

Identificación y caracterización microbiológica, fenotípica y genotípica del *Streptococcus mutans*: experiencias de investigación

Microbiological, Phenotypic, and Genotypic Characterization of Streptococcus mutans: Research Experiences

Fredy Omar Gamboa Jaimes

Bacteriólogo, Universidad Metropolitana de Barranquilla, Colombia. Magíster en Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Magíster en Biotecnología, PhD en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Barcelona, España. Profesor titular, Departamento de Microbiología (Facultad de Ciencias) y Centro de Investigaciones Odontológicas (Facultad de Odontología), Pontificia Universidad Javeriana.

Este artículo se ubica dentro de la categoría de "reflexiones sobre resultados de investigación" basado en experiencias de investigación propias que estuvieron enmarcadas en proyectos financiados por 1) la Vicerrectoría Académica de la Pontificia Universidad Javeriana, título Biotipificación y detección de bacteriocinas en cepas *S. mutans*, registro #1091; 2) el Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana, título Genotipificación por AP-PCR de *Streptococcus mutans* aislados de pacientes con y sin caries dental", registro 3648, y 3) el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias), Programa Nacional de Ciencia y Tecnología de la Salud, título Identificación de cepas *S. mutans* con efectos antagónicos sobre *S. mutans*, registro 30650. Los tres proyectos fueron aprobados por el Comité de Ética e Investigación de la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana.

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

Gamboa F. Identificación y caracterización microbiológica, fenotípica y genotípica del *Streptococcus mutans*: experiencias de investigación. Univ Odontol. 2014 Jul-Dic; 33(71): 65-73. <http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.uo33-71.icmf>

doi:10.11144/Javeriana.uo33-71.icmf

Recibido para publicación: 01/06/2014
Aceptado para publicación: 20/12/2014

Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/universitasodontologica>

RESUMEN

Antecedentes: la caries dental es un proceso patológico infeccioso, multifactorial, localizado y transmisible que destruye los tejidos duros dentales. En términos ecológicos, esta enfermedad es consecuencia de un desequilibrio en el ecosistema oral que lleva al predominio de una flora antes considerada normal en cavidad oral y ahora convertida en patógena. Los principales microorganismos asociados con la producción de caries son, en orden de frecuencia: 1) *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) (principalmente el serotipo c) y en menor proporción *S. sobrinus* y *S. gordonii*; y 2) especies de *Lactobacillus* y *Actinomyces*. En general, en la comunidad científica hay consenso en señalar al *S. mutans* como el microorganismo más importante en caries dental. Por lo tanto, las estrategias de aislamiento, identificación, tipificación, prevención y control se dirigen principalmente hacia este. **Método:** este artículo, con base en experiencias de investigación propias y contrastadas con las de otros grupos de investigación, describe la microbiología y las estrategias de aislamiento, recuento e identificación del *S. mutans* a partir de muestras de placa dental y saliva. También se discuten aspectos de fenotipificación, genotipificación, detección fenotípica de bacteriocinas y de la susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *S. mutans*. **Conclusión:** el correcto conocimiento de las características fenotípicas y genotípicas del *S. mutans* debe conducir a diseñar mejores estrategias de prevención y control.

PALABRAS CLAVE

Bacteriocinas; caries dental; fenotipificación; genotipificación; identificación; *Streptococcus mutans*; susceptibilidad antimicrobiana

ÁREA TEMÁTICA

Microbiología oral

ABSTRACT

Background: Dental caries is a localized, transmissible, infectious, and pathological process that leads to the destruction of the dental hard tissue. In ecological terms, this disease is caused by an imbalance in the oral ecosystem leading to the dominance of a flora, previously considered normal in the mouth and now treated as pathogenic. The main microorganisms associated with cariogenesis are, in order of frequency: (1) *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) (mainly serotype c) and to a lesser extent *S. sobrinus* and *S. gordonii*; and (2) species of *Lactobacillus* and *Actinomyces*. Overall, the scientific community's consensus identifies *S. mutans* as the most important microorganism in dental caries. Therefore, isolation, identification, characterization, prevention and control strategies are directed primarily against *S. mutans*. **Method:** Based on our own research experience and contrasting it with that of other research groups this article describes the microbiology, isolation strategies, counting, and identification of *S. mutans* from dental plaque and saliva samples. It also depicts aspects of phenotyping, genotyping, phenotypic detection of bacteriocins and antimicrobial susceptibility of *S. mutans* strains. **Conclusion:** The correct understanding of the phenotypic and genotypic characteristics of *S. mutans* should lead to designing better prevention and control strategies.

KEY WORDS

Antimicrobial susceptibility; bacteriocins; dental caries; identification; genotyping; phenotyping; *Streptococcus mutans*

THEMATIC FIELD

Oral microbiology

INTRODUCCIÓN

La microbiota oral se caracteriza por ser extraordinariamente compleja en géneros y especies. La mayoría de investigadores coinciden en señalar que existen más de 600 especies bacterianas en el ambiente oral. La interrelación de la microbiota oral entre sí, expuesta a la acción de factores físicos y químicos del ambiente oral, define las características y composición de los microorganismos orales (1,2).

La ecología no solo estudia las interrelaciones entre los organismos y su ambiente, sino el papel y contribuciones de estos en la naturaleza y en los ciclos biológicos y ecológicos que mantienen en equilibrio los eventos que ocurren en un ambiente determinado (1,2). Para definir los procesos involucrados en las enfermedades infecciosas orales, es necesario entender la ecología de la cavidad oral e identificar los factores responsables del paso de una relación comensal a una patógena en el huésped. La colonización y consolidación de la comunidad de microorganismos orales lleva consigo una sucesión de poblaciones, proceso que comienza con la conquista del hábitat por grupos de microorganismos pioneros y que continúa hacia la diversidad y complejidad de la comunidad microbiana (1).

