

Streptococcus mutans and dental caries

Streptococcus mutans y caries dental

Juan Carlos Ojeda-Garcés,¹ Eliana Oviedo-García,² Luis Andrés Salas³

¹Bacteriólogo. BSc. Docente. Facultad de Odontología. Universidad Cooperativa de Colombia –Pasto. E-mail: juanc.ojeda@campusucc.edu.co.

²Bióloga. Mg Ciencias Biomédicas. Docente. Facultad de Medicina. Universidad Cooperativa de Colombia –Pasto. E-mail: eliana.oviedo@campusucc.edu.co.

³Odontólogo. Candidato a Magíster en epidemiología. Universidad del Valle. Docente. Facultad de Odontología. Universidad Cooperativa de Colombia- Pasto. E-mail: andres.salas@ucc.edu.co

Recibido: febrero de 2013. Aprobado: junio de 2013

Abstract

Streptococcus mutans is one of cariogenic microorganisms associated with tooth decay. According with the hypothesis of the ecological plaque, dental caries is the consequence of changes in the natural balance in the dental plaque microflora (oral microbial homeostasis). Its role in the colonization of dental tissues, implantation and interaction with other microorganisms is of paramount importance for the understanding of the dynamics of dental biofilms. By means of molecular biology techniques, there have been advances in the identification of the different types that live in the oral cavity, the products they produce which are critical for its implantation, the interaction with other species and the development of new procedures that help its identification as one of the most important agents in dental caries. This review examines the latest advances in the biology of *Streptococcus mutans*, its role in the genesis of the caries and the identification and study techniques most used in recent years.

Key words:

Streptococcus mutans, Dental caries, Biofilm, PCR.

Resumen

Streptococcus mutans es uno de los microorganismos cariogénicos asociados a la caries dental. De acuerdo con la hipótesis de la placa ecológica, la caries dental es la consecuencia de cambios en el balance natural de la microflora de la placa dental causados por la alteración de las condiciones ambientales locales (homeostasis microbiana oral). El estudio de su participación en la colonización de tejidos dentales, implantación e interacción con otros microorganismos es de mucha importancia para la

Forma de citar: Ojeda-Garcés JC, Oviedo-García E, Salas LA. *Streptococcus mutans* y caries dental. Rev. CES Odont. 2013; 26(1) 44-56

comprensión de la dinámica de las biopelículas dentales. Por medio de técnicas de biología molecular, se ha avanzado en la identificación de los diferentes tipos que habitan la cavidad oral, los productos que generan y que son críticos para su implantación, las interacciones con otras especies y el desarrollo de nuevos procedimientos que ayuden su identificación como uno de los agentes más importantes en la caries dental. Esta revisión examina los últimos avances en la biología de *Streptococcus mutans*, su papel en la génesis de la caries y las técnicas de identificación y estudio más usadas en los últimos años.

Palabras Clave:

Streptococcus mutans, Caries dental, Biopelícula, PCR.

Introducción

De las enfermedades infecciosas que afectan a los seres humanos, la caries dental es probablemente la más prevalente. Se describe la caries dental como un proceso dinámico de desmineralización y remineralización, producto del metabolismo bacteriano sobre la superficie dentaria, que con el tiempo puede producir una pérdida neta de minerales y posiblemente, aunque no siempre, resultará en la presencia de una cavidad. Las bacterias orales pertenecen a una comunidad compleja de numerosas especies que participan en la formación de la placa bacteriana (biofilm o biopelícula) con todas sus funciones, interacciones y propiedades. El concepto actual contempla que varios microorganismos se incluyen en la patogénesis de la caries dental (estreptococos del grupo *mutans*, *Lactobacillus spp* y *Actinomyces spp*) de los cuales, *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) es el agente más importante asociado a ella. La caries y la periodontitis son causadas por un desequilibrio en las poblaciones bacterianas de biopelículas que se forman naturalmente y ayudan a mantener el estado normal de la cavidad oral.¹

La complejidad de la enfermedad que conocemos como caries se debe a los múltiples factores que están asociados con la evolución de una población bacteriana que pasa de una biopelícula saludable a otra patológica. Una biopelícula sana puede estar formada por más de 700 especies bacterianas, de las cuales menos del 1% son bacterias potencialmente patogénicas; una biopelícula saludable actúa como defensa de primera línea para ayudar a proteger la boca de infecciones por bacterias patogénicas u otros patógenos. Cambios en el medio dentro de la biopelícula hacen que se favorezca la proliferación de especies patogénicas acidúricas y acidogénicas y tomen posesión de la misma.²

La formación de la biopelícula dental y su sistema de quórum sensing son fundamentales en la vida bacteriana de *S. mutans*. La superficie dental es un hábitat natural indispensable para *S. mutans* y el tropismo por la biopelícula dental se refleja por su adaptación a sintetizar glucanos, fijar compuestos y a adaptar su aciduricidad. La competitividad por este nicho ecológico está en relación con un sistema de regulación de un proceso denominado Respuesta de Tolerancia al Acido (RTA) dependiente

de la densidad celular. Este proceso de RTA forma parte de los sistemas de señalización de *quorum* sensing desarrollado por algunas bacterias al formar la biopelícula y *S. mutans* ha evolucionado para que su desarrollo, sobrevivencia y persistencia en la cavidad oral dependa de su crecimiento en biopelícula y de la densidad celular que alcance en ella.

