

# Aplicación diagnóstica de PCR para detección de Streptococcus constellatus en pericoronaritis.

**Helena Isabel Fernandes Borges da Costa**

Dipòsit Legal: B. 8061-2013

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Universitat Internacional de Catalunya

Doctorat en Tècniques clíniques i de Laboratori en Odontologia



Aplicación Diagnóstica de PCR para detección de  
*Streptococcus constellatus* en Pericoronaritis

**TESIS DOCTORAL**

**Helena Costa**

**Directores: Doctor Federico Hernández Alfaro y Doctor Paulo Maia**

Barcelona 2012



**AUTORITZACIÓ DELS DIRECTORS DE TESI PER A LA SEVA PRESENTACIÓ**

Els doctors Paulo Maia i Federico Hernández Alfaro, com a directors de la tesi doctoral:

*"Aplicación Diagnóstica de PCR para detección de Streptococcus constellatus en Pericoronaritis"*

realitzada a la Facultat d'Odontologia per la doctoranda Sra. Helena Isabel Fernandes Borges da Costa, autoritza la presentació de l'esmentada tesi doctoral, atès que reuneix les condicions necessàries per a la seva defensa.

Sant Cugat del Vallès, 10 de novembre de 2010

ELS DIRECTORS DE LA TESI



Dr. Paulo Maia



Dr. F. Hernández Alfaro



Aplicación Diagnóstica de PCR para detección de  
*Streptococcus constellatus* en Pericoronaritis



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN Y ESTADO ACTUAL DE LA CUESTIÓN .....</b>	<b>5</b>
1.1. La Pericoronaritis: características generales y etiopatogenia .....	8
1.2. Manifestaciones clínicas de la pericoronaritis .....	12
1.3. Enfoque terapéutico de la pericoronaritis.....	15
1.4. Características microbiológicas de la pericoronaritis .....	17
1.4.1. Características generales y clasificación del género <i>Streptococcus</i> .....	20
1.4.2. Características generales y diferenciación de <i>Streptococcus</i> del grupo <i>milleri</i> ..	25
1.5. <i>Streptococcus constellatus</i> y <i>anginosus</i> en la pericoronaritis .....	34
1.6. Diagnóstico de las patologías infecciosas .....	40
1.7. Detección de agentes infecciosos mediante métodos de diagnóstico molecular	41
1.7.1. PCR .....	41
1.7.2. Identificación de <i>Streptococcus</i> del grupo <i>milleri</i> mediante técnicas de biología	molecular51
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>57</b>
2.1. Objetivo General .....	59
2.2. Objetivos específicos .....	59
<b>3. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....</b>	<b>61</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>65</b>
4.1. Evaluación de la especificidad de secuencias publicadas .....	67
4.2. Búsqueda de regiones genómicas específicas y diseño de cebadores .....	68
4.3. Estudio empírico de la especificidad del par de cebadores seleccionado .....	71
4.4. Crecimiento de los microorganismos .....	73
4.5. Preparo de las suspensiones bacterianas para posterior extracción del DNA. .	73
4.6. Extracción de DNA bacteriano.....	75
4.7. Amplificación mediante PCR .....	76
4.8. Temperatura annealing.....	80
4.9. Visualización del producto amplificado. ....	82
4.10. Aplicación en muestras clínicas:.....	87
4.10.1. Recogida de muestras clínicas.....	87
4.10.2. Crecimiento de los microorganismos.....	90

4.10.3.	Procedimiento laboratorial para la identificación bacteriana a partir de muestras orales.	91
4.10.4.	Extracción de DNA de muestras clínicas orales.....	93
4.10.5.	Amplificación del DNA obtenido de las muestras clínicas .....	93
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>95</b>
5.1.	Secuencias de cebadores publicadas previamente en la literatura.....	97
5.2.	Estudio bioinformático de regiones genómicas específicas y diseño de cebadores para <i>Streptococcus constellatus</i> .....	97
5.3.	Estudio empírico de la especificidad de los cebadores en las especies bacterianas orales estudiadas .....	99
5.3.1.	Par de cebadores HC2 .....	100
5.3.2.	Par de cebadores HC1 .....	102
5.3.3.	Par de cebadores HC3 .....	103
5.3.4.	Par de cebadores universales para 16S rRNA.....	104
5.4.	Aplicación en muestras clínicas.....	106
5.4.1.	PCR de las muestras clínicas no diluidas, con todos los cebadores diseñados	107
5.4.2.	PCR de las muestras clínicas de cepas aislados, con todos los cebadores utilizados en el estudio.....	110
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>111</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>121</b>
<b>8.</b>	<b>PERSPECTIVAS DE FUTURO .....</b>	<b>125</b>
<b>9.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>129</b>
<b>10.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>151</b>

# **1. INTRODUCCIÓN Y ESTADO ACTUAL DE LA CUESTIÓN**



Las infecciones odontogénicas tienen su origen en el propio diente o en los tejidos que lo rodean íntimamente. Pueden progresar desde el periodonto hasta el ápice, afectando al hueso periapical, y diseminándose hasta estructuras vecinas o más lejanas. Constituyen por eso uno de los problemas más difíciles de tratar en Odontología, pues la progresión de la infección depende del equilibrio entre las condiciones del paciente y de los microorganismos implicados<sup>1</sup>.

La naturaleza polimicrobiana de la infección odontogénica se ha puesto de manifiesto en muchos trabajos, y el tratamiento adecuado depende de un exhaustivo conocimiento de las bacterias implicadas<sup>2,3</sup>. Un correcto diagnóstico de las infecciones polimicrobianas permite combinar un tratamiento antimicrobiano con un tratamiento odontológico conservador o con cirugía.

La extracción del tercer molar es el procedimiento más frecuente en cirugía oral, por presentar este diente una elevada prevalencia de inclusión dentaria y por estar asociado a patologías como la pericoronaritis. Esto puede ser explicado por la tendencia evolutiva a la disminución de tamaño de la mandíbula<sup>4</sup>.

La Pericoronaritis en los terceros molares inferiores es una de las enfermedades infecciosas más comunes en la práctica de la cirugía oral y la complicación más frecuentemente asociada a la erupción de los terceros molares<sup>5</sup>.

## **1.1. La Pericoronaritis: características generales y etiopatogenia**

La pericoronaritis es una infección odontógena mixta de la cavidad oral que acompaña frecuentemente la erupción del tercer molar, estando presente en porcentajes superiores al 60%. Su aparición más común es provocada por la erupción del tercer molar inferior, parcialmente erupcionado, en posición distoangular y vertical<sup>6</sup>.

Su prevalencia es mayor entre los 20 y 29 años, asociada a la erupción del tercer molar<sup>7</sup>, por lo que en pacientes jóvenes es la razón principal para la indicación de extracción de terceros molares impactados.

Nitzan et al.<sup>8</sup> comprueban en su estudio una elevada prevalencia de pericoronaritis entre los 20 a 29 años, cerca de 81 casos de entre los 245 estudiados. En el 95% de los casos, la pericoronaritis se presentaba en la región del tercer molar inferior.

Se caracteriza clínicamente por una inflamación del tejido blando que rodea el diente retenido, denominada opérculo. Este nicho ecológico favorece el crecimiento bacteriano, por presentar características físicas adecuadas, como la temperatura, humedad, oscuridad, pH y disminución del potencial oxidorreducción, así como la presencia de restos alimenticios que son difíciles de eliminar<sup>9</sup>.

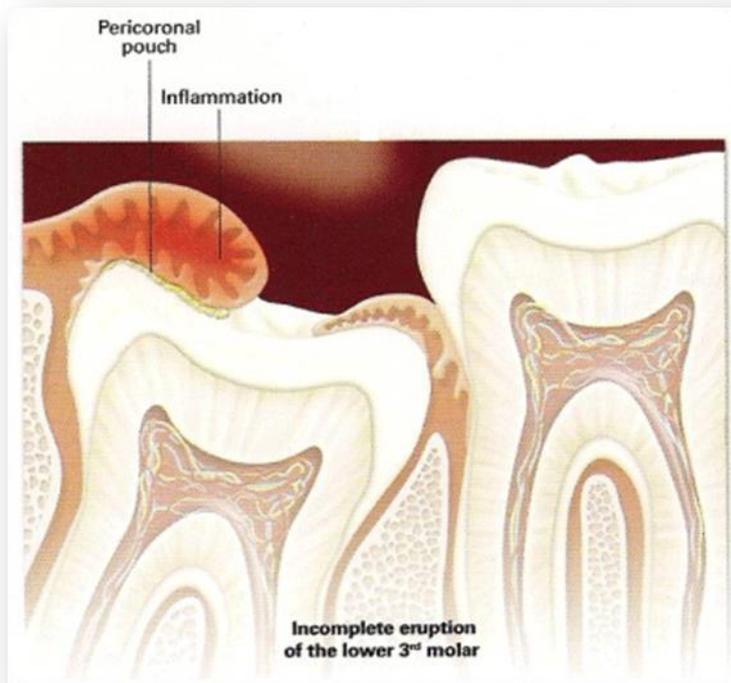


Figura 1: Esquema de la presentación clínica de la pericoronaritis<sup>10</sup>

Este capuchón mucoso normalmente no se retrae, porque el diente parcialmente erupcionado presenta un espacio muy estrecho con el diente contiguo, lo que favorece la multiplicación bacteriana, actualmente considerada un punto de partida para una infección recurrente. Esta es protagonizada por una flora de naturaleza polimicrobiana, con especial participación de géneros anaerobios estrictos y productores de betalactamasas<sup>6</sup>.



