

Revista de la Asociación Dental Mexicana

Volumen
Volume 60

Número
Number 5

Septiembre-Octubre
September-October 2003

Artículo:

Detección de una secuencia del gene
spaP de *Streptococcus mutans* en
muestras de placa dental mediante
reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Derechos reservados, Copyright © 2003:
Asociación Dental Mexicana, AC

Otras secciones de
este sitio:

- 👉 Índice de este número
- 👉 Más revistas
- 👉 Búsqueda

*Others sections in
this web site:*

- 👉 *Contents of this number*
- 👉 *More journals*
- 👉 *Search*



Medigraphic.com

Detección de una secuencia del gene *spaP* de *Streptococcus mutans* en muestras de placa dental mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Luis Alejandro Aguilera Galaviz,* Iris C. Estrada García**

* Instituto de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

** Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, Departamento de Inmunología Molecular II.

Resumen

Streptococcus mutans es un patógeno relacionado con la caries dental. La determinación de la cantidad de bacterias presentes en placa dental, así como la proporción de otras bacterias en la boca, son de interés para evaluar el riesgo de caries. Es necesario establecer sistemas de detección de alta sensibilidad, especificidad y que no consuman tiempo en relación a los métodos de cultivo e identificación bioquímica tradicionales. Utilizando el método de Polimerase Chain Reaction (PCR) fue posible detectar e identificar una secuencia de 192 pb del gene *spaP* para evaluar la presencia de cepas de *S. mutans* potencialmente cariogénicas, usando DNA aislado de muestras de placa dental y establecer una relación con el índice CPOD. Los resultados sugieren que es más importante la presencia de *S. mutans* con potencial cariogénico que la acumulación de placa, sin embargo sabemos que existen otros factores claves que contribuyen en la presencia de caries.

Palabras clave: *Streptococcus mutans*, antígeno I/II, reacción en cadena de la polimerasa, placa dental.

Abstract

Streptococcus mutans is a pathogen related to human dental caries. The determination of the amount of mutans streptococci as well as their proportion to other oral bacteria is of interest for the assessment of the risk for the development of caries. In this way is better to use a sensitive, specific and no time consuming method in relation to the culture and biochemical identification. We used a PCR to identify a sequence from the *spaP* gene in order to establish the presence of strains with cariogenic potential of *S. mutans* and the relation with the DMFT index. By this method is possible to amplify a 192 bp sequence from the *spaP* gene using DNA isolated from dental plaque, the results suggest that is important to evaluate the presence of cariogenic strains of *S. mutans* in the plaque content instead of the amount of dental plaque, however, another factors, play a key role in the development of caries.

Key words: *Streptococcus mutans*, antigen, chain reaction polimerase, dental plaque.

Antecedentes

El *Streptococcus mutans* se ha identificado como uno de los principales agentes etiológicos de la caries dental, la cual se caracteriza por la pérdida de la sustancia dentaria, principalmente en las fosas y fisuras y sobre

las superficies interproximales de la corona. La caries no tiene una causa única, sino que es una enfermedad en la que los factores ambientales, los hábitos higiénicos y alimentarios y la susceptibilidad genética del individuo, tienen un papel importante en el desarrollo de esta patología.

Algunos resultados de estudios epidemiológicos señalan que alrededor del 18% de los niños entre los 2 y los 4 años han experimentado algún tipo de caries y que el 23% de los niños de 8 años de edad tienen cuando menos un sellador dental en sus molares, que a la edad de 17 años, el 18% de los jóvenes tienen una lesión cavitada y el 7% han perdido un diente permanente.¹ Por estos motivos en la caries dental, el control de la placa y el contenido de especies cariogénicas en ella, es uno de los factores importantes para limitar la implantación y colonización del agente causal.^{2,3}

Detección de *Streptococcus mutans* cariogénicos: Se han desarrollado diferentes métodos para la detección de cepas cariogénicas de *S. mutans*; algunos de ellos estiman el número de UFC de *S. mutans* para establecer el riesgo y monitorear el nivel de colonización de un individuo, tal es el caso de la prueba de la tira de *mutans* (Strip mutans), que permite estimar la cantidad de *S. mutans* en saliva, y aunque no toma en cuenta los factores de virulencia de la bacteria, puede ser utilizada para dar seguimiento a un paciente o al nivel de poblaciones e identificar a grupos de personas con riesgo de desarrollar caries.⁴

