

La flora de la boca en la era de la biología molecular

Evelio J. Perea ⁽¹⁾

(1) Catedrático-Director del Departamento de Microbiología. Facultades de Medicina y Odontología. Universidad de Sevilla

Correspondencia:

Dr. Evelio J. Perea Pérez

Dpto. Microbiología

Facultades de Medicina y Odontología

Universidad de Sevilla

Apartado 914

41080 Sevilla

Télf.: 954 552 862 Fax: 954 377 413

E-mail: epereap@us.es

Indexed in:

-Index Medicus / MEDLINE / PubMed

-EMBASE, Excerpta Medica

-Índice Médico Español

-IBECS

Perea EJ. La flora de la boca en la era de la biología molecular. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2004;9 Suppl:S1-10.

© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - ISSN 1137 - 2834

RESUMEN

El presente trabajo describe los fundamentos de los Métodos Moleculares que se han aplicado a la Microbiología oral: sondas, PCR, PCR múltiple y en tiempo real, detección de ARNr 16S y proteómica. Asimismo, se expresan los resultados obtenidos de la aplicación de estos métodos al estudio de la flora bacteriana de la cavidad oral. Por medio de la identificación del ARNr 16S se han encontrado hasta 132 especies conocidas y 215 nuevos filotipos desconocidos en las bolsas periodontales de pacientes. Actualmente, utilizamos un sistema comercial que se fundamenta en la PCR múltiple (técnica de ampliación genómica), seguido de hibridación reversa para detectar las cinco especies reconocidas como periodontopatógenas.

También se resumen los hallazgos encontrados con la aplicación de técnicas de proteómica al estudio de la patogénesis de infecciones odontológicas y la aplicación de los métodos moleculares al estudio de resistencia a los antimicrobianos.

Finalmente, se exponen los problemas a resolver en el estudio de la flora oral y en el tratamiento de las infecciones odontógenas. Los métodos tradicionales de cultivo siguen siendo imprescindibles, pues permiten un trabajo posterior con el microorganismo cultivado.

Palabras clave: Microbiología oral, PCR múltiple, técnicas moleculares, PCR, microarrays, sondas, técnicas moleculares de hibridación, técnicas moleculares de ampliación.

INTRODUCCION

En los últimos años, nuestros conocimientos sobre la microbiología oral se han multiplicado exponencialmente gracias a las técnicas de Biología Molecular. Se considera que la cavidad oral del ser humano es el nicho ecológico con mayor biodiversidad conocido hasta ahora. En el año 2001 se estimaba que existían 500 especies en la cavidad oral, hoy se calcula que serían unas 700 las que la habitan.

La mayoría de las especies se consideran comensales, un pequeño grupo de ellas se comporta como patógenos oportunistas en la

propia cavidad oral, otras pueden causar infecciones sistémicas como endocarditis, neumonía por aspiración, osteomielitis en niños y, finalmente, algunas también podrían estar implicadas en la patogenia de la obstrucción coronaria y la trombosis cerebral a través de su contribución a la formación de placas de ateroma. Hasta ahora, nuestra aproximación al conocimiento de la flora microbiana oral lo habíamos realizado por medio del cultivo e identificación bioquímica o cromatográfica de las especies aisladas. Lógicamente, hemos cultivado las especies que podían crecer en esos medios de enriquecimiento o selectivos, pero no podíamos conocer todas aquellas especies que no pueden crecer en ellos y de las que ignoramos sus necesidades nutritivas.

Hasta que no se han estudiado sistemáticamente, las especies bacterianas de la cavidad oral, se han venido determinando por su implicación en la patología sistémica, como en endocarditis infecciosa y abscesos cerebrales o en infecciones de la propia cavidad bucal como periodontitis y abscesos. Actualmente, y gracias a técnicas de biología molecular, empezamos a conocer a través de estudios sistemáticos parte de esa flora oral hasta ahora desconocida (1,2).

En este trabajo expondremos las técnicas de Biología Molecular que se han aplicado a la cavidad oral y algunos ejemplos de los resultados obtenidos con ellas (Tabla 1).

MÉTODOS MOLECULARES

El uso de técnicas microbiológicas convencionales, que requieren el crecimiento de los microorganismos para su posterior análisis fenotípico y bioquímico, ha pasado a ser complementada con la aplicación de métodos moleculares de diagnóstico.

Sondas

La primera técnica de Biología Molecular que se utilizó fue la de sondas de ácidos nucleicos. Con ellas se pretendía detectar si en un microorganismo aislado o muestra clínica existe un trozo o fragmento de ADN o ARN que denominamos diana. Este trozo o secuencia debe ser exclusivo de esa especie microbiana pues, si no, darían positivo también otros microorganismos.

- | |
|---|
| <p>a) Técnicas de amplificación</p> <ul style="list-style-type: none"> - PCR (copia de secuencias de ADN, Diana) - PCR múltiple (microDent®) - Ligasa <p>b) Técnicas de hibridación</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sondas (Ác. nucleicos de microorganismos, Diana) - Microarrays (sondas de ADN en biochips) <p>c) Secuenciación del ARNr 16S</p> <p>d) Análisis proteómico</p> |
|---|

Tabla 1. Nuevas técnicas moleculares

La detección se realiza mediante hibridación (unión) entre ese trozo del ácido nucleico del microorganismo a detectar (diana) y un oligonucleótido sintético (cadena de ADN de sólo varios nucleótidos) con una secuencia de bases complementaria a la diana. A este oligonucleótido complementario de la diana lo denominamos sonda. Para saber si existe un determinado microorganismo en una muestra de un paciente, pondremos ésta en contacto con la sonda y de existir ese microorganismo buscado, se producirá la hibridación entre la sonda y la diana.

