

“NIVEL DE HIGIENE Y PREVALENCIA DE *PORPHYROMONA GINGIVALIS* Y *FUSUBACTERIUM NUCLEATUM* EN PACIENTES RECUPERADOS DE SARS-CoV-2”

J.L. Rodríguez-Cardona ¹, W.J. Alvarez-Fernández ², J.A. Jimenez-Del Valle ³, M.E. Sánchez-Dorado ⁴, V.H. Urrutia-Baca ⁵, A.A. Cienfuegos-Sarmiento ⁶, M.A. De la Garza-Ramos ⁷.

1. Estudiante de odontología, Universidad de Montemorelos, Nuevo León, México. 2. Profesor, Escuela de ciencias estomatológicas, Universidad de Montemorelos, Nuevo León, México

3. Centro de investigación, Escuela de ciencias estomatológicas, Universidad de Montemorelos, Nuevo León, México. 4. Facultad de ciencias biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, México

5. Facultad de ciencias biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, México. 6. Investigación, Centro de investigación y desarrollo en ciencias de la salud, Nuevo León, México

7. Microbióloga, Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, México

Resumen

Antecedentes: El SARS-CoV-2 afecta el sistema respiratorio en diferentes grados. La cavidad oral es el lugar más colonizado por bacterias, por lo tanto, al no tener una buena higiene, pueden presentarse diferentes enfermedades secundarias; esto ha causado alerta en el gremio odontológico, ya que puede contribuir a complicaciones posteriores en los pacientes. **Materiales y métodos:** El estudio fue conformado por 47 pacientes voluntarios recuperados de SARS-CoV-2, residentes de Montemorelos, Nuevo León, México, donde fueron atendidos en BucaliA Dent, consultorio dental. Después del consentimiento informado de cada paciente, se realizó una historia clínica para conocer los síntomas, enfermedades sistémicas, ausencia de dientes y nivel de inflamación gingival de acuerdo al índice de Löe y Silness. Seguido a esto, se tomó una muestra de placa dentobacteriana, la cual se suspendió en una solución buffer de fosfato, posteriormente fue llevada al centro de investigación y desarrollo en ciencias de la salud (CIDICS), Monterrey, N.L., México. Se extrajo ADN y se purificó, después se realizó PCR para detectar los patógenos orales; la PCR se visualizó en gel de agarosa (1.5%) por tinción de bromuro de etidio. **Resultados:** Se detectó 80.85% *Porphyromona gingivalis* y 68.09% *Fusubacterium nucleatum* en pacientes recuperados de SARS-CoV-2. 23.4% presentaron inflamación leve de acuerdo al índice de Löe y Silness, 54.5% fueron masculinos y 45.5% femeninas. Por otro lado, 36.4% de los pacientes con inflamación leve presentaron de 4-6 dientes ausentes. En estos pacientes se detectó 18.18% únicamente con *Fusubacterium nucleatum* y 27.27% solo con *Porphyromona gingivalis*; El sexo masculino tuvo predisposición con 66.6% y el sexo femenino a 33.33%; Se observó infección con los dos patógenos presentes en el 45.45%; y 60% de estos pacientes fueron masculinos. **Conclusiones:** Pacientes recuperados de SARS-CoV-2 mostraron poca higiene oral y alta prevalencia de los patógenos mencionados altamente relacionados a inflamación gingival o enfermedad periodontal, esto nos indica que es indispensable la intervención del odontólogo al finalizar el periodo de infección de cada paciente.

Palabras clave: SARS-CoV-2, Bacterias, *Porphyromona gingivalis*, *Fusubacterium nucleatum*, Higiene oral, Inflamación gingival

Introducción

El 11 de marzo del 2020 la Organización mundial de salud (OMS) declaró el SARS-CoV-2 como pandemia. Este virus ha causado muchas muertes y una cantidad significativa de afectados alrededor del mundo, sin importar edad, raza o género. La cavidad oral, es uno de los medios principales de contagio, debido a los fluidos, a su vez, la boca alberga grandes cantidades de colonias bacterianas que pueden desarrollar problemas en las estructuras bucales; también

se conoce que es la parte principal de la digestión y se relaciona a posibles complicaciones en los cuadros sintomáticos de los pacientes.