Figura 2: Pericoronaritis en el tercer molar inferior (foto del autor de la presente tesis).

Se pueden considerar varios factores predisponentes en la patogenia de episodios de pericoronaritis, de modo que las infecciones del tracto respiratorio superior actúan como factor precipitante por presentar cepas bacterianas similares<sup>11,12</sup>. Además, los focos infecciosos que circulan a nivel sistémico o presentes en la cavidad oral también intervienen, por sí solos o en conjunto, en el proceso infeccioso, pues los patógenos encontrados en la pericoronaritis son similares a las lesiones por periodontitis sin señales de enfermedad en pacientes sin sintomatología<sup>7</sup>. Por otro lado, la inflamación se produce en parte por la agresión de la flora bacteriana mixta hallada en el surco gingival y en parte por la modulación de la respuesta inmune del hospedador, que será un factor determinante en la evolución de la lesión<sup>9</sup>.

A grandes rasgos, la etiopatogenia de las formas clínicas de pericoronaritis tiende a seguir un patrón común, aunque la relevancia de cada uno de los factores implicados es lo que modifica la presentación clínica y, como consecuencia, su clasificación. Se

puede presentar de forma aguda (serosa y supurada) o crónica, siendo el dolor el protagonista de las formas agudas, y el exudado en ambas.

Se ha demostrado que el factor etiológico principal es la flora bacteriana presente en el espacio gingivodentario y las condiciones anatómicas del mismo.

## 1.2. Manifestaciones clínicas de la pericoronaritis

Como se ha expuesto en el apartado anterior, las manifestaciones orales en esta patología son muy variadas en función de factores locales, generales, del equilibrio del sistema defensivo orgánico y la actividad bacteriana.

La pericoronaritis se presenta de diferentes formas:

- I. Pericoronaritis aguda congestiva o serosa
- II. Pericoronariis aguda supurada
- III. Pericoronaritis crónica

El cuadro clínico en las formas agudas se presenta como una lesión supurativa, inflamada, roja, muy sensible, con dolor irradiado al oído, faringe y suelo de la boca. Se confirma la presencia de adenopatía en la cadena ganglionar submandibular dolorosa a la palpación, y en las crónicas hay un signo muy típico de faringitis unilateral, intermitente y recidivante<sup>13</sup>.

Las formas clínicas se suceden una a otra, siempre que persista el factor etiológico, por eso su forma crónica es consecuencia de la evolución no tratada de las formas anteriores. Por tanto, su enfoque terapéutico debe ser abordado con medidas antimicrobianas, sintomáticas y quirúrgicas.

En la forma aguda, las extracciones deben ser evitadas por posibles complicaciones locales y serias infecciones secundarias, como la osteomielitis. Asimismo, la osteomielitis de la mandíbula secundaria a la pericoronaritis es rara<sup>14</sup>.

La pericoronaritis aguda se puede agravar por un trauma mecánico del diente antagonista erupcionado durante la masticación. En estos cuadros, el dolor es más intenso en la forma supurada que en la serosa. Las formas crónicas cursan con poca sintomatología, prestando molestias ligeras pero constantes<sup>6</sup>. De este modo, hay

manifestaciones clínicas comunes que son independientes de la forma clínica de presentación:

1. Dolor
2. Tejido pericoronario enrojecido y edematoso
3. La inflamación se extiende a los tejidos blandos adyacentes.
4. Amigdalitis y absceso peritonsilar o faríngeo.
5. Puede observarse presencia de pus.
6. Dificultad en la masticación.
7. Presencia de trismo o limitación de la apertura bucal.
8. Halitosis.
9. Afectación del estado general (escalofríos, hipertermia o fiebre).
10. Linfadenopatía cervical con mayor frecuencia en la cadena submandibular, ganglios dolorosos y endurecidos<sup>13</sup>.

En el análisis radiográfico, es usual que la pericoronaritis presente una translucidez alrededor de la corona del diente afectado, correspondiendo la misma al folículo, donde se puede observar una pérdida determinada por la infección subyacente.



Figura 3: Radiografía del tercer molar inferior con pericoronaritis, evidenciando la translucidez (foto del autor de la presente tesis).

### **1.3. Enfoque terapéutico de la pericoronaritis**

Como se puede comprobar por la variedad de manifestaciones clínicas de la pericoronaritis, el tratamiento conlleva un abordaje quirúrgico y antimicrobiano de la misma, así como medidas sintomáticas. La forma aguda congestiva es la única susceptible de un tratamiento conservador puramente sintomático<sup>6</sup>.

El tratamiento antimicrobiano está indicado en la profilaxis preoperatoria con alto riesgo de infección postquirúrgica y en las pericoronaritis supuradas en fase aguda en las que se debe posponer la cirugía. En cuanto a las medidas antimicrobianas, se puede decir que el empleo de antibióticos es empírico, por no haber consenso en el abordaje antimicrobiano<sup>15</sup>. Asimismo, casi siempre va a ser necesario el empleo de antibióticos sistémicos para evitar la diseminación de la infección, no descartando un tratamiento local con desbridamiento, irrigación y drenaje de las áreas afectadas, o incluso la extracción del diente<sup>16</sup>.

La flora bacteriana alrededor del tercer molar inferior parcialmente erupcionado puede ser significativamente distinta de la flora encontrada en cualquier otra parte de la cavidad bucal y contiene gran número de especies altamente invasivas. Sin embargo, para plantear una terapéutica apropiada y prevenir la pericoronaritis, es importante la identificación de los agentes infecciosos causantes. Con frecuencia, se encuentran altas concentraciones de microorganismos resistentes a la penicilina en esta área; por ello, el absceso pericoronario alrededor del tercer molar inferior se considera, en principio, un problema más serio que un absceso pericoronario en otra área de la cavidad bucal. El mayor riesgo de la pericoronaritis es el compromiso de las estructuras adyacentes y la diseminación de la infección a través de los espacios fasciales. A partir de ellos, puede haber comunicación con el espacio parafaríngeo, y así evolucionar

hacia una angina de Ludwig y celulitis en el cuello, o descender a la cavidad torácica o extenderse al cráneo.

Sawalha e Ahmad<sup>17</sup> presentaban posibles complicaciones torácicas derivadas de procedimientos dentales. Describen un caso de mediastinitis con rápida evolución de un empiema pleural bilateral derivado de una pericoronaritis, sin antecedente de ninguna intervención quirúrgica dental.

En el estudio de Moloney J, Stassen LF, 2009, se comentan los riesgos y los beneficios de la extracción del tercer molar inferior con pericoronaritis en una paciente de 52 años, ilustrando estos autores cómo puede ser problemática la decisión terapéutica<sup>18</sup>. Actualmente, en la literatura aún se discute ampliamente la extracción de los terceros molares<sup>19</sup> por motivos terapéuticos o profilácticos, y se destaca la importancia de evaluar cada situación clínica<sup>18,20</sup>. Asimismo, los terceros molares con una inclinación vertical o cerca del plano oclusal dentario deberían ser evaluados desde un punto de vista profiláctico, al presentar un elevado riesgo de desarrollar un episodio de pericoronaritis en su forma aguda, con consecuencias severas para el paciente<sup>21</sup>.

#### 1.4. Características microbiológicas de la pericoronaritis

La microflora oral contiene una gran variedad de bacterias, ya que se han identificado más de 750 especies y quedan muchas más, probablemente, por identificar<sup>22</sup>.

En la literatura, la flora microbiológica de la pericoronaritis fue confundida durante muchos años con la de entidades como la gingivitis y el absceso periodontal, dependiendo de su grado de severidad. Por otra parte, se ha atribuido al saco pericoronario el carácter microbiológico de entidad diferenciada, ya que manifiesta por sí mismo una autonomía microbiana de distintos grados de virulencia ante condiciones específicas<sup>8</sup>. Asimismo, los estudios son escasos y poco concluyentes<sup>5</sup>.

La microflora que coloniza y se asienta sobre el tejido pericoronario infectado está formada fundamentalmente por microorganismos anaerobios estrictos (80%), organismos microaerófilos y anaerobios facultativos. Varios estudios que han abordado el desarrollo de las bacterias causantes de pericoronaritis han sugerido una gran variedad de posibles patógenos, que incluyen a *Prevotella intermedia*, *Capnocytophaga* especies, *Prevotella melaninogenica*, *Fusobacterium nucleatum* y espiroquetas, además de especies de estreptococos con gran virulencia. En investigaciones recientes sobre la flora microbiana encontrada en la pericoronaritis de terceros molares, se hallaron microorganismos como espiroquetas, bacterias fusiformes, bacterias anaerobias, que incluía *Actinomyces* y *Prevotella* especies, pero las especies más prevalentes fueron *Streptococcus milleri*, *Stomatococcus mucilaginosus* y *Rothia dentocariosa*.

Sin embargo, estas bacterias forman un complejo ecosistema dinámico, donde se pueden encontrar de forma simultánea bacterias residentes y ocasionales. El carácter endógeno y oportunista protagonizado por las bacterias aerobias y anaerobias que

intervienen en la pericoronaritis supone que se trate de una infección mixta, donde la proporción de estas bacterias es mucho mayor<sup>23</sup>.

En el paciente sano, la microflora tiene predominio de cocos grampositivos, en particular los del grupo de estreptococos hemolíticos alfa y beta, y los no hemolíticos. Las especies que se aíslan con mayor frecuencia son *Streptococcus viridans*, *Streptococcus mitis* y *Streptococcus salivarius*. Entre los grampositivos, también figuran microorganismos del género *Micrococcus* y varias especies de estreptococos anaerobios.