La sonda se fabrica por síntesis química, marcándola con alguna molécula que permita su detección una vez producida la hibridación.

Esta técnica de hibridación con sondas se utiliza actualmente para identificar de forma rápida las especies de micobacterias aisladas, identificación que, realizada de forma tradicional, suponía semanas. En combinación con las técnicas de amplificación, la hibridación se utiliza mayoritariamente, así en la técnica microDent®, previa amplificación por PCR (en español, Reacción en Cadena de la Polimerasa) de las muestras obtenidas de las bolsas de pacientes con periodontitis, se identifica si existen bacterias periodontopatógenas por hibridación, con sondas específicas de las cinco especies más características.

PCR

En la actualidad, la PCR es la técnica de amplificación más sensible y la que se aplica más satisfactoriamente en microbiología clínica. En particular, en el caso de patógenos que son difíciles de crecer in vitro o que presentan crecimiento lento, así como en el de todas aquellas infecciones clínicamente atribuibles a nuevos agentes (Tabla 2) se utiliza esta técnica.

Se han desarrollado múltiples protocolos para identificar de forma específica y rápida a bacterias de diagnóstico lento o difícil, como la flora oral implicada en las periodontitis, las diferentes especies de *Mycobacterium*, de *Chlamydia*, etc., también para detectar en ellas la presencia de genes de importancia clínica, como los que codifican resistencia a antibióticos o los que confieren mayor virulencia a los organismos que los portan, por ejemplo en el *Treponema denticola* se ha identificado un fago integrado, responsable de la producción de leucocidina.

La PCR es un método aparentemente simple y muy versátil, que permite obtener múltiples copias de una secuencia diana de ADN mediante un proceso de amplificación. Cualquier segmento de ADN o de ARN puede ser amplificado, siempre que se conozcan las secuencias flanqueantes de la región diana o, lo que es lo mismo, podemos amplificar cualquier porción de

- | |
|---|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Identificación de cepas aisladas en cultivo: Sondas, PCR - Bacterias con deficiente identificación fenotípica - Bacterias de crecimiento lento 2. Diagnóstico directo en muestras de pacientes: Sondas, PCR, microarrays, Técnicas Combinadas, PCR + sondas - Bacterias con requerimientos nutritivos complejos - Bacterias no cultivables - Bacterias de crecimiento lento 3. Estudio de nuevos patógenos: secuenciación del ARNr 16S 4. Estudio de los mecanismos de patogenicidad y de resistencia a los antimicrobianos: sondas, análisis proteómico |
|---|

Tabla 2. Aplicaciones de las Técnicas Moleculares al Diagnóstico Microbiológico

ácido nucleico, conocido o no, siempre que quede comprendido entre dos secuencias conocidas, con las que se podrán hibridar oligonucleótidos complementarios, que actuarán como cebadores para que la polimerasa pueda copiar las bandas de ácido nucleico que nos sirve de molde.

Por último, es conveniente recordar que la PCR es una técnica que, por su aparente simplicidad y su alta sensibilidad, es muy susceptible de errores en su ejecución, además de posibles contaminaciones; por lo que la introducción de la PCR en los laboratorios de microbiología clínica, requiere una formación especializada previa del personal que ejecute los análisis.

PCR múltiple

Durante los últimos años ha cobrado gran interés el desarrollo de las denominadas PCR múltiples, reacciones que consiguen detectar de forma simultánea y en un único tubo diferentes secuencias diana, permitiendo la detección e identificación simultánea de distintos genes de una misma bacteria o de diferentes especies en una sola muestra clínica (3-5).

Esta técnica se ha completado con la utilización de PCR en tiempo real, método que combina la PCR con el uso de marcadores fluorescentes de forma que se pueda registrar la cinética de la reacción. Esto permitirá el desarrollo de nuevos y eficientes protocolos de PCR múltiple por su rapidez y sencillez. Así, la técnica de microDent® utiliza como primer paso una PCR múltiple a partir de muestras de exudado periodontal (6).

Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S

Los ácidos nucleicos y las proteínas, macromoléculas comunes a todos los seres vivos, cambian con el tiempo. Por ello, pueden considerarse como cronómetros moleculares o documentos de la historia evolutiva. Asumiendo que los cambios se producen al azar y que aumentan con el tiempo de manera lineal, las diferencias en la secuencia de los nucleótidos o aminoácidos que integran macromoléculas homólogas, presentes en dos formas de vida, reflejan la distancia evolutiva existente entre ellas (7).

El ARN ribosómico o ribosomal 16S (ARNr 16S) (ARNr específico de procariotas) es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. El análisis de los ARNr 16S se ha utilizado ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procariota, causando

un profundo impacto en nuestra visión de la evolución y, como consecuencia, en la clasificación e identificación bacteriana.

Existen situaciones en las cuales la identificación fenotípica necesita mucho tiempo, resulta difícil, e incluso a veces imposible, en estas circunstancias, la identificación molecular basada en el análisis del ARNr 16S (o del gen que lo codifica) puede representar una ventaja tanto en tiempo como en precisión, llegando incluso a competir de manera favorable con otras técnicas rápidas y eficaces, como las inmunológicas.

