

# Infecciones asociadas a biofilms supragingival II

Prof. M.Leyla Gómez C.

14-15 de Noviembre de 2011

# *Streptococcus* orales

- Grupo pyogénico
- Grupo anginosus
- Grupo mitis
- Grupo salivarius
- Grupo bovis
- Grupo mutans

## Grupo mutans

- *S.mutans*
- *S.sobrinus*
- *S.cricetus*
- *S.rattus*
- *S.macacae*
- *S.downei*
- *S.ferus*

Reservorio/habitat de las especies del grupo mutans.

*S. mutans* y *S. sobrinus* :cavidad oral de seres humanos.

*S. cricetus* :cavidad oral de ratas, hamsters y ocasionalmente humanos.

*S. rattus* :cavidad oral de ratas y ocasionalmente humanos

*S. downei* y *S. macacae* : placa dental de monos

*S. ferus* :cavidad oral de ratas

# *Streptococcus* fuertemente asociados a caries

Género: *Streptococcus*.

Grupo: *Streptococci mutans*.

Especies: *Streptococcus mutans*, biotipo I

serotipos: c, e, f.

*Streptococcus sobrinus*, biotipo IV,

serotipos: d, g, h.

# Mecanismos de patogenicidad de *Streptococcus mutans*

# 1.-Microorganismos acidogénicos,generan ácido a partir de sacarosa.

La sacarosa es desdoblada por acción enzimática en glucosa y fructosa, que ingresan a la célula gracias a un complejo sistema de transporte:

Fosfoenolpiruvato-fosfotransferasa(PEP-PTS)

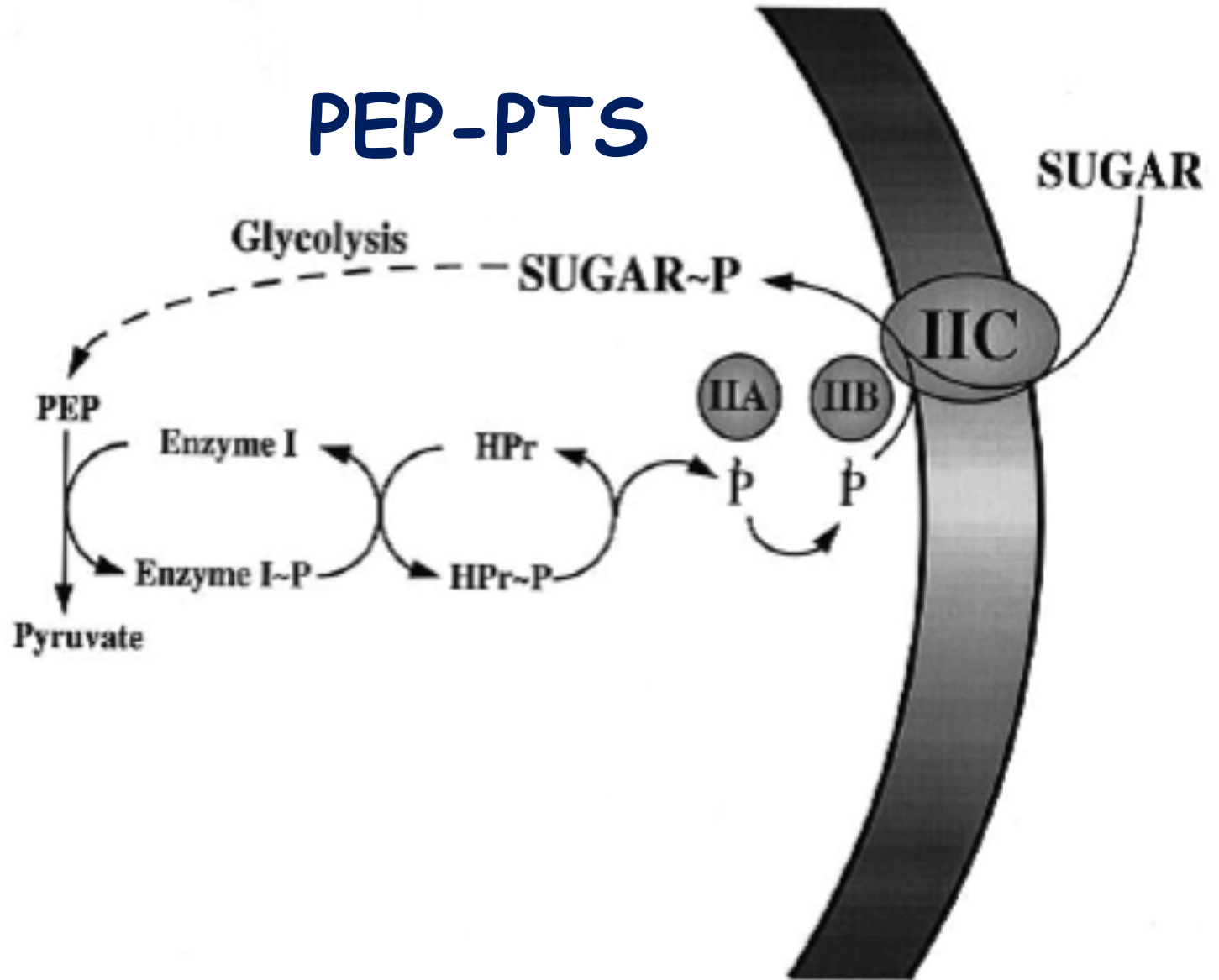
PEP-PTS también es capaz de ingresar sacarosa a la célula.

