

Diseño y estandarización de la técnica de PCR para *Porphyromonas gingivalis*

*Design and standardization of PCR technique
for Porphyromonas gingivalis*

*Concepção e padronização das PCR técnica
para Porphyromonas gingivalis*

Fecha de Recepción

04 de abril de 2017

Aceptado para su publicación

15 de abril de 2017

Maria Rosenda Britos

*Facultad de Odontología. Universidad Nacional
del Nordeste. Corrientes, Argentina.*

Cynthia Solange Sin

*Biología Microbiana para la Innovación
Alimentaria (BiMIA) – (IMIT) Instituto de
Modelado e Innovación Tecnológica.
CONICET - Argentina*

Silvia Mercedes Ortega

*Facultad de Odontología. Universidad Nacional del
Nordeste. Corrientes, Argentina*

Olga Miriam Vasek

*Biología Microbiana para la Innovación
Alimentaria (BiMIA) – (IMIT) Instituto de
Modelado e Innovación Tecnológica.
CONICET - Argentina*

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue diseñar y estandarizar la técnica de PCR para detección en líquido gingival de *Porphyromonas gingivalis*, en pacientes con enfermedad periodontal. Material y métodos: Se utilizaron iniciadores específicos para el gen ARNr 16s de *Porphyromonas gingivalis*. La especificidad de los iniciadores se ensayó utilizando material genético extraído de la cepa de referencia *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. Se ajustaron las condiciones de amplificación y concentraciones de la mezcla de reacción. Para validar la técnica se aplicó a diez muestras clínicas de líquido gingival de pacientes con enfermedad periodontal. Resultados: Se visualizaron bandas nítidas a 197pb utilizando cebadores específicos en seis muestras clínicas, y se obtuvo sensibilidad hasta 15 ug/ml de ADN purificado de la cepa de referencia ATCC 33277. Conclusiones: Se validó y estandarizó una PCR sencilla para la detección de *Porphyromonas gingivalis* en líquido gingival.

Palabras claves

PCR, *Porphyromonas gingivalis*, líquido gingival.

Abstract

The aim of the present work was to design and standardize the PCR technique for the detection of *Porphyromonas gingivalis* in gingival fluid in patients with periodontal disease. Material and methods: Specific primers were used for the *Porphyromonas gingivalis* 16s rRNA gene. The specificity of the primers was assayed using genetic material extracted from the reference strain *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. The amplification conditions and concentrations of the reaction mixture were adjusted. To validate the technique was applied to 10 clinical samples of gingival fluid of patients with periodontal disease. Results: Clear bands were visualized at 197bp using specific primers in 6 clinical samples, and sensitivity was obtained sensitivity up to 15ug / ml purified DNA from the reference strain ATCC 33277. Conclusions: A single PCR was validated and standardized for the detection of *Porphyromonas Gingivalis* in gingival fluid.

Key words

PCR, *Porphyromonas gingivalis*, gingival fluid.

Resumo

O objetivo deste estudo era conceber e padronizar a técnica de PCR para a detecção de fluido gengival *Porphyromonas gingivalis* em doentes com doença periodontal. foram utilizados iniciadores específicos para o gene de rRNA 16S de *Porphyromonas gingivalis*: Material e métodos. A especificidade dos iniciadores foi testada utilizando extraído a partir da estirpe de referência condições de amplificação do material genético ATCC 33277. *Porphyromonas gingivalis* e concentrações da mistura reaccional foi ajustado. Para validar a técnica foi aplicada para dez amostras clínicas de fluido gengival de pacientes com doença periodontal. Resultados: bandas nítidas são vizualizaram de 197pb utilizando iniciadores específicos em seis amostras clínicas e de sensibilidade foi obtida até 15 ug / ml de ADN purificado a partir da estirpe de referência ATCC 33277. Conclusões: foi validado e estandardizado simples PCR para a detecção de *Porphyromonas gingivalis* em fluido gengival.

Palavras chave

PCR, *Porphyromonas gingivalis*, fluido gengival.