Pero, ¿Los pacientes recuperados quedan con secuelas bacterianas?, ¿El nivel de higiene es necesario antes y después de contraer el SARS-CoV-2?, ¿Qué afecciones pueden existir después del virus?.

Materiales y métodos

Toma de muestra

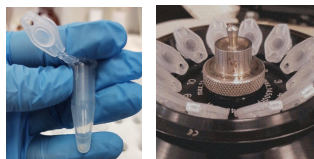
Se realizó una Historia clínica con preguntas claves para conocer el estado del paciente durante su desarrollo del SARS-CoV-2, acompañada de un examen intraoral así como una inspección de acuerdo al índice gingival de Löe y Silness. Con un palillo estéril fue tomada una muestra de placa dentobacteriana de la zona retromolar y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5ml con buffer de fosfato, sellando la muestra con parafina, las cuales fueron procesadas en el Centro

de investigación y desarrollo en ciencias de la salud (CIDICS).



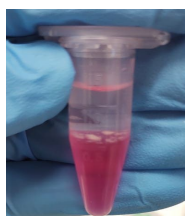
Extracción y preparación de ADN

El tubo de 1.5ml fue introducido en la centrifuga a 12,000 revoluciones por 10 minutos, para obtener la pastilla del ADN.



Se añadió 1ml de Trizol por pipeteo repetido y 2 µl de cloroformo, se homogeneizó por medio del vortex durante 15 seg, con un reposo de 10 min para después centrifugar durante el mismo tiempo. Posterior a eso se dividió en 3 fases:

1. Acuosa (RNA)
2. Interfase (ADN)
3. Orgánica (Proteínas y resto de trizol)



Se recopiló la interfase (ADN) en un tubo diferente de 1.5ml. Se añadió 500 µl de etanol absoluto para eliminar las impurezas, dejándolo reposar por 3 min. y centrifugando nuevamente; se descartó el sobrenadante, se lavó y

centrifugó 2 veces con 1 ml de citrato trisódico.

Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 1.5 ml de etanol al 70%, se reposó entre 10-20 min. y centrifugó; finalmente se retiró el sobrenadante y se agregó PBS+BSA al 0.5%.

Reacción en la Cadena Polimerasa (PCR)

Se utilizó dNTP Mix:

- dGTP (Trifosfato de Desoxiguanosina)
- dTTP (Trifosfato de Timidina)
- dATP (Trifosfato de Desoxiadenosina)
- dCTP (Trifosfato de Desoxicitidina)

Se preparó un volumen inicial de 500 µl; en un tubo de 1.5 ml, se introdujo 50 µl de cada reactivo de dNTP mix y se agregaron 300 µl de H₂O.

En un tubo de 1.5 ml se realizó la preparación de los primers 10 µl de Forward (Fv) y 10 µl de Reverse (Rv), agregando 90 µl de H₂O respectivamente; estos actúan como cebadores de la acción de polimerasa.

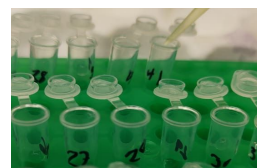
Para llegar a la reacción final de PCR es necesario realizar el mix de los reactivos antes preparados:

Buffer reacción	2.5 µl
Primer Fw	2.0 µl
Primer Rv	2.0 µl
dNTP Mix	1.0 µl
Taq Polimerasa	0.25 µl
H ₂ O	15.25 µl

La tabla anterior indica los volúmenes necesarios para una

muestra, por lo tanto estos valores fueron multiplicados por 47 que fue el número de nuestras muestras.

Se tomaron tubos de 10 mg de acuerdo al número de muestras; a cada uno se agregó 23 µl de reacción final de PCR y 2 µl de ADN respectivo a cada paciente. Posteriormente, las muestras se colocaron en el termociclador para realizar los ciclos de temperaturas necesarios para la amplificación de PCR.



Electroforesis en gel de agarosa

En un matraz se rebajó el TAE 10x con 10 ml y 90 ml de H₂O, se agregó 1.5 g de Agarosa, se colocó el matraz en la plancha durante 5 min. aproximadamente, verificando que todo se integrara; el líquido obtenido de agarosa se colocó en la base de la cámara de electroforesis con sus respectivas celdas para gelificar; una vez gelificado se introdujo a la cámara el buffer de carga, asegurándose de cubrir todo el gel.