Dada la complejidad del análisis de la microflora de las pericoronaritis, y la divergencia de los resultados entre los diversos estudios, puede ser conveniente analizar por separado la influencia de especies concretas sobre la evolución de este cuadro clínico.

En las últimas décadas, han sido numerosos los estudios que han investigado la flora microbiana predominante en las localizaciones afectadas por pericoronaritis, pero los resultados obtenidos son muy variables, en función de la metodología y sistemática de identificación de las especies bacterianas, y de los cambios surgidos en la taxonomía de las mismas<sup>24,25</sup>. Los estudios recientes más destacados en este ámbito son los llevados a cabo por Peltroche-Llacsahuanga<sup>2</sup> en Alemania, por un lado, y Sixou<sup>15,26</sup> en Francia, por otro.

En el primer estudio, se tomó muestra de las bolsas pericoronarias de los terceros molares inferiores de 37 pacientes que presentaban síntomas de pericoronaritis aguda, y se analizaron microbiológicamente, empleando una amplia variedad de medios selectivos. Se aislaron un total de 441 especies, cuya distribución principal fue la siguiente: entre los cocos grampositivos, un 78% de las muestras presentaron *Streptococcus* grupo *milleri* (con un 62% de *S. intermedius* y un 59% de *S. anginosus*), y un 71% de *Stomatococcus mucilaginosus*; entre los bacilos grampositivos, el 57% de

las muestras contenían *Rothia denticariosa* y el 54% poseía *Actinomyces naeslundii*. Ya entre los gérmenes gramnegativos, destacaba el 65% de *Neisseria*, y el 60% de *Capnocytophaga*. Los autores se centran en abordar la alta presencia de *Streptococcus* del grupo *milleri*, y destacan su discrepancia con otros estudios previos en este sentido, lo que es atribuido al empleo de medios de cultivo que no favorecen el desarrollo de estos estreptococos. Según el estudio con mayor tamaño de muestra, encabezado por Peltroche-Llacsahuanga y cols<sup>2</sup>, las especies del grupo de *Streptococcus milleri*, son las más prevalentes en estos pacientes. Dicho grupo lo componen principalmente *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus anginosus* y *Streptococcus constellatus*, todos ellos con potencial patógeno demostrado y asociados en gran parte de ocasiones a cuadros de supuración.

En el estudio de Sixou et al<sup>15</sup>, se tomaron muestras de 35 sujetos de ambos sexos, y se aisló *Streptococcus anginosus* en 21 individuos (60%), de modo que era el germen más prevalente, junto con *Actinomyces odontolyticus*, *Capnocytophaga*, *Actinomyces israeli* y *Prevotella intermedia/nigrescens/pallens*. Se aisló *Streptococcus constellatus* en el 28% de individuos y *S. intermedius* solo en 2 casos (5%).

Otros estudios microbiológicos<sup>7,27</sup> no han investigado la flora global presente en las localizaciones con pericoronitis, sino que se han centrado en la detección de organismos periodontopatógenos, con resultados variables.

Dadas las características demostradas por un creciente número de investigaciones<sup>28-32</sup>, se van a estudiar a continuación en mayor profundidad los aspectos generales de los estreptococos y del grupo *milleri*, pues se presentan como patógenos causantes de la pericoronaritis, actuando en sinergia con otros anaerobios y participando en la formación de abscesos.

### 1.4.1. Características generales y clasificación del género *Streptococcus*

En el Manual de Sistemática Bacteriológica de Bergey (1986), se considera que el género *Streptococcus* tiene personalidad propia y no se engloba en familia alguna. Está constituido por cocos grampositivos, de forma esférica u oval, de 1-1,5 µm de diámetro, anaerobios facultativos, que se disponen por pares o en cadena por la existencia de puentes de pared celular. No producen catalasa ni oxidasa, y fermentan la glucosa con formación de ácidos. Forman un grupo muy amplio y heterogéneo, algunos de cuyos componentes son saprofitos, otros forman parte de la flora normal y se comportan como oportunistas y algunos son patógenos y pueden producir infecciones diversas en el hombre y los animales<sup>33</sup>.

Se conocen cerca de cien especies de *Streptococcus* y solamente se encuentran el 50% en la cavidad oral en humanos.

Microorganismos	Mucosa	Dorso Lengua	Placa bacteriana supragingival e subgingival asociada a la superficie dentaria	Surco gingival en salud	Saliva
Cocos	97%	67%	50%	67%	65%
Gram (+) anaerobios facultativos	95%	45%	37%	50%	44%
Gram (+) anaerobios estrictos	~ 1%	4%	~ 1%	4%	3%
Gram (-) aerobios	~ 1%	2%	2%	~ 1%	3%
Gram (-) anaerobios estrictos	~ 1,5%	16%	12%	13%	15%
Bacilos	~ 4%	33%	48%	32%	35%
Gram (+) anaerobios facultativos	~ 1%	12%	40%	18%	15%
Gram (+) aerobios	~ 1%	2%	~ 1%	~ 1%	2%
Gram (+) anaerobios estrictos	~ 1%	6%	~ 1%	3%	7%
Gram (-) anaerobios facultativos	~ 1%	5%	3%	6%	4%
Gram (-) anaerobios estrictos	~ 1%	8%	3%	5%	7%
Treponemas		~ 1%	1%	1%	

**Tabla 1:** Distribución aproximada de microorganismos en la cavidad oral (según áreas)<sup>34</sup>

Su clasificación genérica se efectúa tomando como base tres caracteres: el tipo de hemólisis, la estructura antigénica y las propiedades fisiológicas. Según una amplia revisión publicada recientemente por Palavecino<sup>35</sup>, la clasificación tradicional del género *Streptococcus* se ha basado en la reacción hemolítica de la cepa aislada y en su grupo serológico. Este último está determinado por el tipo de polisacárido C presente en la pared celular del microorganismo, denominado antígeno de Lancefield. Estos antígenos permiten la clasificación de los *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos en grupo A, B, C, D, F, G y otros grupos aislados con menor frecuencia. Cada grupo comparte un mismo tipo de carbohidrato C. Algunos grupos solo tienen una especie, como el grupo A, con *Streptococcus pyogenes*. Lo mismo ocurre con el grupo B, el cual contiene sólo la especie *S. agalactiae*. El resto de grupos serológicos contienen un número variable de especies.

Hemólisis	Especies	Tipos	Hábitat más frecuente	Procesos patológicos	Sensibilidad a la penicilina y agentes externos	
Grupo A	$\beta$	<i>S. pyogenes</i>	70	Nasofaringe del hombre	90% de procesos supurados y no supurados	Muy sensibles
Grupo B	$\beta$	<i>S. agalactiae</i>	5	Intestino y aparato genital del hombre y animales	Mastitis crónica. Infecciones neonatales.	Sensibles
Grupos C, G, F	$\beta$	<i>S. equisimilis</i> <i>S. anginosus</i> <i>S. sp.</i>	8			Sensibles
Grupo D	$\alpha, \beta, \gamma$	<i>S. faecalis</i> <i>S. faecium</i> <i>S. avium</i> <i>S. bovis</i>	11 19	Intestino del hombre y animales	Infecciones urinarias Meningitis Otitis Endocarditis	Resistentes
Grupo viridans (no grupo D)	$\beta$	<i>S. salivarius</i> <i>S. mitis</i> <i>S. mutans</i>		Orofaringe del hombre y animales	Endocarditis subaguda Carles dental	Menos sensibles

**Tabla 2:** Algunas propiedades de los principales grupos de *Streptococcus*<sup>33</sup>.

Se ha descubierto que existen especies de *Streptococcus* que no producen hemólisis pero poseen polisacárido C y que, además, algunas cepas  $\beta$ -hemolíticas de diferentes especies de estreptococos pueden compartir el mismo grupo antigénico. Por este motivo, y también por los estudios filogenéticos realizados en este grupo de microorganismos, los *Streptococcus* han experimentado varios cambios taxonómicos en las dos últimas décadas. A pesar de dichos cambios, la reacción hemolítica, el tamaño de la colonia y la presencia de antígeno de Lancefield siguen siendo la base de la diferenciación de los *Streptococcus* en el laboratorio clínico.

Las cepas de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticas con antígenos de los grupos A, C o G se subdividen de acuerdo al tamaño de la colonia. Las cepas que forman una colonia grande y que presentan el antígeno A, C o G son consideradas *Streptococcus* piogénicos clásicos. Las cepas  $\beta$ -hemolíticas que también tienen los antígenos A, C o G, pero que forman una colonia pequeña son consideradas cepas del grupo *milleri*. Sin embargo, a este grupo también pertenecen cepas no  $\beta$ -hemolíticas.

Al aislar una cepa de *Streptococcus* que presenta hemólisis  $\beta$ , debe diferenciarse *Streptococcus pneumoniae* de los otros *Streptococcus* del grupo *viridans*. Todas aquellas cepas de *Streptococcus* que no pueden ser clasificadas como *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. pneumoniae*, o *S. bovis* son clasificadas como *Streptococcus* del grupo *viridans* (Tabla 3).