Introducción

La periodontitis es una enfermedad, que se caracteriza por la pérdida de inserción periodontal de las piezas dentarias. La periodontitis se considera una enfermedad infecciosa de origen poli-microbiano y la literatura menciona a más de 300 patógenos posiblemente relacionados con la destrucción periodontal¹. En la variada microbiota subgingival, diferentes especies Gram negativas, anaerobias estrictas y microaerófilas juegan un papel primordial en el inicio y progresión de la enfermedad periodontal. Diferentes complejos microbianos se asociaron con la secuencia de colonización sobre la superficie de la pieza dentaria y con la gravedad de la enfermedad. El complejo rojo², que aparece tardíamente en la secuencia del desarrollo del biofilm, comprende especies que se consideran microorganismos patógenos periodontales tales como *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*), *Treponema denticola*, y *Tannerella forsythia*^{1,3,4}. Los expertos coinciden en que estas bacterias inician la periodontitis humana y la perpetúan. De hecho, en el Taller Mundial de 1999 sobre Periodoncia clínica se concluyó que la mayor parte de las periodontitis humanas son causadas por las especies antes mencionadas, a las que se suma *Aggregatibacter* (antes *Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans*⁵.

P.gingivalis es un cocobacilo gramnegativo, anaerobio estricto, con factores de virulencia que le proveen un gran potencial para colonizar e invadir tejidos periodontales, modular la respuesta inmune del huésped, desencadenar una respuesta inflamatoria crónica y colaborar con los procesos de destrucción de tejido periodontal y hueso alveolar⁶⁻⁹. Conocer los mecanismos mediante los cuales *P.gingivalis* evade los ataques del sistema inmune, es de suma importancia para comprender su rol en la periodontitis. La interacción entre las células del huésped y *P. gingivalis* puede ser la clave para mantener la salud o la progresión de la enfermedad. Este microorganismo desempeña un papel crucial en la disbiosis dentro de la comunidad microbiana oral, quizás, al servir como un disruptor de comunicación en-

tre el biofilm poli-microbiano y el sistema inmune del huésped¹⁰. Se considera que las comunidades microbianas exhiben una virulencia sinérgica que les permite soportar la respuesta inmunológica del huésped y, también, desarrollar mecanismos para valerse del proceso inflamatorio, utilizando los tejidos deteriorados del huésped como nutrientes. Surgen, de este modo, nuevos modelos para entender los mecanismos y epidemiología de las infecciones poli-microbianas tales como la periodontitis, integrando la interacción microbiana y elementos de la inmunidad innata y adaptativa, que inician y propagan la inflamación periodontal crónica¹¹. Estas características permiten que se considere a *P. gingivalis* como el principal patógeno de la periodontitis y de enfermedades sistémicas como artritis reumatoidea y enfermedades cardiovasculares¹². Teniendo en cuenta el rol que desempeña este microorganismo en la iniciación y progreso del proceso inflamatorio periodontal, su identificación se hace necesaria para definir la etiología de la enfermedad e instaurar un tratamiento adecuado. Tradicionalmente, la tipificación se basó en métodos de cultivo a partir de su aislamiento, incluyendo a la microscopía, los criterios fenotípicos y bioquímicos. Sin embargo, estas pruebas son laboriosas y, a veces, proporcionan resultados conflictivos, lo cual puede originarse en la variación existente entre cepas de una misma especie. Las técnicas basadas en el análisis de ADN se utilizan para identificar bacterias en forma directa a partir de muestras clínicas y eludir la necesidad de cultivo In Vitro¹³.

En microbiología, esta metodología permite la detección de secuencias de ácidos nucleicos (ADN o ARN) que son específicos y conservados para cada microorganismo, a partir de diferentes matrices. Su aplicación, surge como una necesidad para detectar microorganismos de difícil crecimiento en cultivo tradicional o desarrollos tardíos. PCR es una de las herramientas de amplificación más sensible y que, en la actualidad, se aplica más satisfactoriamente en el área de microbiología clínica. Particularmente, para los microorganismos patógenos que son difíciles de aislar In Vitro o que presentan crecimiento lento, así como para el agente etiológico de aquellas infecciones clínicamente atribuibles a microorganismos emergentes¹⁴.