El crecimiento en biopelículas proporciona las condiciones óptimas para el funcionamiento del sistema de señalización entre las células estreptocócicas para facilitar el intercambio genético y generar factores de virulencia. Las poblaciones formadoras de biopelículas también pueden alcanzar altas densidades en áreas confinadas como es el caso de válvulas cardíacas, aparatos prostéticos, criptas amigdalinas, senos nasales, pasajes respiratorios terminales y lesiones infecciosas de piel, de ahí, su importancia como patógeno oportunista fuera de la cavidad oral.³⁻⁵

Streptococcus mutans produce ácido láctico, ácido propiónico, ácido acético y ácido fórmico cuando metaboliza carbohidratos fermentables como la sacarosa, glucosa y fructosa. Estos ácidos circulan a través de la placa dental hacia el esmalte poroso, disociándose y liberando hidrogeniones, los cuales disuelven rápidamente el mineral del esmalte, generando calcio y fosfato, los cuales, a su vez, difunden fuera del esmalte. Este proceso se conoce como desmineralización.^{6,7}

Los diversos métodos y técnicas que se ofrecen para el estudio y la determinación de las especies relacionadas con la caries dental y las enfermedades periodontales, permiten seleccionarlas de acuerdo al objetivo del estudio. Por tener ventajas y limitaciones, es necesario evaluarlas para obtener la mejor información en beneficio de los pacientes y la comunidad. De ahí que en el presente artículo se hace una revisión del conocimiento acerca de *Streptococcus mutans* y las técnicas usadas desde los albores de la microbiología hasta los procesos más recientes empleados en biología molecular para el aislamiento, clasificación y estudio de uno de los agentes asociados con el inicio y progreso de la caries dental.⁸

Flora microbiana oral

La microflora oral es un complejo ecosistema que contiene una amplia variedad de especies microbianas. (Tabla 1) La boca es colonizada por varios microorganismos antes de la erupción de los dientes, sin embargo, los recién nacidos son esencialmente libres de microorganismos. Con la erupción de los dientes, la placa dental se desarrolla en las superficies dentales expuestas las cuales están cubiertas por una película amorfa, casi invisible compuesta principalmente por glicoproteínas salivales. De no tomarse medidas de higiene oral, las superficies de los dientes acumulan grandes masas microbianas, mientras que la descamación de células epiteliales no permite la acumulación en las superficies de la mucosa oral. El número de bacterias en placa dental puede alcanzar 10^8 por mg (peso húmedo).

Tabla 1. Distribución de bacterias en varios sitios en la boca humana

Grupo Bacteriano	Sitio			
	Placa	Lengua	Saliva	Surco
Gingival				
Cocos G+ Facultativos	28.2	44.8	46.2	28.8
Estreptococos	27.9	38.3	41.0	27.1
<i>S. mutans</i>	(0-50)	(0-1)	(0-1)	(0-30)
<i>S. sanguis</i>	(40-60)	(10-20)	(10-30)	(10-20)
<i>S. mitior</i>	(20-40)	(10-30)	(30-50)	(10-30)
<i>S. salivarius</i>	(0-1)	(40-60)	(40-60)	(0-1)
<i>S. milleri</i>	(3-25)	(0-1)	(0-1)	(14-56)
Estafilococos	0.3	6.5	4.0	1.7
Cocos G+ anaerobicos	12.6	4.2	13.0	7.4
Cocos G- anaerobicos	6.4	16.0	15.9	10.7
Cocos G- facultativos	0.4	3.4	1.2	0.4
Bacilos G+ facultativos	23.8	13.0	11.8	15.3
Bacilos G+ anaerobicos	18.4	8.2	4.8	20.2
Bacilos G- facultativos	NDb	3.2	2.3	1.2
Bacilos G- anaerobios	10.4	8.2	4.8	16.1
Espiroquetas	ND	ND	ND	1.0

Fuente: Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiological reviews. 1980 Jun;44(2):331–84.

Los datos entre paréntesis son expresados como un porcentaje de los conteos totales de estreptococos facultativos.

h ND, No detectado.

