



Artículo original

Distribución del genotipo *Fim-A* de *Porphyromonas gingivalis* entre la población colombiana

Porphyromonas gingivalis *Fim-A* genotype distribution among Colombians

Sandra Moreno^{1,2}, Adriana Jaramillo^{1,2}, Beatriz Parra^{2,3}, Javier Enrique Botero⁴, Adolfo Contreras^{2,5}

¹ Escuela de odontología, Universidad del Valle, Cali, Colombia

² Periodontal Medicine Group.

³ Departamento de Microbiología, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

⁴ Facultad de odontología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

⁵ Profesor Escuela de odontología, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

Moreno S, Jaramillo A, Parra B, Botero JE, Contreras A. *Porphyromonas gingivalis* *Fim-A* genotype distribution among Colombians. *Colomb Med.* 2015; 46(3): 122-27.

© 2015. Universidad del Valle. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution License, que permite el uso ilimitado, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que el autor original y la fuente se acrediten

Historia:

Recibido: 03 marzo 2014

Revisado: 01 septiembre 2015

Aceptado: 16 septiembre 2015

Palabras clave:

Porphyromonas gingivalis, fimbrias bacterianas, reacción en cadena de la Polimerasa, periodontitis, gingivitis.

Keywords:

Porphyromonas gingivalis, Bacterial fimbriae, Polymerase Chain Reaction, periodontitis, gingivitis.

Resumen

Introducción: *Porphyromonas gingivalis* es una bacteria asociada con la periodontitis. Expresa una amplia gama de factores de virulencia, incluyendo las fimbrias, las cuales están codificadas por el gen *FimA* que representa seis genotipos conocidos.

Objetivo: Identificar los genotipos de *FimA* de *P. gingivalis* en pacientes de Cali - Colombia, incluyendo la co -infección con *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythia*.

Métodos: Se obtuvieron muestras subgingivales de 151 individuos con diferentes diagnósticos periodontales. La ocurrencia de *P. gingivalis*, los genotipos de *FimA* y otras bacterias se determinó por PCR.

Resultados: *Porphyromonas gingivalis* fue positiva en 85 pacientes. El genotipo *FimA* II fue más prevalente, pero no hubo diferencias significativas entre los grupos de estudio (54.3%), *FimA* IV fue el más frecuente en la gingivitis (13.0%). Una alta correlación ($p=0.000$) se encontró entre *P. gingivalis*, *T. denticola* y *T. forsythia*. El genotipo *FimA* II estuvo correlacionado con la detección de *T. denticola* y *T. forsythia*.

Conclusiones: *Porphyromonas gingivalis* tuvo una alta frecuencia incluso en el grupo de individuos sanos. Se encontró una tendencia hacia una mayor frecuencia de *FimA* II en pacientes con periodontitis moderada y severa. El genotipo *FimA* II también se asoció con una mayor profundidad de la bolsa, una mayor pérdida de nivel de inserción, y con los pacientes en los que se detectó co-infección con *T. denticola* y *T. forsythia*.

Abstract

Introduction: *Porphyromonas gingivalis* is associated with periodontitis and exhibit a wide array of virulence factors, including fimbriae which is encoded by the *FimA* gene representing six known genotypes.

Objective: To identify *FimA* genotypes of *P. gingivalis* in subjects from Cali-Colombia, including the co-infection with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*.

Methods: Subgingival samples were collected from 151 people exhibiting diverse periodontal condition. The occurrence of *P. gingivalis*, *FimA* genotypes and other bacteria was determined by PCR.

Results: *Porphyromonas gingivalis* was positive in 85 patients. Genotype *FimA* II was more prevalent without reach significant differences among study groups (54.3%), *FimA* IV was also prevalent in gingivitis (13.0%). A high correlation ($p=0.000$) was found among *P. gingivalis*, *T. denticola*, and *T. forsythia* co-infection. The *FimA* II genotype correlated with concomitant detection of *T. denticola* and *T. forsythia*.

Conclusions: *Porphyromonas gingivalis* was high even in the healthy group at the study population. A trend toward a greater frequency of *FimA* II genotype in patients with moderate and severe periodontitis was determined. The *FimA* II genotype was also associated with increased pocket depth, greater loss of attachment level, and patients co-infected with *T. denticola* and *T. forsythia*.

Autor de correspondencia:

Sandra Moreno. Dirección: Calle 4B 36-00. Edificio 132. Universidad del Valle. Fax: +57 2 5581941, teléfono: +57 2 5141246. Correo electrónico: sandra.m.moreno@correounivalle.edu.co.