Uno de los aspectos más difíciles de estudiar han sido los factores que inciden en la alteración del balance en el ecosistema oral. La mayor parte de la flora oral tiene la característica de ser transitoria. Por sí solas y en estado de equilibrio, la mayoría de las bacterias de la cavidad oral son inofensivas. Sin embargo, cuando se reúnen condiciones especiales del ambiente oral, de los mecanismos de virulencia del microorganismo y de la respuesta del hospedero, las bacterias se convierten en actores principales que exhiben un amplio potencial virulento conducente a enfermedad (1).

Ecológicamente, la caries dental es producto de un desequilibrio en el ecosistema oral que lleva al predominio de una flora antes considerada normal en la cavidad oral y ahora convertida en patógena (1,2). Como es conocido, la caries dental es un proceso patológico infeccioso, multifactorial, localizado, posteruptivo y transmisible que destruye los tejidos duros dentales (3). Los principales microorganismos asociados a la producción de caries son, en orden de frecuencia: a) *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) (principalmente el serotipo c) y en menor proporción *Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*) y *Streptococcus gordonii*; y b) especies de *Lactobacillus* y *Actinomyces* (1,2,4).

Con base en experiencias de investigación propias y contrastadas con las de otros grupos de investigación, este artículo describe la microbiología, las estrategias de aislamiento, el recuento y la identificación de *S. mutans* a partir de muestras de placa dental y saliva. También se discuten aspectos de fenotipificación, genotipificación, detección fenotípica de bacteriocinas y de la susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *S. mutans*. El correcto conocimiento de las características fenotípicas y genotípicas del *S. mutans* debe conducir a diseñar mejores estrategias de prevención y control.

ACTIVIDADES EN MICROBIOLOGÍA ORAL

Gracias a las técnicas de biología molecular, los conocimientos sobre microbiología oral se han multiplicado de forma exponencial. En la actualidad se considera que la cavidad oral del ser humano es el nicho ecológico con mayor biodiversidad conocido hasta la fecha. Este es un momento de gran importancia en la ecología microbiana oral, debido a las grandes posibilidades que existen de entrar a un enorme fondo de biodiversidad que está en proceso de conocimiento y caracterización (5). Aunque el balance químico y ecológico depende en gran medida de los microorganismos, poco se sabe del modo y la dinámica de los ecosistemas microbianos responsables de mantenerlo (1). Una razón crítica de por qué la información en esta materia es tan limitada es que hasta hace muy poco el cultivo era la única herramienta que se tenía para describir los microorganismos (5).

Tradicionalmente, los microorganismos se han caracterizado por su fenotipo, esto es, la colección de propiedades celulares observables: morfología, fisiología y estructura de los componentes celulares. El cultivo, al permitir el crecimiento de los microorganismos en forma abundante, es un requisito para evaluar tales propiedades, situación que limita la caracterización de los microorganismos no cultivables (1,2). Está claramente descrito que el 68 % de los grupos bacterianos que conforma la microbiota oral no son cultivables (5). En la actualidad, las técnicas de ADN y su estudio molecular permiten sobrepasar las limitaciones del cultivo y conocer los microorganismos que no se han descrito (5). Métodos moleculares de identificación bacteriana mucho más avanzados, como el análisis de secuenciación de genes ARNr16S, han revelado que la participación de otras bacterias en el desarrollo de caries dental es mucho más compleja de lo que se creía (6,7). Entre estas bacterias se destaca

el *Actinomyces* B19SC, que está presente en concentraciones muy altas en niños con caries dental (6). También es importante nombrar algunas especies bacterianas compatibles con estados de salud como *Streptococcus parasanguinis*, *Abiotrophia defectiva*, *Gemella haemolysans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus cristatus* y *Streptococcus sanguinis* (6).

En consecuencia, los microorganismos inmersos en nichos naturales (placa dental, saliva, mucosas y otros) se pueden estudiar por secuenciación de genes del ARNr bacteriano directamente de su medio ambiente ordinario (5). El estudio y análisis de comunidades microbianas por estos métodos permite: a) inferir propiedades de los organismos no cultivables; b) diseñar y construir modelos de medios de cultivo para su aislamiento; c) sintetizar sondas de ADN para la detección e identificación de microorganismos crecidos en cultivos mixtos, monitorear la distribución en la naturaleza y evaluar tasas relativas de crecimiento *in situ*; d) identificar fuentes o nichos de otros géneros bacterianos, y e) estudiar la biodiversidad de forma rápida y completa.

El cumplimiento de las tareas en microbiología oral exige la realización de tres actividades: la primera de ellas es el aislamiento e identificación de microorganismos, que se inicia con el cultivo de muestras procedentes de la cavidad oral en medios específicos y en condiciones definidas. A este le siguen el examen microscópico y pruebas bioquímicas del microorganismo aislado. La segunda actividad comprende el conocimiento de la susceptibilidad a agentes antimicrobianos, la fenotipificación y la serotipificación. La tercera actividad involucra la asociación epidemiológica molecular o comparación de los aislamientos por genotipificación, con el fin de hacer el control de la infección o análisis de población (1,2). En los últimos veinte años, esta actividad se ha visto enriquecida con las técnicas de tipificación molecular basadas en el análisis de ADN que permiten identificar clones o grupos de clones (cepas que tienen un alto grado de relación genética) presentes en bacterias de la misma especie y aisladas de diferentes fuentes y en múltiples circunstancias (1,2).