Grupo Lancefield	Tamaño colonias <sup>1</sup>	Especie	PYR	VP <sup>2</sup>	CAMP	BGUR
A	Grande	<i>S. pyogenes</i>	+	-	-	ND
A	Pequeña	<i>S. grupo anginosus</i>	-	+	-	ND
B	Grande	<i>S. agalactiae</i>	-		+	ND
C	Grande	<i>S. dysgalactiae</i>	-	-	-	+
C	Pequeña	<i>S. grupo anginosus</i>	-	+	-	-
F	Pequeña	<i>S. grupo anginosus</i>	-	+	-	ND
G	Grande	<i>S. dysgalactiae</i>	-	-	-	+
G	Pequeña	<i>S. grupo anginosus</i>	-	+	-	-
No agrupable	Pequeña	<i>S. grupo anginosus</i>	-	+	-	ND

<sup>1</sup>Tamaño de colonias: grande > de 5 mm de diámetro después de 24 horas de incubación  
<sup>2</sup>Resultado del test VP para *S. agalactiae* ha sido omitido por diferentes resultados en la literatura  
 +: resultado del test positivo, -: resultado del test negativo, ND: Datos no disponibles  
 VP: Voges-Proskauer; PYR: pirrolidonil aminopeptidasa; CAMP: test de CAMP, BGUR, β D-glucuronidasa

**Tabla 3:** Especies y pruebas de laboratorio para la diferenciación de *Streptococcus* β-hemolíticos clínicamente relevantes<sup>36</sup>.

Por este motivo, este grupo está compuesto por microorganismos que son muy diferentes en morfología, en reacciones hemolíticas y en participación en procesos infecciosos. Suelen considerarse con frecuencia como flora normal o contaminante. En general, este concepto es válido, ya que forman parte de la flora de la cavidad oral, del tracto gastrointestinal y del tracto genital femenino, y pueden ser encontrados en

sangre de forma transitoria. Sin embargo, además de su papel patogénico en la endocarditis bacteriana, los *Streptococcus* del grupo *viridans* (Tabla 4) han asumido también un rol importante como causantes de infecciones en pacientes neutropénicos.

Grupo	Especies
mitis	<i>S. mitis</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. parasanguis</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>S. crista</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. pneumoniae</i> .
mutans	<i>S. mutans</i> , <i>S. sobrinus</i> , <i>S. criceti</i> , <i>S. rattus</i> .
salivarius	<i>S. salivarius</i> , <i>S. vestibularis</i> , <i>S. thermophilus</i> .
bovis	<i>S. bovis</i> , <i>S. alactolyticus</i> , <i>S. equinus</i> .
anginosus o milleri	<i>S. anginosus</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>S. intermedius</i> .

**Tabla 4:** Especies del grupo Viridans<sup>36</sup>.

#### 1.4.2. Características generales y diferenciación de *Streptococcus* del grupo *milleri*

Los *Streptococcus* del grupo *milleri* se consideran parte del grupo *viridans* pero, a diferencia de los otros miembros de este grupo, que suelen presentar una reacción hemolítica  $\alpha$ , las especies dentro del grupo *milleri* pueden presentar hemólisis  $\beta$ , hemólisis  $\alpha$ , o ser no hemolíticos. A pesar de los esfuerzos por obtener una clasificación que esté de acuerdo a los últimos hallazgos genéticos, este grupo de microorganismos sigue en constante cambio en cuanto a nomenclatura. En la actualidad se reconocen tres especies: *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* y *Streptococcus intermedius*. Estas especies forman colonias pequeñas y pueden tener antígenos de Lancefield grupos A, C, G o F o no ser agrupables. El antígeno Lancefield del grupo F es el encontrado con mayor frecuencia.

Los *Streptococcus* del grupo *milleri* presentan reacciones bioquímicas variables y son también dependientes del tipo y tiempo de incubación, por lo que su identificación en el laboratorio no es fácil. Una colonia  $\beta$ -hemolítica que presenta el antígeno F será identificada como *Streptococcus* grupo *milleri*. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que sólo un pequeño porcentaje de cepas dentro de este grupo son  $\beta$ -hemolíticas y que, de éstas, menos de la mitad presentan el antígeno F.

O'Neill et al<sup>37</sup> publicaron un esquema para diferenciar *Streptococcus* del grupo *milleri* de otros *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos. Proponen la identificación de *Streptococcus* de importancia clínica a partir de la combinación de la morfología de la colonia, reacción hemolítica, presencia de antígeno de Lancefield, estudio de susceptibilidad a bacitracina y la presencia de la enzima  $\beta$ -D-glucuronidasa. Esta última prueba se puede hacer con un medio ya disponible comercialmente, que contiene el sustrato de la enzima. Según este esquema, los *Streptococcus* grupo *milleri* que presentan hemólisis

$\beta$  y antígeno A pueden ser fácilmente diferenciados de los *Streptococcus* del grupo A (*S. pyogenes*) por la resistencia a la bacitracina. Los *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos del grupo *milleri* que presentan antígeno C o G pueden ser diferenciados de los grupos C y G (*S. dysgalactiae*) por ser negativos para  $\beta$ -D-glucuronidasa. De esta manera sólo aquellas cepas que son  $\alpha$ -hemolíticas o que no presentan hemólisis deben ser estudiadas con pruebas bioquímicas adicionales.

La diferenciación de *Streptococcus* grupo *milleri* no  $\beta$ -hemolíticos de otros *Streptococcus* del grupo *viridans* es bastante problemática y dichas cepas representan aproximadamente dos tercios del total, dependiendo de la especie aislada. Aunque *S. constellatus* se asocia frecuentemente con hemólisis  $\beta$ , *S. intermedius* y *S. anginosus* suelen ser no  $\beta$ -hemolíticos.

Whiley et al<sup>38</sup> han planteado un esquema de identificación de las diferentes especies de este grupo, basado en varias pruebas enzimáticas y en la degradación de azúcares. Aunque este esquema de identificación ha sido ampliamente aceptado y es considerado el método de referencia, es importante destacar que tiene algunos problemas<sup>35</sup>. Por un lado, la técnica de preparación de estos reactivos es bastante laboriosa. Además, la reacción de  $\beta$ -galactosidasa, considerada como negativa para *Streptococcus* del grupo *milleri* por estos autores, parece ser variable, por lo que no debería ser tomada en cuenta para la identificación final. Este método de identificación requiere bastante dedicación, tiempo y, sobre todo, cepas como control de calidad para poder interpretar los resultados. En ocasiones, la reacción hemolítica cambia si las placas se incuban por un tiempo más prolongado, y las pruebas enzimáticas y de degradación de azúcares son muy dependientes del tamaño del inóculo usado y del tiempo de incubación.

En la actualidad, se dispone de varios métodos comerciales que pueden ser utilizados para identificar *Streptococcus* del grupo *milleri*, como API 20 y API 32 *Strep test* (Bio-Merieux) y BBL Crystal Gram positive ID System (Becton Dickinson)<sup>35,39</sup>. Los dos primeros tienen buena correlación con el método manual de referencia. Sin embargo, API tiene incluida la prueba de  $\beta$ -galactosidasa como negativa en la información de datos y, por ello, muchas veces no da un código correcto de identificación. Todos estos métodos tienen dificultades para la identificación de las especies del grupo *milleri*, ya que pocas veces se obtiene un porcentaje de identificación alto.

#### **1.4.2.1. Patogenicidad de los *Streptococcus* del grupo *milleri***

Debido a la confusión con respecto a su taxonomía, nomenclatura y dificultad en la identificación de este grupo de *Streptococcus*, ha sido problemático evaluar la patogenicidad y la participación en infecciones clínicas. Sin embargo, no hay duda de que estos microorganismos representan un grupo con características muy diferentes a los otros *Streptococcus* del grupo *viridans* y se ha reconocido desde hace tiempo su papel en infecciones graves. En general, dentro de este grupo, la especie *S. anginosus* ha sido asociada con bacteriemias y las otras dos especies, *S. constellatus* y *S. intermedius* son asociadas con la producción de abscesos.

Yoshida et al.<sup>40</sup> describen el grupo *milleri* como comensales de la flora humana, pero destacando localizaciones preferentes donde se encuentran, como la cavidad oral, el tracto genito-urinario y el intestinal. Los describen también en infecciones supurativas en el hígado y cráneo, destacando su enorme capacidad de causar abscesos.

Un estudio multicéntrico realizado en Francia durante un periodo de seis años<sup>41</sup> analizó los datos clínicos y microbiológicos en adultos con el diagnóstico de endocarditis causada por *Streptococcus* grupo *anginosus*. Estos investigadores encontraron que los

pacientes con endocarditis causada por este grupo tienden a poseer más antecedentes de cardiopatía previa, pero un menor número de enfermedades de base que aquellos pacientes con endocarditis causada por *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos. El análisis de los casos también demostró que el tiempo promedio de evolución antes de hacer el diagnóstico y el tiempo hasta que se identificó la puerta de entrada, fue significativamente mayor en el grupo con endocarditis por *Streptococcus* grupo *anginosus*.

Whiley et al.<sup>42</sup> obtuvieron 153 cepas de *S. milleri* de diferentes laboratorios de Reino Unido y de fuera de él. De ellas, 18 procedían de localizaciones de cabeza y cuello, 21 de sistema nervioso central (20 de abscesos cerebrales y 1 de líquido cefalorraquídeo), 12 del aparato respiratorio, 24 del tracto gastrointestinal, 9 de localizaciones abdominales y pélvicas, 44 de origen genitourinario, 19 de piel, tejidos blandos y hueso, y 4 de hemocultivos. Los resultados pusieron de manifiesto una asociación relevante de *S. intermedius* con las infecciones del SNC, y escasa presencia en el tracto respiratorio y gastrointestinal, así como en el genitourinario. Por el contrario, *S. anginosus* fue el más prevalente en aparato digestivo y genitourinario, así como presente de forma más amplia en otras localizaciones, excepto el SNC. También se identificó con frecuencia *S. constellatus* en la mayor parte de localizaciones, excepto SNC, pero no predominó en ninguna de ellas.

