o en lactancia
 - Cualquier enfermedad infecciosa
 - Obesidad
 - Pacientes con alto riesgo cardiovascular
 - Pacientes que han sido tratados con Antibióticos un mes antes del procedimiento.
 - Pacientes con enfermedades autoinmunes
 - Pacientes en tratamiento con AINES crónicos y estatinas
 - Pacientes alérgicos a la penicilina

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Protocolo clínico de Cepillado dental

Los pacientes fueron atendidos a primera hora de la mañana para realizar el procedimiento clínico, con anterioridad se les indicó no consumir líquidos y no realizar higiene oral. Se realizó asepsia y antisepsia para la toma secuencial de muestras de sangre; la cual se llevó a cabo introduciendo un catéter en la vena anti cubital. Se tomaron 6 muestras de 15 ml; la primera antes del cepillado (T0) para evaluar la presencia o ausencia de microorganismos por hemocultivo y ddPCR, la segunda una vez terminó el cepillado dental el cual fue supervisado y tuvo una duración de 2 minutos (T1) para evaluación de bacteriemia por ddPCR y hemocultivo y la tercera a los 15 minutos de terminado el cepillado (T2). Una hora después del cepillado dental se realizó una nueva toma (T3) para verificación de la ausencia de bacteriemia e iniciar el ciclo de masticación. Cada paciente consumió una dieta hipocalórica (café con leche deslactosada y queso pera) e inmediatamente se tomó una nueva muestra (T4) para evaluar bacteriemia por ddPCR y hemocultivo, 15 minutos después de la dieta se toma otra muestra (T5) en la cual se evalúa bacteriemia por ddPCR y hemocultivo asociado a masticación.

8.2 Cultivo de muestras de sangre periférica (Hemocultivo).

Para la realización del Hemocultivo se sembraron 3.0 mL de sangre en el medio bifásico de Ruiz Castañeda (Biobacter) suplementado con hemina y menadiona el cual se llevó a incubación a 36°C durante 15 días. Para evidenciar la presencia de *P. gingivalis* o cualquier otro microorganismo en la sangre, se realizaron subcultivos a los 7 y a los 15 días de incubación antes de descartar la muestra. Las condiciones de las resiembras se realizaron en los mismos medios y siguiendo las mismas condiciones y técnicas utilizadas para el cultivo de las muestras de placa subgingival.

8.3 Cuantificación de los microorganismos presentes en bacteriemia

La cuantificación de los microorganismos se realizará mediante la PCR digital que permite la cuantificación absoluta de los blancos moleculares. Se divide la muestra en gran número de

porciones en un microarreglo las cuales pueden tener cero o una (o más copias) de las moléculas blanco. Después de la amplificación, las porciones son contadas como positivas o negativas. El análisis se hará con el equipo Droplet Digital PCR (ddPCR) de Bio-Rad Laboratories cuya tecnología permite la partición de la muestra en 20.000 gotas y provee el conteo digital de las moléculas blanco.

La ddPCR se estandarizará para la cuantificación de *P. gingivalis* a partir de sangre periférica después del tratamiento periodontal, 5 mL de sangre periférica será extraída en los tiempos ya mencionados para hacer extracción de ADN por el método de Fenol Cloroformo reportado por Castillo *et al.*, (2011) para la evaluación de bacterias orales a partir de sangre periférica, en donde se realizan procedimientos de lisis celular en el que se incluye tratamiento con proteinasa K con el fin de favorecer la lisis bacteriana, además de incubaciones adicionales que permiten la adecuada liberación del ADN bacteriano, durante el procedimiento de extracción se incluirán controles positivos de extracción que constan de sangre total obtenida de un individuo sano periodontalmente que será contaminada con un inóculo de *P. gingivalis* ATCC 33277 de 1×10^8 previamente estandarizado en el Laboratorio de Microbiología Oral del Instituto UIBO, además de controles negativos que será sangre de un individuo sano periodontalmente que no será contaminada. Estos controles permiten confirmar que el procedimiento se realizó de la manera adecuada.

Una vez completado el proceso de extracción el DNA fue cuantificado usando el NanoDrop®2000 (BioRad) para confirmar la pureza del ADN y la cantidad que deberá ser ajustada para el proceso de estandarización de la ddPCR.

