

Estudio de la placa dental en la infección por *Helicobacter pylori*

M. Jané Santamaría, V. Varea Calderón, M.C. Muñoz Almagro¹

Resumen. *Objetivo:* Se procede a conocer el estado de la placa dental frente a *Helicobacter pylori* (HP) en 53 niños, endoscopiados por dolor abdominal crónico y/o hematemesis, de entre 3 y 17 años.

Método: La técnica utilizada fue la PCR. Para ello se utilizaron los primers de Clayton HPU1 y HPU2, que codifican para el gen de la ureasa. Tras la obtención de muestra de placa dental se practica una esofagogastroscoopia; se toman biopsias gástricas y se analizan también por la técnica de PCR. Además se estudiaron los distintos hábitos de higiene dental. Los resultados obtenidos en la cavidad oral se compararon con aquéllos obtenidos a nivel gástrico.

Resultados: No obtuvimos amplificación de parte del genoma en ninguna de las 53 muestras de placa dental, mientras que la PCR gástrica resultó positiva en 35 niños (66%).

Conclusión: Este estudio no confirma la hipótesis que otorga a la placa dental un papel relevante como reservorio de este microorganismo.

An Esp Pediatr 1999;50:244-246.

Palabras Clave: *Helicobacter pylori*; Placa dental; Infancia; PCR; Epidemiología.

STUDY OF THE DENTAL PLAQUE IN INFECTIONS BY *HELICOBACTER PYLORI*

Abstract. *Objective:* The aim of this study was to determine the role of *Helicobacter pylori* infection in dental plaque from 53 children, between 3 and 17 years of age, with recurrent abdominal pain and/or upper gastrointestinal bleeding.

Patients and methods: Dental plaque was analyzed by using polymerase chain reaction (PCR) for a specific internal urease gene (as described by Clayton). Esophago-gastro-duodenoscopy was performed after the dental plaque was obtained and biopsies were taken from the gastric antrum and fundus and analyzed by PCR. An individual interview was performed to know the customs and attitudes about buccal dental hygiene.

Results: None of the children were positive with the PCR test in dental plaque, while 35 children (66%) had a positive gastric PCR result.

Conclusions: This study does not confirm the hypothesis that dental plaque might act as a reservoir for this microorganism.

Key words: *Helicobacter pylori*. Dental plaque. Children. PCR test. Epidemiology.

Servicio de Gastroenterología y ¹Microbiología. Unidad Integrada de Pediatría Hospital Clínic-Hospital Sant Joan de Déu. Esplugues de Llobregat. Barcelona. *Correspondencia:* M. Jané Santamaría. Santíssima Trinitat del Mont, 7. 08017 Barcelona.

Recibido: Febrero 1998

Aceptado: Noviembre 1998

Introducción

La infección por HP es una de las más frecuentes en el mundo. Se conocen múltiples datos sobre su prevalencia en distintas zonas geográficas, pero el modo de transmisión es todavía muy controvertido.

El principal huésped del HP es el hombre. Su adquisición parece ocurrir predominantemente en la infancia⁽¹⁾, adquiriéndose más precozmente en los países del Tercer Mundo.

Lo cierto es que los estudios de seroprevalencia en unidades familiares⁽²⁻⁴⁾ y los realizados en instituciones cerradas tipo orfanatos⁽⁵⁾, lleva a la mayoría de autores a considerar la transmisión persona-persona como la primordial, aunque difieren sobre el tipo de vía utilizada: oro-oral⁽⁶⁾ o fecal-oral⁽⁷⁾.

Tras la aparición de los primeros trabajos publicados en India⁽⁸⁾ en 1990 en que consiguieron cultivar HP de muestras bucales, incluso en individuos asintomáticos, se comenzó a atribuir a la placa dental un papel clave en la epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*, además de hacerla responsable de las no raras recidivas postratamiento.

En los últimos tiempos, estudios de tipaje del ADN extraído de cultivos de biopsias gástricas y de placa dental de un mismo individuo han demostrado que puede tratarse de colonias idénticas en alguna ocasión^(9,10). Otros autores, como Cammarota⁽¹¹⁾ y cols., han demostrado ADN de HP en cavidad oral de individuos sin infección gástrica, aunque el significado último de este hallazgo es desconocido por el momento.