La cavidad oral es un ecosistema donde cohabitan principalmente comensales (aproximadamente 10^{10} bacterias, siendo el 60% cultivables) pertenecientes entre 500 y 700 especies, que colonizan las mucosas y dientes donde forman la placa bacteriana o biofilm, entre las cuales están los miembros del género *Streptococcus*.⁹

Como se muestra en la Tabla 1, las especies microbianas predominantes son significativamente diferentes en los sitios de localización. Independientemente de las variaciones de muestra a muestra, estreptococos, bacilos gram positivos y veillonelas comprenden la mayoría del total de recuentos viables. Observaciones clínicas en humanos y animales indican que la formación de placa es un requisito esencial tanto para la caries como para la enfermedad periodontal. Se ha

descrito un viraje en la población microbiana en la placa en desarrollo de preponderantes formas cocáceas en la placa temprana con un incremento de bacilos y formas filamentosas. Sin embargo los estreptococos conforman el mayor número del total de la población bacteriana en la placa dental. Muchos de los estreptococos pueden ser identificados como una de las siguientes especies: *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. mitior*, *S. salivarius*, y *S. milleri*. Parece que ciertas especies estreptocócicas orales tienen predilección por colonizar sitios particulares de la boca. *S. sanguis* y *S. mutans* preferiblemente colonizan las superficies de dientes y aparatos prostéticos. *S. salivarius* está presente en bajo número en placa y es un colonizador primario de la boca después del nacimiento, *S. mitior* no tiene un sitio preferido en cavidad oral, *S. sanguis* usualmente no se encuentra sino hasta

la erupción de los dientes. Los estreptococos del grupo *mutans* han sido estudiados usando pruebas bioquímicas, serológicas y moleculares que incluyen hibridación ADN-ADN y secuenciación de genes ARN ribosomales. Las especies más importantes en el humano son *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*. Estos se han caracterizado como colonizadores secundarios del biofilm que rodea a los dientes y su patogenicidad se ha demostrado en relación a la producción de caries del esmalte, debido a la capacidad que poseen de producir ácidos a partir de la sacarosa.¹⁰

Morfología y características en cultivo

Streptococcus mutans es un coco Gram positivo, dispuesto en cadena, no móvil, catalasa negativo, productor rápido de ácido láctico con capacidad de cambiar un medio de pH 7 a pH 4.2 en, aproximadamente, 24 horas. Fermentador de glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina con la producción de ácido. Normalmente no desamina la arginina para producir amoníaco. Usualmente no producen ni hemólisis ni decoloración en agar sangre, es principalmente alfa o gamma hemolítico en agar sangre de cordero, aunque se han reportado unas pocas cepas hemolíticas. *Streptococcus mutans* se ha subclasificado en varios tipos con base en las propiedades inmunológicas, biológicas y genéticas: los serotipos de *Streptococcus mutans* son c, e, f y k. El hábitat natural de *S. mutans* es la boca humana. En cavidad oral, las colonias se adhieren muy cerca de la superficie del diente e igualmente se puede recuperar en lesiones cariosas. Puede aislarse frecuentemente de heces en humanos y ratas. Aunque *S. mutans* no se distribuye ampliamente en animales salvajes, se ha aislado

en monos, murciélagos, ratas salvajes habitantes de campos de cultivo de caña de azúcar y de monos Rhesus. Igualmente, se ha aislado en ratas y hámsteres de experimentación.⁹

Medios de cultivo

En general hay muchas dificultades técnicas para obtener muestras representativas de diferentes sitios orales y para aislar, cultivar y contar los microorganismos. No existe un solo método de cultivo para examinar la variable y compleja placa dental que satisfaga todas las condiciones necesarias. En algunos casos se requieren procedimientos estrictamente anaeróbicos. Afortunadamente, muchas de las especies de estreptococos orales pueden aislarse de varios sitios usando medios selectivos como el Agar Mitis *Salivarius* (MS). Aunque el Agar MS fue originalmente desarrollado para aislar estreptococos fecales, su uso ha predominado sobre otros medios de cultivo para el aislamiento de estreptococos orales, incluyendo *Streptococcus mutans*. En el agar MS, muchos estreptococos orales muestran una morfología característica de las colonias (blanquecinas, de bordes definidos, colonias firmes muy adherentes al medio de cultivo) lo cual permite su diferenciación inicial. Usualmente, la placa de agar se cultiva en una atmosfera del 95% de nitrógeno y 5% de dióxido de carbono a 37°C por 1 o 2 días seguida de una incubación en aire por 1 o 2 días. Además de la morfología característica de las colonias, los estreptococos orales pueden diferenciarse por su habilidad para fermentar ciertos azúcares (especialmente manitol y sorbitol) y por adherirse a superficies lisas en presencia de sacarosa. (Tabla 2)

Tabla 2. Características claves para la identificación de la especie predominante estreptocócica

Organismo	Fermentación						Hidrolisis		Polisacárido a partir de la sacarosa	Peróxido	Hemólisis en agar sangre de cordero
	Manitol	Sorbitol	Melibiososa	Rafinosa	Esculina	Inulina	Arginina	Esculina			
<i>S. mutans</i>											
a	+	+	+	+	+	+	-	+	Glucano>>fructano	+	δ
b	+	+	+	+	+	+	+	+	Glucano>>fructano	-	γ
c/ef	+	+	+	+	+	+	-	+	Glucano>>fructano	-	γ
d/g	+	±	-	-	-	+	-	+	Glucano>>fructano	+	δ
<i>S. sanguis</i>											
A	-	-	-	+	+	+	+		Glucano	+	α
B	-	-	-	-	-	-	-		Glucano	+	α
<i>S. mitior</i>	-	-	-	±	±	-	-		±	+	α
<i>S. salivarius</i>	-	-	-	+	+	±	-		Fructano>>glucano	-	γ
<i>S. milleri</i>	-	-	-	-	+	-	+		-	-	α/γ

Fuente: Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiological reviews. 1980. Jun;44(2):331-84.