En la primera celda se depositó 1 µl de colorante, 1 µl de buffer blue y 5 µl de ladder; en la segunda celda 1 µl de colorante, 1 µl de buffer blue y 5 µl de PCR de la bacteria; en las siguientes celdas 1 µl de colorante, 1 µl de buffer blue y 5 µl de PCR de los pacientes respectivos. Para observar los resultados claramente, se introdujo el gel al Bio-Rad, Gel Doc™ XR.



Resultados

Se detectó en los pacientes recuperados de SARS-CoV-2 80.85% *Porphyromona gingivalis* y 68.09% *Fusobacterium nucleatum*. 23.4% mostraron inflamación leve de acuerdo al índice de Lõe y Silness, de estos pacientes 54.5% fueron del sexo masculino y el 45.5% fueron del sexo femenino. Por otro lado, 36.4% de los pacientes que presentaron inflamación leve presentaron 4-6 dientes ausentes.

18.18% de los pacientes presentaron únicamente *Porphyromona gingivalis* y 27.27% *Fusobacterium nucleatum*; El sexo masculino tiene una predisposición de una enfermedad gingival de 66.66% y el sexo femenino de 33.33%; Los dos patógenos mencionados se observó 45.45% en femenino y 60% en sexo masculino.

Discusión

Nos encontramos en un campo desconocido en relación al SARS-CoV-2.

Sabemos que una de las entradas principales del virus es la cavidad oral, por lo tanto, la higiene bucal es esencial para minimizar el riesgo de adquirir el virus.

En esta investigación decidimos concentrarnos en las bacterias principales de enfermedad periodontal, así como también en la enfermedad respiratoria.

Está comprobado que pacientes con mayor número de bacterias en boca están predispuestos a desarrollar una enfermedad oral, así como también una enfermedad bacteriana secundaria.

Esta investigación queda abierta para continuar con los estudios de diferentes grupos bacterianos en pacientes recuperados, así como también de pacientes actualmente infectados con SARS-CoV-2 y relacionar las cargas bacterianas entre ambos pacientes.

Conclusión

Los pacientes recuperados de SARS-CoV-2 presentan una pobre higiene oral y alta prevalencia a patógenos orales relacionados a enfermedad periodontal.

Esta investigación invita a los pacientes recuperados de SARS-CoV-2 a una evaluación y tratamiento con su odontólogo de confianza, pues son altamente susceptibles a contraer las enfermedades antes mencionadas y llevarlos a complicaciones sistémicas.

Referencias

1. Mijović B. COVID-19 - Lessons Learned. Scripta Medica [Internet]. 2020;51(1):1-5.
2. Ashikujaman Syed. Coronavirus: A Mini-Review. IJCRM. [Internet] Vol 6. 2020;2020.06.01.002
3. Perlman S. Another Decade, Another Coronavirus. The new england journal of medicine. pubmed. [Internet] 2020;382(8), 760-762.
4. Gaitán-Cepeda L, Leyva-Huerta E, Cruz-González R, Carmona-Ruiz D, Rodríguez M, Gómez-Arenas A. COVID-19 y el cirujano dentista. Una revisión integral. Rev Odont Mex. [Internet] 2019; 23 (4).
5. Abramovitz I, Palmon A, Levy D, Karabucak B, Kot-Limon N, Shay B, et al. Dental care during the coronavirus disease 2019