Un método simplificado utiliza un palillo de dientes para tomar una muestra de placa dentobacteriana se transfiere la muestra a la tira y posteriormente se cultiva en Agar de *mitis salivarius* con sacarosa y bacitracina; para esta prueba se cuenta con un sistema de valores determinado en donde 0 significa poco o nulo crecimiento y 3 representa un crecimiento muy denso. Este método se desarrolló para implementar un sistema sencillo de muestreo en el consultorio dental y estimar los niveles de *S. mutans* en un sitio específico del diente (superficies proximales). Los resultados corresponden con los estimados mediante la prueba del abatelenguas y siembra en Agar selectivo.⁵

En general, la identificación de individuos con alto riesgo de desarrollo de caries dental se lleva a cabo mediante la cuantificación de UFC de *S. mutans* en Agar *mitis salivarius* y posteriormente se realiza la caracterización bioquímica de las cepas aisladas, en donde la producción de ácido a partir de sacarosa y la formación de polisacáridos extracelulares son dos de las principales características de las cepas con alta capacidad cariogénica.

La tipificación mediante mutacinas (Bacteriocinas) producidas por el *S. mutans* es de gran utilidad, éstas representan un marcador epidemiológico para establecer la fuente de infección y el mecanismo de transmisión, debido a que predomina un tipo productor de bacteriocinas en un individuo, de igual forma se ha comprobado que la producción de mutacinas está relacionado con la capacidad para producir caries; además mediante la tipificación por bacteriocinas se puede establecer el mecanismo y la fuente de transmisión de la infección de padres a hijos y entre familiares cercanos.⁶

Otros métodos con alta especificidad, y recientemente la clonación e identificación de genes a partir de cepas aisladas de *S. mutans* GS5 involucrados en la síntesis de polisacáridos extracelulares que codifican para la enzima fructosiltransferasa *ftf* (FTF), se ha demostrado que presentan gran homología con los genes *gtfB* y *gtfC* de la glucosiltransferasa-I y glucosiltransferasa-SI respectivamente y *gtfD* para la enzima glucosiltransferasa-S, por lo cual se han utilizado para construir sondas de DNA que permitan identificar a las bacterias potencialmente patógenas con una alta especificidad.⁷

T. Ono y cols.⁸ considerando que inicialmente el *S. mutans* se adhiere al esmalte de los dientes a través del antígeno I/II, y que éste constituye un marcador genético para cepas cariogénicas, diseñaron un par de oligonucleótidos a partir de la secuencia del gene que codifica para este antígeno, y amplificaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la región que comprende los nucleótidos 3668 a 3859. Esta región no presenta ninguna homología con otras secuencias de bacterias relacionadas o con *spaA* de *S. sobrinus* y los resultados obtenidos demuestran que existe una relación directa entre los resultados obtenidos a partir de PDB con este método y los estudios microbiológicos de aislados de PDB, y que, además la sensibilidad y especificidad de este método permiten identificar con mayor certeza la presencia de cepas de *S. mutans* potencialmente cariogénicas.⁸ Bajo un procedimiento similar T. Igarashi y cols.⁹ a partir de la secuencia del gene que codifica para la dextranasa para amplificar un segmento que pudiera utilizarse en la detección de cepas cariogénicas de *S. mutans*. A partir de cepas aisladas y caracterizadas bioquímicamente y mediante extracción de DNA a partir de PDB demostraron que es posible amplificar el segmento del gene *dexA* a partir de 12 (Unidades Formadoras de Colonias) UFC y que utilizando PCR es posible obtener mayor rapidez, sensibilidad y especificidad que por los métodos convencionales.^{9,10}

Material y métodos

Para establecer un sistema de detección por PCR de *Streptococcus mutans*, se les tomó una muestra de placa dental a 38 niños de ambos sexos, con una edad promedio de 5.7 (± 1.2) años de edad que acuden en forma voluntaria, a las instalaciones de la clínica de la Especialidad en Odontopediatría de la UAZ. Se les determinaron los índices odontológicos CPOD (dientes cariados perdidos y obturados) e IHOS (índice de higiene oral simplificado).