Únicamente se realizó la cuantificación para *P. gingivalis* por ser el microorganismo aislado con mayor frecuencia de las bacteriemias presentadas en este tipo de pacientes. La reacción se realizará con 1X de Supermix para sonda [BioRad, Pleasanton, CA], 0,4-1 μ M de cada primer específico y 0,1-0,5 μ M de la sonda correspondientes a un fragmento del r16S RNA específico para *P. gingivalis* los primers y la sonda a emplear fueron reportados por Boutaga *et al.*, 2003, además se usarán entre 1 y 5 μ L del DNA extraído de cada muestra [todas las concentraciones deberán ser optimizadas], la reacción se llevará a cabo en 22 μ L. Veinte microlitros de la reacción de la ddPCR serán usados para generar la mezcla de las gotas

usando el QX 100 droplet generator (Bio-Rad), 40 μ L de la emulsión serán transferidas a placas de 96 pozos y amplificadas bajo las siguientes condiciones: denaturalización por 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de denaturalización a 94°C por 30 segundos y elongación a 60°C por 1 minuto. Los productos de la PCR serán denaturalizados a 98°C por 10 minutos y mantenidos a 4°C hasta que las gotas sean leídas. Las placas de 96 pozos serán transferidas al Lector Droplet QX100 [Bio-Rad] y el análisis de los datos serán realizados usando el software Quantasoft versión 1.7 [Bio-Rad]. La amplitud del umbral de fluorescencia para la discriminación entre positivos y negativos debe ser determinada de acuerdo con la curva estándar y los controles negativos, la concentración será calculada con ayuda del software en copias por μ L que deberá ser multiplicado por el volumen de reacción y así obtener en número absoluto de copias por reacción. Las curvas estándar se harán con DNA de la cepa de referencia de *P. gingivalis* ATCC 33277.

8.4 Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo para determinar las medianas y rango intercuartil (IQR), prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, como la distribución fue no normal se realizó la prueba de signos de Wilcoxon.

9. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Esta investigación se realizará bajo la RESOLUCIÓN NÚMERO 8430 DE 1993 por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Se clasifica en la categoría Investigación con riesgo mayor al mínimo debido a que se implementaran antibióticos y placebo; y adicionalmente se realizará extracción de sangre previa y posterior a tratamiento periodontal. Lo anterior, se llevó a cabo bajo la autorización del representante legal de la Unidad de Investigación Básica Oral- UIBO y de la Universidad El Bosque; el Consentimiento Informado de los participantes; y la aprobación del proyecto por parte del Comité de Ética en Investigación de la institución.

10. RESULTADOS

En la tabla 1, 2, 3 y 4 se presentan la identificación y la frecuencia de hemocultivo y ddPCR positivos para *P. gingivalis* en los diferentes tiempos evaluados para una muestra de 34 y 28 pacientes respectivamente. Se realizó en análisis de esta manera debido a que en el momento de la cuantificación por ddPCR algunas muestras no se pudieron procesar debido a que el DNA ya no había muestra, por esta razón solo se evaluaron 34 muestras hasta el T2 y 28 muestras hasta el T3.

Tabla 1. *P. gingivalis* identificada en muestras de sangre periférica por hemocultivo y ddPCR en diferentes tiempos de evaluación n=34

Codigo FR	T0 Cultivo	T0 ddPCR	T1 Cultivo	T1 ddPCR	T2 Cultivo	T2 ddPCR
581	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
580	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
584	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
586	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
590	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
618	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
619	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
620	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>P. gingivalis</i>
621	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
622	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
623	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
625	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
628	Neg	Neg	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
629	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
631	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
632	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
633	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
634	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
635	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
636	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	Neg	Neg	Neg
638	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
639	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	Neg	Neg	Neg
640	Neg	Neg	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
644	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	Neg
645	<i>P. gingivalis</i>	<i>P. gingivalis</i>	Neg	Neg	Neg	<i>P. gingivalis</i>
647	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>P. gingivalis</i>
648	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
649	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
650	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
651	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
652	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	Neg
653	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
654	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
655	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>

T0 Cultivo	T0 ddPCR	T1 Cultivo	T1 ddPCR	T2 Cultivo	T2 ddPCR
F(%)	F(%)	F(%)	F(%)	F(%)	F(%)
1(2,94)	28(82,35)	0(0)	27(79,41)	1(2,34)	27(79,41)

Tabla3. Frecuencia (%) de identificación de *P. gingivalis* por hemocultivo y por ddPCR n=34

Tabla 2. *P. gingivalis* identificada en muestras de sangre periférica por hemocultivo y ddPCR en diferentes tiempos de evaluación n=28