El cultivo en agar es considerado como el estándar de oro ya que permite realizar recuentos bacterianos para establecer proporciones relativas, mediante métodos cuantitativos en medios no selectivos. Actualmente hay 5 medios de cultivo diferentes para el aislamiento de *Streptococcus mutans*. Estos son: Agar Mitis *salivarius* con bacitracina (MSB), Agar Mitis *Salivarius* con bacitracina y kanamicina (MSKB) Agar glucosa-sacarosa-telurito bacitracina (GSTB) Agar Trypticasa de soya con sacarosa y bacitracina (TYS20B) y Agar triptona extracto de levadura cisteína con sacarosa y bacitracina (TYCSB). El agar MS es el medio más ampliamente usado para aislar *S. mutans* y otras especies orales de estreptococos. El agar MS ha sido modificado para ser más selectivo en el aislamiento de *S. mutans* adicionando tanto sulfonamida (Agar MC), bacitracina (Agar MSB), polimixina o aun sacarosa (MS40S). Los métodos de recuento de colonias permiten determinar el grado de colonización producida por *Streptococcus mutans* según las edades, siendo de gran utilidad para identificar la población de alto riesgo de caries dentales y su

aplicación permitiría desarrollar programas de prevención en salud oral en poblaciones específicas y vulnerables.¹¹⁻¹⁶

Clasificación de *Streptococcus mutans*

Con base en la composición y los enlaces de los polisacáridos de la pared celular, estreptococos del grupo *mutans* se pueden clasificar en 8 serotipos: *Streptococcus mutans* (serotipos c, e, f y k), *Streptococcus sobrinus* (serotipos d y g), *Streptococcus cricetus* (serotipo a), *Streptococcus rattus* (serotipo b), *Streptococcus ferus* (serotipo c), *Streptococcus macacae* (serotipo c) y *Streptococcus downei* (serotipo h). Se sabe que el serotipo c de *S. mutans* es el tipo predominante en la cavidad oral humana más que las cepas e, d, f y k.¹⁷

Los polisacáridos de la pared celular juegan un papel importante en la colonización de sus nichos ecológicos. Las diferencias en las afinidades para la unión de los antígenos de polisacáridos a los tejidos humanos pueden ser la causa de esta distribución

tan variada. Por otro lado, se cree que el progenitor de *S. mutans* haya sido el serotipo c y que las cepas f y e pueden haberse originado por mutaciones del determinante del serotipo c.¹⁸

Streptococcus mutans generalmente es conocido como patógeno dental e igualmente se considera que causa bacteremia y endocarditis infecciosa. (19) Previamente se ha clasificado en tres serotipos c, e y f debido a la diversa composición química de los polisacáridos específicos de los serotipos los cuales están compuestos por un esqueleto de ramnosa y cadenas laterales de glucosa. Recientemente se designó una cepa de *S. mutans* con serotipo no *c/ef* como serotipo k el cual se caracteriza por una drástica reducción en la cantidad de cadenas laterales de glucosa. Un rasgo biológico común del serotipo k es su bajo nivel de cariogenicidad debido a las alteraciones de varios de los mayores antígenos proteicos de superficie. En cuanto a la virulencia en sangre, estas cepas sobreviven en la sangre por mayor tiempo debido a su baja antigenicidad. Otros estudios revelan la participación de este serotipo en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares, en la cuales se ha detectado su alta frecuencia.²⁰

Transmisión, Colonización y estabilidad de *Streptococcus mutans* en cavidad oral

La caries dental es una enfermedad dental transmisible en la cual los estreptococos del grupo *mutans* juegan un papel principal. Como en muchas enfermedades infecciosas, se requiere la colonización de un patógeno antes de que ocurra la infección. Hay un rango de factores de virulencia importante para el establecimiento de *Streptococcus mutans* en la compleja comunidad microbiana de la biopelícula dental. Estudiar los factores de virulencia de *S. mutans* y su correlación con la biodiversidad de especies es fundamental para entender el papel que juega en la colonización por los diferentes genotipos en el mismo individuo y la expresión de las características que puedan

o no influenciar su capacidad de virulencia y su habilidad para sobrevivir bajo diferentes condiciones ambientales.

El papel de los estreptococos del grupo *mutans*, especialmente *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, en la etiología de la caries dental ha sido extensamente investigado y claramente demostrado.