Extracción de DNA cromosomal a partir de placa dentobacteriana por el método de lisis con lisozima: La obtención del DNA cromosomal se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento: Se tomaron muestras de PDB con cucharillas para dentina (Medicon no. 5) estériles, poste-

riormente se homogeneizó la muestra en medio BHI e incubó 18 h a 37°C, posteriormente se centrifugó el cultivo bacteriano a 3,000 rpm durante 10 min; se eliminó el sobrenadante. El paquete celular se lavó 2 veces con 500 μ L de TE (Tris-HCl 10 mM EDTA 1 Mm) pH 8.0, e inactivó a 95°C durante 10 min, se resuspendió en 250 μ L de TE y se agregó 2 mg/mL de lisozima e incubó a 37°C durante 60 min, y a 50°C por 20 min. Se adicionaron 4 μ g/mL de proteinasa K e incubó a 37°C durante 60 min, posteriormente se agregó SDS al 10% hasta alcanzar una concentración de 1.5% y 7.3 μ L de una solución de cloruro de sodio 4 M para incubarse a 50°C por 10 min. El lisado resultante se extrajo una vez con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y 2 veces con fenol neutro (fenol:cloroformo: alcohol isoamílico 25:24:1) y se precipitó con etanol al 90% y un volumen de acetato de amonio 7.5 M. El DNA cromosomal precipitado se disolvió en 50 μ L de buffer TE pH 8.0.¹¹

Amplificación del fragmento de DNA del Ag I/II de 192 bp por PCR: De acuerdo a la secuencia del DNA que codifica para el antígeno I/II, B, P1, *spaP* o Pac de *Streptococcus mutans* serotipo c obtenida del Banco de Genes (Número de acceso x17390) T. Ono y colaboradores⁸ diseñaron un par de oligonucleótidos con las siguientes secuencias sentido 5'-AAC GAC CGC TCT TCA GCA GAT ACC-3' localizado en la región 3668 a 3698 y contrasentido 5'-AGA AAG AAC ATC TCT AAT TTC TTG-3' en la región 3835 a 3859 para obtener un fragmento de 192 bp. Se utilizó una concentración de 500 nM para los oligonucleótidos, 200 μ M para la mezcla de desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), MgCl₂ 2.5 mM y 2 U de Taq polimerasa en un volumen de reacción de 50 μ L. La amplificación se llevó a cabo de la siguiente manera:

Desnaturalización inicial 2 minutos a 94°C. Treinta ciclos con las siguientes condiciones: Desnaturalización 1 minuto a 94°C, apareamiento 30 segundos a 57°C y extensión 1 minuto a 72°C; con una extensión final de 5 minutos a 72°C.

Electroforesis en geles de agarosa: Los productos de amplificación por PCR para el Ag I/II fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa neutra al 2% en amortiguador TBE (Tris 0.04 M, ácido bórico 0.04 M y Na₂EDTA(2H₂O 1mM) a 80 miliamperes.

Resultados

Se estudiaron 38 sujetos al azar, de los cuales 29 presentaron caries dental y 9 sujetos sanos, en edades de 3 a 7 años. Se examinaron clínicamente y se determinaron los índices CPOD e IHOS. Los valores del CPOD encontrados en este grupo de estudio son de 0 a 20 con una media de 4.2, y en el caso del IHOS de 0 a 2.5 con una media de 2; en el caso del CPOD un alto porcentaje, 28.94% del total de pacientes, presenta valores de 3 a 5 y solamente un 7.89 mayores de 10. Para el IHOS el 55% del grupo de estudio presenta valores de 1 a 2 y sólo un 2.63% de cero (*Cuadro I*).

La experiencia relativa de caries dental se determinó de acuerdo a Grainger y Nikiforuk¹² y se resume en la *figura 1*.

A partir de las muestras de PDB se amplificó un segmento de 192 pb del gene *spaP* que codifica para el Ag I/II de *S. mutans* (*Figura 1*).

De las muestras de PDB obtenidas 28 son positivas para el gene *spaP* que codifica para el Ag I/II y 10 negativos (*Figura 2*).

De acuerdo al CPOD, 6 pacientes son positivos para *spaP* con un índice de cero, y el resto presentan una distribución homogénea a excepción de 3 con un valor mayor a 10. En el caso de los negativos para el Ag I/II, uno presenta valor mayor a 10 y las restantes están distribuidas en los diferentes rangos establecidos. Para *dexA*, 3 muestras positivas corresponden a pacientes con CPOD igual a cero. La distribución de las muestras positivas y negativas de acuerdo al CPOD se muestran en la *figura 4*.