Las cepas de *S. intermedius* y *S. constellatus* presentaban unas pruebas bioquímicas relativamente homogéneas, acordes a lo publicado previamente. Sin embargo, estos autores encontraron una alta diversidad en las reacciones de fermentación entre las cepas de *S. anginosus*. Todas las cepas del grupo *milleri* que fermentaban rafinosa o manitol, o ambos, se identificaron como *S. anginosus*, de modo que el 88% de las

cepas aisladas del tracto genitourinario fermentaban uno o ambos azúcares, al igual que el 53% de las de origen gastrointestinal, el 50% de las de origen abdominal o pélvico, y el 70% de las de origen cutáneo, óseo y en tejidos blandos, todo lo cual contrasta con la ausencia de cepas fermentadoras de entre las aisladas de cabeza y cuello, SNC y tracto respiratorio.

Los datos presentados por Clarridge et al.<sup>43</sup>, basados en muestras clínicas tomadas de diversas localizaciones corporales en un hospital de adultos de nivel terciario, demuestran que *S. constellatus* y *S. anginosus* se aíslan aproximadamente con la misma frecuencia.

Cada una de estas especies se encontraba con una frecuencia unas cuatro veces superior que *S. intermedius*. Dichos datos respaldan la observación previa de la tendencia del grupo *milleri* a originar abscesos<sup>42,44,45</sup>, de modo que la mitad de los casos mostraban formación de estos. Sin embargo, los miembros del grupo no originan dichos abscesos con una frecuencia similar. *S. intermedius* y *S. constellatus* son más proclives a ocasionar abscesos profundos (86% y 73% de las muestras de cada especie, respectivamente) que *S. anginosus* (19%). Los abscesos causados por *S. intermedius* tienden a asociarse con diseminación hematógica o a asentarse en profundidad, mientras que los originados por *S. constellatus* se presentan en zonas superficiales con mayor frecuencia. Esta última especie también origina un espectro más amplio de infecciones, desde odontógenas hasta intraabdominales.

*S. intermedius* se encontró en solitario en muestras obtenidas de los 8 de los 9 pacientes infectados por el mismo, mientras que los abscesos ocasionados por las otras dos especies del grupo tendían a ser polimicrobianas. El germen más frecuentemente asociado con *S. constellatus* era *Eikenella corrodens*, lo que concuerda con el hallazgo de que las especies de *Eikenella* estimulan el crecimiento de *S.*

*constellatus* pero no de *S. anginosus*<sup>46</sup>. Aparte del líquido proveniente de un absceso, la sangre fue la muestra de la que se aislaban con más frecuencia los estreptococos del grupo *milleri*, con predominio de *S. anginosus* (64% de las muestras sanguíneas). La ambigüedad en la identificación, ya descrita previamente, puede haber sido la responsable de que, en un trabajo previo<sup>47</sup>, hubiera más presencia de *S. constellatus* y de *S. intermedius* en los casos de bacteriemia. Los autores sugieren que *S. intermedius* es la especie más patógena del grupo, al originar abscesos en solitario en la mayor parte de los pacientes, y estar presente en más de un tercio de los hemocultivos. *S. constellatus* se aislaba como parte de la flora mixta, y con menos frecuencia se asociaba con casos de bacteriemia. El que tiene menor capacidad de producir abscesos es *S. anginosus*, a no ser que coincida con otras especies.

Williams et al.<sup>48</sup> investigaron la flora asociada a los abscesos endodóncicos. Obtuvieron muestra por aspiración de 10 abscesos dentales de origen endodóncico, todos los cuales habían penetrado en hueso y presentaban inflamación con fluctuación. El 70% de las cepas aisladas eran anaerobios estrictos o microaerófilos. En uno de los abscesos se obtuvo un cultivo puro de *Streptococcus* grupo *milleri*, y en otro, se halló un predominio de *S. intermedius*.

Fisher et al.<sup>23</sup> aislaron estreptococos del grupo *milleri* en el 37% de su muestra de 16 pacientes con abscesos dentoalveolares, de modo que todos ellos, a excepción de uno, presentaban *S. anginosus*, y el restante, *S. intermedius*. No se aisló *S. constellatus*. Estos autores han confirmado que *S. intermedius* es el miembro del grupo *milleri* que se aísla con mayor frecuencia de placa supragingival, pero sigue sin determinarse si las cepas de *S. anginosus* asociadas con abscesos dentales se hayan ampliamente dispersas por la población y si difieren de las de otras localizaciones corporales.

Okayama et al. investigaron la capacidad de formación de abscesos de la placa dental en ratones<sup>49</sup>. Para ello, tomaron alícuotas de una suspensión de placa supragingival con una cantidad determinada de unidades formadoras de colonias, y se inyectaron de modo subcutáneo en el dorso de los ratones. Se indujo de este modo la formación de abscesos en 76 de 85 ratones, a partir de 10 muestras diferentes de placa. Se aislaron 13 microorganismos de las muestras de pus obtenidas por aspiración de las lesiones. *S. anginosus* fue el organismo que se detectó con mayor frecuencia, y el más prevalente en siete de los abscesos. Asimismo, *S. intermedius* y *S. constellatus* predominaron, respectivamente, en uno y tres abscesos. Las cepas aisladas presentaban una alta capacidad antifagocítica frente a polimorfonucleares humanos.

Han et al.<sup>50</sup> revisaron la base de datos del Departamento de Patología del Hospital Infantil de Wisconsin (EEUU), entre 1997 y 1999, e identificaron 26 pacientes con cultivos positivos para bacterias del grupo *milleri*. De ellos, 16 pacientes presentaban infecciones de cabeza y cuello, con origen en senos paranasales, dientes, tejidos blandos faciales, espacios profundos del cuello, región periamigdalina, principalmente. Los senos paranasales fueron la localización más común (37%). Se aisló *Streptococcus* grupo *milleri* en solitario en el 69% de los casos. Se produjo una diseminación regional de la infección en el 56% de los pacientes, principalmente hacia la órbita, base del cráneo y espacios cervicales profundos. Se tuvo que realizar el drenaje quirúrgico en todos los casos, y 15 de los 16 pacientes requirieron antibioterapia intravenosa.

En su estudio, Claridge<sup>51</sup> empleó antibioterapia mediante penicilina en solitario o reforzada, o bien mediante combinaciones de fármacos, y pudieron constatar que el grupo *milleri* era susceptible a estos regímenes terapéuticos en la mayor parte de casos. Otro estudio<sup>43</sup> ha demostrado que todos los miembros del grupo *milleri* son

susceptibles a las dosis habituales de penicilina, amoxicilina, cefotaxima y ceftriaxona. Gómez-Garcés<sup>52</sup> también puso de manifiesto una susceptibilidad variable a la tetraciclina, clindamicina y eritromicina.

En la investigación publicada por Bantar et al.<sup>44</sup>, la especie más prevalente fue *S. anginosus* (64.4%), seguida de *S. constellatus* y *S. intermedius* (26 y 9,6%, respectivamente). El origen anatómico era abdominal (17 abscesos abdominales, 15 muestras de fluido peritoneal y 2 de vías biliares), urogenital (11 abscesos de tracto genital femenino y 3 de tracto urinario), cabeza y cuello (6 abscesos submandibulares, 5 dentales y una muestra de fosa nasal), sangre, piel y tejidos blandos (3 abscesos y 2 úlceras en pie diabético) y pleuropulmonar (un absceso de pulmón y una muestra de un paciente con empiema). *S. anginosus* se aisló con mayor frecuencia de localizaciones abdominales y urogenitales, mientras que *S. intermedius* fue aislado de forma importante de muestras purulentas de cabeza y cuello. Aunque *S. constellatus* parecía ser más prevalente en muestras abdominales que en las de cabeza y cuello y urogenitales, no se pudieron encontrar diferencias significativas. Tras realizar pruebas de susceptibilidad a las cepas aisladas, se halló una resistencia a la penicilina en el 12,5% del grupo *milleri*, en conjunto, con una disminución de la susceptibilidad del 12,5% en el *S. anginosus*, y del 5,5% de *S. constellatus*. Dos de las seis cepas de *S. intermedius* mostraban una resistencia intermedia. Se detectaron dos cepas resistentes a eritromicina (una de *S. anginosus* y otra de *S. constellatus*), y ninguna resistente a vancomicina ni aminoglucósidos.

Jacobs et al.<sup>53</sup> también estudian la susceptibilidad del grupo *milleri*. Para la penicilina, el 1,4% de sus cepas mostraba una susceptibilidad moderada, repartida entre las tres especies. Ninguna de las cepas presentaba un alto nivel de resistencia a gentamicina. En cuanto a los macrólidos, el 2,6% era resistente a eritromicina y un 2,4% a

clindamicina y roxitrocimina. Estas resistencias solo implicaban a *S. anginosus* y *S. constellatus*.

Debido a las implicaciones clínicas asociadas con el aislamiento de cepas del grupo *milleri* en muestras clínicas, es importante que el laboratorio de microbiología trate de obtener una identificación de este grupo, separando las cepas de los otros grupos de *Streptococcus viridans*, por lo que es necesario adoptar estrategias simplificadas de detección con fines diagnósticos. La determinación de su prevalencia mediante métodos moleculares supone un primer paso para medir la relevancia de su eliminación en la evolución de la pericoronaritis.

