

## DETECCIÓN DE *ESTREPTOCOCOS SALIVARIUS* Y *S. ORALISEN* LA SALIVA POR PCR

Ref.PCR10

### 1.OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

**El objetivo de este experimento es introducir a los estudiantes en los principios y práctica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como herramienta para la detección de bacterias presentes en la cavidad oral.**

**Los estudiantes adquirirán conocimientos básicos sobre la biología y microbiología de las bacterias de la cavidad oral.**

### 2. INTRODUCCIÓN

#### **2.1 Bacterias presentes en la cavidad oral**

La cavidad oral es un ambiente ideal para la colonización de bacterias, hongos, protozoos, arqueas y virus. Esto se debe a que la cavidad oral es una cavidad húmeda y cálida (35°C – 37°C), el cual es adecuado para el crecimiento de múltiples microorganismos. La cavidad oral no solo provee de abundante y continuo flujo de nutrientes para el crecimiento de bacterias, sino también de proteínas de la saliva y glicoproteínas, como componentes de la dieta como carbohidratos. Como resultado, la boca alberga más de 700 especies de bacterias y un amplio espectro de virus, arqueas, hongos y protozoos. Pero no todos los organismos que se encuentran en la cavidad oral se encuentran en la misma proporción y en toda la boca por igual, sino que existen distintos nichos microbiológicos, dependiendo de la cantidad de nutrientes que llega a la zona, pH, cantidad de oxígeno, fuerza de la saliva y masticación.

La saliva es el fluido biológico que recubre la cavidad oral. Se trata de un líquido hipotónico con respecto al plasma y en su composición encontramos enzimas como la amilasa, componentes de la inmunidad, entre otras moléculas. Al tratarse de un fluido fácilmente accesible puede usarse para la evaluación de la salud oral general, extracción de ADN, entre otras.

Entre las distintas bacterias presentes en la cavidad oral, el género estreptococos es principal. Los estreptococos se encuentran en la mayoría de las partes del cuerpo humano y son la especie dominante en la cavidad oral humana y en el tracto respiratorio superior. Las especies del género estreptococo fueron inicialmente diferenciados según el patrón de hemólisis que presentaban en las placas agar sangre, clasificándose en  $\beta$ -hemolíticos (generan una lisis completa),  $\alpha$ -hemolíticos (generan una lisis parcial) y  $\gamma$ -hemolíticos (no hemolíticos). Muchas especies  $\beta$ -

hemolíticas fueron diferenciadas entre ellas a posterior gracias al estudio de los antígenos de carbohidratos, dividiéndose en grupo A (*S. pyogenes*) y grupo B (*S. agalactiae*). Históricamente el estreptococo oral por excelencia ha sido el *Streptococcus viridans*. *S. viridans* es una bacteria gram positiva  $\alpha$ -hemolítica, que presenta una hemólisis característica, forma un halo verdoso a su alrededor. Hoy en día aun se usa el estudio de la hemólisis para clasificar a los distintos estreptococos.

Los estreptococos orales fueron clasificados inicialmente en cuatro grupos: anginosus, mitis, mutans and salivarius. Mientras que los estreptococos encontrados fuera de la cavidad oral fueron clasificados en los grupos bovis y pyogenic. Recientemente, usando estudios filogenéticos más robustos, los reclasificaron en 8 grupos: mitis, sanguinis, anginosus, salivarius, downei, mutans, pyogenic and bovis. En la cavidad se han encontrado todos menos pyogenic y bovis. El grupo mitis es el más extendido en la cavidad oral con 20 especies distintas.

La diversidad de la microflora oral aumenta durante los primeros meses de vida. El pionero de las diferentes especies de bacterias orales es principalmente estreptococos, particularmente *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis* y *Streptococcus oralis*. Estos colonizadores tempranos van seguidos de anaerobios gram negativo, como *Prevotellamelaninogenica*, *Fusobacterium nucleatum*, y *Veillonella* spp. Bacterias como *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis* empiezan a colonizar la cavidad oral en el momento en que salen los primeros dientes, siendo capaces de atacar los tejidos dentales con el fin de desarrollar y madurar los biofilms orales. Desde el primer mes de vida hasta el primer año y en la vida adulta, el microbioma oral se convierte mucho más diverso y con mecanismos específicos influenciado por los factores ambientales y el sistema inmune.