PEP-PTS cataliza: fosforilación y translocación de mono y disacáridos en una cadena de reacciones enzimáticas que transfieren fosfato desde fosfoenolpiruvato al azúcar que ingresa.

Glucosa y fructosa ingresan a la vía glicolítica, generando ácido láctico como producto final.



# PEP-PTS



## 2.-Síntesis de polisacáridos intracelulares

Cuando hay alta concentración de azúcar, *S.mutans* sintetiza polisacáridos intracelulares que se tiñen con yodo(IPS).

IPS es un glucano tipo-glicógeno

Reserva de IPS puede ser una fuente de ácido cuando disminuye o falta azúcar exógena.

### 3.-Toleran ácido-Acidúricos

*S. mutans* y *S.sobrinus* pueden crecer y continuar con el proceso de glicólisis a un pH inferior a 5 y seguir disminuyendo el pH a valores menores de 4.

La capacidad de tolerar ambiente ácido se atribuye a una F-ATPasa ,que expulsa protones, *S.mutans* expresa mayor cantidad de esta enzima que otras bacterias bucales.

La expulsión de protones vía F-ATPasa otorga un pH interno más básico que el ambiental, protegiendo a enzimas glicolíticas sensibles al ácido.

*S.mutans* posee una vía de reparación de DNA inducible por pH bajo.

*S.mutans* es capaz de montar una respuesta adaptativa de tolerancia al ácido(ATR).

ATR involucra proteínas de novo, importantes para la adaptación a un ambiente ácido.

ATR confiere protección cruzada para otros stress ambientales, como stress oxidativo ,alta osmolaridad,UV.

Cuando a *S.mutans* se le hace crecer a pH ácido es más resistente a la muerte por ácido.

4.-Sintetizan polisacáridos extracelulares(PEC) o exopolisacáridos(EPS) a partir de sacarosa:

El microorganismo produce glucosyl-transferasas(GTFs) y fructosyl-transferasas(FTFs) enzimas extracelulares que hidrolizan sacarosa en glucosa y fructosa.

Crit.Rev.Oral.Biol.Med. 14(2):89-99(2003)

Microbiology and Molecular Biology Reviews,Mar. 2006,157-176

Estas enzimas sintetizan polisacáridos formados por residuos de glucosa(Glucanos) o polisacáridos de residuos de fructosa(Fructanos)

Las enzimas reciben el nombre genérico de glucansucrasas y fructansucrasas.

# GTFs

GTF-S sintetiza glucanos solubles en agua, también llamados dextranos, en los cuales predominan las uniones lineares alfa 1,6.

GTF-I y GTF-SI sintetizan glucanos insolubles en agua en los que predominan las uniones alfa 1,3 con diversos grados de ramificación.

Estos últimos reciben el nombre de mutanos y están asociados con la fuerte adhesión a la superficie dental y con el desarrollo del biofilm.



*S. mutans* produce GTF-I, GTF-SI y GTF-S, por su parte *S. sobrinus* produce GTF-S y GTF-I

*S. sanguis*, *S. oralis*, y *S. gordonii* tienen una sola GTF.

Glucanos tendrían un rol central en la adherencia mediada por sacarosa.

## Fructansucrasas o FTFs

Inulinsucrasas sintetizan Inulina y Levansucrasas sintetizan Levanos.

Levanos consisten de residuos de fructosa con uniones beta 2-6, Inulina consiste de residuos de fructosa con uniones beta 2-1.

Se reporta producción de levanos por *Streptococci* y la producción de inulina por algunas cepas de *Streptococcus mutans*.

Tanto glucanos como fructanos están involucrados en la adherencia entre bacterias y a la superficie dental, modulando la difusión de sustancias a través de la placa.

Además sirven como reserva de energía, pueden proteger a los microorganismos de la desecación, fagocitosis, de los antibióticos o compuestos tóxicos.

## 6.-Sintetizan proteínas que unen glucanos(GBP):

GBPs son un grupo heterogéneo de proteínas, diferentes unas de otras y tienen afinidad por diferentes formas de glucanos.

Las funciones de GBPs incluyen:  
Agregación dependiente de dextrano, inhibición de dextranasa, cohesión de la placa y posiblemente síntesis de pared.