Para la detección universal bacteriana, ARN ribosomal 16S es el utilizado ampliamente, debido a su omnipresencia en todos los organismos procariotas, con porciones conservadas a lo largo de la evolución y, a partir de la puesta en evidencia de porciones de su secuencia es posible obtener información filogenética y taxonómica¹⁵.

Desde su publicación, la técnica de PCR se utilizó ampliamente en Ciencias Médicas y de la salud tal como la Odontología¹⁶. La amplificación de secuencias de ácidos nucleicos mediante PCR para la detección de los distintos microorganismos periodontopatógenos se utilizó para agentes etiológicos de distintos tipos de enfermedad periodontal^{17,18}. El objetivo del presente trabajo fue estandarizar y optimizar la técnica de PCR específica para la detección de *Porphyromonas gingivalis* en muestras de líquido gingival o crevicular.

Materiales y Métodos

Selección de los iniciadores: Para el diseño y optimización de la técnica de PCR se utilizaron iniciadores específicos para el gen que codifica una región conservada del ARNr 16S o ADN 16S (gen-housekeeping) en *Porphyromonas gingivalis*. La especificidad de los iniciadores se ensayó empleando material genético extraído de la cepa ATCC® de *Porphyromonas gingivalis* 33277™. La estrategia del ensayo se diseñó en forma simple y económica. Se utilizaron los cebadores descritos en el protocolo de PCR de acuerdo con Quintero y col (2011)¹⁷ cuya banda se visualiza a 197 pares de bases (pb). Extracción de ADN: Para la extracción de ADN, se tomó una alícuota de 100µl de la suspensión celular y se resuspendió en solución fisiológica (400 µl), luego se homogeneizó en vortex durante 20 segundos. Se centrifugó (4 min, 1.200 rpm), se desechó el sobrenadante y se recuperó el pellet celular para la extracción del material genético. El ADN se extrajo empleando el protocolo que emplea Bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB) de acuerdo con lo sugerido por Stewart y col. (1993)¹⁹ y, posteriormente, se purificó con cloroformo-alcohol isoamílico. Para evaluar la cantidad y calidad de ADN genómi-

co obtenido se utilizó el fotómetro UV Ampli-Quat, AQ-07 Nucleic Acid se midió la absorbancia a 260 nm (A260) y 280 nm (A280) utilizando la fórmula siguiente: $[ADN] = \frac{A_{260} \text{ nm} \times D \times 50 \text{ } \mu\text{g/mL}}{A_{280} \text{ nm}}$ D= factor de dilución. El grado de pureza se calculó dividiendo la absorbancia a 260 nm entre la absorbancia a 280 nm. Condiciones de PCR. Las secuencias de cebadores utilizadas para la identificación de *P. gingivalis* fueron Pg-IF 5'-TGTAGATGACTGAAAACC-3' - Pg-2R 5'-ACGTCATCCCCACCTTCCTC-3', que amplifican 197 pb. La reacción se realizó con un volumen final de 20 μl . Se realizaron curvas para obtener las concentraciones óptimas de MgCl_2 y de oligonucleótidos. Las concentraciones finales fueron: 1X buffer de PCR, 2 mM de MgCl_2 , 0,25 mM de cada dNTP (Biodynamics, Argentina) 1 μM de cada primer y 1,0 U Taq DNA polimerasa (Promega, Argentina). Se empleó como control positivo la cepa de referencia *P. gingivalis* ATCC® 33277™ y como control negativo, agua. Programa de termociclado. La secuencia de ciclado (termociclador Bio-Rad, China) consistió en 1 ciclo de desnaturalización durante 5 min a 94 °C, seguido de 40 ciclos a 94 °C durante 30 s, unión del cebador a 55 °C durante 30 s, extensión a 72 °C durante 45 s con extensión final a 72 °C durante 10 min e incubación adicional a 4 °C. Análisis del producto de amplificación por electroforesis en gel. Los productos PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa 1% en buffer TBE 1X. Se sembraron 10 ml en cada pocillo más 3 ml de Gel Red 10,000X (Biotium, USA), diluido (3X) en agua destilada-deionizada más 3ml de buffer de carga (60% glicerol, 0,05% azul bromofenol). Como marcador de Peso Molecular (PM) se utilizaron 5 μl de Cien-Marker, (Biodynamics, Argentina). En una cuba horizontal Sub Cell® GT (Biorad, China) y usando TBE 1X (Trisma base, ácido bórico, EDTA, pH 8) como buffer de corrida; se aplicaron 100 voltios durante 30 min. Las bandas se visualizaron en un fotodocumentador (MaestroGen, Taiwan). Sensibilidad de la PCR. Se determinó empleando diluciones 1/10, 1/100, 1/1000 del ADN purificado, obtenido a partir de la cepa de referencia ATCC® de *P. gingivalis* 33277™. Para validar la técnica se procesaron diez muestras clínicas de pacientes que asistieron a las Clínicas Odontológicas de la Facultad de Odontología