Todos estos hechos, junto al hecho de haber aparecido nuevos estudios en los que se demuestra la transmisión intrafamiliar persona-persona con la identificación de cepas prácticamente iguales entre padres e hijos, nos llevaron a estudiar la placa dental frente al *Helicobacter pylori* en aquellos niños de nuestro medio con sintomatología digestiva que obligara a la práctica de una fibroendoscopia digestiva alta.

Material y métodos

Entre los meses de octubre de 1995 y julio de 1996 se practicaron 53 endoscopias digestivas altas por dolor abdominal recurrente (45) y/o hematemesis⁽⁸⁾ en el Servicio de Gastroenterología del Hospital San Juan de Dios de Barcelona.

De estos 53 pacientes, 23 eran varones y 30 eran mujeres, con edades comprendidas entre 3 y 17 años, con una edad media de 10 años 11 meses. Se excluyeron aquellos pacientes que hubiesen recibido antibióticos, inhibidores de los receptores

Tabla I Población estudiada

	Grupo I 3-7 años	Grupo II 8-12 años	Grupo III 13-17 años
Varones	6	8	9
Mujeres	2	19	9

H₂ o antiácidos 4 semanas antes de la práctica endoscópica.

Para su estudio se dividieron en tres grupos de edad, tal como queda reflejado en la tabla I.

Dentro de la anamnesis personal se hizo especial hincapié en los hábitos higiénicos de la cavidad oral: primeros lavados, frecuencia de los mismos (Tabla II), última visita al dentista y último cepillado.

También se procedió a una valoración de la higiene bucal confeccionando una puntuación en función de: estado gingival (gingivitis, 1 pto.), número de caries (menos de dos caries, 1 pto.; más de dos caries, 2 ptos.) y la cantidad de placa dental (escasa, 1 pto.; moderada, 2 ptos. y abundante, 3 ptos.) (Tabla III).

Antes de la práctica endoscópica se procedió a la obtención de muestras de placa dental con el fin de evitar posibles contaminaciones de la cavidad oral con el fibroendoscopio.

Con una cureta estéril se tomaron muestras de placa dental de al menos tres zonas diferentes, tanto interdetales, como subgingivales, para poder minimizar el hecho de su distribución irregular en la boca. Se escogió la zona subgingival por no estar constantemente barrida por el fluido salival y por ser un medio básicamente anaerobio en contraste con el medio supragingival⁽¹²⁾.

El estudio gástrico se lleva a cabo mediante un endoscopio, modelo pediátrico Olympus GIF-XP. Durante la exploración se tomaron muestras biópsicas de antro.

PCR

Un total de 53 biopsias gástricas y 53 muestras de placa dental fueron introducidas en tubos Eppendoff con suero salino fisiológico y congeladas a -70 °C en el plazo de 30 minutos a dos horas.

El estudio de la placa dental se llevó a cabo por medio de la PCR, ya que la realización de cultivos de saliva o de placa dental presenta serias dificultades técnicas. El estudio molecular tiene la ventaja adicional de poder detectar la presencia de un escaso número de microorganismos, llegando a demostrar una sensibilidad muy superior a la obtenida mediante cultivos a este nivel.

Se utilizó un protocolo de extracción rápida de ADN con una solución de resina chelex 100 al 20%. Los primers escogidos fueron los de Clayton⁽¹³⁾ **HPU1** (5'-GCCAATGGTAAATTAGTT-3') y **HPU2** (5'-CTCCTTAATTGTTTTTAC-3') por ser unos de los más universales y por ser punto de referencia de muchas investigaciones al demostrar su gran rendimiento en muestras obtenidas por biopsias gástricas. Con estos primers se amplifi-

Tabla II Frecuencia cepillado dental

	Frecuencia de lavados				
	> 1/24 H	1/24 H	1/48 H	≥ 1/72 H	Nunca
HP+ N = 35	5	7	13	7	3
HP- N = 18	5	3	5	4	1

Tabla III Valoración cavidad oral

	Valoración cavidad oral					
	1	2	3	4	5	6
HP+ N = 35	10	11	8	4	2	0
HP- N = 18	6	9	2	1	0	0

can 411 pares de bases correspondientes al gen que codifica para la UreA, enzima específica de este microorganismo.