Pueden contribuir a la colonización, promoviendo la agregación y la posterior adherencia a la superficie de la placa.

*S.mutans* sintetiza GBPs A,B C y D,por su parte  
*S.sobrinus* sintetiza GBP-1,2,3,4,y 5.

## 7.- Mutacinas

Son péptidos o proteínas antibióticas, bactericidas para otras bacterias de la misma especie o especies relacionadas, así como para otros microorganismos Gram positivos.

La actividad antimicrobiana de mutacinas puede conferir una ventaja ecológica para el establecimiento y la multiplicación en comunidades bacterianas como el biofilm dental.

# Adherencia independiente de sacarosa

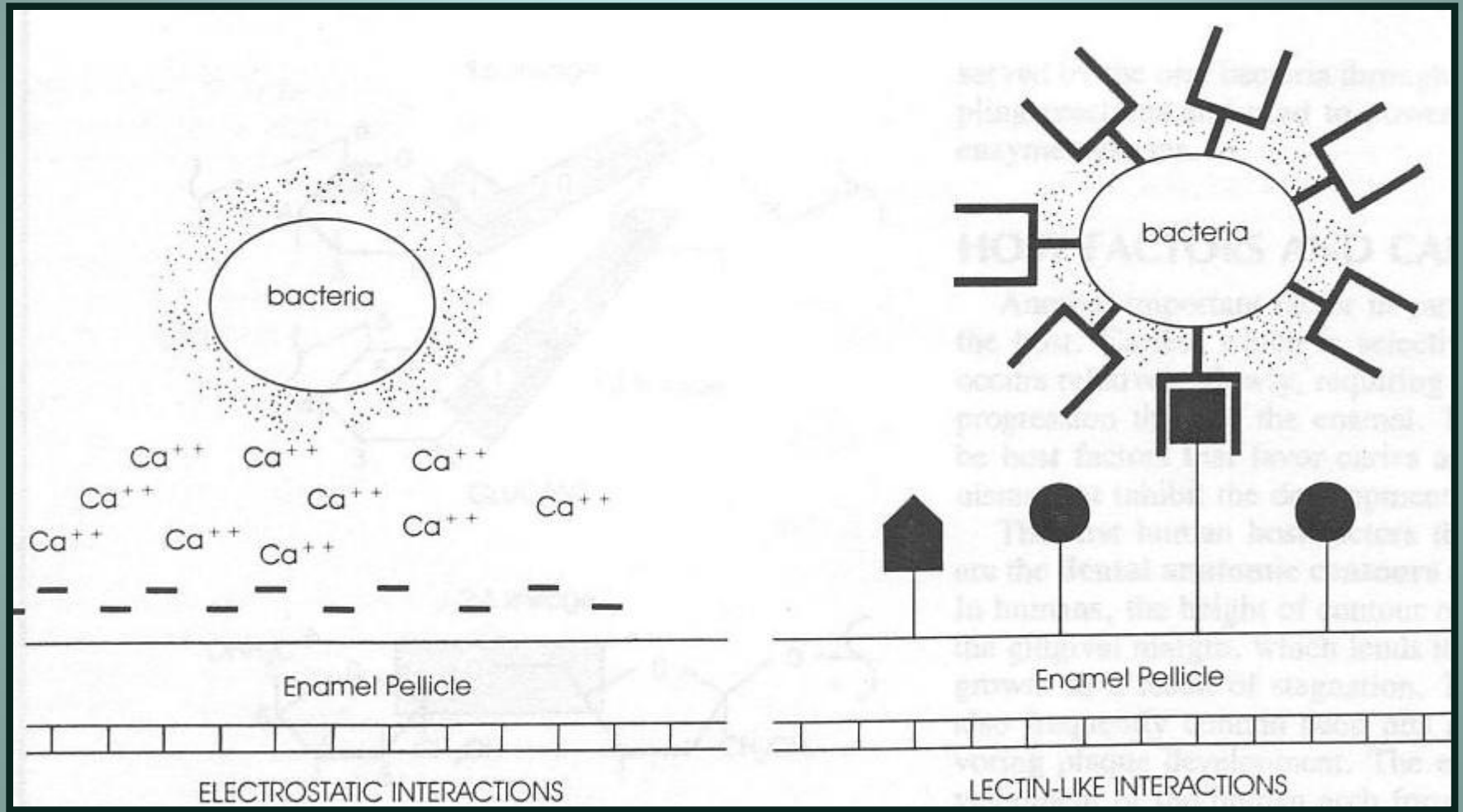
*S.mutans* puede adherirse a la película dental del esmalte en ausencia de sacarosa, gracias a la síntesis de proteínas específicas de superficie llamadas Spa, PI, o Ag I/II.

Cationes divalentes, como  $\text{Ca}^{++}$  permiten la unión a la película cargada negativamente.