Introducción

La Periodontitis es una enfermedad inflamatoria que afecta los tejidos de soporte del diente¹. Uno de los factores que desencadenan la enfermedad es la persistencia de la biopelícula formada en la superficie dental y en el margen de la encía².

En Colombia, de acuerdo con el Tercer Estudio Nacional de Salud Bucal, la prevalencia de pérdida de inserción periodontal fue del 50.2% y esto genera para el sistema de seguridad social cada vez más saturación debido a la alta morbilidad.

Porphyromonas gingivalis se asocia a la aparición y progresión de la periodontitis crónica y agresiva³⁻⁵, aunque también puede ser aislada con frecuencia de pacientes sanos⁶. Posee múltiples factores de virulencia^{4,7-8}, dentro de los cuales, las fimbrias mayores se consideran uno de los más importantes^{7,9}. Las fimbrias mayores están compuestas por subunidades de fimbrilina¹⁰, se encuentran situados en la superficie celular, y le confiere a la bacteria la capacidad de adherirse a los tejidos de soporte del diente, de la película adquirida y a otras especies bacterianas durante la formación y consolidación de la biopelícula. El gen que codifica las fimbrias mayores se denomina *FimA* y se conocen 6 genotipos, (I, Ib, II, III, IV, V), en base a su secuencia de nucleótidos¹⁰.

En sujetos con periodontitis los genotipos *FimA* II y *FimA* IV han sido identificados con mayor frecuencia en contraste con los sujetos sanos en los que el genotipo *FimA* I es el más frecuente¹¹⁻¹⁴.

Este estudio, descriptivo transversal buscó determinar la prevalencia de genotipos *FimA* de *P. gingivalis* aisladas de muestras subgingivales de sujetos sanos, con gingivitis y con periodontitis crónica y determinar su asociación con otros microorganismos periodontopáticos como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythia*.

Materiales y Métodos

Se tomaron muestras subgingivales de 151 sujetos, seleccionados por conveniencia, de acuerdo a los criterios de inclusión. La muestra estuvo conformada por 67 hombres y 84 mujeres con edades comprendidas entre 22-84 años, (43.4 ± 10.6 años), que asistieron a las clínicas de la Escuela de Odontología de la Universidad del Valle, de la Universidad Santiago de Cali y de una clínica dental privada en Cali - Colombia; estos sujetos tenían diferentes diagnósticos periodontales (25 sanos, 77 gingivitis y 49 con periodontitis). Los pacientes autorizaron su participación en el estudio por medio de la firma del consentimiento informado. Este estudio fue aprobado por el comité de ética en humanos de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, protocolo N° 012-010. Los criterios de inclusión fueron: tener más de 15 dientes en la boca, que no hubiesen tomado antibióticos, corticoides y/o AINES por lo menos tres meses antes de ser incluidos en el estudio, sin enfermedades sistémicas y que no hubiesen recibido tratamiento periodontal y/o limpieza dental profesional al menos seis meses antes de participar en el estudio.

Examen periodontal y muestreo

Un examen periodontal completo fue realizado por dos periodoncistas previamente calibrados de acuerdo a los criterios

diagnósticos de la AAP 1999. Las mediciones de la profundidad de bolsa y la pérdida de inserción clínica fueron registradas en seis puntos alrededor de cada diente. Las variables consideradas para el diagnóstico clínico fueron la profundidad de sondaje, la pérdida de inserción clínica, el porcentaje de sangrado y el número de dientes perdidos. Se consideraron como sujetos sanos aquellos que no tenían signos de inflamación, una profundidad al sondaje igual o inferior a 3 mm, sin sangrado al sondaje y sin pérdida de inserción clínica. Los pacientes con gingivitis presentaron signos clínicos de inflamación gingival y edema, sangrado al sondaje, sin pérdida de inserción clínica. Los pacientes con periodontitis presentaron inflamación, edema, sangrado al sondaje y una profundidad al sondaje de 4 mm o más en al menos un diente (localizado) o más del 50% de los dientes (generalizada). Después de la eliminación de la placa supragingival con gasas estériles, dos puntas de papel estéril se introdujeron en las bolsas más profundas (>4 mm) en pacientes con periodontitis y en la superficie vestibular mesial de los primeros cuatro molares en sujetos sanos y pacientes con gingivitis, dejándolos en el surco durante un minuto. A partir de entonces, las puntas de papel se depositaron en tubos Eppendorf y fueron criopreservados a -20° C hasta su procesamiento¹⁴⁻¹⁷.