La evidencia indica que una forma importante de transmisión de *S. mutans* durante los primeros años de vida es la que se produce de madre a hijo por contacto directo (transmisión vertical), mientras que el contacto con otros familiares, incluidos el padre, los hermanos y demás posibles cuidadores constituye otra vía de transmisión (transmisión horizontal) que cobra importancia durante edades posteriores. Una característica importante de *Streptococcus mutans* es la persistencia de sus genotipos en la cavidad oral de adultos, adolescentes y niños mayores de cinco años. Este fenómeno es conocido como persistencia "intraindividual" y revela la relativa estabilidad que estos alcanzan en un hospedador y la relación con la expresión de características fenotípicas que les pueden dar ventajas para la supervivencia, como la capacidad de formar biopelículas, de adherirse y soportar fluctuaciones del pH. Se ha considerado comúnmente que la colonización de la cavidad oral de los niños por *S. mutans* ("ventana" de infección) ocurre al producirse la erupción del primer diente, es decir, alrededor de los seis meses de edad. Sin embargo, es lógico pensar que en niños expuestos a factores que facilitan los procesos de transmisión, la colonización se produzca antes de la aparición de los primeros dientes. Hay dos factores que sugieren que *S. mutans* pueda aparecer durante la etapa pre dental: 1) *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* son capaces de colonizar superficies mucosas. 2) Algunos niños desarrollan lesiones de caries poco después de la erupción dental. La colonización temprana de la cavidad

oral (antes de la erupción dental) por *S. mutans* puede aumentar el riesgo de caries y hacer que su desarrollo se produzca a edades más tempranas.^{21,36}

Se han identificado unos 52 genotipos diferentes en niños pero las madres transmiten cerca de 16 de ellos. Se observa una tendencia hacia la estabilidad de los genotipos transmitidos por las madres, en parte, porque la colonización del genotipo materno pueda interferir con la colonización de otros genotipos. Se ha observado que los niños albergan de uno a cinco genotipos diferentes de *S. mutans* en diferentes edades. La diversidad genotípica de *S. mutans* en cuatro sitios de muestreo (saliva, dorso de la lengua, mucosa alveolar y biopelícula dental) de niños parece ser homogénea, sin embargo, la biopelícula dental es un lugar muy importante dado el gran número de genotipos de *S. mutans* y las cepas aisladas. Se ha demostrado un alto grado de homología entre cepas de *S. mutans* recuperadas de miembros de la misma familia indicando tanto la transmisión vertical y horizontal y una persistente colonización de *S. mutans* adquiridos previamente hasta la adultez temprana.^{22,23}

La colonización inicial por *S. mutans* fue investigada en un estudio prospectivo de 46 niños estadounidenses desde el nacimiento a 5 años de la edad cuyas madres portaban altos niveles de *S. mutans*. De aquel estudio, la ventana de infectividad fue definida como el período a partir de 19 a 31 meses de edad, cuando el riesgo de adquisición de *S. mutans* era alto.²⁴

Adherencia de *Streptococcus mutans* y desarrollo inicial de la caries

Las cepas de *S. mutans* son fenotípicamente homogéneas. Sin embargo, recientes investigaciones han revelado un gran nivel de la heterogeneidad serológica, genética y bioquímica de *S. mutans*. La heterogeneidad también se observa a nivel de enzimas producidas por las

diferentes especies de *S. mutans* tales como las deshidrogenasas, glucosiltransferasas, aldolasas e invertasas. La serotipificación es un procedimiento rutinario y de mucho valor para determinar otros grupos inmunológicos y tipos de estreptococos.²⁵

Se ha aceptado que las glucosiltransferasas (Gtfs) de *S. mutans* desempeñan papeles críticos en el desarrollo de la placa dental virulenta. Las Gtfs se adsorben para producir glucanos in situ sobre el esmalte, proporcionando los sitios para la colonización ávida por microorganismos y una matriz insoluble para la formación de la placa. Las Gtfs también se adsorben a las superficies de otros microorganismos orales convirtiéndolos en productores de glucanos. *S. mutans* expresa 3 Gtfs genéticamente distintas; cada una parece desempeñar un papel diferente pero que se superpone en su papel en la formación de la placa virulenta. GtfC se adsorbe dentro de la película mientras que la GtfB se liga ávidamente a las bacterias promoviendo una apretada fusión celular incrementando la cohesión de la placa. La GtfD forma un polisacárido soluble, fácilmente metabolizable y sirve de iniciador de la GtfB. El comportamiento de Gtfs solubles no refleja lo observado con enzimas adsorbidas en la superficie. Además, la estructura de la matriz de polisacárido cambia con el tiempo a consecuencia de la acción de mutanasas y dextranasas dentro de la placa. Las Gtfs en diferentes lugares ofrecen blancos quimioterapéuticos para prevenir la caries dental. Sin embargo, los agentes que inhiben las Gtfs en solución, con frecuencia tienen efecto reducido o ninguno sobre las enzimas adsorbidas. Se han identificado otros productos bacterianos solubles usando técnicas inmunológicas, entre otros, fructosiltransferasa, Glucosiltransferasa (Gtf) y ácido lipoteicoico en la película formada in vitro e in vivo a partir de saliva entera. Se ha observado que las enzimas cuando se insolubilizan permanecen muy activas en una amplia gama de valores de pH. Está claro que la presencia de Gtf activa dentro de la

película dental facilita la formación de glucanos in situ, proporcionando así, distintos sitios de unión para los microorganismos orales.²⁶