de la Universidad Nacional del Nordeste, con diagnóstico previo de periodontitis, cada participante firmo el consentimiento aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Odontología de la UNNE. Las muestras fueron obtenidas con conos de papel absorbente (Asorbent Paper Points; Meta, Biomed, Chungbuk, Corea) conservadas en tubos Eppendorf a -20°C hasta su procesamiento (Fig 1).

Resultados

Con el método de extracción con CTAB y purificación se obtuvo 1552,65 $\mu\text{g/ml}$ de DNA genómico de la cepa de referencia ATCC® *P. gingivalis* 33277™, y la calidad del DNA con una relación de OD260/OD280 de 1,648 de pureza. Luego de estandarizar la metodología de PCR, se obtuvieron resultados satisfactorios con visualización de bandas nítidas a 197 pb, correspondiente a los iniciadores específicos cuando se utilizó como molde ADN purificado correspondiente a la cepa de referencia ATCC® *P. gingivalis* 33277™ de mientras que en las calles correspondientes al control negativo no se visualizaron bandas de amplificación. Para analizar la sensibilidad de la prueba se realizaron diluciones: 1/10, 1/100 y 1/1000 de ADN genómico de la cepa de referencia ATCC® *P. gingivalis* 33277™, la prueba de PCR presento gran sensibilidad, llegando a detectar hasta 15 $\mu\text{g/ml}$ de ADN purificado correspondiente a la dilución 1/100 del templado. Cuando la técnica se aplicó a las muestras de líquido gingival se observó la presencia de banda compatible con *P. gingivalis* en seis muestras de pacientes con enfermedad periodontal, una banda nítida a 197 pb correspondiente al control positivo ADN purificado de la cepa de referencia ATCC® *P. gingivalis* 33277™ y no se observó banda en el control negativo, donde de utilizo agua en reemplazo del templado. Fig 1