Extracción de ADN y PCR

La extracción de ADN bacteriano de las puntas de papel se llevó a cabo a través de la adsorción a partículas de sílice, de acuerdo con el protocolo del Boom 1989, y el procedimiento de genotipificación de *P. gingivalis* se realizó mediante PCR, utilizando cebadores publicados previamente¹⁶⁻¹⁸. En primer lugar, la extracción de ADN se confirmó mediante el uso de cebadores genéricos específicos para el gen 16S rRNA bacteriano; a continuación, la presencia de ADN de *P. gingivalis* se confirmó con cebadores específicos¹⁶⁻¹⁸ y, a partir de entonces se realizó una PCR con los cebadores para cada genotipo de *FimA*: I, Ib, II, III, IV, V, que han sido ampliamente reportados en la literatura^{11,14-17}.

El ADN de las cepas de *P. gingivalis* ATCC 33227 (*FimA* I), W83 (*FimA* IV), ATCC33279 (*FimA* Ib) fue utilizado como control positivo de estos genotipos¹⁴. Para los controles positivos de los genotipos *FimA* II y *FimA* III, se utilizaron los aislados clínicos número 486y723, respectivamente, que fueron tipificadas y donadas por el laboratorio de microbiología en la Universidad del Bosque¹³.

Para estudiar los genotipos de *FimA* la PCR se realizó en un termociclador (marca Axygen) con el siguiente programa de amplificación: desnaturalización inicial a 95° C durante 5 min, seguido de 36 ciclos a 94° C durante 30 s, 60° C durante 30 s y 72° C durante 30 s, y una extensión final a 72° C durante 7 min. Además de los genotipos *FimA* de *P. gingivalis*, también se utilizaron las mismas muestras para identificar la presencia de otras bacterias periodontopáticas como: *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola* y *T. forsythia* a través de una sola ronda de PCR usando cebadores específicos para el gen 16S rRNA de cada uno de los tres microorganismos antes mencionados. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa y las bandas de ADN se tiñeron con SYBR SAFE y se visualizaron mediante luz UV en un trans-iluminador (marca Invitrogen). Los resultados fueron documentados a través de un registro fotográfico. La Identificación de los genotipos de *FimA* realizó de acuerdo con el tamaño molecular de las bandas de amplificación obtenidas, en comparación con el respectivo control positivo¹⁴.

Estandarización y sensibilidad analítica de la PCR para la detección del gen *FimA* de *P. gingivalis*

Para determinar el límite de detección del gen *FimA* de *P. gingivalis* por la técnica de PCR, se llevaron a cabo diluciones seriadas de los cultivos de las cepas de los genotipos de *P. gingivalis* *FimA* II y *FimA* III (aislados clínicos previamente tipificados), *FimA* Ib (cepa ATCC33279), *FimA* IV (cepa W83), *FimA* I (cepa ATCC 33227), cepas que definimos como control para el propósito de este estudio. Además, para determinar la exactitud del procedimiento de PCR para detectar cada uno de los genotipos de *FimA* a partir de muestras clínicas de fluido gingival crevicular (GCF), los controles también fueron inoculadas experimentalmente con muestras de GCF negativos para *P. gingivalis* con cada una de las diluciones de las cepas de control de *FimA* y se realizó el procedimiento de PCR.

Especificidad de la PCR para la detección del gen *FimA* de *P. gingivalis*

Para determinar la especificidad de los cebadores utilizados en la PCR para detectar los diferentes genotipos de *FimA* de *P. gingivalis*, se realizó la prueba de PCR, optimizado para cada uno de los genotipos de *FimA* (I, II, III, IV, y Ib). La reactividad cruzada se estableció frente a otras bacterias periodontopáticas como *A. actinomycetemcomitans* (D11-s1), *T. denticola* (ATCC 43056), y *T. forsythia* (ATCC 43037).

Análisis estadístico

Se utilizó la prueba estadística del Chi cuadrado de Pearson para comparar las frecuencias de los genotipos *FimA*; para analizar las frecuencias de los otros periodontopatógenos, se aplicó la prueba exacta de Fisher, dado que el tamaño de la muestra fue inferior a 20. Las variables cuantitativas, como CAL (pérdida de inserción clínica), fueron analizadas con la prueba T de Student y las variables cuantitativas como PD (sondaje profundidad), BOP (sangrado al sondaje), número de dientes y edad se analizaron mediante el test de Wilcoxon y la prueba de Mann-Whitney. La selección de las pruebas utilizadas en las variables cuantitativas se basó en pruebas anteriores de distribución Normal.

Tabla 1. Frecuencia y Distribución de los genotipos de *FimA* de *P. gingivalis* de acuerdo al diagnóstico periodontal (AAP 1999).