Coagregación

Streptococcus mutans tiene la capacidad de adherirse a superficies, establecer uniones con otros estreptococos y con bacterias de otras especies. Muchas cepas de *S. mutans* se aglutinan (adherencia homóloga) por la adición de dextranos de alto peso molecular. También se ha reportado que ciertas cepas de *S. mutans* forman agregados con *Nocardia*, *Neisseria* al igual que con *Candida albicans* (adherencia heteróloga). Estos procesos son complejos e implican una variedad de componentes bacterianos y de factores externos como la dieta especialmente el consumo de sacarosa que puede influir también en la proporción de las distintas especies bacterianas que constituyen la película, la cual es fermentada por *S. mutans* y *C. albicans*, produciendo un entorno acidogénico favorable para ambos.^{21,27}

Pruebas diagnósticas para el aislamiento, conteo y tipificación de *Streptococcus mutans*

Existen diversos métodos y técnicas para el estudio y la identificación de patógenos asociados con caries y enfermedad periodontal los cuales incluyen: desde microscopía, cultivos, inmunología, hasta los más modernos como son las técnicas moleculares.

Microscopía directa

Puede proporcionar datos útiles como la morfología tradicional que nos permite clasificarlos como estreptococos Gram positivos. Por otro lado, la microscopía electrónica permite estudiar la estructura, distribución y cambios comparativos de los microorganismos en la placa. La desventaja de la microscopía es que sólo es posible establecer morfotipos y no géneros ni especies bacterianas.

Inmunoensayos

Entre las ventajas de los inmunoensayos para la detección de *S. mutans* están su sensibilidad, sencillez y rapidez, sin embargo, como desventajas de estos procedimientos se tiene que la especificidad puede dificultarse si hay reactivos que se cruzan con especies no incluidas en la batería (*Phadebact Streptococcus*) o con bacterias no cultivables.

Pruebas con Técnicas Moleculares

Con el nombre de Diagnóstico Molecular se engloba una serie de técnicas basadas en el análisis del DNA o ácido desoxirribonucleico. Gracias a la ingeniería genética, dicho análisis puede tener dos objetivos: la detección de microorganismos de forma rápida y eficaz, así como el estudio de variaciones en los genes humanos que pueden condicionar la aparición de enfermedades. Estas técnicas moleculares sirven para estudios epidemiológicos, a nivel general para determinación algunas enterotoxinas, identificación de genes de resistencia, identificación de especies difíciles de cultivar o no cultivables, clonación de secuencias de genes, entre otros.

Los primeros estudios a nivel molecular partieron del conocimiento de 18 cepas estreptocócicas cariogénicas identificadas como miembros de *Streptococcus mutans* las cuales fueron comparadas por medio de pruebas bioquímicas, deshidrogenasas, la composición de las bases del DNA y las homologías de la secuencia del DNA. Se encontraron ligeras diferencias bioquímicas (tales como la fermentación de carbohidratos) que se correlacionaron con grandes diferencias en la composición del DNA y la secuencia heterológica que existe entre estas cepas. De ahí que todas las cepas pudieran asignarse a uno de los cuatro grupos con base en las diferencias bioquímicas y genéticas. Más aun, estos cuatro grupos se correlacionaron con los cuatro grupos serológicos descritos en estudios previos.²⁸

Hace algunos años los métodos microbiológicos y bioquímicos disponibles no permitían la rápida

detección e identificación de *Streptococcus mutans* y *sobrinus*. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar su presencia en saliva es una de las alternativas para su identificación rápida y segura. Inicialmente se realizó un recuento de estreptococos del grupo *mutans* en saliva por método microbiológico y luego la diferenciación de especies por la técnica de PCR. Los resultados mostraron que la sensibilidad de la técnica de PCR fue superior a la del método microbiológico. Además, el análisis de la especificidad de la amplificación, evaluada por restricción enzimática, confirmó la presencia de estas bacterias. Con base en determinadas secuencias se han desarrollado ensayos de PCR que pueden diferenciar los estreptococos del grupo *mutans* de otros estreptococos pertenecientes al grupo viridans.^{7,29,30-33}

Las mayores limitaciones de los métodos de cultivo incluyen la detección de *Streptococcus mutans* en las muestras clínicas, una morfología inconsistente dependiendo del medio de cultivo usado, su alto costo y la dedicación que requiere. Más aun, el cultivo requiere de muestras viables haciendo que su aplicación en estudios epidemiológicos y de desempeño en investigación sea impráctica. Se han desarrollado algunos iniciadores (primers) y sondas (probes) de DNA ya que los métodos de cultivo convencionales pueden limitar los estudios de población y su interacción con otras bacterias en la cavidad oral. Muchos de ellos se enfocaron en los genes específicos asociados con la virulencia de *Streptococcus mutans*, tales como glucosiltransferasas, fructosiltransferasas, dextranasa y proteína fijadora de glucanos B, el sistema de fosfotransferasa de la sacarosa dependiente del fosfoenolpiruvato y el antígeno proteínico. De igual forma se diseñaron otros primers para amplificar regiones específicas de

regiones de los genes del rRNA 16S del *S. mutans*. Se ha encontrado que muchos primers para PCR funcionan bien para cultivos puros de *Streptococcus mutans*. Sin embargo, hay poca información de si las regiones blanco para PCR pueden estar, también, presentes en otras especies bacterianas encontradas en el mismo hábitat de *S. mutans* o de si estos primers se pueden encontrar en muestras clínicas mezcladas. Claro que algunos de estos sitios genéticos podrían no ser únicos para *S. mutans*.³⁴