Código	T0 Cultivo	T0 ddPCR	T1 Cultivo	T1 ddPCR	T2 Cultivo	T2 ddPCR	T3 Cultivo	T3 ddPCR
618	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
619	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
620	Neg	Neg	Neg	<i>P. gingivalis</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>P. gingivalis</i>	Neg	Neg
621	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
622	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
623	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	Neg
625	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
628	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
629	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
631	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
632	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
633	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
634	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
635	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
636	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
638	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>P. gingivalis</i>
639	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>P. gingivalis</i>
640	Neg	Neg	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	Neg
644	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	Neg	Neg	<i>P. gingivalis</i>
646	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	Neg	Neg	Neg
647	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
648	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
650	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
651	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
652	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	Neg	Neg	Neg
653	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>
654	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	Neg
655	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>	Neg	<i>P. gingivalis</i>

Tabla 4. Frecuencia (%) de identificación de *P. gingivalis* por hemocultivo y por ddPCR n=28

T0 Cultivo	T0 ddPCR	T1 Cultivo	T1 ddPCR	T2 Cultivo	T2 ddPCR	T3 Cultivo	T3 ddPCR
F(%)	F(%)	F(%)	F(%)	F(%)	F(%)	F(%)	F(%)
0(0)	22(78,6)	0(0)	22(78,6)	1(3,6)	20(71,4)	0(0)	19(67,9)

Además, se realizó un análisis cuantitativo, para analizar los cambios de carga bacteriana a través del tiempo, en la tabla 5 se puede observar que antes del cepillado los pacientes ya tenían *P. gingivalis* en el torrente sanguíneo, inmediatamente después de cepillado la concentración baja, pero a los 15 minutos aumenta incluso más que antes del tratamiento.

Tabla 5. Análisis cuantitativo ddPCR n=34

	T0	T1	T2
Mediana	5.5	4.6	6.25
Rango intercuartil	(2.3-20)	(2.8-46.7)	(2.5-39)

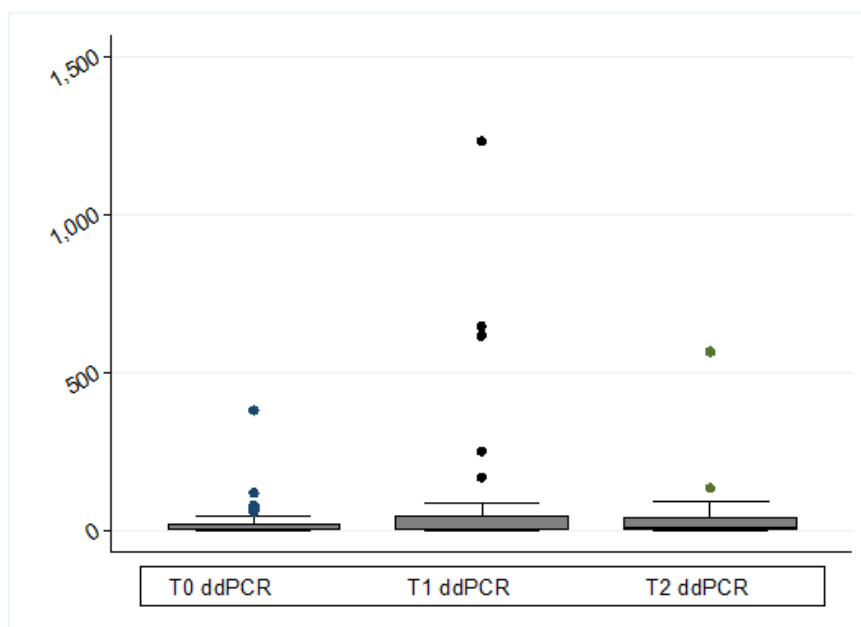


Figura 1. Diagrama de caja cuantificación ddPCR n=34

La tabla 6 muestra que antes del cepillado los pacientes ya tenían *P. gingivalis* en el torrente sanguíneo, inmediatamente después de cepillado la concentración disminuye, a los 15 minutos aumenta más del doble que en el tiempo basal y una hora después es donde se puede observar la mayor concentración.