Microbiology 2010,10:111

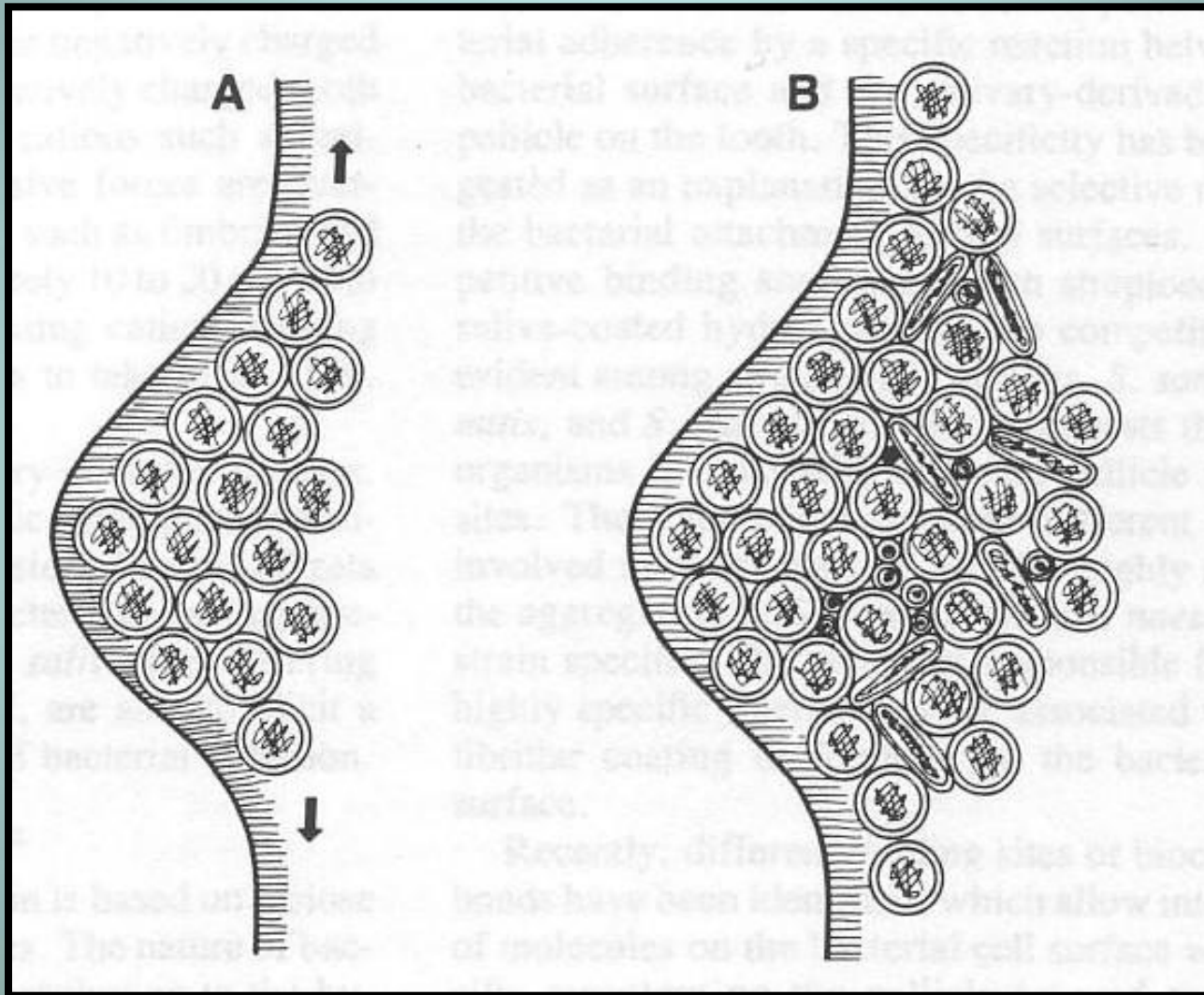
Infection and Immunity,1991,4606-4609

# Adherencia bacteriana a la película dental





# Colonización bacteriana de la superficie dental



# Hipótesis de placa ecológica ( Philip D. Marsh año 1991,1994, Marsh y Bradshaw 1997)

Es semejante a la hipótesis de placa específica,  
considera además principios ecológicos.

A pH neutro, con una dieta convencional, bacterias  
potencialmente cariogénicas son débilmente  
competitivas, se encuentran en baja proporción.

El proceso de remineralización y demineralización está en equilibrio.