El proyecto de microbioma humano lanzado en 2008 fue un proyecto que trató de definir el microbioma de las distintas zonas del cuerpo humano, incluyendo la cavidad oral, siendo el primer análisis de la diversidad y abundancia de bacterias en el ser humano. Este proyecto estudió la diversidad de la flora del cuerpo humano a través de métodos de secuenciación, pudiendo así identificar muchos más organismos que por los métodos clásicos. Ya que el cultivo de bacterias de la cavidad oral es todo un reto, ya que algunas bacterias orales necesitan requerimientos específicos de nutrientes para su crecimiento, otras son inhibidas por sustancias presentes en el medio de cultivo o sustancias que son producidas por otras bacterias.

### **Microambientes orales**

Las propiedades físicas y biológicas de la cavidad oral pueden ser muy distintas entre las personas, y de aquí viene la gran diversidad de comunidades microbiológicas que se han adaptado a los diferentes nichos de la cavidad oral. Algunas comunidades colonizan la mucosa oral como es la lengua, las mejillas, las encías y el paladar, mientras que otras colonizan zonas más duras como son los dientes. Otros factores que afectan a la composición de la comunidad es la disponibilidad de nutriente y los potenciales redox, pH, condiciones atmosféricas, salinidad y acceso a la saliva.

La carga de microorganismos en las mucosas es relativamente baja a causa de la descamación, sin embargo, la colonización aumenta en los sitios donde no se produce este proceso. Más concretamente, los biofilms orales se desarrollan y

maduran en lugares de la cavidad oral que se encuentran relativamente protegidos de las acciones mecánicas de la lengua, las mejillas, los alimentos y el cepillado de los dientes. Para persistir en la cavidad oral, los microorganismos orales se adhieren a la mucosa o bien a otros organismos. Esta cohesión facilita la cooperación nutricional, transferencia de genes y señalizaciones célula- célula. Además, este tipo de crecimiento en biofilm hace que sean más tolerantes al estrés ambiental, las defensas de huésped, y los agentes antimicrobianos en comparación con el crecimiento aislado de las diferentes bacterias.

## 2.2 El género *Streptococcus*

El grupo *Streptococcus* forma parte de la flora normal de la boca y del tracto respiratorio superior y la mayoría de ellos son susceptibles a la penicilina G. Algunas de estas especies pueden causar endocarditis, caries o enfermedades en personas inmunocomprometidas.

### ***Streptococcus oralis***

*Streptococcus oralis* es una bacteria comensal que forma parte del grupo Mitis. *S. oralis* es un componente del microbiota oral humana y de los primeros colonizadores de la cavidad oral. Es una bacteria gram positiva, inmóvil,  $\alpha$ -hemolítico que forma cadenas de cocos. Las condiciones óptimas de crecimiento son a temperatura entre 30-35 °C. El genoma de *S. oralis* es un cromosoma circular, el cual presenta una elevada similitud con el cromosoma de *S. pneumoniae* y *S. mitis*. La diferencia con *S. pneumoniae* es que *S. oralis* ha perdido los genes de patogenicidad.

*S. oralis* es un patógeno oportunista que afecta sobre todo a personas inmunosuprimidas o con cánceres hematológicos. Es conocido por provocar caries, endocarditis bacteriana, síndrome de distrés respiratorio en adultos y shock estreptocócico. El tratamiento de elección son las penicilinas.