Aunque existen cronómetros moleculares alternativos al ARNr 16S, hasta el momento ninguno ha conseguido desplazarle (7-9), de hecho, esta macromolécula presenta una serie de características en base a las cuales fue considerada como un cronómetro molecular definitivo (7):

1. Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales. Constituye, por tanto, una diana universal para su identificación.
2. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios.
3. Los cambios ocurren de manera lo suficientemente lenta como para aportar información acerca de todos los procariotas y, junto con las variaciones en los ARNr 16S (en español, la subunidad menor del ARNr), contienen, sin embargo, suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos.
4. El tamaño relativamente largo de los ARNr 16S (1.500 nt) minimiza las fluctuaciones estadísticas.
5. La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.
6. Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los ARNr 16S existen bases de datos amplias, en continuo crecimiento.

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos se establecen comparaciones con las bases de datos de secuencias de especies ya conocidas. Será el grado de similitud entre las secuencias de los ARNr 16S de dos bacterias lo que indique su relación evolutiva. Además el análisis comparativo de secuencias permite construir árboles filogenéticos, que reflejan gráficamente la genealogía molecular de la bacteria, mostrando su posición evolutiva en el contexto de los organismos comparados.

No obstante, hay que tener en cuenta que es la comparación de genomas completos, y no la comparación de los ARNr 16S, la que aporta una indicación exacta de las relaciones evolutivas (7).

Aplicaciones de la secuenciación del ARNr 16S en el diagnóstico microbiológico

La identificación basada en la secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S en los laboratorios clínicos se centra principalmente en cepas cuya identificación por métodos fenotípicos resulta imposible, difícil o requiere mucho tiempo, incluyendo los siguientes casos:

1. Bacterias no cultivables presentes en muestras clínicas, situación que en ocasiones ha conducido al descubrimiento de nuevos agentes patógenos.
2. Bacterias cuyas características bioquímicas no se adaptan a las de ningún género o especie reconocida (10).

3. Bacterias fastidiosas, a consecuencia de sus requerimientos nutricionales o de crecimiento lento.

La mayoría de las especies anaerobias de la cavidad bucal están comprendidas en las anteriores categorías.

Como conclusión, hoy se puede afirmar que la secuenciación del ARNr 16S constituye un método rápido y eficaz de identificación bacteriana y que nos ha permitido el descubrimiento de nuevas bacterias, especialmente de la cavidad oral. Actualmente, se usa la amplificación por PCR del ARNr 16S y su posterior hibridación con sondas para la detección de las principales especies periodontopatógenas (6,11).

Estudios de resistencia a antimicrobianos

Las sondas son secuencias de ADN o ARN monocatenario marcadas por isótopos o enzimas. Para saber si en una muestra existe una determinada especie o si en una población bacteriana existe un gen de resistencia, el ADN o ARN se escinde y se fija en un soporte sólido (p. ej., nitrocelulosa), de esta manera, puede reaccionar de forma específica con una sonda que reconozca secuencias homólogas.

Se puede determinar la resistencia a antimicrobianos utilizando directamente la propia muestra clínica.

Por desgracia, existían una serie de problemas que dificultaban y limitaban el empleo de sondas de resistencia y las técnicas moleculares de amplificación, como en el caso de :

- El gen de resistencia no siempre llega a expresarse fenotípicamente.
- Muchos microorganismos de la flora saprofita poseen genes de resistencia similares a los de los patógenos, por lo que las sondas de resistencia deben emplearse en muestras no contaminadas de sitios estériles, como sangre, LCR, etc...
- Puesto que cada sonda es específica para un determinado gen, es necesario emplear un gran número de las mismas para el estudio de las diversas resistencias que suelen existir. Esto se ha resuelto con la PCR múltiple y los microarrays.
- En una misma especie pueden existir varios mecanismos de resistencia a un mismo antimicrobiano, sólo detectables si para cada caso se ha diseñado la sonda adecuada.

En los casos en que se detectan genes que codifican toxinas u otros factores de virulencia, la presencia del gen no implica que la proteína esté siendo producida, por lo que la PCR debería aplicarse, siempre que sea posible, en conjunción con métodos bioquímicos y/o inmunológicos. No obstante, tampoco se debe dejar de considerar la gran utilidad que puede tener una detección precoz de información genética, ya que permite la ejecución de medidas preventivas, tanto de tratamiento como de control (4,5).

Microarrays

Es una nueva técnica que combina el método molecular de la hibridación con sondas de ADN, con la tecnología de los biochips o chip microelectrónico (12).

Un array es un conjunto de sondas moleculares fijadas de forma ordenada a un soporte sólido, que pueden llegar a ser de hasta más de 100.000 sondas, lo que supone unas posibilidades casi infinitas de detección simultánea de diferentes genes de un solo microorganismo o de numerosas especies distintas.

En muchas circunstancias o cuadros clínicos pueden estar implicados numerosos patógenos. La PCR múltiple que antes citábamos puede multiplicar un número limitado de genes, pues es difícil realizarlo simultáneamente. Este inconveniente ha sido ampliamente superado por la tecnología de los microarrays. Esta tecnología permitirá identificar no sólo a los posibles patógenos implicados en un síndrome clínico, sino también conocer sus características de patogenidad, epidemiológicas y de resistencia a los antimicrobianos.

Como conclusión, podemos afirmar que los métodos moleculares aplicados al diagnóstico tienen una gran serie de ventajas, pero los métodos tradicionales de cultivo aún siguen siendo imprescindibles, pues permiten un trabajo posterior con el microorganismo cultivado (Tabla 3).

DESVENTAJAS
- No permite el estudio posterior del microorganismo
- No permite el estudio fenotípico de sensibilidad a los antimicrobianos
VENTAJAS
- Facilita el transporte y procesamiento de muestras
- Obtenemos resultados más rápidos

Tabla 3. ¿La identificación molecular es superior al cultivo tradicional?