Caracterización microbiológica del *S. mutans*

En general, en la comunidad científica hay consenso en señalar al *S. mutans* como el microorganismo más importante en la caries dental. Por lo tanto, las estrategias de aislamiento, identificación, tipificación, prevención y control están dirigidas hacia este. El *S.*

mutans es un coco grampositivo que fue aislado e identificado por Clarke, en 1924, a partir de lesiones cariosas en humanos. Lo denominó *S. mutans* por las formas mutantes en que se presenta: cocobacilo (forma ovalada) en un medio ácido y coco (forma redonda) en un medio alcalino (8). En cultivos de agar sangre, las colonias de este microorganismo se diferencian fácilmente: altas, convexas, pulvinadas (en forma de cojín) y mucoides, de 0,5 a 1 mm de diámetro, y opacas con un aspecto que recuerda al vidrio esmerilado (8).

Esta bacteria es anaeróbica facultativa, es decir, que puede utilizar el oxígeno para su crecimiento; pero si este no está presente también puede sobrevivir. Sin embargo, su crecimiento óptimo ocurre en anaerobiosis (H₂:CO₂:N₂, 10:10:80, durante 48-72 h a 37 °C). De forma concomitante con la síntesis de dextrano a partir de la sacarosa, las colonias de este microorganismo emiten un exudado acuoso en la superficie del medio de cultivo, a menudo lo suficientemente abundante como para que forme un charco en torno a la colonia (8). En medios de cultivo con sacarosa este microorganismo está en capacidad de producir polisacáridos extracelulares y adquirir una apariencia opaca, rugosa y blanca, no adherente al medio de cultivo y ocasionalmente rodeada por polímeros de glucano de aspecto húmedo. Estos estreptococos no hidrolizan el almidón y fermentan la inulina, la rafinosa, el manitol y el sorbitol (8). El *S. mutans* produce polisacáridos extracelulares a partir de la sacarosa por la acción de dos enzimas: la glucosiltransferasa (GTF) y la fructosiltransferasa (FTF). La GTF sintetiza glucano a partir de la glucosa, y la FTF, fructano a partir de la fructosa. El medio más común para el aislamiento de *S. mutans* es el agar mitis salivarius suplementado con bacitracina 0,2 U/ml y sacarosa al 20 %, que permite la selección de otros estreptococos (8).

El *S. mutans* se encuentra de forma permanente en la cavidad oral después de la erupción dental, debido a que requiere la presencia de tejido duro no descatativo para colonizar (8). La principal fuente para la adquisición y transmisión del *S. mutans* en los niños es la saliva de sus madres. La evidencia al respecto proviene de diferentes estudios que han mostrado un patrón idéntico de ADN cromosomal en las bacterias de los niños y sus madres. La colonización de esta bacteria ocurre a los 26 meses de edad, periodo que ha sido denominado *ventana de infectividad* (9,10).

Por todo lo anterior, es importante recordar que el *S. mutans* es un microorganismo que forma parte de la

floral oral microbiana, por lo que se puede encontrar tanto en pacientes sin caries como en pacientes con caries (8-12). Actualmente, los estudios no solo se dirigen hacia la búsqueda del *S. mutans* en la saliva y la placa dental, sino también hacia la cuantificación de este microorganismo (8-12). Diferentes estudios han mostrado una correlación entre los recuentos de este microorganismo en la cavidad oral con la prevalencia e incidencia de la caries (8-12). No obstante, en otros estudios no se ha hallado correlación entre la cantidad de *S. mutans* y la incidencia de caries (8-10). Actualmente, el hallazgo de un recuento alto de *S. mutans* es un factor de riesgo para tener en cuenta en la prevención y control de la caries dental.

Aislamiento, recuento e identificación del *S. mutans* a partir de muestras de placa dental y saliva

Con el fin de iniciar el aislamiento de *S. mutans*, las muestras de placa dentobacteriana y saliva espontánea o estimulada se diluyen en forma seriada de 10 en 10 en tubos que contienen tampón fosfato salino 0,05 M. Después de mezclar las muestras con el tampón fosfato salino 0,05 M en vórtice durante 30 s, se toman 100 µl de cada dilución y se siembran en agar mitis salivarius bacitracina (MSB), con el fin de hacer el aislamiento selectivo y el recuento de *S. mutans*. El agar MSB (Difco Laboratories, Detroit, MI) contiene caseína pancreática digerida, peptona proteosa n.º 3, peptona proteosa, dextrosa, sacarosa al 20 %, fosfato dipotásico, azul tripán, cristal azul, agar, telurito de Chapman y bacitracina 0,2 U/ml. Las cajas de Petri con agar MSB se incuban en anaerobiosis (H₂:CO₂:N₂ 10:10:80) durante 2 días a 37 °C. Después del crecimiento se hace el recuento de colonias con morfología característica de *S. mutans*, y se hace el cálculo respectivo con el factor de dilución de la caja donde crecen. El recuento final se expresa en unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro de saliva o gramo de placa dental (13).