Genotipos	Diagnostico periodontal						valor p*
	Sanos		Gingivitis		Periodontitis		
	**n	(%)	n	(%)	n	(%)	
<i>P. gingivalis</i>	13	52.0	46	59.7	26	53.1	0.681
<i>FimA I</i>	2	15.4	12	26.1	3	11.5	0.301
<i>FimA II</i>	6	46.2	25	54.3	15	57.7	0.792
<i>FimA III</i>	2	15.4	2	4.3	2	7.7	0.386
<i>FimA IV</i>	1	7.7	6	13.0	0	0.0	0.154
<i>FimA Ib</i>	3	12.0	15	19.5	2	4.1	0.057
<i>FimA V</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	
No genotipificable	5	38.0	10	21.7	8	30.7	0.428
<i>fimA I, II, Ib</i>	1	7.7	8	17.4	0	0.0	0.066
<i>fimA III, IV, Ib</i>	1	7.7	0	0.0	0	0.0	0.079
<i>fim A I, III, Ib</i>	1	7.7	0	0.0	0	0.0	0.079
<i>fimA II, IV</i>	0	0.0	2	4.3	0	0.0	0.377
<i>fimA I, II</i>	0	0.0	1	2.1	2	4.3	0.406
<i>fim A III, Ib</i>	0	0.0	0	0.0	1	2.1	0.350
<i>fim A III, IV</i>	0	0.0	1	2.1	0	0.0	0.616
<i>fim A I, Ib</i>	0	0.0	4	8.7	1	3.8	0.375

* Chi cuadrado de Pearson.

**Los valores de n no suman el total que se muestra ya que el mismo sujeto puede expresar diversos tiempo genotipos.

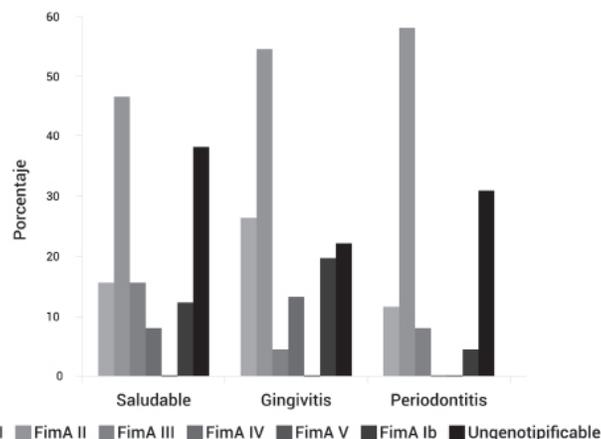


Figura 1. Frecuencia de los genotipos *FimA* de *P. gingivalis* según el diagnóstico periodontal

Resultados

Sensibilidad y Especificidad de la PCR para el gen *FimA* de *P. gingivalis*

El límite de detección del gen *FimA* se determinó hasta 50 células bacterianas en las diluciones realizadas a partir de un cultivo puro de cada cepa de *P. gingivalis* disponible. Sin embargo, el límite de detección aumentó hasta 500 células cuando se inocularon las diluciones bacterianas en GCF. Este último se puede atribuir a la presencia de DNAsas presentes en el GCF. Se encontró una alta especificidad entre los cebadores utilizados y las cepas representativas de cada uno de los genotipos de *FimA* estudiados.

Tabla 2. Relación entre los genotipos de *FimA* y las variables clínicas.

Genotipos	Variables clínicas*			
	PD	CAL	BOP	NoDi
<i>FimA I</i>	4.3	4.2	55.8	25.1
<i>FimA II</i>	4.6	4.5	53.4	23.2
<i>FimA III</i>	4.6	4.0	63.5	24.0
<i>FimA IV</i>	4.4	4.3	61.8	23.4
<i>FimA Ib</i>	4.2	4.0	56.0	24.0

* Los datos son la media.

PD: sondeo sitio profundidad de la bolsa (mm).

CAL: sitio de la pérdida de inserción clínica (mm).

BOP sangrado al sondaje (%).

NoDi: número de dientes.

Tabla 3. Co-infección positiva con otros microorganismos periodontopatógenos y genotipos de *FimA*.

Diagnóstico periodontal	Especies*		
	<i>A. actinomyc**</i>	<i>T. denticola</i>	<i>T. forsythia</i>
Sanos	8.0	40.0	56.0
gingivitis	20.8	58.4	68.8
periodontitis	14.2	40.8	65.3
<i>P. gingivalis</i>	64.0	74.7	72.7
<i>FimA</i> Genotipos			
<i>FimA I</i>	31.2	21.4	22.2
<i>FimA II</i>	68.8	55.3	52.8
<i>FimA III</i>	6.7	7.1	5.5
<i>FimA IV</i>	6.7	8.9	6.9

*Porcentaje

***A. actinomycetemcomitans*

Frecuencia de *P. gingivalis*

Un total de 85 sujetos fueron positivos para *P. gingivalis* (56.3%), (57.6% en mujeres y 42.3% en hombres). La frecuencia de *P. gingivalis* por diagnóstico fue del 52.0% en sujetos sanos, 59.7% para pacientes con gingivitis y 53.1% para pacientes con periodontitis (Tabla 1).