La PCR se llevó a cabo con un termociclador automático Perkin Elmer 9.600. Se programó para 35 ciclos consecutivos.

La detección del producto amplificado y marcado con digoxigenina fue llevado a cabo por el sistema de detección PCR ELISA Dig Detection[®] de Boehringer Mannheim.

La sonda utilizada fue el primer de Clayton **HPUII** 5'-TTGACATTGGCGGTAAC-3'.

El producto final fue leído por el lector de microplacas, Microplate reader 2001 Bio-Whittaker, a 405 nm con un filtro de referencia de 492 nm. Se consideró un resultado positivo absorbancias superiores a 500 OD, una vez efectuada a cada muestra la sustracción de la absorbancia del control negativo. Se consideró un resultado negativo absorbancias iguales o menores de 200 OD.

Para evaluar la reproducibilidad del ensayo por cada 13 muestras analizadas se añadieron un control negativo con 50 µl de SSF, un control positivo con 50 µl de una solución que contenía 3-5 colonias de *Helicobacter pylori* y un control interno compuesto por 25 µl de placa dental extraída con 25 µl de control positivo extraído.

Resultados

En el estómago se obtuvo amplificación positiva en 35 pacientes, con edad media de 11a 5m ± 4a 2m.

A pesar de existir diferencias objetivas en la higiene oral (Tabla III), y a pesar de los distintos hábitos de limpieza (tres pacientes del grupo HP+ no habían cepillado nunca sus dientes, como se pone de manifiesto en la tabla II), no conseguimos detectar ADN de HP en placa dental de ninguno de nuestros 53 pacientes sometidos a estudio fibroendoscópico.

Discusión

El hecho de no haber conseguido resultados positivos en ningún caso podría ser debido a tres motivos principalmente:

1. A un problema en la extracción del ADN de la placa dental o a la existencia de algún material biológico complejo que al unirse al ADN bacteriano lo inactivase.

2. A la escasa sensibilidad de los primers escogidos.

3. A la no existencia de microorganismo en la placa dental en nuestra población estudiada.

La posibilidad de un problema en la extracción del ADN o la posibilidad de que existiese una substancia inhibidora de la Taq polimerasa en las muestras orales fue descartada al conseguir hibridación colorimétrica positiva en todos los controles internos realizados (PCR+ en placa dental de pacientes escogidos al azar, a la que inoculamos de 3 a 5 HP obtenidos de cultivos específicos para este microorganismo).

La hipótesis de la escasa sensibilidad de los primers escogidos fue una posibilidad desestimada, puesto que los mismos primers fueron utilizados para analizar las muestras antrales con buenos resultados a este nivel.

La no existencia de microorganismos a este nivel en nuestra población y con nuestros medios, parece ser la explicación más convincente a los resultados obtenidos.

Este dato estaría apoyado por el hecho de que los dentistas no presenten mayor riesgo de contagio que la población en general⁽¹⁴⁾, y sí en cambio los endoscopistas, tal vez por contaminación directa desde las secreciones gástricas⁽¹⁵⁾.

No creemos que el hecho de haber utilizado placa dental descongelada haya sido un factor determinante en estos resultados⁽¹⁶⁾, las muestras gástricas también fueron congeladas a la misma temperatura y estuvieron almacenadas el mismo tiempo antes de proceder a su análisis.

Cuando uno lleva a cabo una revisión bibliográfica sobre el tema constata que la PCR es una técnica poco estandarizada, por lo que se hace muy difícil comparar los distintos trabajos realizados; las técnicas de extracción del ADN son distintas, así como lo son los primers utilizados para los distintos genes e incluso para el estudio de un mismo gen. El estudio del producto amplificado es analizado también por distintos mecanismos (por electroforesis en gel, en medio líquido, mediante la utilización de sondas marcadas, ...).