### ***Streptococcus salivarius***

*Streptococcus salivarius* es una bacteria comensal. Es uno de los primeros colonizadores de la cavidad oral, tracto respiratorio superior e intestinos después del nacimiento. Se cree que además ayuda a la homeostasis del sistema inmunitario y regula la respuesta inflamatoria. Se trata de una bacteria gram positiva esférica facultativa anaeróbica. El genoma de *S. salivarius* es un cromosoma circular de 2.2 millones de pares de bases.

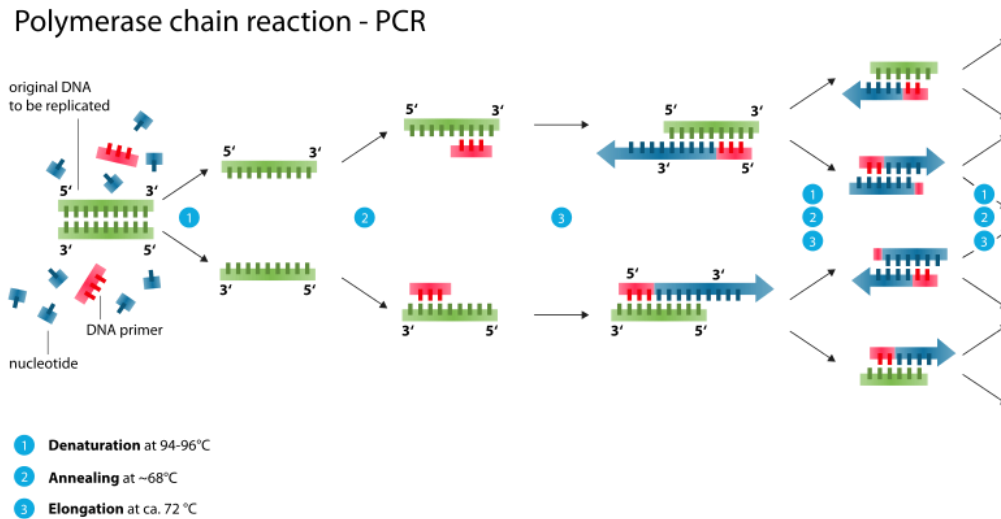
Es considerado un patógeno oportunista, viéndose en casos de sepsis en inmunodeprimidos con neutropenia, enfermedad asociada a la depleción de los niveles de las células de la línea blanca del organismo.

## 2.3 El análisis por PCR

En una reacción de PCR, el primer paso es la preparación de la muestra de ADN que es extraída de varias fuentes biológicas o tejidos. En la PCR, el ADN o gen a amplificar se define como "target" (diana) y los oligonucleótidos sintéticos utilizados se definen como "primers" (cebadores). Un set de 2 cebadores de entre 20-45 nucleótidos son sintetizados químicamente para que se correspondan con los extremos del gen a amplificar. Cada cebador se une a uno de los extremos de cada cadena de ADN y es el punto de inicio de la amplificación.

Una reacción típica de PCR contiene ADN, Taq polimerasa y los 4 dNTPs en un tampón de reacción apropiado. El volumen total de la reacción es de 25-50  $\mu$ l. En el primer paso de la reacción de PCR, las cadenas complementarias de ADN se separan (desnaturalizan) la una de la otra a 94°C, mientras que la Taq polimerasa

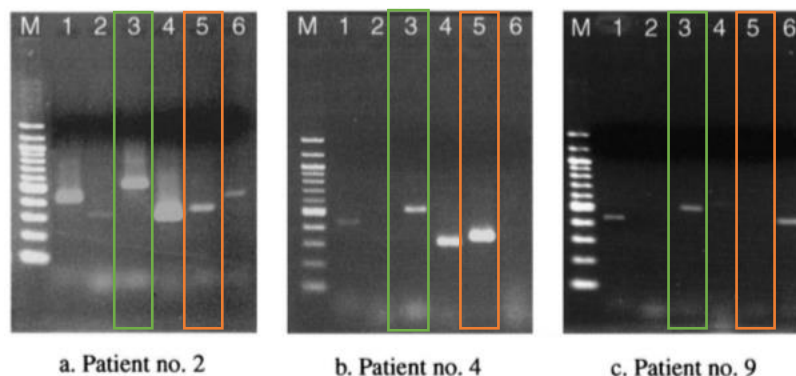
permanece estable. En el segundo paso, conocido como emparejamiento, la muestra es enfriada a una temperatura entre 45-65°C que permita la hibridación de los 2 cebadores, cada uno a una hebra del ADN molde. En el tercer paso, conocido como extensión, la temperatura es elevada a 72°C y la Taq polimerasa añade nucleótidos a los cebadores para completar la síntesis de una nueva cadena complementaria.