## 1.5. *Streptococcus constellatus* y *anginosus* en la pericoronaritis

*S. constellatus* es una de las especies que, junto a *S. anginosus* y *S. intermedius*, forman el grupo de *S. milleri*. Habitantes de la cavidad oral, el tubo digestivo, aparato genital femenino y las vías respiratorias altas, es infrecuente encontrarlos en otras localizaciones. A pesar de todo, su correlación con síndromes clínicos no ha sido consistente, pero se ha señalado que las distintas especies del grupo manifiestan asociaciones con diferentes síndromes clínicos<sup>54</sup>.

Cuando producen enfermedad, se asocian a procesos infecciosos bucales, como la pericoronaritis y periodontitis, además de sinusitis, neumonías, abscesos cerebrales e incluso procesos meníngeos en pacientes inmunodeprimidos o con factores de riesgo (cirugía previa, traumatismos, diabetes mellitas o enfermedad tumoral), pero son procesos excepcionales fuera de estas poblaciones. Es muy característica de *S. milleri* su propensión a producir infecciones muy supurativas.

La infección por *Streptococcus constellatus*, se caracteriza por la formación de abscesos en diversos órganos, pero de forma más superficial que *S. intermedius*, que se caracteriza por producir abscesos profundos y más aislados. *S. constellatus* es causante de abscesos polimicrobianos y no parece tener predilección por ningún área específica. Es detectado infrecuentemente en la sangre, al contrario que *S. anginosus*, que es la asociada más frecuentemente con bacteriemia de las tres especies del grupo. Las bacteriemias del grupo *milleri* suele asociarse con focos supurativos<sup>54</sup>. El trabajo de Frédéric Bert y cols.<sup>55</sup>, en 1998, describía signos de shock en 4 pacientes de 51 estudiados con bacteriemias del grupo *milleri*, con 2 muertes entre la población de estudio. Asimismo, la tasa de mortalidad en pacientes con bacteriemia es variable, y oscila alrededor del 12,5%.

Yoshida et al.<sup>40</sup> intentaron obtener información sobre la virulencia de los *Streptococcus* del grupo *milleri*, evaluando la capacidad molecular y enzimática de la  $\beta$ C-liasa en *Streptococcus constellatus*, intentando descubrir si era común a otras cepas de *Streptococcus constellatus* y *anginosus*. Las cistationinas-beta-liasas son enzimas que catalizan la  $\alpha$ - $\beta$ -eliminación de los aminoácidos sulfurados. El gen que codifica estas enzimas es el *lcd*, del cual se ha realizado en este estudio la comparación de su secuencia en *Streptococcus constellatus*, *anginosus* y *gordonii*. Han concluido que la elevada producción de sulfuro de hidrógeno por las cepas de *Streptococcus constellatus* y *anginosus* puede estar asociada a su formación de abscesos, pues este gas tóxico predomina en bolsas periodontales y está asociado con la producción de endotoxinas que inducen la inflamación. La conclusión de los autores puede ser respaldada por otro estudio donde se observa la presencia de este grupo de *Streptococcus* en masas quísticas que contienen este gas, en cuatro de nueve abscesos del cuello, por tomografía computarizada. Asimismo, señalan que el otro miembro del grupo, *Streptococcus intermedius*, tiene baja capacidad para producir sulfuro de hidrógeno a partir de la L-cisteína.

Chiang et al., en 2003, describen por primera vez un caso clínico de una mujer de 87 años con aneurisma micótico torácico-abdominal aórtico, donde se ha confirmado la presencia de *Streptococcus constellatus subsp.constellatus*<sup>56</sup>. Su cuadro clínico era de dolor abdominal severo y persistente hacía dos semanas, por lo cual se ha diagnosticado a través de una tomografía computarizada la infección y se realizaron hemocultivos antes de iniciar la antibioterapia. Se identificaron cocos grampositivos y posteriormente se realizaron pruebas bioquímicas, que fueron positivas para  $\alpha$ -glucosidasa y hialuronidasa, y negativas para  $\beta$ -N-acetilgalactosidasa y  $\beta$ -N-

acetilglucosaminidasa, lo que conlleva la presencia de *Streptococcus constellatus subsp.constellatus* y su confirmación se realizó mediante amplificación por PCR.

IchiKama et al. en 1998, centran sus estudios en la implantología, y demuestran que *Streptococcus constellatus* puede adherirse in vitro en mayor medida a la densa hidroxiapatita que al titanio, lo que condiciona el éxito de los implantes dentales<sup>57</sup>. La hidroxiapatita fue acondicionada con ácido fluorhídrico al 5% durante diversos periodos de tiempo cortos (0 a 50 segundos), tras lo cual, la adherencia bacteriana aumentaba. Los resultados de este estudio concuerdan con el estudio in vivo de Nakazato et al, 1989, lo que confirma que la calidad y cristalinidad de la hidroxiapatita determina su capacidad para facilitar la adherencia bacteriana, lo cual condiciona los resultados del implante<sup>57</sup>.

Bonnet et al han diagnosticado por un periodo de más de doce años casos de bacteriemias con *Streptococcus milleri* asociadas a infecciones de injertos vasculares, con la posterior observación de fístulas vasculo-digestivas<sup>58</sup>. Han descrito siete pacientes con infecciones provocadas por *S. grupo milleri*. *Streptococcus anginosus* fue aislado en cuatro pacientes y *Streptococcus constellatus* en tres. Concluían que las infecciones periprotéticas secundarias a fístulas digestivas en pacientes con injertos aórticos o vasculares merecen atención, pues al ser raras, su estudio es prioritario, al no revelar la tomografía abdominal una contribución diagnóstica precisa, y ser preciso realizar hemocultivos para un diagnóstico exacto antes de la cirugía y repetirlos cuando haya sintomatología.

Peromingo et al.<sup>59</sup> destacan la importancia del empiema pleural causado por *Streptococcus constellatus* cuando se asocia con otros anaerobios, presentando un caso clínico de un paciente de 59 años del sexo masculino con secuelas graves de una

enfermedad neurológica previa. En el cultivo bacteriano identificaron la presencia de *Streptococcus constellatus* y dos cepas de anaerobios (*Prevotella intermedia* y *Fusobacterium urealyticus*). Sugerían que al menos un anaerobio pudiera actuar junto a *S. constellatus* en la producción de infecciones pulmonares, al estimular el crecimiento de este último y suprimir la actividad bactericida del hospedador.

En una serie japonesa, la presencia de enfermedades subyacentes moderadas o severas se observó en 86,7% de los pacientes con infecciones agudas del tracto respiratorio superior asociados a bacterias del grupo *anginosus*. De ellos, solo un pequeño porcentaje eran portadores de enfermedades del sistema nervioso central y *S. constellatus* fue el más frecuentemente aislado en esta serie.

Las bacteriemias debidas a los microorganismos del grupo *milleri* son infrecuentes y se suelen asociar a un foco de sepsis intraabdominal, siendo aproximadamente un tercio las debidas a focos pulmonares como empiema o absceso.

El tratamiento de las infecciones por *S. constellatus* sigue siendo la penicilina o las cefalosporinas de 3ª generación, asociando fármacos con actividad anaerobicida, si coexiste infección por anaerobios. Bantar y cols.<sup>44</sup>, en 1996, estudiaron las susceptibilidades de cada cepa a la penicilina, eritromicina, vancomicina, gentamicina y estreptomina, encontrando una disminución de la susceptibilidad en el 12,5% de *S. anginosus*, 5,5% de *S. constellatus* y 33,3% de *S. intermedius*, por lo que este grupo presenta una gran divergencia en la susceptibilidad a los antibióticos betalactámicos. Asimismo, las diferencias a nivel clínico no son relevantes, y se puede concluir que la identificación de las especies del grupo *milleri* no ayudaría a predecir la susceptibilidad antibiótica, reforzando la elección empírica de la misma. Estudios más recientes destacan la susceptibilidad del grupo *milleri* a la penicilina, amoxicilina, cefradoxina en la dosis recomendada<sup>43</sup>.

A lo largo del tiempo, se ha sugerido que los abscesos craneales, a pesar de ser raros, tienen una etiología odontogénica, normalmente tras la realización de tratamientos y procedimientos dentales e infecciones orales. Han sido numerosos los esfuerzos hechos y las dificultades en establecer inequívocamente si los microorganismos aislados del cráneo tienen un origen oral, ya que estos se encuentran en otras partes del cuerpo. No hay estudios comparativos, con métodos discriminativos donde se aíslen microorganismos de estas dos regiones. Marques da Silva, R. et al. describieron un absceso craneal causado por *S. constellatus* en un paciente inmunodeprimido con periodontitis, y demostraron su similitud genética con otra muestra de origen oral<sup>60</sup>. Se han descrito abscesos hepáticos secundarios a una bacteriemia provocada por *S. constellatus*. Legout, L. et al.<sup>61</sup> describen el caso clínico de una paciente con múltiples abscesos hepáticos, de 39 años de edad, con antecedentes de alcoholismo, que había sido hospitalizada debido a un shock séptico. En los hemocultivos realizados se aisló *S. constellatus*, posiblemente de origen intestinal. El pronóstico de la paciente fue favorable por los múltiples drenajes percutáneos junto con la antibioterapia continuada intravenosa con el fin de controlar la infección bacteriana. La asociación entre *S. constellatus* y las infecciones hepatobiliares y digestivas se pone de manifiesto en pacientes con factores predisponentes que llevan a una inmunodepresión subyacente. El pronóstico de las infecciones causadas por los *S.* del grupo *milleri* es variable y depende de la localización de los abscesos y del terreno subyacente. Perez y cols describen como factores de mal pronóstico el origen biliar, la presencia de un shock inicial y la presencia de abscesos múltiples<sup>61</sup>. En la actualidad, muchos de los estudios<sup>41,62-64</sup> describen casos clínicos de abscesos múltiples causados por *S. constellatus* y le confieren el papel de patógeno raro causante de endocarditis.