Si aumenta la frecuencia de ingesta de carbohidratos fermentables, el biofilm permanece mas tiempo bajo el pH crítico (pH 5.5)

Condiciones de pH bajo favorece la proliferación de bacterias acidúricas y acidogénicas:  
*Mutans streptococci* y *Lactobacilli*

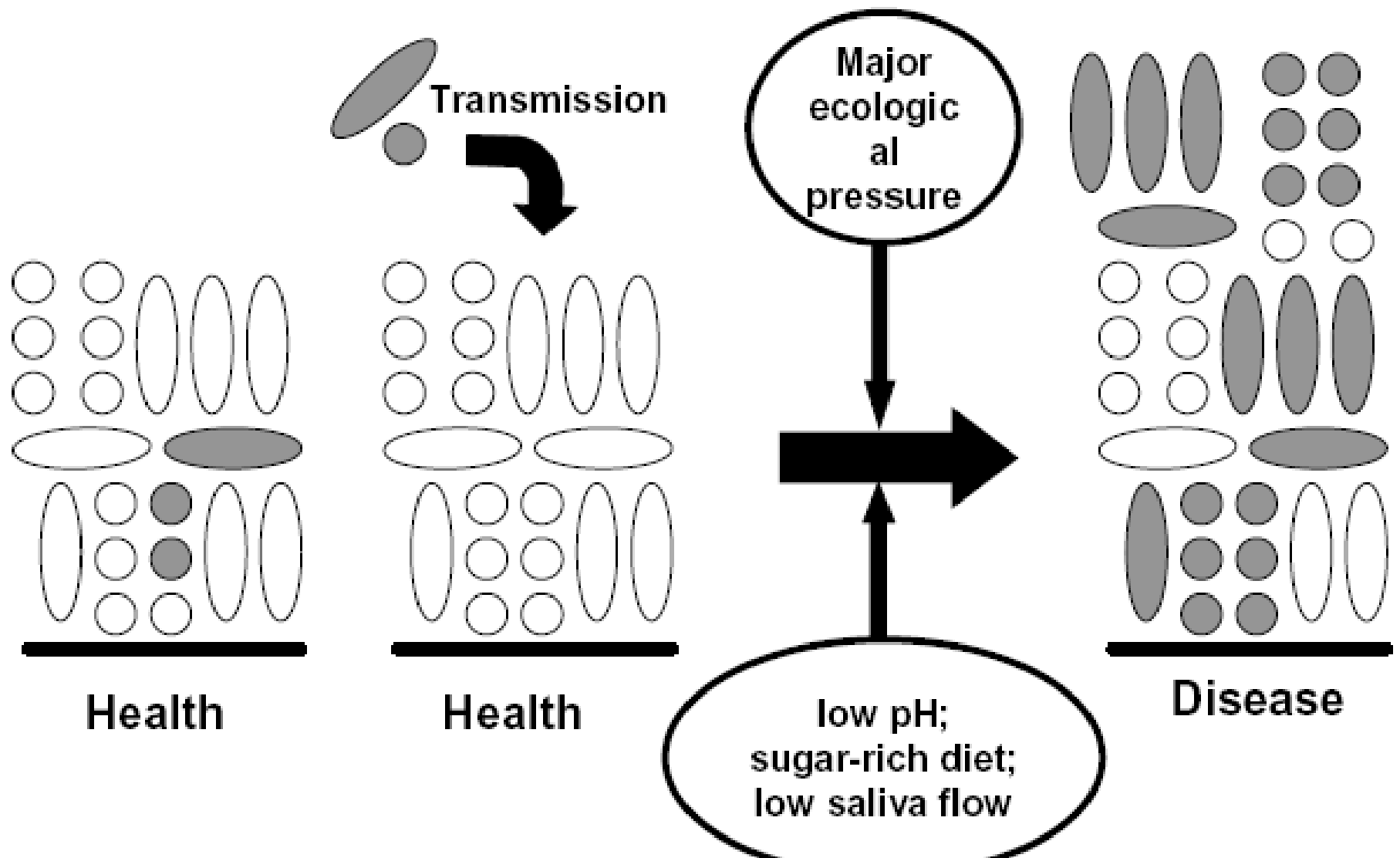
Cepas de otras especies, miembros del grupo *S. mitis* también podrían producir ácido en condiciones similares, pero en bajas cantidades.

Bacterias *no Streptococci mutans* pueden ser responsables de algunos de los estados iniciales de la desmineralización o causar lesiones en ausencia de especies cariogénicas en un hospedero susceptible.

Esta secuencia de eventos dan cuenta de la falta de especificidad en la etiología microbiológica de la caries .

La selección de bacterias patógenas está directamente relacionado con cambios ambientales: pH, potencial redox, dieta, presencia y calidad de los nutrientes de la cavidad oral.

Las enfermedades no requieren de una etiología específica, cualquier especie con características relevantes puede contribuir al proceso de la enfermedad.