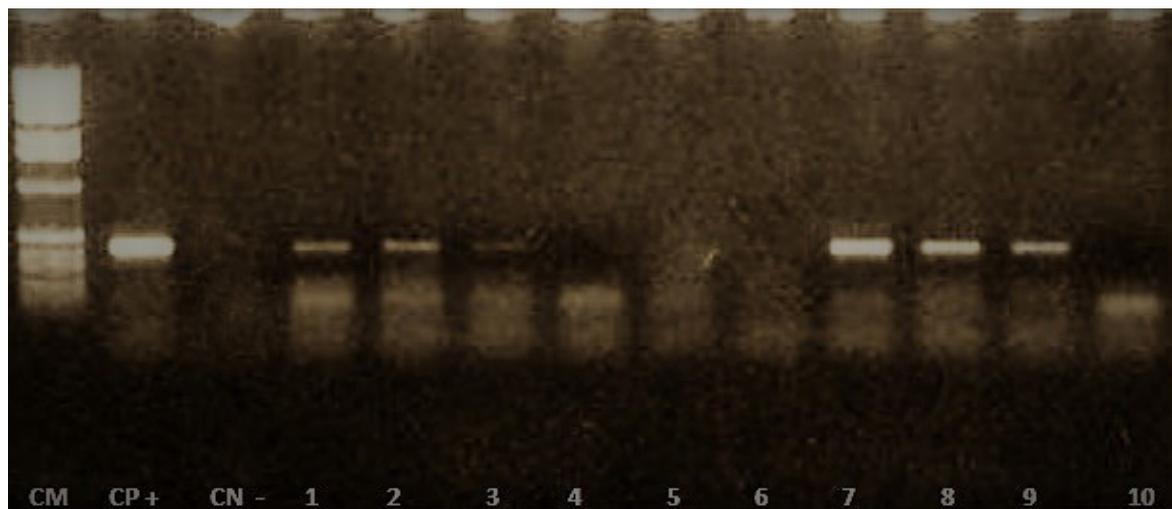


Figura 1. Perfil electroforético de amplicones PCR especie específica de *Porphyromonas gingivalis* en agarosa (1%). CM: marcador de peso molecular CP: Control positivo cepa de referencia *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™ CN: Control negativo. Calles 1,2,3,7,8,9 muestras clínicas *Porphyromonas gingivalis* detectable. Calles 4,5,6 muestras clínicas *Porphyromonas gingivalis* no detectable.

Discusión

En la actualidad surgen nuevas líneas de investigación sobre la diversidad bacteriana dentro de las biopelículas, su patogenicidad y la susceptibilidad propia del paciente para producir una respuesta inmune dirigida a los patógenos periodontales invasores. Entre las técnicas moleculares, PCR, particularmente, es la metodología más empleada para el diagnóstico de los microorganismos debido a su elevada sensibilidad y especificidad, por lo que resulta una herramienta útil para este fin^{20,21}. La capacidad para detectar e identificar secuencias de ácidos nucleicos provenientes de microorganismos permitió la detección de bacterias tanto cultivables como viables no cultivables, entre ellas *P. gingivalis*. Mättö y col (1998)²² demostraron la efectividad de la metodología PCR en la detección de *P. gingivalis* en saliva comparándola con técnicas de cultivo y, arribaron a la conclusión que la capacidad de detección mediante PCR fue superior a la que emplea cultivo. Okada y col en el año 2000²², recogieron material de placa a partir de cepillos dentales de niños, con el objetivo de detectar la presencia de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* utilizando PCR. Estos

autores, indicaron que dichos microorganismos raramente se detectaron en las cavidades orales de niños sanos, a diferencia de aquellos que presentaron patologías. Sakamoto y col en el año 2001²³, compararon las metodologías de PCR convencional, PCR en tiempo real utilizando el sistema LightCycler™ y, el método de cultivo para detectar y cuantificar bacterias periodontopatógenas tales como *A. actinomycetemcomitans*, *B. forsythus*, *P. gingivalis*, *T. dentícola* y *T. socranskii* en saliva y placa subgingival. Tomazinho y col en 2007²⁴ evaluó la prevalencia de *P. gingivalis* y otros microorganismos en lesiones periapicales crónicas por metodología de cultivo y PCR hallando un 15.2% y 43.3% con cada método respectivamente. Este hallazgo confirmó los resultados reportados en estudios anteriores^{21,25} que mostraron mayor sensibilidad de la técnica PCR que la de cultivo para la detección de bacilos anaerobios estrictos. El menor porcentaje de prevalencia empleando metodología de cultivo, se debería a las dificultades para recuperar estos microorganismos en función de su elevada sensibilidad frente al oxígeno. Varios estudios concluyeron al comparar la tecnología de PCR cuantitativa y el procedimiento de cultivo, que la elevada sensibilidad y especificidad de

la PCR cuantitativa, justifican su uso en los estudios epidemiológicos y en el diagnóstico clínico de los pacientes periodontales^{26,27}.

P. gingivalis, por sus fimbrias se adhiere a células del endotelio vascular simulando receptores plaquetarios, favoreciendo así el proceso aterogénico; por la capacidad de invadir células endoteliales, evade el sistema inmune y además produce alteraciones hemostáticas. De igual manera, las mujeres embarazadas que padezcan enfermedad periodontal estarán expuestas a riesgo de parto pre-término o bajo peso del niño al nacer, dependiendo de la magnitud de la respuesta inflamatoria lo que se refleja en el grado de destrucción periodontal. En el sistema respiratorio, ya sea por aspiración o por vía hematógena *P. gingivalis* es reconocida por las células de la inmunidad natural a través de receptores tipo Toll, activando la producción de sustancias proinflamatorias²⁸.