Después del recuento bacteriano, se examinan de 5 a 20 colonias en promedio con características de *S. mutans* con la tinción de Gram y se someten a las siguientes pruebas bioquímicas: fermentación de rafinosa, manitol, melobiosa, trehalosa e inulina; hidrólisis de la esculina en presencia y ausencia de bilis; ureasa; hidrólisis de la arginina, y resistencia a la bacitracina. El *S. mutans* posee el siguiente perfil bioquímico: fermentación positiva de rafinosa, manitol, melobiosa, trehalosa e inulina; hidrólisis negativa de la esculina en la presencia de bilis e hidrólisis positiva de la esculina en ausencia de bilis; ureasa negativa;

hidrólisis negativa de la arginina, y resistencia a 2 U de bacitracina (13,14).

Fenotipificación del *S. mutans*

Después del crecimiento, las colonias identificadas como *S. mutans* se someten a tipificación. La tipificación de cepas de *S. mutans* permite establecer la clonalidad, así como los patrones de colonización y de transmisión de este microorganismo. Actualmente se está realizando la fenotipificación (biotipificación) de *S. mutans* de acuerdo con su perfil enzimático, utilizando el sistema comercial api-ZYM (bioMérieux, Marcy-l'étoile, Francia) (14, 15). Este sistema de tipificación ha permitido establecer diferencias en las cepas de *S. mutans* en el mismo individuo y entre individuos (16). El sistema api-ZYM es un micrométodo semicuantitativo de investigación que permite detectar rápida y simultáneamente 19 actividades enzimáticas a partir de pequeñas cantidades de inóculo de la bacteria (16). El sistema consta de una tira con 20 micropocillos (1 control y 19 pruebas), cuya base contiene los sustratos enzimáticos y el amortiguador. La base permite el contacto entre la enzima del microorganismo y el sustrato generalmente insoluble. Los sustratos del 2 al 20 corresponden respectivamente a 2-naftil fosfato, 2-naftil butirato, 2-naftil caprilato, 2-naftil miristato, L-leucil-2-naftilamida, L-valil-2-naftilamida, L-cistol-2-naftilamida, N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida, N-glutaril-fenilalanina-2-naftilamida, 2-naftil fosfato, Naftol-AS-BI-fosfato, 6-Br-2 naftil-alfa D-galactopiranosido, 2-naftil-beta D-galactopiranosido, Naftol-AS-BI-beta D-glucoronido, 2-naftil-alfa D-glucopiranosido, 6-Br-2 naftil-beta D-glucopiranosido, 1-naftil-N-acetil-BD-glucosaminida, 6-Br-2-naftil-alfa D-manopyranosido y 2-naftil-alfa L-fucopiranosido (16).

En la parte práctica, los sustratos se inoculan con una suspensión densa de bacterias (turbidez 5-6 de McFarland) que rehidrata y ejerce una acción enzimática en los sustratos contenidos. Los productos finales generados durante un periodo de incubación de 4 h, son detectados mediante reacciones coloreadas producidas después de la adición de reactivos. La fenotipificación se realiza por duplicado y los fenotipos se asignan de acuerdo con la acción ejercida por las cepas de *S. mutans* sobre los 19 sustratos del sistema (16). La primera evaluación del sistema api-ZYM en la utilización como sistema de fenotipificación fue realizada en 1999 por De la Higuera y colaboradores (14). En este estudio se identificaron 8 fenotipos en 160 aislamientos clínicos de *S. mutans* solo sobre la base de la acción de 3 enzimas de los microorganismos.

Posteriormente, el sistema fue utilizado para evaluar la acción enzimática sobre los 19 sustratos (15-18). El estudio de Lamby y colaboradores (15) en niños de 3 a 6 años de edad con caries dental incipiente identificó 17 fenotipos, donde el fenotipo más frecuente fue el 15, con 10 cepas de *S. mutans*. Es importante resaltar que el mayor número de reacciones enzimáticas positivas con los sustratos se producen en un pH ácido (pH = 5,4), situación que puede estar relacionada con algunas de las características específicas del *S. mutans*, su capacidad de producir constantemente ácidos en un pH bajo o ácido (aciduricidad) y su propiedad de tolerar y sobrevivir en medios ácidos (acidofilia) (8). En el estudio de Gamboa y colaboradores (17), las cepas *S. mutans* se agruparon en 10 fenotipos, de los cuales los más frecuentes fueron el 10 y el 15, con 9 y 8 cepas, respectivamente. Además, se logró establecer con claridad y rapidez las diferencias entre individuos y en el mismo individuo. En otro estudio de Gamboa y colaboradores (18), 119 cepas de *S. mutans* se agruparon en 85 fenotipos: 33 en las cepas aisladas de niños sin caries y 52 en las cepas aisladas de niños con caries. Los 2 tipos de pacientes presentaron en común 4 fenotipos (5, 6, 9 y 12). Los fenotipos más frecuentes en niños sin caries fueron, de mayor a menor, 6, 9, 5 y 3, y en pacientes con caries los más frecuentes fueron 37, 39, 6 y 9. En este estudio se resalta un gran número de fenotipos representados por una sola cepa (18).

Genotipificación del *S. mutans*

Uno de los objetivos de la tipificación molecular es identificar clones específicos virulentos dentro de especies bacterianas y estudiar los clones implicados en un evento epidemiológico. Varios métodos moleculares han permitido el estudio de estreptococos orales (19,20), de los cuales el análisis por enzimas de restricción, ribotipificación y la tipificación con *arbitrarily primed PCR* (AP-PCR) han revelado una considerable heterogeneidad genética entre cepas de *S. mutans* (21,22). Durante los últimos años, la AP-PCR se ha aplicado ampliamente en la caracterización genotípica de diferentes especies bacterianas, entre las que se incluyen patógenos orales (23,24). En los años recientes se ha empezado a consensuar sobre la utilización de la técnica AP-PCR para mostrar diferentes perfiles de ADN en aislamientos clínicos de *S. mutans* (25-29). Con la AP-PCR, segmentos de ADN al azar del organismo objeto de estudio se amplifican con imprimadores simples de secuencia arbitraria. La mayor ventaja que ofrece la AP-PCR para su desarrollo es que no es necesario conocer con anterioridad la secuencia de ADN de la especie bacteriana que se va a amplificar.