PROTEOMICA

El término “proteoma” fue acuñado por Marc Wilkins en 1994 para describir “todas las proteínas expresadas por un genoma”.

La genómica y la transcriptómica proporcionan la secuencia de un ADN, los elementos reguladores y la expresión del gen. La “proteómica” ofrece el perfil de proteínas totales de una célula o un microorganismo.

Como método de estudio de la Proteómica se usa la electroforesis en gel bidireccional para separar las proteínas, identificándose las mismas mediante espectrometría de masas. Dado que no todo el genoma se expresa como proteínas, se identifica alrededor del 95% del mismo.

El proteoma es una caracterización de las proteínas expresadas in vitro por un genoma en diferentes condiciones. Pero lo que más se utiliza es el estudio comparativo de dichas proteínas en diferentes condiciones fisiológicas, lo que ofrece una visión de los cambios fenotípicos que sufre un microorganismo en función de las circunstancias que le rodean (13).

Aplicación de la proteómica a la microbiología oral

Caries dental y Streptococcus sobrinus

Se ha detectado que la presencia de flúor en el medio no sólo determina la formación de fluoropatía por el esmalte, lo que le protege de los ácidos bacterianos, sino que el *S. sobrinus*, que expresa diferentes proteínas, en presencia de flúor presenta pérdida de la capacidad de formar lectinas que le permiten la unión de los glucanos y su adherencia al esmalte.

Endocarditis infecciosa

S. gordonii y *S. oralis* forman parte de la flora normal de la boca, los cuales se pueden asociar a endocarditis bacteriana. Cuando estos estreptococos, que viven en la boca a un pH ácido de 6 a 6.5, pasan a la sangre encuentran un pH más elevado, de 7.3. Esto determina cambios en su formación de proteínas lo que le permite entonces adherirse y colonizar las válvulas cardíacas. El tratamiento de la endocarditis producida por estos estreptococos puede ser problemático por el fenómeno de tolerancia a la penicilina que pueden desarrollar los mismos. Por medio de la proteómica hoy conocemos las dos proteínas que producen los *Streptococcus* y que condicionan este fenómeno de tolerancia a la penicilina.

APLICACION DE LA BIOLOGIA MOLECULAR AL ESTUDIO DE LA ETIOLOGIA BACTERIANA DE LA PERIODONTITIS

Hasta ahora, se considera que la mayoría de las especies bacterianas implicadas en las diversas formas de periodontitis son saprofitos comunes de la cavidad oral, que sólo expresan su capacidad patógena en huéspedes genéticamente susceptibles y/o cuando se producen determinadas circunstancias exógenas de riesgo. Dentro de esas especies consideradas “marcadores de periodontitis” se han establecido tres categorías: las muy patógenas: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Bacteroides forsythus*; las patógenas: *Prevotella intermedia* y *Treponema denticola*, estas cinco especies son las que detecta el sistema microDent® (Tabla 4); y finalmente, se citan hasta cinco especies más que potencialmente pueden estar implicadas, si se encuentran en una alta concentración.

Gracias a las técnicas moleculares, se ha estudiado, de qué forma ha sido afectada la flora oral.

Después de los trabajos iniciales en los que, utilizando el estudio del ARN ribosómico 16S, se puso de manifiesto la extraordinaria riqueza y biovariedad que existe en el surco gingival, y en los que se identificaron 132 especies conocidas y 215 nuevos filotipos desconocidos hasta entonces (1) (Tabla 5), se ha tratado de identificar los potenciales patógenos periodontales dentro de esa amplia gama de especies nuevas encontradas (2).

En los casos de periodontitis crónica se han identificado una serie de nuevas bacterias o filotipos aún no cultivados, como los clones DO84 y BH017 pertenecientes al Phylum Bacteroidetes, el clon BB166, perteneciente a *Magasphaera*, además de otros clones no pertenecientes a ningún Phylum conocidos y, finalmente, algunas especies ya conocidas como *Eubacterium saphenum*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella denticola* y *Cryptobacterium curtum*.

En las personas sanas se encontró que entre las especies o filotipos más prevalentes se encontraban dos no identificados ni cultivados aún, como el clon WO90 del Phylum Deferribacter y el BV063 del Bacteroidetes y que se han denominado *Atopobium rimae* o *Atopobium parvulum* (2).

PAPEL DE LOS BIOFILMS EN LAS ENFERMEDADES DE LA BOCA

Las enfermedades de la boca más importantes, como la caries dental, enfermedad periodontal y periimplantitis, se producen

- *Actinobacillus actinomycetemcomitans*
- *Porphyromonas gingivalis*
- *Bacteroides forsythus*
- *Prevotella intermedia*
- *Treponema denticola*

Tabla 4. MicroDent®. Diagnóstico de periodontopatógenos: PCR múltiple del ARNr 16S seguida de hibridación reversa (sondas de ADN). Detecta: saprofitos marcadores de la periodontitis

Población	Nº spp	Nuevos filotipos	Total
Sanos	42	30	72
Periodontitis	46	45	91
Perio. Refract.	112	101	213
Perio. VIH	6	5	11
Total	132	215	347

Tabla 5. Diversidad de especies bacterianas y nuevos filotipos en la flora de la boca en pacientes con periodontitis y personas sanas (1)

por la placa dental. Esta placa es un biofilm formado por microorganismos que se unen firmemente a un sustrato sólido y al mismo tiempo entre ellos mismos por medio de los polímeros que forman. Una vez integradas las bacterias en el biofilm se muestran más resistentes a los antimicrobianos y manifiestan un comportamiento diferente comparativamente con el estado libre (14). Si conociéramos los factores que determinan esta forma de agregación y el desarrollo del biofilm podríamos desarrollar una estrategia de tratamiento y/o prevención de su formación y consecuentemente de las enfermedades odontológicas más frecuentes (14).