Conclusión

En la medida en que la microbiología evolucionó, en la cavidad bucal se aislaron, aproximadamente, unas 400 especies bacterianas, de las cuales el 30%, aún, no se pudieron cultivar. PCR es una herramienta muy útil en diversos campos de investigación y en Odontología. Entre muchas de sus aplicaciones, se puede utilizar para el diagnóstico de virus, parásitos y bacterias de difícil cultivo por poseer una alta especificidad, sensibilidad y seguridad, por ofrecer un diagnóstico confiable, más rápido y menos laborioso que los cultivos convencionales para este tipo de microorganismos. La metodología PCR para detectar *P. gingivalis* es de particular interés en el diagnóstico médico y odontológico. Se validó y estandarizó una PCR sencilla para la detección de *Porphyromonas gingivalis* en líquido gingival.

Conflicto de Intereses

No existen conflictos de intereses

Agradecimientos

Fuente de financiamiento: Secretaria General de Ciencia y Técnica Universidad Nacional del Nordeste.

Bibliografía

1. Bascones A, Caballero A. Actinobacillus Actinomycescomitans y Porphyromonas Gingivalis como principales patógenos periodontales 2000;12:69-75. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/peri/v12n2/original1.pdf>
2. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol 1998; 25: 134-44. DOI/10.1111/j.1600-051X.1998.tb02419.x/abstract
3. Holt S, Ebersole J. Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, y Tannerella forsythia: el «complejo rojo», un prototipo de consorcio patógeno polibacteriano en la periodontitis Periodontology 2000 2005;12:72-122. DOI: 10.1111/j.1600-0757.2005.00113.x
4. Kumawat, R. M., Ganvir, S. M., Hazarey, V. K., Qureshi, A., & Purohit, H. J. Detection of Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola in chronic and aggressive periodontitis patients: A comparative polymerase chain reaction study. Contemporary Clinical Dentistry 2016 ; 7: 481.
5. Roy C, Kenneth S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. Periodontology 2000 1997; 14: 9-11.
6. Ramos D, Moromi H, Martínez E. Porphyromonas gingivalis: Patógeno predominante en la periodontitis crónica. Odontol. Sanmarquina 2011; 14: 34-38 Disponible en : http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/odontologia/2011_n1/pdf/a11.pdf
7. Moreno S, Contreras A. Factores de Virulencia de Porphyromonas gingivalis. Rev Fundac Juan Jose Carraro 2013; 37: 16-27. Disponible en: http://www.fundacioncarraro.org/descarga/revista37_art2.pdf
8. Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, Lyuya-Mi Y, Bartova J, Janatova T, Prochazkova J, Duskova J. Porphyromonas gingivalis: Major Periodontopathic Pathogen Overview. J Immunol Research 2014 disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/476068>
9. Pandit N, Changela R, Bali D, Tikoo P, Gugnani S. Porphyromonas gingivalis : Its virulence and vaccine. J Int Clin Dent Res Organ 2015;7:51. Disponible en: <http://www.jicdro.org/text.asp?2015/7/1/51/153496>
10. Cugini C, Klepac-Ceraj V, Rackaityte E, Riggs J, Davey M. Porphyromonas gingivalis: keeping the pathos out of the biont. J Oral Microbiol 2013; 5 Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3402/jom.v5i0.19804>
11. Hajishengallis G. Porphyromonas gingivalis–host interactions: open war or intelligent guerilla tactics? Microbes Infect 2009;11: 637-45. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2704251/pdf/nihms103806.pdf>
12. Burmistrz M, Dudek B, Staniec D, Rodriguez Martinez JI, Bochtler M, Potempa J, Pyrc K. Functional analysis of Porphyromonas gingivalis W83 CRISPR-Cas system. J. Bacteriol 2015;197:2631-41. Disponible en: <http://jb.asm.org/content/early/2015/05/19/JB.00261-15.full.pdf+html>