Frecuencia y distribución de los genotipos de *FimA* de *P. gingivalis*

El genotipo más frecuente fue *FimA II* (54.1%), seguido por *FimA Ib* (23.5%), *FimA I* (20.0%), *FimA IV* (8.2%), y *FimA III* (7.1%). No se encontraron muestras positivas para el genotipo *FimA V*. De los 85 pacientes positivos para *P. gingivalis*, 23 (27%) fueron negativos para los 6 genotipos estudiados, estas muestras se designaron como genotipos desconocidos o no genotipificables (Tabla 1). En los tres grupos los pacientes sanos, con gingivitis y periodontitis, los porcentajes de los genotipos *fimA II* fueron 46.2%, 54.3%, y 57.7%, respectivamente (Tabla 1, Fig. 1).

El genotipo *FimA II* presentó una tendencia a ser más frecuente en los diagnósticos periodontales más severos, estando alto en pacientes con periodontitis moderada y severa (AAP 1999), aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p=0.813$). También se analizó la prevalencia y distribución de los diferentes genotipos de *FimA* de acuerdo a las variables clínicas, encontrándose que los genotipos *FimA II* y *FimA III* estuvieron relacionados con mayor PD por sitio, el genotipo *FimA II* estuvo relacionado con mayor CAL y mayor pérdida de dientes, mientras el genotipo *FimA III* estuvo relacionado con mayor BOP (Tabla 2). Once muestras fueron positivas para 3 genotipos y 12 muestras para 2 genotipos diferentes (Tabla 1).

Prevalencia de otros periodontopatógenos

La prevalencia de *T. forsythia* fue del 65.3% en pacientes con periodontitis, 68.8% en pacientes con gingivitis y 56.0% en pacientes sanos. La prevalencia de *T. denticola* en pacientes sanos, con gingivitis y periodontitis fue del 40.0%, 58.4% y 40.8% respectivamente y para *A. actinomycetemcomitans* fue del 8.0% en sanos, 20.8% en pacientes con gingivitis y 14.2% en pacientes con periodontitis (Tabla 3).

Co-infección de *P. gingivalis* y genotipos de *FimA* con *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, y *T. forsythia*

Se observó una alta correlación entre *P. gingivalis*, *T. denticola*, y *T. forsythia*, ($p=0.000$). La co-infección de estos microorganismos fue observada en altos porcentajes para el genotipo *FimA II* con frecuencias en las muestras positivas para *A. actinomycetemcomitans* de 68.7%, *T. denticola* 55.3%, y *T. forsythia* 52.8%, aunque esta relación no fue estadísticamente significativa. (Tabla 3).

Discusión

Frecuencia de *P. gingivalis*:

Los resultados de este estudio en la frecuencia de *P. gingivalis* difieren de los reportados por Amano *et al.*^{14,15}, Guo *et al.*¹⁹, Wu *et al.*²², Zhao *et al.*²³, pero son similares a los reportados por Beikler²⁰ y por Missailidis *et al.*¹⁶.

La alta prevalencia de *P. gingivalis* es común en la población colombiana, de acuerdo a lo reportado por Botero *et al.*²⁴, Lafaurie

*et al.*²⁵, y Mayorga *et al.*²⁶. Estos hallazgos pueden ser debidos a las condiciones de sanidad, pobreza y vivienda. Los pacientes incluidos en este estudio viven con un aproximado de \$350 US dólares por mes. Esto dificulta el acceso a los servicios dentales, el empeoramiento de la periodontitis por el retraso o la falta de tratamiento dental, favoreciendo quizás, la transmisión horizontal y vertical de patógenos periodontales.

Frecuencia y distribución de los genotipos de *FimA* de *P. gingivalis*

En general, el genotipo más frecuente fue *FimA II*, el cual se detectó en 46 muestras (54.1%).

En los pacientes sanos los genotipos más frecuentes fueron *FimA II* seguido por *FimA I*, estos resultados son diferentes a los publicados en estudios previos que reportaron bajas frecuencias de *P. gingivalis* en pacientes sanos^{16,20,21}, así como bajas frecuencias del genotipo *FimA II* y altas frecuencias de los genotipos *FimA I*, *FimA III*, y *FimA V* en este tipo de pacientes^{14,16,22,23}, considerando estos últimos genotipos como poco virulentos (Tabla 1, Fig. 1).