Tabla 6. Análisis cuantitativo ddPCR n=28

	T0	T1	T2	T3
Mediana	5.45	5	11.6	14
	(2-25.9)	(2.3-69)	(0-60.1)	(0-86)
Rango intercuartil				

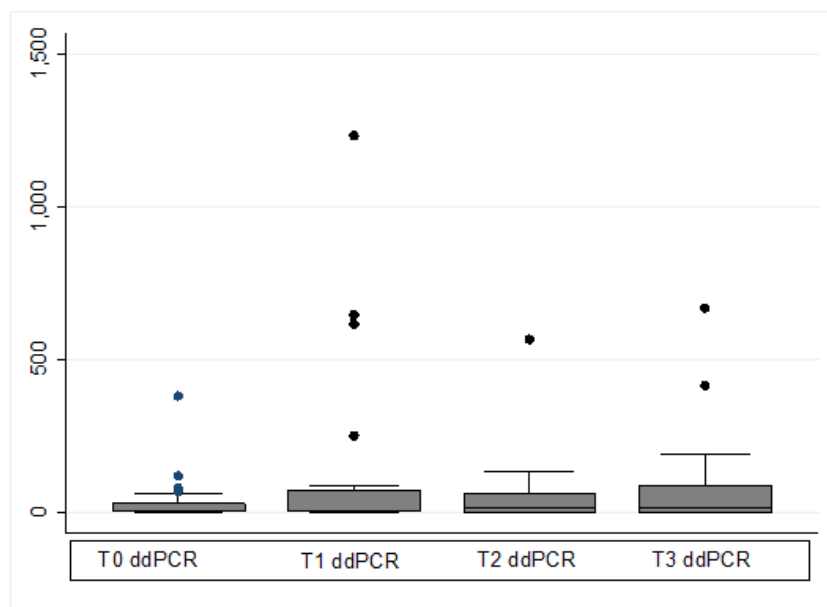


Figura 2. Diagrama de caja cuantificación ddPCR n=28

11. DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio era realizar una comparación entre hemocultivo y PCR digital para la detección de *P. gingivalis* luego de cepillado dental en pacientes con periodontitis crónica.

En este estudio se observó la presencia de *P. gingivalis* en los diferentes tiempos de cepillado dental tanto por hemocultivo como por ddPCR, este microorganismo fue detectado en un 2.34% y 79.4 % respectivamente, resultados que concuerdan con el estudio de Al-Attas (2000), Castillo (2011) y Álvarez (2015) donde se evidencia que al igual que en este estudio el porcentaje de patógenos en sangre aumentan con la técnica de PCR digital en comparación con el hemocultivo.

En un estudio realizado por Forner en 2006 se encontró que el 3.3% de 60 pacientes presentó bacteriemia por técnica de hemocultivo, mientras que en este estudio se evidencio presencia de *P. gingivalis* en 2.34% en una muestra menor de 34 pacientes por la misma técnica. No obstante, los datos arrojados por la tecnica de ddPCR aumentaron a un porcentaje de 79,4 para la detección de esta especie bacteriana en sangre periférica después del cepillado dental.

El estudio de Lockhart en 2008 demostró que la incidencia de bacteriemia fue mayor en los primeros 5 minutos luego del cepillado con un porcentaje de 19 % en un total 89 pacientes, lo cual difiere del presente estudio en el cual la mayor el pico de bacteriemia se presentó en el tiempo 2 con un porcentaje de 2,34% en una muestra menor de 34 pacientes.

El porcentaje de *Porphyromonas gingivalis* encontrado en este estudio por medio de ddPCR fue de 79,41 % de 34 pacientes, un porcentaje mayor al encontrado por Boutaga en 2003 el de 53% en una muestra mayor de 259 pacientes el cual se comparó con el método de cultivo que mostró un porcentaje de 43% en el mismo tamaño de muestra, en consecuencia se pone

en evidencia que la técnica de PCR digital es de gran valor para utilizarse en la detección de patógenos en la sangre humana.

El decrecimiento de la detección de *P. gingivalis* por PCR digital en la muestra de 28 pacientes en el tiempo 3 (67,9%) sugiere que después de este tiempo el sistema inmunológico elimina gran parte de las bacterias en el torrente sanguíneo, sin embargo, es importante apuntar que a pesar de ser una bacteremia transitoria, en pacientes que padezcan de afecciones cardiacas podría suponer una predisposición a desarrollar endocarditis infecciosa.

Se ha demostrado que los métodos moleculares resultan ser más sensibles, específicos y confiables para la identificación de especies microbianas en comparación con la técnica de hemocultivo, esto debido a que por medio de este último es difícil detectar la presencia de algunos patógenos, puesto que posiblemente la cantidad de microorganismos en sangre es muy reducida. Además, que por este mismo no se detectan bacterias no viables. Adicionalmente esta técnica no permite determinar el número total de bacterias recolectadas en una muestra a diferencia de la PCR digital. Lo anterior justifica los resultados de nuestro estudio en el cual se logró obtener una cuantificación del número total de la bacteria objetivo y un porcentaje mayor en la detección de este mismo en relación con el hemocultivo. Lyons (2000), Nozaki (2001), Boutaga (2003).