De acuerdo con la presencia de caries, se encontró que 29 positivos para *spaP*, 12 tienen caries de primer y segundo grado, 5 de tercer grado, 2 de cuarto y 7 no presentaron lesiones (*Figura 5*).

Discusión

En este estudio establecimos un sistema de detección para cepas con potencial cariogénico de *Streptococcus mutans* utilizando reacción en cadena de la polimerasa a partir de cultivos de PDB, con una alta especificidad y

Cuadro I. Distribución de pacientes de acuerdo al ceo/CPOD y el IHOS.

ceo/CPOD	Número de pacientes	Porcentaje	IHOS	Número de pacientes	Porcentaje
0	8	23.68%	0	1	2.63%
1-2	7	18.42%	< 1	12	31.57%
3-5	12	28.94%	1-2	19	50%
6-9	7	21.05%	> 2	6	15.78%
> 10	4	7.89%			

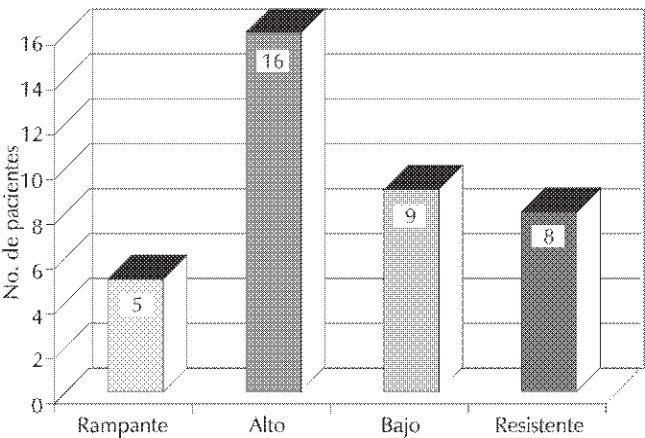


Figura 1. Experiencia relativa de caries dental.

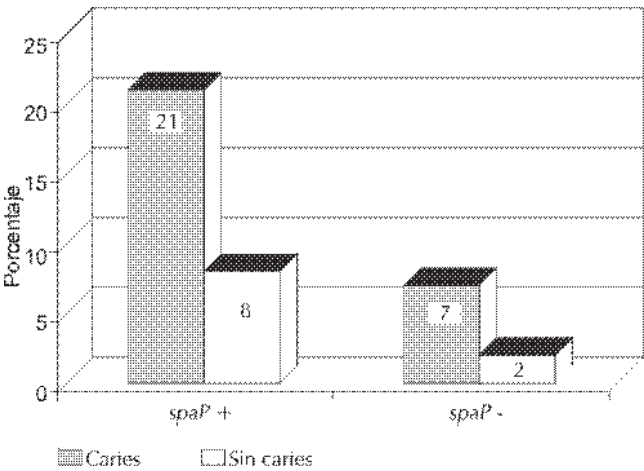


Figura 3. Detección de *spaP* en muestras de PDB positivas y negativas por PCR, en pacientes con y sin caries.