# Diagnóstico microbiológico

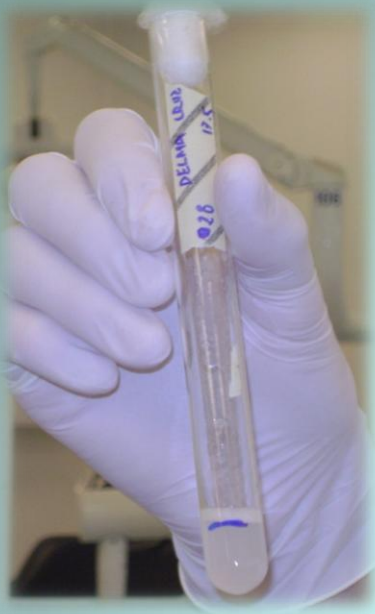


*S. mutans* :Indicador biológico de riesgo  
cariogénico

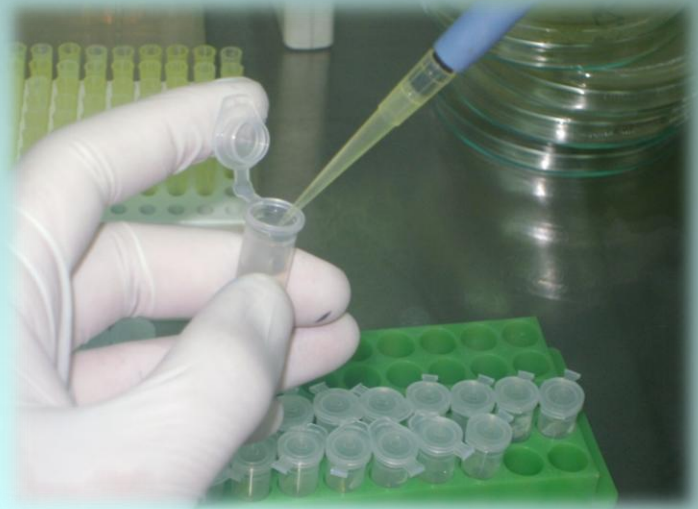
Riesgo de caries:

Recuento de *S.mutans* igual o superior a:

$1 \times 10^5$  UFC *S.mutans*/ml de saliva.



Saliva estimulada



Diluciones de saliva en Buffer



Siembra y diseminación en Agar TYCSB

## 2.-Cultivo:

Incubar a 37°C. en Jarra de anaerobiosis o en Jarra con vela por 48 hrs.



Anaerobiosis



Capnofilia

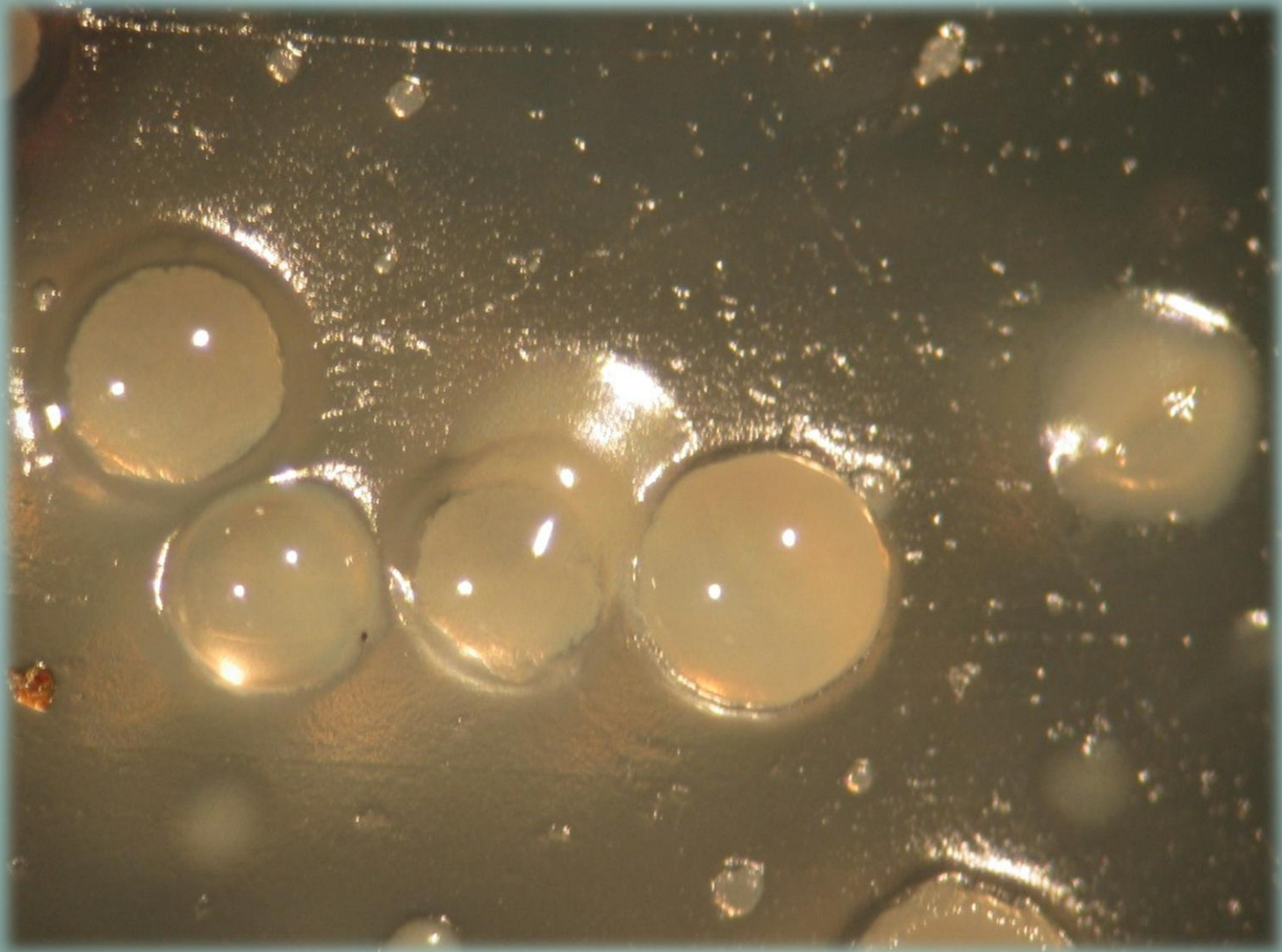
### 3.-Recuento de colonias en lupa estereoscópica