CONCLUSION

La aplicación de los métodos moleculares al conocimiento de la flora de la boca y sus características están revolucionando nuestros conocimientos sobre la misma (Tabla 6). Sería necesario revisar los conocimientos que hasta ahora teníamos sobre ella, sus características de patogenicidad, ecología e implicación en las diversas infecciones orales y de esta manera poder establecer unos tratamientos específicos para las diversas especies y los diferentes procesos en que están implicadas.

Como retos futuros en cuanto al tratamiento de las infecciones orales podemos señalar una serie de problemas que resumimos en la Tabla 7. Dentro de ellos debemos destacar la necesidad de conseguir tratamientos más específicos dirigidos a los microorganismos implicados directamente en los diferentes procesos y su resistencia fenotípica cuando están integrados en los biofilms.

- Conocemos poco los componentes de la flora bucal
- Empezamos a asociar algunas especies con determinadas patologías
- No sabemos si esa asociación es de causa-efecto
- No sabemos si esa relación etiológica sería sólo de unos determinados clones dentro de una especie

Tabla 6. Flora de la boca. Conclusiones

- Infecciones mixtas. ¿Cómo tratarlas?
- Bacterias en biofilms. Resistencia fenotípica
- Patógenos específicos. Antimicrobianos de corto espectro
- Resistencias a los antimicrobianos. ¿Prevenir las?

Tabla 7. Infecciones orales. Retos futuros.

Oral flora in the age of molecular biology

PEREA EJ. ORAL FLORA IN THE AGE OF MOLECULAR BIOLOGY. MED ORAL PATOL ORAL CIR BUCAL 2004;9 Suppl:S 1-10.

ABSTRACT

The present work describes the fundamental aspects of the molecular methods that are applied to oral microbiology: probes, PCR, multiple real time PCR, 16S rDNA, and proteomics. Likewise, it presents the results obtained by applying these methods to the study of the bacterial flora encountered inside the mouth. By identifying 16S rDNA, up to 132 known species and 215 new, unknown phylotypes have been detected inside patients' periodontal pockets. We are currently using a commercial system based on multiple PCR (genomic amplification), followed by reverse hybridization to detect the five species known to cause periodontal disease.

We also summarize the findings derived from the application of proteomic techniques to the study of odontologic infections pathogenesis and from the use of molecular methods in the study of resistance to antimicrobial agents.

Finally, it puts forth the problems that remain unsolved with respect to oral flora and the treatment of odontogenic infections. Traditional culture methods continue to be indispensable, as they make it possible to later work with the cultured microorganisms

Key words: Oral microbiology, multiple PCR, molecular techniques, PCR, microarrays, probes, molecular hybridization techniques, molecular amplification techniques.

INTRODUCTION

Thanks to molecular biology techniques, our understanding of oral microbiology has grown exponentially in recent years. The human oral cavity is considered to be the ecological niche with greatest biodiversity known to date. In the year 2001, 500 species were estimated to inhabit the mouth; today it is estimated that the figure is close to 700.

Most of the species are considered to be commensal, a small group of them act as opportunistic pathogens in the mouth itself, others may cause systemic infections such as endocarditis, aspiration pneumonia or osteomyelitis in children, and, finally, some may also be involved in the pathogeny of coronary obstruction and cerebral thrombosis through participation in the formation of atheromatous plaques.

Thus far, our approach to understanding oral microbial flora had been by means of culture and biochemical or chromatographic identification of the isolated species. Logically, we have cultured the species that were capable of growing in enriched or selective media, but we were unable to determine those species that were incapable of growing in these media and those whose nutritional requirements we were unaware of.

Until systematic research on the bacterial species present in the mouth was conducted, these species have been determined through their involvement in systemic disease, such as infectious

endocarditis and cerebral abscesses or in infections of the oral cavity itself, such as periodontitis and abscesses. At present, thanks to molecular biology techniques used in systematic investigation, we are beginning to understand part of this oral flora that, until now, was unknown (1, 2).

We will expound on the molecular biology techniques that have been used in the oral cavity and some examples of the results obtained from them (Table 1).

a) Amplification techniques
- PCR (DNA sequence copy, Target)
- multiple PCR (microDent®)
- Ligase
b) Hybridization techniques
- Probes (microorganism nucleic acids, Target)
- Microarrays (DNA probes in biochips)
c) 16S rRNA sequencing
d) Proteomic analysis

Table 1. New molecular techniques

MOLECULAR METHODS

The use of conventional microbiological techniques that call for growing microorganisms in order to later analyze their phenotype and biochemistry has been complemented with the use of molecular diagnostic methods.

Probes

The first molecular biology technique to be used was nucleic acid probes. The probes were used to detect the presence of a piece or fragment of DNA or RNA, called a target, in an isolated microorganism or clinical sample. This fragment or sequence must be exclusive to that microbial species, otherwise, it would test positive in other microorganisms as well.

Detection takes place by means of hybridization (bonding) between the fragment of nucleic acid belonging to the microorganism to be identified (the target) and a synthetic oligonucleotide (a chain of DNA containing only a few nucleotides) with a sequence of bases that is complementary to the one belonging to the target. The oligonucleotide that is complementary to the target is called the probe. To find out if a certain microorganism is present in a patient's sample, we put the sample in contact with the probe and if the microorganism we are looking for exists, hybridization takes place between the probe and the target.