Está muy bien establecido que existen diferentes genotipos de *S. mutans* en niños con caries dental y que la genotipificación con AP-PCR es útil para demostrar la diversidad de genotipos (25-29). En el estudio de Gamboa y colaboradores (30) se muestra una gran diversidad en los genotipos de *S. mutans* con AP-PCR. Encontraron 22 genotipos en el grupo de pacientes con caries dental y únicamente 9 en el grupo libre de caries. Con los 27 genotipos presentes se determinaron con claridad diferencias entre individuos y en el mismo individuo. En el estudio de Napimoga y colaboradores (29) también se encuentra un mayor número de genotipos en pacientes con caries en relación con los presentados en pacientes sin caries. Se estableció la relación entre diversidad clonal y algunos factores de virulencia del *S. mutans* aislados de 8 pacientes con caries dental y de 8 pacientes libres de caries. Encontraron 44 genotipos diferentes con un número máximo de 8 genotipos en un individuo. También hallaron un gran número de genotipos de *S. mutans* con gran capacidad para sintetizar glucanos insolubles (29). Redmo Emanuelsson y colaboradores (31) analizaron la distribución y persistencia de *S. mutans* en diferentes sitios de los dientes en la cavidad oral y encontraron 7 siete genotipos en un mismo individuo. Perialisi y colaboradores (32) evaluaron la diversidad genotípica de *S. mutans* en preescolares con caries dental y sin esta en Brasil y encontraron 62 genotipos en los 28 niños que participaron en el estudio.

Todos estos resultados ilustran claramente la complejidad y la heterogeneidad de la colonización del *S. mutans* y su persistencia en la cavidad oral de individuos con caries dental. En la AP-PCR, con el fin de incrementar el poder discriminatorio de la técnica, se han utilizado diferentes imprimadores (28,29,32,33). Existen dos estrategias para usar los imprimadores: una en la cual se utilizan los imprimadores OPA 02 y OPA 03 (28,29,32-34) y otra en la cual se utiliza el imprimador OPA 05 (28,35-37). Con el fin de determinar el potencial discriminatorio de los imprimadores, Tabchoury y colaboradores (28) evaluaron la diversidad genotípica en *S. mutans* utilizando los imprimadores OPA 02, OPA 03, OPA 05 y OPA 13. La variabilidad genotípica y la heterogeneidad encontrada dejan claro que cualquiera de los cuatro imprimadores es útil para tipificar *S. mutans*.

En el estudio de Gamboa y colaboradores (30), con la utilización del primer OPA 05, se obtuvieron 27 perfiles de los 69 aislamientos de *S. mutans*. Estos últimos resultados concuerdan estrechamente con los de Sarella y colaboradores (35), que utilizaron el primer

OPA 05 sobre 81 cepas de *S. mutans* con la obtención de 33 genotipos. De esta manera, la variabilidad genotípica en la población depende del anidamiento al azar de los imprimadores simples sobre el ADN de la bacteria estudiada. Con relación a la reproducibilidad, al evaluar por duplicado, Truong y colaboradores (38) y Gamboa y colaboradores (30) informan que los resultados fueron consistentes. Truong y colaboradores (38) concluyen que, debido a que la AP-PCR es rápida y reproducible, es de gran valor para distinguir especies de *S. mutans*, *S. sobrinus* y otras cepas de estreptococos orales.

DetECCIÓN fenotípica de bacteriocinas en cepas de *S. mutans*

El establecimiento y posterior multiplicación del *S. mutans* en la cavidad oral está influenciado por varios factores (39), entre ellos la capacidad metabólica de este microorganismo para sintetizar glucanos, a partir de la sacarosa y producir bacteriocinas, que tiene gran importancia en el proceso de iniciación y desarrollo de la caries dental (39), y las bacteriocinas, que son péptidos o proteínas antibióticas con fuerte propiedad bactericida producidas por una amplia variedad de especies bacterianas. Hamada y Ooshima (40) demostraron que muchas cepas de *S. mutans* son productoras de bacteriocinas que poseen un amplio rango de actividad contra microorganismos grampositivos y especies estrechamente relacionadas (33,40,41).

La supervivencia y proliferación de un microorganismo se puede dar si este logra eliminar o desplazar a un organismo competente en su nicho ecológico, donde la competencia es muy fuerte debido a la diversidad de especies (42). Se ha sugerido que la función de las bacteriocinas es permitir el establecimiento y la permanencia de la cepa que la produce en el nicho que coloniza. La mayoría de las cepas de *S. mutans* produce bacteriocinas que se denominan específicamente mutacinas y que son las que ejercen acción antagónica o inhibitoria sobre otros microorganismos del medio oral (42-45). Durante muchos años se ha continuado con la búsqueda de cepas de *S. mutans* con capacidad antagónica y su aplicación en terapia de remplazo o control bacteriológico para desplazar cepas nativas virulentas de *S. mutans* (42).