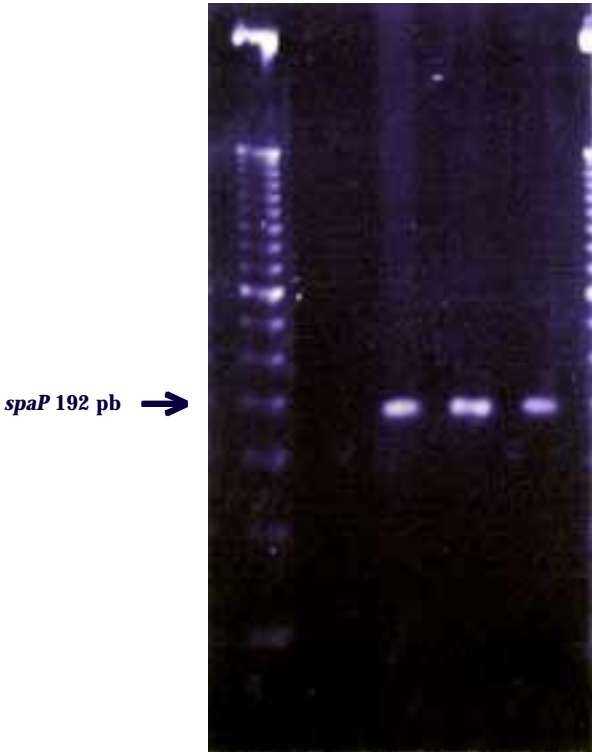


Figura 2. Productos de PCR identificados a partir de placa dental: carril 1 marcador de peso molecular (DNA 50pb), carril 2 control negativo, carril 3-5 segmentos del gene *spaP* de *S. mutans*.

sensibilidad. Mediante este método es posible la detección de *S. mutans* utilizando como marcadores genéticos al gene *spaP* que codifica para el Ag I/II, de la misma forma mediante esta tecnología se puede evaluar la presencia de *S. mutans* en forma rápida a partir de muestras clínicas y sin necesidad de utilizar medios selectivos ni aislar al microorganismo, así mismo, nos ayuda a establecer un sistema más inmediato y cualitativo de con-

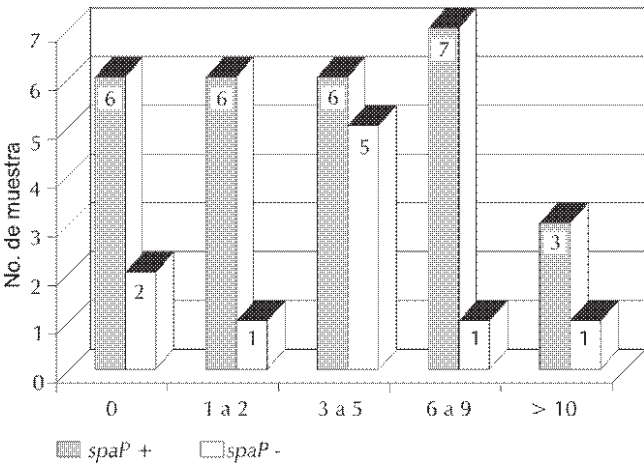


Figura 4. Distribución de muestras positivas y negativas para *spaP* por PCR de acuerdo con el ceo/CPOD.

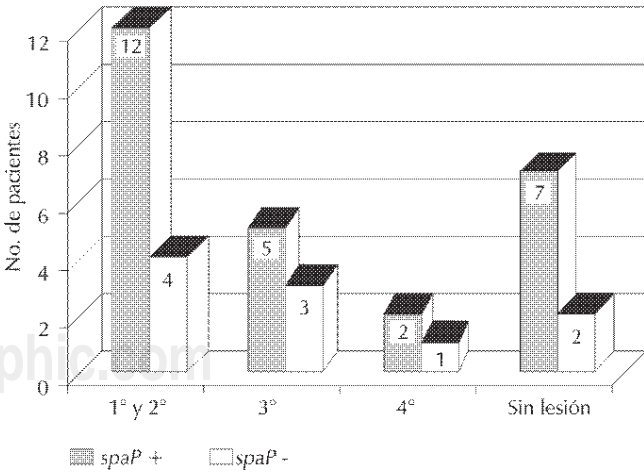


Figura 5. Detección de *spaP* en PDB por PCR, que muestra el grado de lesión encontrado en pacientes con caries y pacientes sanos.

trol y riesgo de caries dental, de tal forma que el pronóstico sea favorable para los pacientes que presenten cepas con potencial cariogénicos; por otro lado es importante señalar que se ha demostrado (Hajishengalis y cols. 1996, 1998) que el Ag I/II juega un papel importante en la implantación inicial del *S. mutans* a la superficie del diente, produce una respuesta inmune protectora cuando es administrado por vía oral acoplado a la subunidad A2/B de la toxina colérica, lo cual coincide con los datos antes señalados ya que la presencia de una cantidad considerable de muestras positivas para *spaP* están relacionadas con lesiones de primero y segundo grado o con la ausencia de lesiones, de igual forma esto corresponde con las características de colonización y daño al diente ya que a medida que la lesión involucra tejido profundo la flora microbiana cambia, permitiendo la implantación de bacterias con mayor resistencia al medio ambiente ácido y menores requerimientos de oxígeno. Por otro lado la presencia de cepas bacterianas en PDB que presenta el gene para el Ag I/II favorece la presencia de caries ya que es posible que el *S. mutans* se adhiera al diente mediante la interacción del Ag I/II con las proteínas de la película adquirida unida al diente.