Estos tres pasos, desnaturalización-emparejamiento-extensión, constituye un ciclo de PCR. Este proceso se repite durante 20-40 ciclos amplificando la secuencia objeto exponencialmente. La PCR se lleva a cabo en un termociclador, un instrumento que es programado para un rápido calentamiento, enfriamiento y mantenimiento de las muestras durante varias veces. El producto amplificado es luego detectado por separación de la mezcla de reacción mediante electroforesis en gel de agarosa.

### PCR detección de *Streptococcus oralis* y *Streptococcus salivarius*

Los primers que se utilizan para la reacción de PCR, por un lado, amplifican los genes específicos para la bacteria *S. oralis*, y, por otro lado, los genes específicos de *S. salivarius*. En este caso, si hay presencia de *S. oralis* en la saliva nos amplificará un fragmento de 374 pb, mientras que si hay presencia de *S. salivarius* se nos amplificará un fragmento de 544 pb.



**Análisis en gel de agarosa de *S. salivarius* y *S. oralis*.** La amplificación de los distintos primers se ha realizado en varios pacientes y de forma independiente. Correspondiendo al pocillo número 3 la amplificación para *S. salivarius* (marcado en color verde) y el número 5 para *S. oralis* (marcado en color naranja). Podemos observar que los tres pacientes analizados en la imagen presentan *S. salivarius* en su saliva, mientras que para *S. oralis* el paciente 9 no presenta este tipo de estreptococo en su muestra de saliva.

### **3. EXPOSICIÓN DE LOS HECHOS**

Se recolectará aproximadamente 1,5 ml de saliva de los alumnos en el tubo correspondiente de recogida de muestra de saliva. Se recomienda no haber comido nada durante los 30 minutos previos a la toma de muestra. Para ello pasar la lengua con movimientos arriba-abajo por las paredes de las mejillas, mandíbulas y paladar para recoger las células.

### **4. COMPONENTES**

Tampón de electroforesis concentrado 10x	100 ml	
Agarosa	6,0 gr	
Mix PCR detección <i>S. salivarius</i> y <i>S. oralis</i>	2 x 350 µl	-20°C
Control positivo ADN <i>S. salivarius</i> y <i>S. oralis</i>	10 µl	-20°C
GELSAFE tinción ADN	25 µl	4/8°C

**Tampón de electroforesis 10 X para preparar Tampón de electroforesis 1 X que es el Tampón de trabajo para hacer los geles y el de la cubeta.**

### **5. PRÁCTICA**

#### **5.1 EXTRACCIÓN DEL ADN DE LA MUESTRA DE SALIVA**

Cada alumno recogerá una muestra de saliva propia en un tubo de recogida de saliva o vaso. **Se RECOMIENDA el uso de nuestro DANAGENE SALIVA Kit**

#### **5.2 REACCIÓN DE LA PCR**

**NOTA: Utilizar siempre puntas con filtro y cambiar de punta cada vez que se realiza una acción para evitar contaminaciones que puede dar lugar a falsos resultados.**

1. Utilizar 2,5 µl (100-250ng) del ADN de cada extracción de ADN. Importante:
  - a) Preparar un control negativo de amplificación, para ello colocar 5 µl de agua libre de nucleasas en lugar del ADN, esto sirve para saber si los reactivos o micropipetas y puntas pueden estar contaminados con ADN, no se ha de amplificar nada.
  - b) Preparar un control positivo de amplificación, para ello colocar 2,5 µl del ADN proporcionado en el kit
2. Las concentraciones típicas de los "primers" y parámetros utilizados dependerá de cada sistema utilizado. Una concentración final típica de "primers" es 0,5 µM.