The probe is created by chemical synthesis by labeling it with a molecule that allows it to be detected once hybridization has occurred.

This hybridization technique with probes is currently used to identify the isolated microbial species quickly; the same identification using traditional techniques would take weeks. Hybridization is predominantly used following amplification with PCR (Polymerase Chain Reaction), as in the case of the microDent® technique. This procedure is applied to samples

taken from the pockets of patients with periodontitis to determine whether or not the samples contain periodontopathic bacteria by means of hybridization using probes that are specific for the five most characteristic species.

PCR

At present, PCR is the most sensitive amplification technique and is the most satisfactory technique used in clinical microbiology. In particular, this technique is applied in the case of pathogens that are difficult to grow in vitro or that are slow-growing, as well as in all infections that are clinically attributable to new agents (Table 2).

1. Identification of cultured isolates: Probes, PCR
 - Bacteria with deficient phenotypic identification
 - Slow growing bacteria
2. Direct diagnosis in patient samples: Probes, PCR, microarrays, Combined Techniques, PCR + probes
 - Bacteria with complex nutritional requirements
 - Non-cultivable bacteria
 - Slow growing bacteria
3. Study of new pathogens: 16S rRNA sequencing
4. Study of pathogenicity and antimicrobial resistance mechanisms: probes, proteomic analysis

Table 2. Molecular Techniques applied to Microbiological Diagnosis

Several different protocols have been developed to specifically and quickly identify slow or difficult to diagnose bacteria, such as the oral flora involved in periodontitis, the different *Mycobacterium* species, *Chlamydia*, etc., as well as to detect the presence of clinically relevant genes in this flora, such as those that code for resistance to antibiotics or those that endow the organisms that carry them with greater virulence; for example, in *Treponema denticola*, an integrated phage has been identified that is responsible for producing leukocidin.

PCR is an apparently simple and highly versatile method of obtaining multiple copies of a target DNA sequence by means of a process of amplification. Any segment of DNA or RNA can be amplified, as long as the flanking sequences of the target are known; in other words, we can amplify any portion of known or unknown nucleic acid, as long as it is located between two known sequences with which complementary oligonucleotides can be hybridized and that will act as primers so that the polymerase can copy the bands of nucleic acid that will serve as a mold.

Finally, it must be remembered that PCR is a technique that, owing to its apparent simplicity and high degree of sensitivity, is susceptible to errors during execution, as well as possible contaminations; the introduction of PCR in clinical microbiology laboratories therefore requires that the personnel in charge of performing the analyses undergo prior specialized training.

Multiple PCR

Great interest has emerged in recent years in the development of the so-called multiple PCRs, reactions that are capable of

simultaneously detecting different target sequences in the same tube, thereby enabling different genes belonging to the same bacteria or different species in a single clinical sample to be detected and identified at the same time (3-5).

This technique has been completed using real time PCR, a method that combines PCR with the use of fluorescent markers that enable reaction kinetics to be recorded. Thanks to its speed and simplicity, this procedure will make it possible to develop new, efficient multiple PCR protocols. Thus, the microDent® technique uses multiple PCR of periodontal exudates samples as a first step (6).

Bacterial Identification by Means of 16S rRNA Sequencing

Nucleic acids and proteins, macromolecules common to all living beings, change over time. Hence, they can be considered molecular chronometers or documents of evolutionary history. Assuming that these changes occur randomly and that they increase linearly over time, the differences in the sequence of the nucleotides or amino acids that comprise homologous macromolecules, present in two forms of life, reflect the evolutionary distance between them (7).

Ribosomal RNA or ribosomal 16S (16S rRNA) (specific prokaryote rRNA) is the most widely used macromolecule in phylogenetic and taxonomic studies. 16S rRNA analysis has been widely used to establish phylogenetic relationships in the world of prokaryotes, exerting a profound impact on our view of evolution and, as a result, on the classification and identification of bacteria.

In certain situations, phenotypic identification is very time-consuming, difficult, and can even be impossible at times. In these circumstances, molecular identification based on 16S rRNA analysis (or the gene that codes it) can be advantageous, both in terms of time and accuracy, and can even come out ahead of other fast, efficient techniques, such as immunological procedures.

Although there are molecular chronometers other than 16S rRNA, thus far, none has managed to displace it (7- 9); in fact, this macromolecule possesses a series of characteristics that have made it a definitive molecular chronometer (7).

1. It is a very old molecule that is present in all currently existing bacteria. Therefore, it is a universal target for identification.
 2. It has remained structurally and functionally constant over a very long period of time, so that alterations in the sequence probably reflect random changes.
 3. Changes take place slowly enough that they are capable of providing information about all the prokaryotes and yet, along with the variations in the SSU rRNA (small subunits) they contain, enough variability as to distinguish not only the most distant organisms, but also the closest ones as well.
 4. Because the 16S rRNA are relatively long (1,500 nt), statistical fluctuations remain at a minimum.
 5. Secondary structure conservation can aid in making comparisons, providing a basis for accurate alignment.
 6. Because it is fairly simple to sequence 16S rRNA, there are large and ever-growing databases.
- Once the sequence of nucleotides has been determined, comparisons are set up with the databases of known species.

The degree of similarity between the 16S rRNA sequences of the two bacteria under study indicates the evolutionary relationship. In addition, comparative sequence analyses make it possible to elaborate phylogenetic trees that serve as a graphic representation of the bacteria's molecular genealogy, showing its evolutionary position within the context of the organisms it is being compared to.

Nonetheless, one must remember that the comparisons of complete genomes, not 16S rRNA comparisons, are what give us an exact indication of evolutionary relationships (7).