Diferentes investigaciones señalan que la capacidad antagónica del *S. mutans* se debe a la producción de bacteriocinas por parte de este, que podría conferir una gran habilidad para desplazar cepas nativas de la

misma especie en la cavidad oral (13,15). En el estudio de Gamboa y colaboradores (17) se informa de la presencia de 8 cepas de *S. mutans* productoras de mutacinas con actividad completa (100 %) sobre todas las cepas de *S. mutans* utilizadas como indicadores. En el trabajo de Balakrishnan y colaboradores (43) se informa del hallazgo de 39 cepas de los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Staphylococcus*, productoras de bacteriocinas, que representan un 14,3 % de las 272 cepas evaluadas. En otro estudio (33) sobre 319 cepas de *S. mutans* aisladas de 8 pacientes con caries y de 8 pacientes sin caries se reporta el hallazgo de 254 (79,62 %) cepas de *S. mutans* productoras de bacteriocinas que tienen diversidad de acción sobre las 12 cepas de *S. mutans* utilizadas como indicadores. La diversidad en la producción de bacteriocinas por las cepas *S. mutans* evaluadas en los diferentes estudios probablemente se deba a las diferentes condiciones en que se hacen las pruebas y a la susceptibilidad propia de las cepas indicadoras utilizadas. En cuanto a las cepas utilizadas como indicadoras, en el trabajo de Gamboa y colaboradores (16) para la búsqueda de bacteriocinas en cepas *S. mutans* se utilizaron 12 cepas indicadoras, 6 de las cuales fueron los biotipos más representativos de aislamientos clínicos colombianos y 6 cepas de referencia, con el fin de tener una idea cercana del espectro de las bacteriocinas.

La determinación de la producción de bacteriocinas en las cepas de *S. mutans* se realiza con el ensayo de doble capa en agar BHI (infusión cerebro corazón), en el que se siembran las cepas que actúan como productoras y las cepas que actúan como indicadoras (16). Existen otros agares (agar tripticasa de soya y agar Mueller Hinton) con los que también se puede montar esta técnica. A continuación se describe con detalle el procedimiento para detectar mutacinas (16).

Preparación de las cepas productoras

Las cepas productoras son aquellas que van a tener una acción inhibitoria sobre las cepas indicadoras. Con este fin, dos a tres colonias de cada cepa de *S. mutans* crecidas en el agar BHI se resuspenden en caldo BHI y se llevan a incubación a 37 °C en anaerobiosis (H₂:CO₂:N₂ 10:10:80) durante 48 h. A partir de esta suspensión se hacen siembras con micropipeta (2 µl) sobre el agar BHI (agar al 1,5 % y extracto de levadura al 2 %) y se llevan a incubación a 37 °C en anaerobiosis (H₂:CO₂:N₂ 10:10:80) durante 48 h. Después de ese tiempo de incubación se colocan las cepas indicadoras sobre las cepas productoras (16).

Preparación de las cepas indicadoras

Las cepas indicadoras son aquellas que van a sufrir la acción de las cepas productoras y se eligen de acuerdo con la frecuencia de los biotipos, serotipos o genotipos presentes en la población de estudio. Con este fin, dos a tres colonias de cada cepa de *S. mutans* crecidas en el agar BHI se resuspenden en caldo BHI y se mantienen en incubación a 37 °C en anaerobiosis (H₂:CO₂:N₂ 10:10:80) durante 48 h. Posteriormente, se toman 0,5 ml de esta suspensión, se mezclan con 5 ml de agar BHI (agar al 0,75 % y extracto de levadura al 2 %) y se agrega inmediatamente sobre el agar BHI (agar al 1,5 % y extracto de levadura al 2 %) en el que se encuentran crecidas las cepas productoras preparadas en el paso anterior. Estas cajas de Petri con agar BHI en doble capa, en las que están sembradas tanto las cepas productoras como las indicadoras, se llevan a incubación a 37 °C en anaerobiosis (H₂:CO₂:N₂ 10:10:80) durante 48 h. Al cabo de estas últimas horas, la presencia y acción de las bacteriocinas se refleja en la presencia de un halo de inhibición realizado por la cepa productora sobre la cepa indicadora. Para establecer el efecto inhibitorio se tienen en cuenta los halos de inhibición mayores de 4 mm (16).

Susceptibilidad antimicrobiana en el *S. mutans*

Además de caries dental e infecciones piogénicas relacionadas, el *S. mutans* es un agente infeccioso muy importante en endocarditis (46). La participación de este microorganismo en infecciones orales y no orales ha generado interés por conocer su susceptibilidad a agentes antimicrobianos. Uno de los procedimientos más adecuados para ello es determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) (47). Los agentes antimicrobianos más utilizados son penicilina, amoxicilina, cefazolina, eritromicina, clindamicina, imipenem y vancomicina. La CMI se hace utilizando el método de dilución en agar. A continuación se describe brevemente el protocolo: a) la CMI se hace con los antimicrobianos ya mencionados, en concentraciones entre 0,003 y 32 µg/ml (13,47); b) con un replicador, sobre el agar Wilkins-Chalgren se aplican suspensiones estandarizadas de 10.000 UFC/ml de la bacteria que se va a evaluar, y c) después de 48 h de incubación a 35 °C en atmósfera anaeróbica (H₂:CO₂:N₂ 10:10:80), se determina la CMI de acuerdo con la concentración más baja del agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de la bacteria evaluada (13,47). En el estudio de Gamboa y colaboradores (16) se informa acerca de la alta sensibilidad de cepas de *S. mutans* a penicilina, amoxicilina, cefazolina, eritromicina, clindamicina, imipenem y vancomicina. El 50 y el 90 %

de las cepas de *S. mutans* fueron inhibidas por todos los antibióticos en concentraciones inferiores a 0,12 y 0,5 µg/ml, respectivamente. El valor promedio más bajo fue el de la penicilina. Las CMI de todas las cepas fueron muy similares a las observadas por otros autores (14,47).