- (COVID-19) outbreak: operatory considerations and clinical aspects. Quintessence International [Internet]. 2020;51(5):418-29.
6. Baghizadeh Fini M. What dentists need to know about COVID-19. Oral Oncology. [Internet] 2020; jun 1;105.
7. Dziedzic A, Wojtyczka R. The impact of coronavirus infectious disease 19 (COVID-19) on oral health [Internet]. Pubmed.2020;10.1111/odi.13359.
8. Suárez V, Suarez-Quezada M, Oros-Ruiz S, Ronquillo-De Jesús E. Epidemiología de COVID-19 en México: del 27 de febrero al 30 de abril de 2020. ncbi. [Internet] 2020; 220(8): 463-471.
9. Pacheco MPM, Pacheco GJD, Hernández MAB, et al. Consideraciones sobre el diagnóstico de COVID-19 y el papel del diagnóstico salival. Rev ADM. [Internet] 2020;77(4):191-196.
10. Cruz-Quintana S, Díaz-Sjostrom P, Arias-Socarrás D, Mazón-Baldeón G. Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal. Rev Cubana Estomatol [Internet] 2017; 54(1): 84-99.
11. Serrano-Coll H, Sánchez-Jiménez M, Cardona-Castro N. Conocimiento de la microbiota de la cavidad oral a través de la metagenómica. CES odontol. [Internet] 2015; 28(2): 112-118.
12. Baghizadeh-Fini M. Oral saliva and COVID-19. Elsevierpure.[Internet] 2020; 1;108.
13. Carreras-Presas M, Amaro-Sánchez J, López-Sánchez A, Jané-Salas E, Somacarrera-Pérez M. Oral vesiculobullous lesions associated with SARS-CoV-2 infection. Pubmed.[Internet] 2020; 5;10.1111
14. Sinadinos A, Shelswell J. Oral ulceration and blistering in patients with COVID-19. NCBI. [Internet] 2020; 21(2): 49.
15. Petrescu N, Lucaciu O, Roman A. Oral mucosa lesions in COVID-19. NCBI. [Internet] 2020; 10.1111
16. Riad A, Gomaa M. Comment on: Oral Manifestation of COVID-19 as an inaugural symptom?. JOMOS. [Internet] 2020; 26:19
17. Dantas-Souares C, Andrade-de Carvalho R, Andrade-de Carvalho K, Gorette-Freire M, Paes-de Almeida O. Letter to Editor: Oral lesions in a patient with Covid-19. NCBI. [Internet] 2020; 25(4)
18. Nemeth-Kohanszky M, Matus-Abásolo C, Carrasco-Soto R. Manifestaciones Orales de la Infección por COVID-19. Int. J. Odontostomat. [Internet] 2020. 14(4)

-
19. Amorim-dos Santos J, Normando A, Carvalho-da Silva R, De Paula R, Cembranel A, Santos-Silva A et al. Oral mucosal lesions in a COVID-19 patient: New signs or secondary manifestations?. Elsevier.[Internet] 2020. 97:326–328.
 20. Sampson V, Kamona N, Sampson A. Could there be a link between oral hygiene and the severity of SARS-CoV-2 infections?. Pubmed. [Internet] 2020. 228(12)
 21. Yaumara A, Yayquier D, Leonardo A, Olga G, Orlando L, María S. Infecciones bacterianas asociadas a la COVID-19 en pacientes de una unidad de cuidados intensivos. Rev Med Militar. [Internet] 2020; 49(3)
 22. Cruz-Quintana S, Díaz-Sjostrom P, Arias-Socarrás D, Mazón-Baldeón G. Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal. Revista Cubana de Estomatología [Internet] 2017; 54(1):84–99.
 23. Cervera-Ubierna A. Tratamiento de la infección por SARS-CoV-2. Act Pediatr Mex. [Internet] 2020; 41(4S1)
 24. Yarzabal-Rodríguez L, Buela-Salazar L, Sarmiento-Ordoñez J. Técnica de biología molecular para la investigación en odontología y biología oral (1a parte). Rev OACTIVA UC.[Internet] 2018; 3 (1)
 25. Mas E, Poza J, Ciriza J, Zaragoza P, Osta R, Rodellar C. Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Rev AcuaTic. [Internet] 2016; 15
 26. Garrote-Santana H, Díaz-Alonso C. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa: del “Nobel” a la actualidad. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. [Internet] 2019; 35(4)
 27. Cervantes-Gonzalez J. Obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN) útil para análisis genético, a partir de uñas recortadas. Rev Med Hered [Internet] 2003; 14(4): 229-232.
 28. Yarzabal-Rodríguez L, Buela-Salazar L, Sarmiento-Ordoñez J. Técnica de biología molecular para la investigación en odontología y biología oral (2a parte). Rev OACTIVA UC. [Internet] 2019; 4 (3)
 29. Orrego-Cardozo M, Parra-Gil M, Salgado-Morales Y, Muñoz-Guarín E, Fandiño-Henao V. Porphyromonas gingivalis y enfermedades sistémicas. CES odontol. [Internet] 2015; 28(1): 57-73.
 30. Hoffmeister C, Ducasse K, González M, Quilodrán C, Joyas A. Infección pulmonar y torácica por Fusobacterium nucleatum. Rev Chil Ped. [Internet] 2020; 92 (1)