*S. constellatus* tiene un papel importante en las infecciones respiratorias, aunque por ser un comensal de la orofaringe, por sí solo no tiene la capacidad de causar enfermedad. Su relevancia patógena viene de maniobras diagnósticas, como la intubación (endoscopia, broncoscopia), la cirugía u otras infecciones donde actúa sinérgicamente con otros grupos de bacterias anaerobias. Por ello, la mediastinitis causada por este grupo de bacterias sin intubación o cirugía previa no es frecuente. Ortiz de Saracho J. y cols.<sup>65</sup> describen un caso de mediastinitis y empiema torácico secundario a la infección por *S. constellatus*. Bringas-Bollada M. y cols.<sup>66</sup> presentan un caso de sepsis por *S. constellatus* de origen periodontal en un paciente inmunocompetente que cursó con neumonía y meningitis. El cultivo del líquido cefalorraquídeo demostró crecimiento de *S. constellatus*, a pesar de que no había un foco supurativo localizado. Lo llamativo de este caso fue la gran diseminación de la enfermedad a partir del foco periodontal, a pesar de la ausencia de factores de riesgo. Asimismo, es de destacar que no se formaron abscesos cerebrales a pesar del cuadro clínico de meningitis bacteriana. Dada la tendencia natural de la infección a formar abscesos en distintas localizaciones, descartarlos mediante pruebas de imagen es primordial en estos pacientes. En esta paciente, desde su ingreso hasta el alta, solo se halló como microorganismo causante a *S. constellatus* en distintas localizaciones, pero para conseguir una buena evolución clínica fue necesario tratamiento con antibióticos de amplio espectro, así como la eliminación quirúrgica del foco. Por ello, para descartar una coinfección con otros gérmenes, es muy importante la toma seriada de cultivos.

## 1.6. Diagnóstico de las patologías infecciosas

El diagnóstico de las patologías infecciosas se realiza mediante la identificación de los agentes infecciosos. Para ello, se desarrolla una metodología basada en técnicas directas e indirectas. Mediante los métodos directos se detectan los propios agentes infecciosos y/o sus componentes, tales como los ácidos nucleicos, proteínas estructurales y no estructurales, enzimas y otros. Por otro lado, los indirectos ponen de manifiesto los anticuerpos inducidos por las infecciones. Los métodos más comunes de detección directa son:

- aislamiento o cultivo in vitro
- microscopía óptica
- pruebas enzimáticas bioquímicas
- microscopía electrónica
- inmunofluorescencia
- inmunohistoquímica
- enzimoimmunoensayo (ELISA) para detección de antígenos
- hibridación de ácidos nucleicos (NAH)
- amplificación de ácidos nucleicos, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los métodos indirectos más comunes de detección del agente infeccioso son las pruebas serológicas, entre las que destaca la detección de anticuerpos mediante ELISA o las pruebas de inhibición de la hemoaglutinación. Un diagnóstico preciso puede por ello englobar simultáneamente a los dos métodos<sup>67</sup>.

## **1.7. Detección de agentes infecciosos mediante métodos de diagnóstico molecular**

Se denominan métodos de diagnóstico molecular a aquellos que tienen como objetivo las moléculas de ácidos nucleicos, tales como la hibridación de ácidos nucleicos (NAH) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)<sup>67</sup>.

Dada la complejidad de métodos de diagnóstico molecular, únicamente van a describirse aquellos más relacionados con nuestro estudio y que se han empleado en la presente tesis.

### **1.7.1. PCR**

La introducción de las técnicas moleculares en el ámbito del diagnóstico en medicina, como ha sido el uso de la PCR y su aplicación en la microbiología clínica, ha supuesto un avance en la detección y caracterización de los microorganismos. Su desarrollo en los años 80 se puede considerar una revolución, pues esta técnica ha permitido nuevas estrategias de análisis de genes en el ámbito de la tecnología del ADN recombinante, iniciada en los años 70<sup>68</sup>.

Gracias al descubrimiento de la metodología de PCR, el final de los años 80 brindó grandes avances en el diagnóstico de las patologías infecciosas, pues los métodos eran más sensibles y específicos al obtener grandes cantidades de ADN susceptible de ser analizado.

Los ensayos de PCR inicialmente eran caros y laboriosos. Hoy en día, son herramientas relativamente baratas, seguras y fáciles de utilizar en los laboratorios de diagnóstico<sup>69,70</sup>, por lo que la PCR está revolucionando el diagnóstico de numerosas

enfermedades infecciosas, particularmente aquellas causadas por organismos difíciles de cultivar, y además se ha convertido en una herramienta esencial a emplear en diversos procedimientos comunes como el clonaje de fragmentos específicos de ADN, para la detección e identificación de genes en el diagnóstico y la medicina forense, detección de mutaciones, diagnóstico de enfermedades hereditarias o determinación del sexo del feto previamente a su implantación en procesos de fecundación *in vitro* y en investigaciones relacionadas con marcadores de paternidad.

#### **1.7.1.1. Técnica de la PCR**

La reacción en cadena de la polimerasa se basa en la capacidad de replicación *in vitro* de una secuencia específica de DNA, realizada por enzimas, mediada por primers o cebadores en un proceso dependiente de la temperatura<sup>71</sup>.

El término “reacción en cadena” se refiere a varios ciclos de copia de un tramo específico de DNA diana perteneciente al genoma del agente infeccioso. La región que hay que amplificar está definida por dos o más secuencias de nucleótidos cortos, denominados sitios de los cebadores, que flanquean a la secuencia diana.

Los cebadores o primers, oligonucleótidos cortos que son complementarios de los sitios de los cebadores, se unen a las hebras de DNA para ser copiadas. Utilizando una polimerasa que no se desnaturalice durante el ciclo de calentamiento, es posible copiar la secuencia diana uniendo los nucleótidos libres a los cebadores. La Taq-polimerasa es una enzima aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*, que es resistente al calor, por vivir en altas temperaturas. Es muy utilizada en los ciclos de PCR, por resistir a las elevadas temperaturas (95°C, 55°C y 72°C respectivamente) que se dan a lo largo del procedimiento<sup>68</sup>.

### a) Amplificación del DNA

Si el genoma del agente infeccioso es ADN, la amplificación se realiza directamente, con o sin purificación previa del ADN diana, pero su purificación, dará como resultado un aumento en la sensibilidad analítica y diagnóstica.

### b) Amplificación del ARN (PCR con transcripción inversa)

Los genomas de muchos agentes infecciosos (virus, especialmente) contienen ácido ribonucleico (RNA) que no se puede amplificar directamente mediante la PCR. Para su amplificación, se necesita un ADN diana monocatenario. Este problema se suele resolver utilizando la transcriptasa inversa, por lo cual el ARN se puede transcribir al ADN complementario (ADN<sub>c</sub>). Este tiene una doble cadena y se puede usar en el ensayo de PCR. Es lo que se denomina transcripción inversa - PCR (RT-PCR).

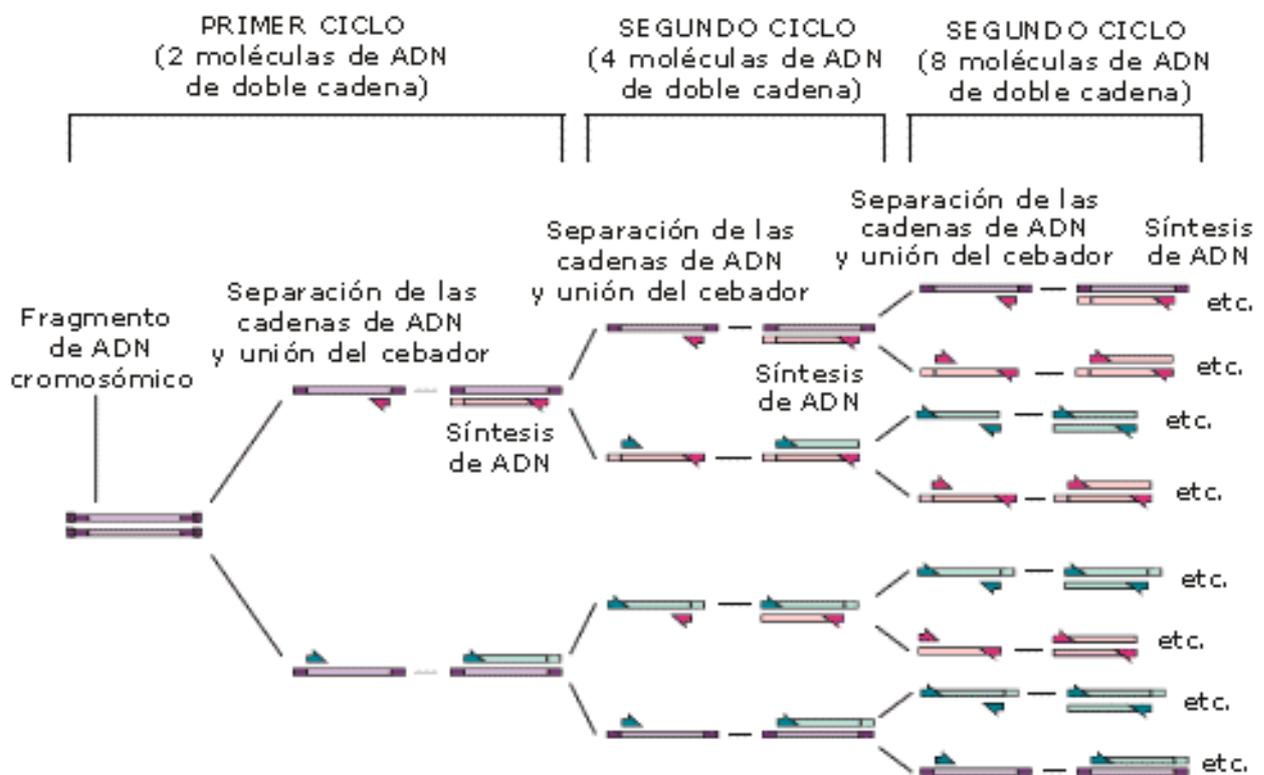


Figura 4: Diagrama de la técnica de la PCR<sup>72</sup>

Son necesarios varios ingredientes para llevar a cabo un experimento de PCR, entre los cuales destacan<sup>73</sup>

- ADN substrato o molde que se pretende amplificar
- Primers en concentraciones molares elevadas
- Taq-polimerasa
- Desoxirribonucleótidos trifosfato
- Solución tampón, con alguna fuente de ión  $Mg^{2+}$

La mezcla de reacción, de volumen variable (25-100 $\mu$ l), se coloca en el termociclador (aparato con capacidad de producir rápidos cambios en la temperatura, figura 9) y se somete a un número de ciclos de entre 30 y 40, con la siguiente programación<sup>73</sup>.