Vale la pena considerar la importancia de realizar estudios en los que se determine la expresión de los genotipos, por ejemplo a través de PCR en tiempo real, los cuales permitirán establecer la relación entre el fenotipo y el genotipo. Otro asunto importante para tener en cuenta es la posibilidad de que los genotipos más virulentos se encuentran en los estadios iniciales de la enfermedad periodontal donde inician los procesos de infección y colonización así como el estímulo de la respuesta inmune e inflamatoria, la cual después del tiempo, puede generar daño y destrucción del tejido, y los resultados hallados con relación a los genotipos encontrados más frecuentemente en el grupo de sanos y de pacientes con gingivitis, puede estar asociado a la carga bacteriana en estos estadios iniciales; sin embargo se requieren más estudios para probar esta hipótesis, estudios que incluyan PCR en tiempo real para cuantificar y establecer diferencias entre los diferentes diagnósticos periodontales.

Los resultados de los grupos de pacientes con gingivitis y periodontitis, referentes a la alta prevalencia del genotipo *FimA II*, específicamente en gingivitis generalizada, periodontitis moderada y periodontitis severa, coinciden con los estudios de Japón^{15,16,18}, China^{19,23}, Alemania²⁰, Noruega, Estados Unidos, Canadá, Holanda²¹, Brasil^{11,16}, México¹⁷, Colombia¹³. El Segundo genotipo más común en estos dos grupos (gingivitis y periodontitis) fue *FimA I*, el cual ha sido asociado en diferentes estudios a individuos sanos, en el presente estudio se encontró una frecuencia de 26.1% y 11.5%, respectivamente (Tabla 1), lo cual es muy similar a lo reportado por Missailidis *et al.*¹⁶ y Davila *et al.*¹⁷.

En nuestro estudio no hubo diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los genotipos por diagnóstico periodontal. Moon *et al.*, publicaron la detección de una reacción cruzada entre los cebadores específicos para la detección del genotipo *FimA II*, con los genotipos *FimA Ib*, cabe aclarar que los estudios previos, reportados en este trabajo, utilizaron estos cebador. Este hallazgo conlleva al supuesto que dicha reacción cruzada, podría conllevar a errores en los resultados previamente reportados²⁷. El mismo grupo publicó otro estudio en 2013 donde probaron los nuevos primers para *FimA II* en población Coreana, encontrando una distribución de 44.5% para pacientes

sanos y 67.3% para pacientes con periodontitis, (sin diferencias estadísticamente significativas), concluyendo que los resultados de previos estudios deben ser revisados pues conllevaron a una sobre estimación del riesgo relativo para el genotipo *FimA II*, sin embargo, dada la patogenicidad de estos genotipos, demostrada en experimentos *in vitro*, los autores sugieren que los sujetos sanos portadores del genotipo *FimA II*, tienen un riesgo incrementado de desarrollar enfermedad periodontal²⁸. Los resultados del estudio en Corea son muy similares a nuestros hallazgos.

Todas las muestras positivas para *P. gingivalis* fueron negativas para el genotipo *FimA V* (Tabla 1). Estos resultados coinciden con los de Mssailidis *et al.*¹⁶, y por Enersen *et al.*²⁹, pero difieren de los resultados de Japón¹⁸, y de China²³ donde reportaron prevalencias de 16 a 29%; sin embargo se ha reportado muy baja prevalencia de este genotipo (1 to 3.9%) en estudios de Alemania²⁰ y Noruega²¹.

Cabe resaltar que en el desarrollo de este estudio, la cepa control del genotipo *FimA V* de *P. gingivalis* no estuvo disponible y aunque se realizó la PCR usando primers específicos para este genotipo, ninguna muestra resultó positiva. La falta de la cepa control para el genotipo *FimA V* fue una limitación del estudio.

Acercas de la relación con las variables clínicas, se encontró que el genotipo *FimA III* fue el más frecuente en los pacientes con valores altos en el promedio de PD, CAL y BOP. No obstante, cuando se compara la relación de los genotipos con la profundidad al sondaje y la pérdida de inserción en los sitios de toma de las muestras (Tabla 2), el genotipo *FimA II* fue el más relacionado con mayor PD y mayor CAL. Una tendencia similar fue encontrada en estudios previos^{11,14,29}.