CONCLUSIONES

En el presente artículo se han presentado y discutido aspectos fundamentales sobre la caracterización microbiológica, fenotípica y genotípica del *S. mutans*. Estos aspectos son necesarios en el conocimiento de este microorganismo y deben llevar al diseño de mejores estrategias de prevención y control de la caries dental.

REFERENCIAS

1. Liébana J. Microbiología oral. 2ª ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2002.
2. Mouton C. Bacteriología bucodental [versión española de la obra original en lengua francesa]. Barcelona: Masson; 1995.
3. Rodríguez A, González OA. Fisiopatología de la caries dental. Univ Odontol. 2000 may; 20(supl. 1): 21-7.
4. Crossner CG, Claesson R, Johansson T. Presence of mutans streptococci and various types of lactobacilli in interdental spaces related to development of proximal carious lesions. Scand J Dent Res. 1989 Aug; 97(4): 307-15.
5. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, Lakshmanan A, Wade WG. The human oral microbiome. J Bacteriol. 2010 Oct; 192(19): 5002-17.
6. Corby PM, Lyons-Weiler J, Bretz WA, Hart TC, Aas JA, Boumenna T, Goss J, Corby AL, Junior HM, Weyant RJ, Paster BJ. Microbial risk indicators of early childhood caries. J Clin Microbiol. 2005 Nov; 43(11): 5753-9.
7. Munson MA, Banerjee A, Watson TF, Wade WG. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. J Clin Microbiol. 2004 Jul; 42(7): 3023-9.
8. Loesche W. Role of Streptococcus mutans in human dental decay. Microbiol Rev. 1986 Dec; 50(4): 353-80.
9. Lang N, Hotz PR, Gusberti FA, Joss A. Longitudinal clinical and microbiological study on the relationship between infection with Streptococcus mutans and the development of caries in human. Oral Microbiol Immunol. 1987 Mar; 2(1): 39-47.
10. Beighton D, Manji F, Baelum V, Fejerskov O, Johnson NW, Wilton JM. Associations between salivary levels of Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus, lactobacilli, and caries experience in Kenyan adolescents. J Dent Res. 1989 Aug; 68(8): 1242-6.