Varios de estos métodos son sistemas de detección bacteriana basados en PCR, muchos de los cuales son análisis cualitativos y, en consecuencia, no adecuados para la evaluación apropiada de la susceptibilidad a la caries o de la actividad cariosa. El análisis cuantitativo es esencial para el monitoreo del número de células y/o de la relación de bacterias cariogénicas en muestras orales tales como la placa dental y la saliva. Más aun, el monitoreo del número de bacterias cariogénicas en biopelículas orales se requiere desde la perspectiva de la investigación de la biopelícula. Con la prueba de PCR en tiempo real se han desarrollado sistemas para la detección de copias de DNA lo que ha permitido la rápida detección y absoluta y relativa cuantificación de bacterias cariogénicas humanas incluyendo *S. mutans* y *S. sobrinus* de muestras orales.³⁵

Conclusiones

El conocimiento acerca del microorganismo cariogénico más importante relacionado con la caries dental ha venido en aumento, lo cual amplía nuestro entendimiento acerca de las vastas correlaciones que se dan desde su implantación en los tejidos orales como en la progresión de la enfermedad y de la amplia gama de interacciones con todos los demás factores.

Aunque mucho se ha avanzado, es necesario continuar con el estudio de *Streptococcus mutans* para descubrir los secretos que nos permitan desarrollar metodologías adecuadas para su control en etapas tempranas y poder restablecer el equilibrio perdido que genera la caries dental. Las técnicas de biología molecular han sido de gran ayuda en la identificación y caracterización

del *Streptococcus mutans*. Uno de los objetivos a mediano plazo es poder desarrollar técnicas que faciliten su uso en la práctica clínica, para la detección temprana de la caries a bajo costo y con alta especificidad, de manera que se genere un beneficio inmediato para usuarios particulares o para desarrollar programas de promoción y prevención.

Referencias

1. Escribano M, Matesanz P BA. Pasado , presente y futuro de la microbiología de la periodontitis. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*. 2005;17(2):79–87.
2. Milicich G. Caries : Una perspectiva de la enfermedad oral que nos esforzamos por manejar. *J Minim Interv Dent*. 2008;108(1):25–35.
3. Cvitkovitch DG, Li Y-hua, Ellen RP. *Quorum* sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. *The Journal of Clinical Investigation*. 2003;112(11).
4. Nadell CD, Xavier JB, Levin S a, Foster KR. The evolution of *quorum* sensing in bacterial biofilms. *PLoS biology*. 2008 Jan;6(1):e14.
5. C. JN. Biofilms bacterianos. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello*. 2007;67:61–72.
6. Fátima RS. Algunas consideraciones sobre caries dental, fluoruros, su metabolismo y mecanismos de acción. *Acta Odontológica Venezolana*. 2008;46 No 4:1–11.
7. Hung W-C, Tsai J-C, Hsueh P-R, Chia J-S, Teng L-J. Species identification of *mutans* streptococci by groESL gene sequence. *Journal of medical microbiology*. 2005 Sep;54(Pt 9):857–62.
8. Moromi Nakata H. Microbiología periodontal. Pruebas diagnósticas, una revisión. *Odontología Sanmarquina*. 2003 Aug;6:43–7.
9. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiological reviews*. 1980 Jun;44(2):331–84.
10. Linossier AC, Valenzuela CY. Colonización de la cavidad oral por *Streptococcus* grupo *mutans*, según edad, evaluado en saliva por un método semi-cuantitativo. *Rev Chil Infect*. 2011;28(3):230–7.
11. Linke HA. New Medium for the Isolation of *Streptococcus mutans* and Its Differentiation from Other Oral Streptococci. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*,. 1977;5(6):604–9.
12. Jensen B, Bratthall D. A new method for the estimation of *mutans* streptococci in human saliva. *Journal of dental research*. 1989 Mar;68(3):468–71.
13. Weinberger SJ WG. A comparison of *S. mutans* clinical assessment methods. *Pediatric Dentistry*. 1990;12(6):375–9.
14. Sabbaj J, Sutter VL, Finegold SM. Comparison of selective media for isolation of presumptive group D streptococci from human feces. *Applied microbiology*. 1971 Dec;22(6):1008–11.