La presencia de más de un genotipo ha sido ampliamente reportada en la literatura^{16,30}. En el presente estudio, 23 muestras, en su mayoría distribuidas en el grupo de gingivitis, presentaron frecuencias del 9.4% del total para dos genotipos y del 9.4% para tres genotipos (Tabla 1). Esta distribución heterogénea de las poblaciones, puede estar asociado a diferencias étnicas discutidas anteriormente^{16,17,20}.

Prevalencia de microorganismos periodontopatogénicos: *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, y *T. forsythia*

Este estudio encontró una alta prevalencia de tres microorganismos como *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, y *T. forsythia*, respecto al total de la muestra, siendo más frecuentes en los grupos de gingivitis y periodontitis comparado con los individuos sanos, lo cual coincide con otros estudios en Colombia como los de Botero *et al.*²⁴ y Lafaurie *et al.*²⁵.

Co-infección de los genotipos de *Fim A* de *P. gingivalis* con *T. denticola*, *T. forsythia*, y *A. actinomycetemcomitans*

En este estudio, se encontró una asociación positiva entre los tres microorganismos del complejo rojo, tal como lo descrito por Socransky *et al.*,³¹ y corroborado por otros investigadores²³⁻²⁵ (Tabla 3). El estudio también encontró un alto porcentaje de muestras positivas para *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*; estos dos microorganismos han sido considerados como importantes factores etiológicos durante el inicio y progresión

de la enfermedad periodontal³². De las muestras positivas para *P. gingivalis* y los otros tres microorganismos estudiados, la mayoría corresponden al genotipo *FimA II*, lo cual podría indicar una alta relación de coinfección de este genotipo con *T. denticola*, *T. forsythia* y *A. actinomycetemcomitans*. Estos resultados son similares a los obtenidos por Zhao *et al.*²³.

Conclusions

El genotipo *FimA II* de *P. gingivalis* fue el más frecuente de los aislados de bolsas periodontales y esto estuvo asociado a la severidad de la enfermedad periodontal.

Porphyromonas gingivalis se asoció con *T. denticola* y *T. forsythia*, y el genotipo *FimA II* fue más frecuente en pacientes que presentaron co-infección con estos periodontopatógenos.

Conflictos de interés:

Los autores no tienen conflictos de intereses.

Reconocimientos:

El estudio fue financiado por la Universidad del Valle, 2012. Código 1695

Referencias

1. Darveau R. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8: 481–90.
2. Zijng V, van Leeuwen MBM, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmür R, *et al.* Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS One.* 2010; 5(2): e9321.
3. Dornelles F, Santos D, Van Dyke T, Calixto J, Batista E, Campos M. In vivo up-regulation of kinin B1 receptors after treatment with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in rat paw. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 33(3): 756–63.
4. Yilmaz O. The chronicles of *Porphyromonas gingivalis*: the microbium, the human oral epithelium and their interplay. *Microbiology.* 2008; 154: 2897–903.
5. Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000. 1999; 20: 168–238.
6. Slots J, Ting M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol* 2000. 1999; 20: 82–121.
7. Brunner J, Scheres N, El Idrissi NB, Deng DM, Laine ML, van Winkelhoff AJ, *et al.* The capsule of *Porphyromonas gingivalis* reduces the immune response of human gingival fibroblasts. *BMC Microbiol.* 2010; 10: 5.
8. Stathopoulou PG, Galicia JC, Benakanakere MR, Garcia CA, Potempa J, Kinane DF. *Porphyromonas gingivalis* induce apoptosis in human gingival epithelial cells through a gingipain-dependent mechanism. *BMC Microbiol.* 2009; 9: 107–19.
9. M Wang, Liang S, Hosur KB, Domon H, Yoshimura F, Amano A, *et al.* Differential virulence and innate immune interactions of Type I and II fimbrial genotypes of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; 24(6): 478–84.