12. CONCLUSIONES

Se demostró que para la detección de *Porphyromonas gingivalis* de pacientes con periodontitis a partir de sangre periférica la PCR digital arroja resultados más precisos, específicos y rápidos a comparación con el hemocultivo. Además, permite realizar la cuantificación de periodonto patógenos.

13. REFERENCIAS

1. Al-Attas, M Al-Khalifa, AR Al-Qurashi, M Badawy, N Al-Gualy, Evaluation of PCR, Culture and Serology for the Diagnosis of Acute Human Brucellosis. 2000; 20(3-4): 224-228.
2. Alka W, Priyanka V, Savitha B, Ruhee , Hiroj B. Bacteremia following scaling and root planing: A clinico-microbiological study. J Indian Soc Periodontol. 2013; 17: 725-730.
3. Alvarez M, Saldaña C, Ballesteros M, Martinez I, et al. Comparación de las pruebas: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), serología y hemocultivo con respecto a sensibilidad y especificidad, para la detección de *Brucella* spp en muestras humanas. Gac Med Mex. 2015; 151:620-7.
4. Boutaga K, Winkeloff A. Comparison of Real-Time PCR and Culture for Detection of *Porphyromonas gingivalis* in Subgingival Plaque Samples. Journal of Clinical Microbiology. 2003; 41: 4950-4954.
5. Bollen CM, Quirynen M. Microbiological response to mechanical treatment in combination with adjunctive therapy. A review of the literature. J Periodontol. 1996 Nov; 67(11):1143-58
6. Carvalho LH, D'Avila GB, Leão A, Gonçalves C, Haffajee AD, Socransky SS, Feres M. Scaling and root planing, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population II- microbiological results. J Clin Periodontol. 2005; 32(4):406-11.
7. Castillo DM, Sánchez-Beltrán MC, Castellanos JE, Sanz I, Mayorga-Fayad I, Sanz M, Lafaurie GI. Detection of specific periodontal microorganisms from bacteraemia samples after periodontal therapy using molecular-based diagnostics. J Clin Periodontol 2011; 38: 418-427.

8. Daly C, Mitchell D, Grossberg D, Highfield J, Stewart D. Bacteraemia caused by periodontal probing. *Aust Dent J*. 1997 Apr; 42(2):77-80
9. Forner L, Larsen T, Kilian M, Holmstrup P. Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *J Clin Periodontol*. 2006; 33: 401-407.
10. Hartzell JD, Torres D, Kim P, Wortmann G. Incidence of Incidence of Bacteremia after Routine Tooth Brushing. *The American journal of the Medical Sciences*. 2005:0329.4.
11. Lafaurie GI, Mayorga-Fayad I, Torres MF, Castillo DM, Aya MR, Baro'n A, Hurtado PA. Periodontopathic microorganisms in peripheric blood after scaling and root planing. *J Clin Periodontol* 2007; 34: 873–879.
12. Lockhart PB, Brennan MT, Sasser HC. Bacteremia associated with toothbrushing and dental extraction. *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease*. 2008; 24:3118-25.
13. Lyons S, Griffen A, Leys E. Quantitative Real-Time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000; 38: 2362–2365
14. Nozaki T, Kusumoto Y, Kitamura M. A sensitive method for detecting *Porphyromonas gingivalis* by polymerase chain reaction and its possible clinical application. *J Periodontol*. 2001;72:1228-35.
15. Toshiya M, Kubota T, Abe D, Shimizu T, Komatsu Y, Yoshie H. Effects of Irrigation With an Antiseptic and Oral Administration of Azithromycin on Bacteremia Caused by Scaling and Root Planing. *J Periodontol* 2010; 81, (11) 1555-1563
16. Yashima A, Gomi K, Maeda N, Arai T. One-stage full-mouth versus partial-mouth scaling and root planing during the effective half-life of systemically administered azithromycin. *J Periodontol*. 2009 Sep; 80(9):1406-13.
17. Zhang W, Daly CG, Mitchell D, Curtis B. Incidence and magnitude of bacteraemia caused by flossing and by scaling and root planing. *J Clin Periodontol*. 2013; 40: 41–52.