5.-Informe:UFC *S.mutans*/ml de saliva.



# Colonias de *Streptococcus mutans* en agar TYCSB



colonias adherentes,  
transparentes  
y difíciles de disgregar.

Colonias de  
*S. mutans* en agar  
TYCSB



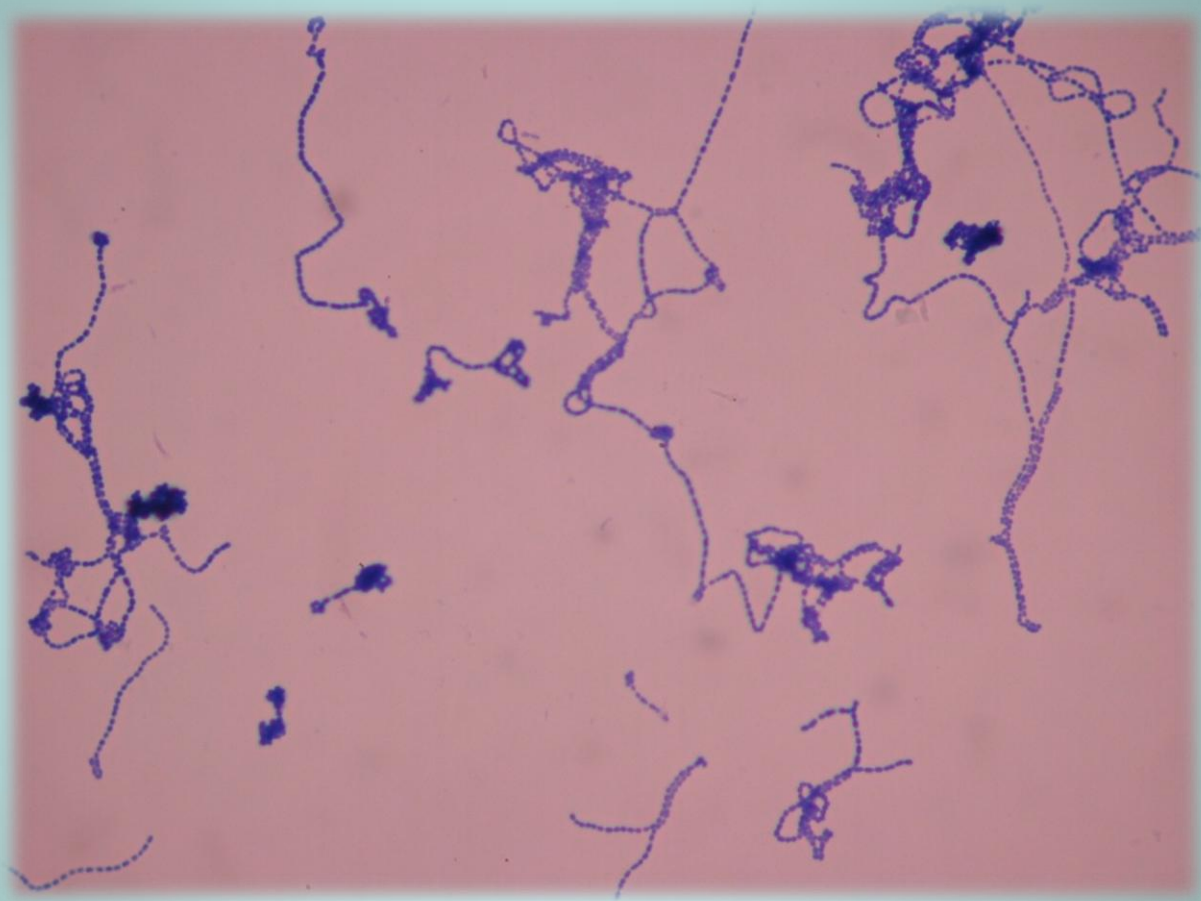


# Colonias de *S.mutans* en agar TYCSB



colonias adherentes,  
transparentes  
y difíciles de disgregar.