16S rRNA Sequencing Applications in Microbiological Diagnostics

Identification based on sequencing the gene that encodes 16S rRNA in clinical laboratories mainly focuses on strains that cannot be phenotypically identified, or whose phenotypic identifications is tedious, including the following cases:

1. Bacteria that are present in clinical samples, but that cannot be cultured; situations of this type have occasionally led to the discovery of new pathogens.
2. Bacteria whose biochemical characteristics do not fit in with any known genera or species (10).
3. Bacteria that are hard to identify, owing to their nutritional requirements or slow rate of growth.

Most anaerobic species in the oral cavity are included in the afore-mentioned categories.

In short, we can now state that 16S rRNA sequencing is a fast, efficient means of identifying bacteria and has enabled us to discover new bacteria, particularly in the oral cavity. PCR amplification of 16S rRNA and its later hybridization with the use of probes is currently used to detect the leading periodontopathogenic species (6, 11).

Antimicrobial Resistance Studies

Probes consist of monocatenary DNA or RNA that has been tagged with isotopes or enzymes. In order to find out if a given species is present in a sample or if there is a gene for resistance in a particular bacterial population, DNA or RNA is separated and fixed onto a solid support (for example, nitrocellulose). Thus, it can react in a specific manner with a probe that recognizes homologous sequences.

Resistance to antimicrobials can be determined by direct use of the clinical sample itself.

Unfortunately, there are a series of problems that impede and limit the use of resistance probes and molecular amplification techniques; for example:

- The gene for resistance is not always phenotypically expressed.
- Due to the fact that many microorganisms of the saprophytic flora have resistance genes that are similar to the ones present in the pathogens to be studied, the resistance probes must be used in uncontaminated samples taken from sterile sites such as blood, CSF, etc.
- Given that each probe is specific for one gene in particular, many probes are needed to study the different resistances that tend to exist. This has been resolved by the use of multiple PCR and microarrays.

- Several different mechanisms of resistance to the same antimicrobial may be present in the same species and can only be detected if the proper probe has been designed specifically for each case.

In those cases in which genes encoding for toxins or other virulence factors have been detected, the presence of the gene does not necessarily mean that the protein is being produced; PCR should therefore be performed along with biochemical and/ or immunological methods whenever possible. However, the usefulness of early detection of genetic information is not to be scorned either, since it enables preventive measures to be taken, for both treatment and control purposes (4, 5).

Microarrays

This new technique combines the molecular hybridization method using DNA probes with biochip or microelectronic chip technology (12).

An array is a set of molecular probes set in an orderly fashion on a solid support and may contain up to 100,000 probes, which represents almost unlimited possibilities for the simultaneous detection of different genes in a single microorganism or in several different species.

Various pathogens may be involved in many circumstances or clinical syndromes. The multiple PCR technique previously mentioned is capable of multiplying a limited number of genes, for it is difficult to do so simultaneously; nonetheless, this stumbling block has been overcome by means of microarray technology. This technique identifies not only the pathogens that may be involved in a clinical syndrome, but also provides information regarding its pathogenic and epidemiological characteristics, in addition to its antimicrobials resistance profile.

In conclusion, it is safe to say that the application of molecular procedures applied to diagnostics offers numerous advantages, but that traditional culture methods are still indispensable, since they allow later work to be carried out with the microorganism that has been cultured (Table 3).

DISADVANTAGES

- It does not allow the subsequent study of the microorganism
- It does not allow the phenotypic study of antimicrobial sensitivity

ADVANTAGES

- Easier sample transport and processing
- Results are obtained faster

Table 3. Is molecular identification superior to traditional culture?

PROTEOMICS

The term, "proteome" was coined by Marc Wilkins in 1994 to describe, "all the proteins expressed by a genome".

Genomics and transcriptomics provide the sequence of a given DNA, its regulating elements, and gene expression. Proteomics provides the profile of all the proteins belonging to a cell or microorganism.

As a means of study, proteomics makes use of bi-directional

gel electrophoresis to separate the proteins, identifying them by means of mass spectrometry. Given that not all the genome is expressed as proteins, approximately 95% of the genome is identified.

The proteome is a characterization of the proteins expressed in vitro by a genome under various conditions. However, what is most commonly used is the comparative study of said proteins under different physiological conditions, which gives us a view of the phenotypic changes a microorganism undergoes depending on the circumstances surrounding it (13).

Proteomics Applied to Oral Microbiology

Dental Caries and *Streptococcus sobrinus*

The presence of fluoride in the medium has been seen to not only determine the formation of fluorapatite by the enamel, which protects it from bacterial acids, but that *S. sobrinus*, which expresses different proteins in the presence of fluoride, loses its capacity to form the lectins that enable glycans binding and adhesion to tooth enamel.

Infectious Endocarditis

S. gordonii and *S. oralis* comprise part of the flora normally found inside the mouth and can be associated with bacterial endocarditis. When these streptococci that live in the mouth at an acid pH level of between 6 and 6.5, move into the bloodstream, they encounter a higher pH level of 7.3. This produces changes in its protein formation, which allows it to adhere to and colonize the heart valves.

Streptococcal endocarditis can be difficult to treat because of its capacity to become tolerant to penicillin. Thanks to proteomics, we now know the two proteins that produce the *Streptococci* and that condition this phenomenon of tolerance to penicillin.