15. Hildebrandt GH, Bretz W a. Comparison of culture media and chairside assays for enumerating *mutans* streptococci. *Journal of applied microbiology*. 2006 Jun;100(6):1339–47.
16. Od RMA, Carlos L, Od MC, Constanza M, Od VR, C SJG. Estudio comparativo de medios de cultivo para crecimiento y recuperación del *Streptococcus mutans* ATCC 25175 “ in vitro .”NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. 2005;3(3):25–30.
17. Nakano K, Nomura R, Nakagawa I, Nakano K, Nomura R, Nakagawa I, et al. Demonstration of *Streptococcus mutans* with a Cell Wall Polysaccharide Specific to a New Serotype, k, in the Human Oral Cavity. *J. Clin. Microbiol*. 2004;42(1):198–202.
18. Shibata Y, Ozaki K, Seki M, Tanaka H, Nakano Y, Shibata Y, et al. Analysis of Loci Required for Determination of Serotype Antigenicity in *Streptococcus mutans* and Its Clinical Utilization. *J. Clin. Microbiol*. 2003;41(9):4107–12.
19. Inaba H, Amano A. Roles of Oral Bacteria in Cardiovascular Diseases — From Molecular Mechanisms to Clinical Cases: Implication of Periodontal Diseases in Development of Systemic Diseases. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2010;113(2):103–9.
20. Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Takeda M, Yoshioka H, et al. Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. *Journal of clinical microbiology*. 2006 Sep;44(9):3313–7.
21. Martínez MC RA. Estudio de las cepas de Estreptococos del grupo *mutans* presentes en binomios madre–hijo. *Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquia* -. 2009;21(2):177–85.
22. Berkowitz RJ. *Mutans* streptococci: acquisition and transmission. *Pediatric dentistry*. 2006;28(2):106–9; discussion 192–8.
23. Napimoga MH, Höfling JF, Klein MI, Kamiya RU, Gonçalves RB. Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. *Journal of Oral Science*. 2005;47(2):59–64.
24. Alves AC, Nogueira RD, Stipp RN, Pampolini F, Moraes AB a, Gonçalves RB, et al. Prospective study of potential sources of *Streptococcus mutans* transmission in nursery school children. *Journal of medical microbiology*. 2009 Apr;58(Pt 4):476–81.
25. S. Rumpf, M. Hannig, K. Breitung, W. Schellenberger, K. Eschrich TR and SK. Phenotypic Heterogeneity of Sm in Dentin. *J Dent Res*. 2008;87.
26. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries research*. 2011 Jan;45(1):69–86.
27. Linossier A, Vargas A, Villegas R CE. Relación cuantitativa entre el nivel de *Streptococcus mutans* y *Candida albicans* en niños con síndrome de Down. *Medicina Oral* 2002; 2002;7(4):284–92.
28. AL C. Four Types of *Streptococcus mutans* Based on Their Genetic, Antigenic and Biochemical Characteristics. *Joirrttnl of General Microbiology*. 1974;83:327–38.
29. Linossier C Alfredo, Vargas D Alex, Zillmann G Gisela, Arriagada R Moisés, Rojas A Robinson VRR. Streptococci *mutans*: Método semi- cuantitativo para establecer el rango de riesgo de infección bucal en niños preescolares chilenos. *Rev. méd. Chile*. 2003;131:412–8.
30. Franco e Franco TCC, Amoroso P, Marin JM, de Avila FA. Detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in dental plaque samples from Brazilian preschool children by polymerase chain reaction. *Brazilian dental journal*. 2007 Jan;18(4):329–33.

31. Salazar LA, Vásquez C, Almuna A, Oporto G, Detección A. Detección Molecular de Estreptococos Cariogénicos en Saliva. *Int. J. Morphol.* 2008;26(4):951–8.
32. Nakanishi H, Kido A, Ohmori T, Takada A, Hara M, Adachi N, et al. A novel method for the identification of saliva by detecting oral streptococci using PCR. *Forensic science international.* 2009 Jan 10;183(1-3):20–3.
33. Nakano K, Nomura R, Shimizu N, Nakano K, Nomura R, Shimizu N, et al. Development of a PCR Method for Rapid Identification of New *Streptococcus mutans* Serotype k Strains. *Journal of clinical Microbiology.* 2004;42(11):4925–30.
34. Zhou Chen, Deepak Saxena, Page W. Caufield, Yao Ge, Minqi Wang and YL. Development of species-specific primers for detection of *Streptococcus mutans* in mixed bacterial samples. *FEMS Microbiol Lett.* 2009;272(2):154–62.
35. Yoshida A, Suzuki N, Nakano Y, Kawada M, Yoshida A, Suzuki N, et al. Development of a 5′ Nuclease-Based Real-Time PCR Assay for Quantitative Detection of Cariogenic Dental Pathogens *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Journal of clinical microbiology.* 2003;41(9):4438–41.
36. P.W. Caufield, G.R. Cutter and A.P. Dasanayake. Initial Acquisition of *Mutans* Streptococci by Infants: Evidence for a Discrete Window of Infectivity. *J DENT RES* 1993 72: 37



UNIVERSIDAD CES

Un Compromiso con la Excelencia

Resolución del Ministerio de Educación Nacional No. 1371 del 22 de marzo de 2007