

Diagnóstico de infecciones periodontales mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

Breve descripción

Técnicas de biología molecular que permiten la detección y/o cuantificación de bacterias patógenas conocidas relacionadas con las infecciones de origen periodontal. La biología molecular se ha convertido en una herramienta muy útil en la práctica profesional del odontólogo actual debido a que ha hecho posible el estudio de las comunidades microbianas de la cavidad oral, incluyendo a especies bacterianas que no son susceptibles de ser cultivadas en el laboratorio. Las llamadas técnicas de biología molecular son procedimientos basados en la caracterización física de moléculas de ácidos nucleicos. Entre ellas, destaca la reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN específico, partiendo de un mínimo, por lo que resulta más fácil identificar con una alta probabilidad las bacterias presentes en una muestra.

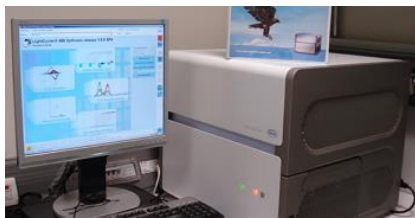


Figura 1. Equipo LightCycler® 480 II (Roche) del que disponemos en el laboratorio de investigación de la Facultad de Odontología, UCM.

¿Cómo funciona?

Para su aplicación, el primer paso a seguir es la obtención y preparación de las muestras, contemplando las condiciones de recogida, conservación y transporte. Por lo general, las muestras microbiológicas se toman de las localizaciones a evaluar, habitualmente surco gingival, mediante puntas de papel estériles. Éstas se depositan en un vial estéril vacío que es enviado al laboratorio para su análisis mediante PCR. Para la correcta conservación de la muestra, se recomienda la posterior congelación del vial en caso de no ser enviado al laboratorio tras el momento de su recogida, pudiendo acumular varias muestras congeladas antes de realizar el envío. Es importante tener en cuenta que, en caso de que se solicite análisis conjunto de la muestra mediante PCR y cultivo anaerobio convencional, las puntas de papel deben recogerse en un vial que contiene un fluido de transporte reducido estéril (RTF), que permite conservar la anaerobiosis de las muestras.

En el laboratorio, las bacterias presentes en las puntas de papel se dispersan mediante agitación, y se procede a la extracción y purificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) bacteriano para después realizar análisis específicos mediante la técnica de PCR que nos permiten detectar su presencia. Para la obtención del ADN empleamos kits comerciales con protocolos que incluyen agentes químicos, enzimáticos y/o físicos que liberan el material genético y la posterior purificación del material extraído. A continuación, se llevan a cabo las técnicas de amplificación en aparatos conocidos como termocicladores, bien por la técnica de PCR cualitativa, utilizando cebadores específicos dirigidos a las bacterias seleccionadas, o por PCR cuantitativa con la incorporación además de marcaje fluorescente para la detección de dichas bacterias en muestras, siendo posible la cuantificación simultánea de distintas especies con la optimización de la PCR cuantitativa múltiple.

¿Qué problema resuelve?

- La qPCR proporciona mediciones precisas mediante la detección de secuencias específicas de organismos seleccionados durante la fase de amplificación exponencial, lo que la hace más eficaz y precisa para el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades periodontales
- La posibilidad de realizar ensayos de multiplexación mejorados permiten la detección simultánea de varias dianas en una sola muestra, reduciendo costes y tiempo.

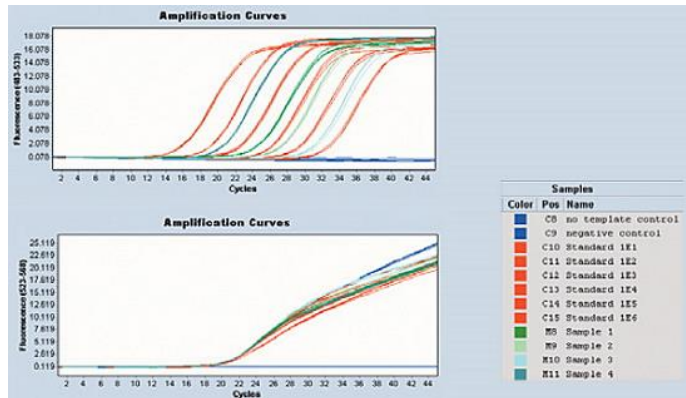


Figura 2: Ejemplo de un ensayo de cuantificación absoluta utilizando el equipo LightCycler® 480 II (Roche) realizado en el laboratorio de investigación de la Facultad de Odontología, UCM.

¿Qué productos futuros resultarán?

Supone una ayuda clara en el diagnóstico y tratamiento rápido de las enfermedades periodontales, principalmente en aquellos casos donde el diagnóstico convencional no pueda ser utilizado. Asimismo, ha demostrado ser de gran utilidad en el campo de la Epidemiología, ya que hace posible el conocimiento de la probable fuente de infección, la forma de transmisión y la puerta de entrada de los microorganismos involucrados en las infecciones.

Ventajas competitivas frente a otras investigaciones

Actualmente, la PCR cuantitativa es considerada como procedimiento complementario o alternativo al cultivo convencional, ya que permite el estudio especies que no son susceptibles de ser cultivadas en el laboratorio, así como aquellas de lento o difícil crecimiento, además de acortar los tiempos de procesado y obtención de resultados, lo cual aporta ventajas importantes para la obtención de diagnósticos rápidos en la práctica clínica diaria. Además, la PCR es más específica y sensible que el cultivo, basándose en la detección de secuencias de ADN específicas de genes bacterianos, por lo que se ofrece la posibilidad de distinguir bacterias estrechamente relacionadas

¿Dónde se ha desarrollado?

Esta técnica ha sido desarrollada en el laboratorio de investigación del grupo ETEP (Etiología y Terapéutica de Enfermedades Periodontales y Periimplantarias) de la Facultad de Odontología. El laboratorio de investigación está empleando las técnicas de biología molecular como soporte de investigación y como ayuda en el diagnóstico, ofreciendo a los investigadores diferentes opciones, llevadas a cabo por personal altamente cualificado y en equipamiento de alto rendimiento. El laboratorio presta asesoramiento técnico y de análisis en estas muestras, participando también en el desarrollo de los estudios y puesta a punto de nuevas metodologías que se están desarrollando en este campo.

Y además...

Con esta tecnología, se pueden aportar ayudas en investigación y a dentistas en dos sentidos:

- **Añadir** el análisis microbiológico dentro del protocolo y de las variables de investigaciones dentro del campo de las investigaciones odontogénicas.
- **Ayudar** en el diagnóstico y tratamiento de sus pacientes a los clínicos, mediante la obtención de consejo basado en el análisis microbiológico de las muestras.

Responsable de la investigación

Mariano Sanz Alonso, marsan@ucm.es

Departamento: Etiología y Terapéutica de Enfermedades Periodontales y Periimplantarias (ETEP)

Facultad: Odontología