MOLECULAR BIOLOGY APPLIED TO THE STUDY OF THE BACTERIAL ETIOLOGY OF PERIODONTITIS

To date, most of the bacterial species involved in the different forms of periodontitis have been considered to be saprophytes, commonly found in the oral cavity and that only express their pathogenic capacity in genetically susceptible hosts and/ or when specific exogenous circumstances of risk arise. Three different categories have been established within the species considered to be "periodontitis markers": highly pathogenic: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Bacteroides forsythus*; pathogenic: *Prevotella intermedia* and *Treponema denticola*, these five species are the ones detected by the microDent® system (Table 4), and finally, up to five more species are listed that are potentially involved if highly concentrated.

Thanks to molecular techniques, we have been able to study how oral flora has been affected.

The first studies performed with 16S rRNA revealed the extraordinary wealth and biovariety that exists in the gingival sulcus and identified 132 known species and 215 new phylotypes that had been unknown up until that time (1) (Table 5). Since then attempts have been aimed at identifying the potential periodontal

- *Actinobacillus actinomycetemcomitans*
- *Porphyromonas gingivalis*
- *Bacteroides forsythus*
- *Prevotella intermedia*
- *Treponema denticola*

Table 4. MicroDent®. Diagnosis of periodontopathogens: multiple 16S rRNA PCR followed by reverse hybridization (DNA probes). It detects: saprophyte markers of periodontitis

Population	Nº spp	New phylotypes	Total
Healthy individuals	42	30	72
Periodontitis	46	45	91
Refract. Perio	112	101	213
Perio. HIV	6	5	11
Total	132	215	347

Table 5. Bacterial diversity and new phylotypes in bucal flora in patients with periodontitis and healthy individuals (1)

In cases of chronic periodontitis, a series of new bacteria or phylotypes have been identified that have as yet not been cultured, such as the DO84 and BH017 clones belonging to the Phylum Bacteroidetes, the BB166 clone, belonging to Magasphera, in addition to other clones that don't belong to any known Phylum and, finally, some known species, such as *Eubacterium sapheum*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella denticolai*, and *Cryptobacterium curtum*.

It was found that in healthy individuals, among the most prevalent species or phylotypes, there were two that had not been identified or cultured as yet, such as the WO90 clone of the Phylum Deferribacter and the BV063 clone of the Bacteroidetes; they have been named *Atopobium rimae* or *Atopobium parvulum* (2).

THE ROLE OF BIOFILMS IN MOUTH DISEASE

The most relevant illnesses in the mouth, such as dental caries, periodontal disease, and periimplantitis are produced by dental plaque. This plaque is a biofilm that is made up of microorganisms that adhere fiercely to a solid substrate as well as to each other, thanks to the polymers they produce. Once the bacteria are integrated into the biofilm, they are more resistant to antimicrobials and behave differently from those that are found in free form (14). If we knew what factors determine this form of aggregation and biofilm development, we would be able to develop a treatment strategy or even keep it from forming and consequently, prevent one of the most common odontologic diseases (14).

CONCLUSION

The application of molecular methods to the understanding of oral flora and its characteristics is revolutionizing what we know about this flora (Table 6). We need to revise what we know thus far, its characteristics, pathogenic capability, ecology, and its

role in different oral infections and thereby, be able to establish specific treatments for the different species and for the processes in which they are involved.

Table 7 summarizes a series of problems that we can put forth as challenges for the future with respect to treating oral infections. Amongst them, we should point out the need to achieve more specific treatments aimed at the microorganisms that are directly involved in the different processes and their phenotypic resistance when they are integrated into biofilms.

- Oral flora components are little known
- Some species are beginning to be associated with certain pathologies
- We don't know if such association is cause-effect
- We don't know if that etiologic association applies only to particular strains in the species

Table 6. Oral flora. Conclusions

- Mixed infections. How to treat them?
- Bacteria in biofilms. Phenotypic resistance
- Specific pathogens. Narrow spectrum antimicrobials
- Antimicrobial resistance. Should be prevented?

Table 7. Oral infections. Future challenges.

BIBLIOGRAFIA/REFERENCES

1. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001;183:3770-83.
2. Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res* 2003;82:338-44.
3. Méndez-Álvarez S, Pérez Roth E. La PCR múltiple en Microbiología Clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clín* 2004;22:183-91.
4. Pérez-Roth E, Claverie-Martín F, Villar J, Méndez Álvarez S. Multiplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of methicillin and mupirocin resistance. *J Clin Microbiol* 2001;39:4037-41.
5. Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2003;41:4089-94.
6. Eick S, Pfister W. Comparison of microbial cultivation and commercial PCR based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 2002;29:638-44.
7. Rodicio MR, Mendoza MC. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microb Clin* 2004;22:238-45.
8. Relman DA, Loutit JS, Schmidt TM, Falkow S, Tompkins LS. The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens. *N Engl J Med* 1990;323:1573-80.
9. Patel JB. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diagn* 2001;6:313-21.
10. Woo PC, Ng KH, Lau SK, Yip KT, Fung AM, Leung KW, et al. Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. *J Clin Microbiol* 2003;41:1996-2001.
11. Ishihara K, Nabuchi A, Ito R, Miyachi K, Kuramitsu HK, Okuda K. Correlation between detection rates of periodontopathic bacterial DNA in carotid

coronary stenotic artery plaque and in dental plaque samples. *J Clin Microbiol* 2004;42:1313-5.

12. Domenech-Sánchez A, Vila J. Fundamento, tipos y aplicaciones de los arrays de ADN en la microbiología médica. *Enferm Infecc Microb Clin* 2004;22:46-54.

13. Macarthur DJ, Jacques NA. Proteome analysis of oral pathogens. *J Dent Res* 2003;82:870-6.

14. Sbordone L, Bortolaia C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin Oral Invest* 2003;7:181-8.