Reactivos	Volumen
Mix PCR	22,5 µl
ADN (100-250ng)	2,5 µl
Volumen total	25 µl

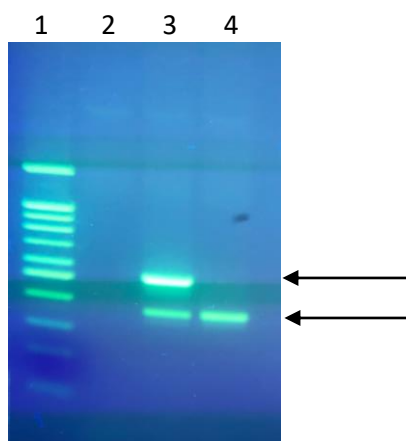
- Mezclar bien, el colorante rosa está incluido en la polimerasa facilitando el proceso.
- Realizar el proceso de amplificación. Importante: Para la activación de la Polimerasa "Hot Star" es necesario programar un paso de desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C, después programar los 30 ciclos específicos de cada producto a amplificar.

#### Programa PCR

Paso	Temperatura	Tiempo
<b>Desnaturalización Hot Star</b>	94°C	5 minutos
<b>Ciclos PCR</b> Realizar 30 ciclos	98°C	10 segundos
	66°C	60 segundos
	72°C	45 segundos
<b>Extensión final</b>	72°C	5-10 minutos
<b>Final</b>	4°C	

- El producto de la PCR puede ser sembrado directamente en un gel de agarosa 2% después de la PCR, ya que el colorante rosa actúa como tampón de carga.
- Utilizar el método de detección o tinción de ADN que se use en el laboratorio. Le recomendamos el uso del GELSAFE suministrado en el kit.

## 6. RESULTADOS



Gel de agarosa 2%

- Marcador de peso molecular
- Control negativo
- Muestra 1 de saliva
- Muestra 2 de saliva

Se presenta un ejemplo de resultado de la amplificación de los controles negativo para la amplificación (comprobar que los reactivos de la PCR no estuvieran contaminados por ADN) y dos muestras de saliva. En la primera muestra de saliva (2) se ve que hay amplificación para los dos estreptococos estudiados, apareciendo una banda de 544 y de 374 pb respectivamente, mientras que la segunda muestra de saliva solo presenta *S. oralis* en su saliva, viéndose pues solo amplificada la banda de 374 pb.

## 7. PREGUNTAS Y RESPUESTAS SOBRE LA PRÁCTICA

Una serie de preguntas se pueden realizar a los alumnos sobre la práctica:

1. **¿Cuál es la función de los 4 nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) en una reacción de PCR?** Los 4 dNTPs son los componentes del ADN. Para la síntesis de ADN se requiere un ADN molde y 2 cebadores, la cadena opuesta del molde es sintetizada siguiendo la regla de emparejamiento de bases de Watson-Crick.
2. **¿Por qué hay 2 diferentes cebadores o "primers"?** Presentan una secuencia diferente que coincide con el inicio y final del gen o secuencia a amplificar (ADN molde)
3. **¿Qué tipo de estreptococo hallo presente en mi muestra de saliva?** Aquellas personas con dos líneas en el gel de agarosa serán positiva para los dos estreptococos estudiados, mientras que aquellas que solo presenten una línea tendrán que ver de cual de las dos líneas se trata si la de peso molecular más elevado o el más bajo para poder identificar el estreptococo.
4. **¿Cuántas personas del grupo de alumnos que han realizado la practica presentan los dos tipos de estreptococos en su muestra de saliva? ¿Y cuántos sólo uno de ellos?**

Para cualquier duda o consulta adicional, por favor, contacte con nosotros [info@bioted.es](mailto:info@bioted.es)