11. Macpherson L, MacFarlane T, Geddes D, Stephen K. Assessment of the cariogenic potential of *Streptococcus mutans* strains and its relationship in vivo caries experience. *Oral Microbiol Immunol.* 1992 Jun; 7(3): 142-7.
12. Marsh P, Featherstone A, Mckee A, Hallsworth A, Robinson C, Weatherell J, Newman H, Pitter A. A microbiological study of early caries of approximal surfaces in schoolchildren. *J Dent Res.* 1989 Jul; 68(7): 1151-4.
13. Gamboa F, Estupiñán M, Galindo A. Presence of *Streptococcus mutans* in saliva and its relationship with dental caries: antimicrobial susceptibility of the isolates. *Univ Sci.* 2004; 9: 23-7.
14. De La Higuera A, Gutiérrez J, Liébana J, García-Mendoza A, Castillo A. A new biotyping method for *Streptococcus mutans* with the api-ZYM system. *Clin Microbiol Infect.* 1999 Feb; 5(2): 88-91.
15. Lamby C, Gamboa F, Chaves M, Valdivieso C. Fenotipificación bioquímica del *Streptococcus mutans* en cavidad bucal en población escolar de Cota-Cundinamarca. *Trib Odontol.* 2005; 2(3): 73-7.
16. Gamboa F, Chaves M, Estupiñán M, Galindo A. Bacteriocins in *S. mutans* strains isolated from children with and without dental caries: biotypes and sensitivity to antibiotics. *Acta Odontol Latinoam.* 2008; 21(1): 97-104.
17. Gamboa F, Chaves M, Estupiñán M, Galindo A. Detección de mutacinas en biotipos de cepas *S. mutans* aisladas de niños prescolares con y sin caries dental. *Univ Odontol.* 2006 jun-dic; 25(57): 6-12.
18. Gamboa F, Chaves M, Lamby C, Fajardo A, Arévalo A. Antagonistic action of indigenous *Streptococcus mutans* strains. *Acta Odontol Latinoam.* 2009; 22(2): 129-38.
19. Coykendall AL, Gustafson KB. Taxonomy of *Streptococcus mutans*. In Hamada S, Michalek SM, Kiyono H, Menaker L, McGhee JR, editors. *Molecular microbiology and immunobiology of Streptococcus mutans.* Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science; 1986.
20. Schleifer KH, Kilpper-Bälz R. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci, and lactococci: a review. *System Appl Microbiol.* 1987 Nov; 10(1): 1-19.
21. Kulkarni GV, Chan KH, Sandham HJ. An investigation into the use of restriction endonuclease analysis for the study of transmission of *mutans streptococci*. *J Den Res.* 1991 Jul; 70(7): 1155-66.
22. Saarela M, Alaluusua S, Takei T, Asikainen S. Genetic diversity within isolates of *mutans streptococci* recognized by an rRNA gene probe. *J Clin Microbiol.* 1993 Mar; 31(3): 584-7.
23. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 1990 Nov 25; 18(22): 6531-5.
24. Chen C, Slots J. Arbitrarily primed polymerase reaction analysis of periodontal pathogens: discriminative primers and genetic diversity. *Clin Infect Dis.* 1995 Jun; 20(suppl. 2): S301-S303.
25. Gronroos L, Alaluusua S. Site-specific oral colonization of *mutans streptococci* detected by arbitrarily primed PCR-Fingerprinting. *Caries Res.* 2000 Nov-Dec; 34(6): 474-80.
26. Li Y, Caufield PW, Emanuelsson IR, Thornqvist E. Differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* via genotypic and phenotypic profiles from three different populations. *Oral Microbiol Immunol.* 2001 Feb; 16(1): 16-23.
27. Cogulu D, Sabah E, Uzel A, Ozkinay F. Genotyping of *Streptococcus mutans* by using arbitrarily primed polymerase chain reaction in children with Down Syndrome. *Arch Oral Biol.* 2006 Mar; 51(3): 177-82.
28. Tabchoury CP, Sousa MC, Arthur RA, Mattos-Graner RO, Del Bel Cury AA, Cury JA. Evaluation of genotypic diversity of *Streptococcus mutans* using distinct arbitrary primer. *J Appl Oral Sci.* 2008 Nov-Dec; 16(6): 403-7.
29. Napimoga MH, Kamiya RU, Rosa RT, Rosa EA, Höfling JF, Mattos-Graner R, Gonçalves RB. Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals. *J Med Microbiol.* 2004 Jul; 53(Pt 7): 697-703.
30. Gamboa F, Chaves M, Valdivieso C. Genotypic profiles by AP-PCR of *Streptococcus mutans* in caries-active and caries-free preschoolers. *Acta Odontol Latinoam.* 2010; 23(2): 143-9.
31. Redmo Emanuelsson IM, Carlsson P, Hamberg K, Bratthall D. Tracing genotypes of *mutans streptococci* on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Oral Microbiol Immunol.* 2003 Feb; 18(1): 24-9.
32. Peralisi FJ, Rodriguez MR, Segura VG, Maciel SM, Ferreira FB, García JE, Poli-Frederico RC. Genotypic diversity of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active preschool children. *Intern J Dent.* 2010; 2010: 824976. doi:10.1155/2010/824976.
33. Kamiya RU, Napimoga MH, Rosa RT, Höfling JF, Gonçalves RB. Mutacin production in *Streptococcus mutans* genotypes isolated from caries-affected and caries-free individuals. *Oral Microbiol Immunol.* 2005 Feb; 20(1): 20-4.
34. Nascimento MM, Höfling JF, Gonçalves RB. *Streptococcus mutans* genotypes isolated from root and coronal caries. *Caries Res.* 2004 Sep-Oct; 38(5): 454-63.
35. Saarela M, Hannula J, Mättö J, Asikainen S, Alaluusua S. Typing of *mutans streptococci* by arbitrarily primer polymerase chain reaction. *Arch Oral Biol.* 1996 Aug-Sep; 41(8-9): 821-6.
36. Hameş-Kocabaş EE, Uçar F, Kocabaş Ersin N, Uzel A, Alpöz AR. Colonization and vertical transmission of *Streptococcus mutans* in Turkish children. *Microbiol Res.* 2008; 163(2): 168-72.
37. Ersin NK, Kocabas EH, Alpöz AR, Uzel A. Transmission of *Streptococcus mutans* in a group of Turkish families. *Oral Microbiol Immunol.* 2004 Dec; 19(6): 408-10.
38. Truong TL, Ménard C, Mouton C, Trahan L. Identification of *mutans* and other oral streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Med Microbiol.* 2000 Jan; 49(1): 63-71.

39. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev.* 1980 Jun; 44(2): 331-84.
40. Hamada S, Ooshima T. Production and properties of bacteriocins (mutacins) from *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 1975 Oct; 20(10): 641-8.
41. Rogers AH. Bacteriogeny and the properties of some bacteriocins of *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 1976; 21(2): 99-104.
42. Hillman JD, Brooks TA, Michalek SM, Harmon CC, Snoep JL, van Der Weijden CC. Construction and characterization of an effector strain of *Streptococcus mutans* for replacement therapy of dental caries. *Infect Immun.* 2000 Feb; 68(2): 543-49.
43. Balakrishnan M, Simmonds RS, Tagg JR. Diverse activity spectra of bacteriocin-like inhibitory substances having activity against *Mutans Streptococci*. *Caries Res.* 2001 Jan-Feb; 35(1): 75-80.
44. Hillman JD, Dzuback AL, Andrews SW. Colonization of the human oral cavity by a *Streptococcus mutans* mutant producing increased bacteriocin. *J Dent Res.* 1987 Jun; 66(6): 1092-4.
45. Gamboa F, Herazo B, Martinez MC. Control microbiológico sobre *Streptococcus mutans* y su acción acidogénica. *Univ Sci.* 2004; 9: 45-55.
46. Ullman R, Miller S, Strampfer M, Cunha BA. *Streptococcus mutans* endocarditis: report of three cases and review of the literature. *Hearth Lung.* 1988 Mar; 17(2): 209-12.
47. Liébana J, Castillo A, Peis J, Baca P, Piedrola P. Antimicrobial susceptibility of 1042 strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*: comparison from 1985 to 1989. *Oral Microbiol Immunol.* 1991 Jun; 6(3): 146-50.

CORRESPONDENCIA

Fredy Omar Gamboa Jaimes
gamboa@javeriana.edu.co