10. Inaba H, Nakano K, Kato T, Nomura R, Kawai S, Kuboniwa M, et al. Heterogenic virulence and related factors among clinical isolated of *Porphyromonas gingivalis* with type II fimbriae. Oral Microbiol Immunol. 2008; 23: 29–35.
11. Teixeira SR, Mattarazo F, Feres M, Figueiredo LC, de Faveri M, Simionato MR, et al. Quantification of *Porphyromonas gingivalis* and FimA genotypes in smoker chronic periodontitis. J Clin Periodontol. 2009; 36: 482–7.
12. Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Takeuchi H, Yoshioka H, et al. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* FimA genotypes in cardiovascular specimens from Japanese patients. Oral Microbiol Immunol. 2008; 23: 170–2.
13. Pérez P, Lafaurie G, Gracieux P, Meuric V, Tamanai-Shacoori Z, Castellanos JE, et al. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* FimA genotypes in isolates from subgingival plaque and blood sample during bacteremia. Biomédica. 2009; 29: 298–306.
14. Amano A, Nakagawa I, Kataoka K, Morisaki I, Amada S. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains with FimA genotypes in periodontitis patients. J Clin Microbiol. 1999; 37: 1426–30.
15. Amano A, Kuboniwa I, Nakagawa, Akiyama S, Morisaki I, Hamada S. Prevalence of specific genotypes of *Porphyromonas gingivalis* FimA and periodontal health status. J Dent Res. 2000; 79: 1664–8.
16. Missailidis CG, Umeda JE, Ota-Tsuzuki C, Anzai D, Mayer MP. Distribution of FimA genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in subjects with various periodontal conditions. Oral Microbiol Immunol. 2004; 19: 224–9.
17. Davila-Pérez C, Amano A, Alpuche-Solis AG, Patiño-Marin N, Pontigo-Loyola AP, Hamada S, et al. Distribution of genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in type 2 diabetic patients with periodontitis in Mexico. J Clin Periodontol. 2007; 34: 25–30.
18. Nakagawa I, Amano A, Kimura RK, Nakamura T, Kawabata S, Hamada S. Distribution and molecular characterization of *Porphyromonas gingivalis* carrying a new type of FimA gene. J Clin Microbiol. 2000; 38: 1909–14.
19. Guo YH, Wu YF, Liu TJ, Xiao XR, Zhou B, Zhou XP. The distribution of FimA genotype of *Porphyromonas gingivalis* in chronic periodontitis patients. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. 2005; 33: 99–102.
20. Beikler T, Peters U, Prajaneh S, Prior K, Ehmke B, Flemmig TF. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* FimA genotypes in caucasians. Eur J Oral Sci. 2003; 111: 390–4.
21. Van der Ploeg J, Giertsen E, Ludin B, Mörgeli C, Zinkernagel AS, Gmür R. Quantitative detection of *Porphyromonas gingivalis* FimA genotypes in dental plaque. FEMS Microbiol Lett. 2004; 232: 31–7.
22. Wu Y-F, Guo YH, Liu TJ, Xiao XR, Zhao L, Meng S, et al. Distribution of FimA genotype of *Porphyromonas gingivalis* in Chinese periodontitis patients and its relationship with chronic periodontitis. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2006; 37: 101–8.
23. Zhao L, Wu YF Y-F, Meng S, Yang H, OuYang YL, Zhou XD. Prevalence of FimA genotypes of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status in chinese adults. J Periodontal Res. 2007; 42: 511–7.
24. Botero JE, Contreras A, Lafaurie G, Jaramillo A, Betancourt M, Arce RM. Occurrence of periodontopathic and superinfecting bacteria in chronic and aggressive periodontitis subjects in a Colombian population. J Periodontol. 2007; 78(4): 696–704.
25. Lafaurie G, Contreras A, Barón A, Botero J, Mayorga-Fayad I, Jaramillo A, et al. Demographic, clinical, and microbial aspects of chronic and aggressive periodontitis in Colombia: a multicenter study. J Periodontol, 2007; 78: 629–39.
26. Mayorga-Fayad I, Lafaurie GI, Contreras A, Castillo DM, Barón A, Aya Mdel R. Subgingival microbiota in chronic and aggressive periodontitis in Bogotá, Colombia: an epidemiological approach. Biomedica. 2007; 27(1): 21–33.
27. Moon JH, Shin SI, Chung JH, Lee SW, Amano A, Lee JY. Development and evaluation of new primers for PCR-based identification of type II fimA of *Porphyromonas gingivalis*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2012; 64: 425–8.
28. Moon JH, Herr Y, Lee HW, Shin SI, Kim C, Amano A, et al. Genotype analysis of *Porphyromonas gingivalis* fimA in Korean adults using new primers. J Med Microbiol. 2013; 62: 1290–4.
29. Enersen M, Olsen I, Kvalheim O, Caugant DA. FimA genotypes and multilocus sequence types of *Porphyromonas gingivalis* from patients with periodontitis. J Clin Microbiol. 2008; 46: 31–42.
30. Nakagawa I, Amano A, Kuboniwa M, Nakamura T, Kawabata S, Hamada S. Functional differences among FimA variants of *Porphyromonas gingivalis* and their effects on adhesion to and Invasion of human epithelial cells. Infect Immun. 2002; 70: 277–85.
31. Socransky SS, Hafajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol 2000. 2002; 28: 12–55.
32. Jaramillo A, Arce RM, Herrera D, Betancourth M, Botero JE, Contreras A. Clinical and microbiological characterization of periodontal abscesses. J Clin Periodontol. 2005; 32(12): 1213–8.