13. Perea EJ. La flora de la boca en la era de la biología molecular. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2004; 9: 1-10. Disponible en: <http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/v9Suppli/medoralv9supplip6.pdf>
14. Ferreira Dos Santos C, Sakai V, Machado M, de Andrade Moreira A, Schippers D, Greene A. Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. *J Appl Oral Sci* 2004;12:1-11. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf>
15. Woese C. Bacterial Evolution. *Microbiol Reviews* 1987; 2: 221-71. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC373105/pdf/microrev00049-0051.pdf>
16. Ledder RG, Gilbert P, Huws SA, Aarons L, Ashley MP, Hull PS. Molecular analysis of the subgingival microbiota in health and disease. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 516-23. DOI: 10.1128/AEM.01419-06
17. Quintero AJ, Prada P, Inostroza CM, Chaparro A, Sanz AF, Ramírez VL, Morales HC. Presencia de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en el biofilm subgingival de pacientes diabéticos tipo 2: estudio transversal. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral* 2011; 4:54-58. Disponible en: www.scielo.cl/pdf/piro/v4n2/art03.pdf
18. Mayorga-Fayad I, Lafaurie G, Contreras A, Castillo D, Barón A, Aya M. Microflora subgingival en periodontitis crónica y agresiva en Bogotá, Colombia: un acercamiento epidemiológico Biomédica. Instituto Nacional de Salud Bogotá, Colombia 2007;27: 21-33. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0120-41572007000100003
19. Stewart CN, Via LE. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *BioTechniques* 1993;14: 748-51. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/80909788/A-Rapid-CTAB-DNA-Isolation>
20. Fenollar F, Raoult D. Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. *APMIS* 2004; 112: 785-807. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2004.apm11211-1206.x
21. Mättö J, Saarela M, Alaluusua S, Oja V, Jousimies-Somer H, Asikainen S. Detection of *Porphyromonas gingivalis* from saliva by PCR by using a simple sample-processing method. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 157-60. Disponible en: <http://pubmedcentralcanada.ca/pmc/articles/PMC124827/pdf/jm000157.pdf>
22. Okada M, Hayashi F, Nagasaka N. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in dental plaque samples from children 2 to 12 years of age. *J Clin Periodontol* 2000; 27 : 763-68. DOI: 10.1034/j.1600-051x.2000.027010763.x
23. Sakamoto M, Takeuchi Y, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. Rapid detection and quantification of five periodontopathic bacteria by real time PCR. [Abstract] *Microbiol Immunol* 2001; 45: 39-44. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11270605>
24. Tomazinho L, Avila-Campos M. Detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in chronic endodontic infection. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathol, Oral Radiol and Endodontol* 2007; 103: 285-88 Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1079210406003751>
25. Loesche W, Lopatin D, Stoll J, van Poperin N, Hujel P. Comparison of various detection methods for periodontopathic bacteria: can culture be considered the primary reference standard? *J Clin Microbiol* 1992; 30:418-26. Disponible en: <http://jcm.asm.org/content/30/2/418.full.pdf>
26. Boutaga K, van Winkelhoff A, Vandenbroucke-Grauls C, Savelkoul P. Comparison of Real-Time PCR and Culture for Detection of *Porphyromonas gingivalis* in Subgingival Plaque Samples. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4950-54. Disponible en : <http://doi.org/10.1128/JCM.41.11.4950-4954.2003>
27. Lau L, Sanz M, Herrera D, Morillo JM, Martín C, Silva A. Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 2004; 31:1061-69. DOI: 10.1111/j.1600-051X.2004.00616.x
28. Orrego-Cardozo M, Parra-Gil MA, Salgado-Morales YP, Muñoz-Guarín E, Fandiño-Henao V. *Porphyromonas gingivalis* y enfermedades sistémicas. *Rev. CES Odont* 2015; 28(1): 57-73 Disponible en: <http://revistas.ces.edu.co/index.php/odontologia/article/view/3492/2385>