En este grupo de pacientes al analizarlos en forma individual no existe una relación entre el IHOS y el CPOD, encontramos que algunos de los sujetos de estudio que presentan una gran cantidad de PDB no presentan un índice CPOD alto y viceversa, por lo que de acuerdo con los resultados de este trabajo contradicen los hallazgos de otros investigadores que señalan que a mayor cantidad de placa mayor es el CPOD. Se puede establecer de los hallazgos clínicos que no hay una relación directa entre el IHOS y el CPOD, por lo que es necesario evaluar la calidad de la PDB en términos cualitativos, es decir, de su contenido bacteriano y no la cantidad de placa presente en los órganos dentarios. Mediante esta tecnología (PCR) es posible detectar individuos o poblaciones en riesgo, por lo que se hace necesario establecer medidas de control eficientes para modificar el medio ambiente bucal e incluir el uso de antisépticos orales como medio de control de la flora bacteriana residente de la placa, así como técnicas de control de la PDB incorporados a programas de impacto.

Finalmente es importante la comprensión de los múltiples factores involucrados en el desarrollo y evolución de la caries dental para el diseño de alternativas para su prevención y control, dilucidar el papel que juega el microambiente en la cavidad oral; las estrategias de evasión de las barreras de defensa del huésped, los mecanismos que utiliza *S. mutans* para colonizar las superficies dentales; las relaciones sinérgicas o antagónicas entre

los diferentes microorganismos que se encuentran en la PDB, de igual forma a partir de nuestros resultados es posible establecer un indicador de riesgo potencial para el desarrollo de caries dental e incrementar las medidas preventivas en poblaciones que por las características del desarrollo dentario, inmunológico, los hábitos alimenticios y la predisposición genética son potencialmente susceptibles.

Bibliografía

1. Center for Disease Control and Prevention. National Center for Chronic Disease Prevention and Health promotion May 2000.
2. Gordon N. *Etiology and mechanisms of dental caries. Basic and clinical aspects*. Blackwell Scientific Publication, Oxford, London, Edinburgh. 1994: 123-130.
3. Tenovuo J, Lehtonen OP, Aaltonen AS. Caries development in children in relation to the presence of mutans Streptococci in dental plaque and serum antibodies against whole cells and protein antigens I/II of *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 1990; 24: 59-64.
4. Jensen B, Bratthall D. A new method for the estimation of mutans Streptococci in human saliva. *J Dent Res* 1981; 68: 468-471.
5. Bratthall D, Hoszek A, Zha X. Evaluation of a simplified method for site-specific determination of mutans streptococci levels. *Swed Den J* 1996; 20: 215-220.
6. Baca P, Liebana J, Piedrola G. Epidemiological application of a new bacteriocin typing scheme for *Streptococcus mutans*. *Community Dent Oral Epidemiol* 1990; 18: 194-196.
7. Smorawsinska M, Kuramitsu HK. DNA probes for detection of cariogenic *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7: 177-181.
8. Ono T, Hirota K, Nemoto K, Fernandez EJ, Ota F, Fukui K. Detection of *Streptococcus mutans* by PCR amplification of *spaP* gene. *J Med Microbiol* 1994; 41: 231-235.
9. Igarashi T, Yamamoto A, Goto N. Rapid identification of mutans streptococcal species. *Microbiol Immunol* 1996; 40: 867-871.
10. Igarashi T, Yamamoto A, Goto N. Direct detection of *Streptococcus mutans* in human dental plaque by polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 1996; 5: 294-298.
11. Marmur J. A Procedure for the isolation of Desoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol* 1961; 3: 208-218.
12. Grainger RM, Nikiforuk G. Determination of relative caries experience. *J Can Dent Ass* 1960; 26: 531.

Reimpresos:

Luis Alejandro Aguilera Galaviz
Homobono Guzmán No. 101
Ave. Quebradilla Col. Caminera
Zacatecas, Zac. México C.P. 98000
E-mail: aguileraagalaviz@hotmail.com
Este documento puede ser visto en
www.medigraphic.com/adm