# *Streptococcus mutans*-tinción de Gram



Microscopio óptico

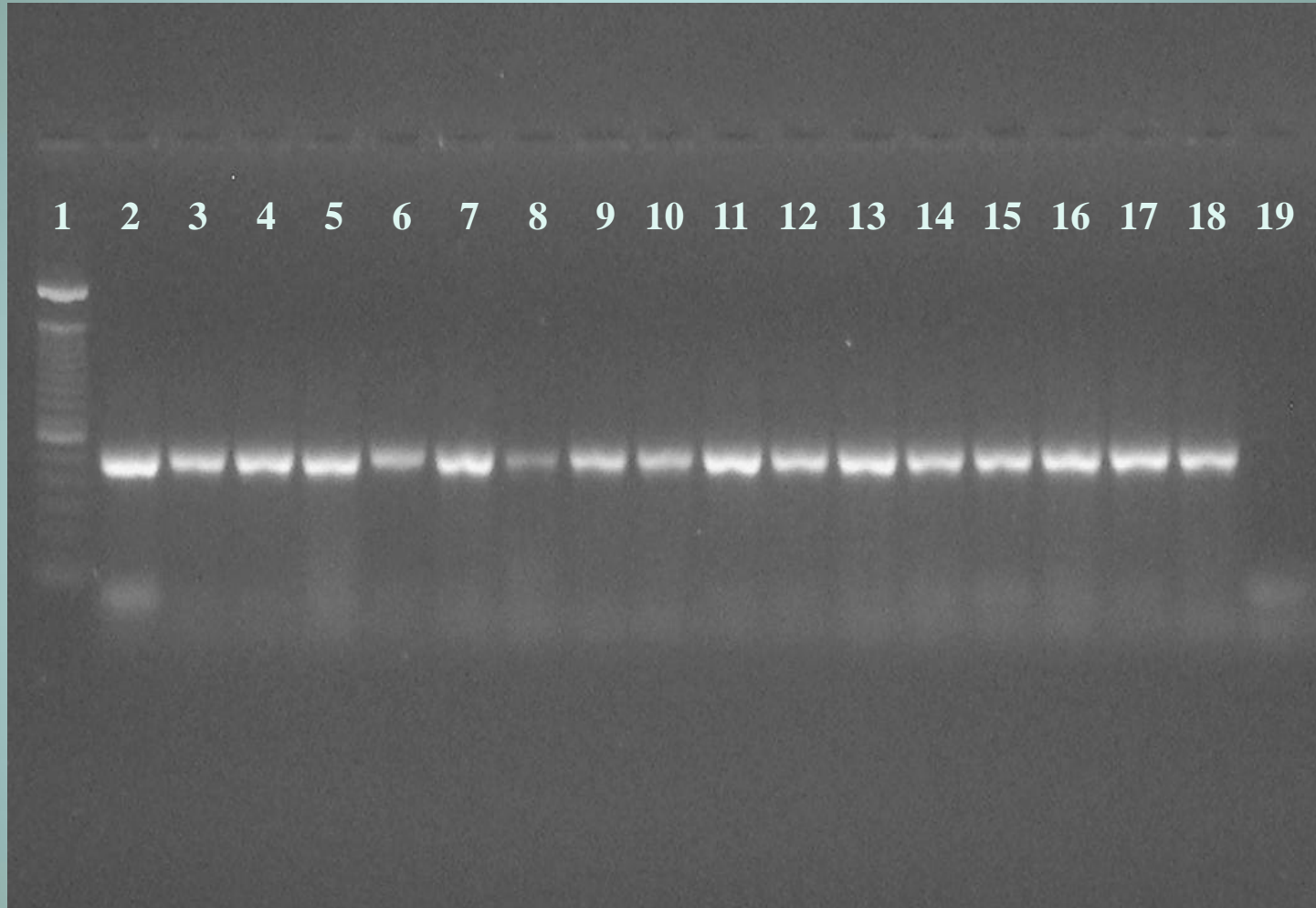


#### 4.-Identificación y Diagnóstico diferencial entre *S.mutans* y *S.sobrinus* en base a pruebas bioquímicas



Esculina, Rafinosa y Melobiosa

# Identificación en base a ensayos moleculares:PCR



PCR con primer GTFB (517bp) de *S.mutans*

Fin de la clase