Otra dificultad añadida es la poca información existente sobre placa dental y HP en la población infantil. La placa no se formaría hasta el establecimiento de la dentición definitiva, sobre los 10 años, por lo que sería razonable no encontrar resultados positivos en aquellos niños de menor edad. Pero en nuestro grupo quedaron incluidos 18 adolescentes, con unas condiciones orales similares a las del adulto, sin conseguir tampoco detectar ADN de esta bacteria.

Se precisan más estudios e investigaciones sistemáticas para conocer el verdadero rol de la placa dental, si se trata de un nicho para el HP raro o si se trata de un hábitat común.

Si su hallazgo es debido a una extensión secundaria desde

el reservorio gástrico o si se trata de una colonización previa a la gástrica.

Bibliografía

- 1 Cullen DJE, Collins BJ, Christiansen KJ y cols. When is *Helicobacter pylori* infection acquired? *Gut* 1993; **34**:1681-1682.
- 2 Webb PM, Knight T, Greaves S y cols. Relationship between infection with *Helicobacter pylori* and living conditions in childhood: evidence for person to person transmission in early life. *Br Med J* 1994; **308**:750-753.
- 3 Drumm B, Pérez-Pérez G, Blaser MJ, Sherman PM. Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 1990; **322**:359-363.
- 4 De Giacomo C, Lisato L, Negrini R, Licardi G, Maggiore G. Serum immune response to *Helicobacter pylori* in children: epidemiologic and clinical applications. *J Pediatr* 1991; **119**:205-210.
- 5 Berkowicz J, Lee A. Person-to-person transmission of *campylobacter pylori*. *Lancet* 1987; **1**:680-681.
- 6 Lee A, Fox JG, Otto G, Dick EH, Krakowka S. Transmission of *Helicobacter spp.* A challenge to the dogma of faecal-oral spread. *Epidemiol Infect* 1991; **107**:99-109.
- 7 Hazell SL, Mitchell HM, Hedges M, Shi X, Hu PJ, Li YY, Lee A, Reiss-Levy E. Hepatitis A and evidence against the community dissemination of *Helicobacter pylori* via feces. *J Infect Dis* 1994; **170**:686-689.
- 8 Majmudar P, Shah SM, Dhunjibhoy KR, Desai HG. Isolation of *Helicobacter pylori* from dental plaque in healthy volunteers. *Indian J Gastroenterol* 1990; **9**:271-272.
- 9 Shames B, Krajden S, Fuksa M, Babida C, Penner L. Evidence for the occurrence of the same strain of *Campylobacter pylori* in the stomach and dental plaque. *J Clin Microbiol* 1989; **27**:2849-2850.
- 10 Khandaker K, Palmer KR, Eastwood MA, Scott AC, Desai M, Owen RJ. DNA fingerprints of *Helicobacter pylori* from mouth and antrum of patients with chronic ulcer dyspepsia. *Lancet* 1993; **342**:751.
- 11 Cammarota G, Tursi A, Montalto M, Papa A, Veneto G, Bernardi S, Boari A, Colizzi V, Fedeli C, Gasbarrini. Role of dental plaque in the transmission of *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Gastroenterol* 1996; **22**:174-177.
- 12 Mouton C, Robert JC. Bacteriología bucodental. De Masson 1995.
- 13 Clayton CL, Klcanthous H, Coates PJ, Morgan DD, Tabaqchali S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; **30**:192-200.
- 14 Luzza F, Maletta M, Imeneo M, Fabiano F, Doldo P, Biancome L, Pallone F. Evidence against an increased risk of *Helicobacter pylori* infection in dentists: a serological and salivary study. *Eur J Gastroenter Hepatol* 1995; **7**:773-776.
- 15 Chong J, Marshall BJ, Barkin JS, McCallum RW, Reiner DK, Hoffman SR, O'Phelan C. Occupational exposure to *Helicobacter pylori* for the endoscopy professional: a sera epidemiological study. *Am J Gastroenterol* 1994; **89**:1987-1992.
- 16 Wahlford J, Meurman JH, Toskala J y cols. Development of a rapid PCR method for identification of *Helicobacter pylori* in dental plaque and gastric biopsy specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; **14**:780-786.