- Desnaturalización: a 94°C, durante 30-60 segundos.
- Hibridación: a 30-65°C, durante 30-60 segundos (según los primers).
- Extensión: a 65-75°C, durante 0-5 minutos (normalmente 72°C, 1 minuto).



Figura 5: Termociclador (Foto del autor de la presente tesis)

La desnaturalización del primer ciclo se realiza a 95°C, con una duración comprendida entre 3 y 5 minutos. Asimismo, en la extensión del último ciclo, la duración se amplía algunos minutos.

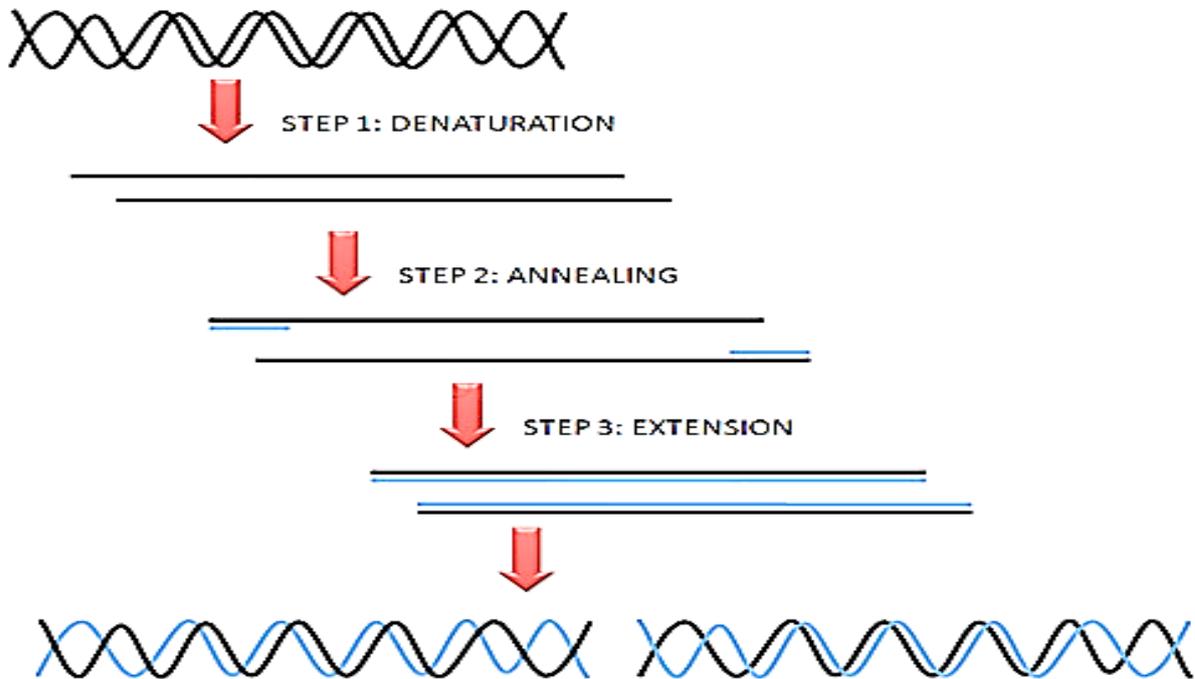


Figura 6: Ciclos de la PCR<sup>74</sup>

Una vez obtenido el fragmento diana amplificado, es preciso llevar a cabo su detección. Lo más usual es realizar la electroforesis en gel de agarosa (Figura 7) y la utilización de bromuro de etidio para la visualización de la banda que representa la secuencia amplificada<sup>73</sup>.

### c) Detección del amplicón por PCR mediante electroforesis

El procedimiento más utilizado para la separación de fragmentos de ácido nucleico es la electroforesis en gel. Su fundamento es la migración dentro de un campo eléctrico de las sustancias a estudiar. La movilidad de las mismas dependerá, sobre todo, de su carga eléctrica y de su masa, de forma que las mayores migrarán más lentamente que

las menores. El gel sirve como matriz y la sustancia tampón como medio de conducción.

Los ácidos nucleicos muestran una carga negativa a pH neutro, debida a los restos fosfato, de forma que migrarán hacia el polo positivo. El tipo de gel vendrá determinado por el tamaño de los fragmentos que se desean separar. Para fragmentos grandes se utiliza el gel de agarosa, cuyos poros permiten la circulación de cadenas de hasta 50.000 pares de bases, mientras que en caso de moléculas menores se emplea el gel de poliacrilamida. La visualización de las bandas de ácido nucleico se realiza aplicando bromuro de etidio y posteriormente luz ultravioleta, de forma que se obtiene un bandeo anaranjado en el gel.



Figura 7: Colocación de la muestra para electroforesis en gel de agarosa<sup>75</sup>

La agarosa es un polisacárido (originalmente obtenido de algas, como el agar-agar, pero de composición homogénea), cuyas disoluciones (típicamente de 0,5 a 2%) poseen la propiedad de permanecer líquidas por encima de 50°C y formar un gel

semisólido al enfriarse. Este gel está constituido por una matriz o trama tridimensional de fibras poliméricas embebida en gran cantidad de medio líquido, que retarda el paso de las moléculas.

#### **d) Variantes de PCR**

Existen varias metodologías distintas de PCR y se diferencian en su sensibilidad y especificidad, además de en su aplicación.

- ✓ **PCR convencional:** amplifica una pequeña parte del genoma del agente infeccioso utilizando un par de cebadores oligonucleótidos, con alta sensibilidad y especificidad. Usando el método Southern-blot, la especificidad puede mejorar posteriormente. Sin embargo, este método lleva mucho tiempo y no es una práctica muy común hoy en día en los laboratorios de diagnóstico<sup>67</sup>, pues consiste en llevar los fragmentos de ADN ya separados en el gel de electroforesis a un soporte sólido como la nitrocelulosa, para posteriormente marcarlos con sondas específicas y realizar el revelado de bandas que representan los fragmentos buscados y permiten su detección<sup>76</sup>.
- ✓ **PCR anidada:** Es muy sensible, utiliza dos ciclos de amplificación con cuatro cebadores, que tienen de unirse específicamente a las dianas seleccionadas para producir una reacción positiva<sup>67</sup>.
- ✓ **PCR en tiempo real o cuantitativa:** Es un método muy sensible y rápido para la detección y cuantificación de especies bacterianas<sup>77-79</sup>. La amplificación de los productos de la PCR son detectados directamente en los ciclos de amplificación

mediante sondas marcadas con fluorescencia. Solo se utiliza un par de cebadores, con riesgo bajo de contaminación, permitiendo la cuantificación de ácidos nucleicos de ADN y ARN mensajero en una muestra, sin necesidad de análisis una vez finalizado el proceso.

- ✓ **PCR múltiple:** Se utilizan cebadores múltiples dirigidos a diferentes dianas en un único ensayo<sup>67</sup>.

#### e) Particularidades y aplicaciones de la PCR en la Biología Molecular

La utilización de la PCR tiene algunos problemas:

- Taq-polimerasa: A pesar de ser una enzima termoestable, carece de actividad 3`-5`-exonucleasa, lo que puede inducir a errores, que serán mayores cuanto más temprano se produzcan en la PCR. Por eso se recomienda no usar un elevado número de ciclos para garantizar su correcto funcionamiento.
- La contaminación con un ADN extraño (aunque en pequeña cantidad). Esto puede dar lugar a amplificación de productos no deseados originados por hibridaciones inespecíficas y obtengamos un resultado que no es real. Por ser una técnica muy sensible, su mayor ventaja se puede transformar a la vez en su mayor inconveniente.

Las aplicaciones de la PCR son variadas y podemos destacar las siguientes:

- Dentro de la Bioquímica Analítica:
  - Secuenciación de ácidos nucleicos
  - Síntesis automatizada de oligonucleótidos
  - Marcado de sondas de ADN
  
- Dentro de la Biomedicina<sup>80</sup>:
  - Estudio de oncogénesis viral y oncogénica
  - Detección de mutaciones puntuales en tumores y enfermedades hereditarias
  - Detección de agentes etiológicos infecciosos
  - Dentro de este aspecto diagnóstico, es importante la facultad que tiene esta técnica para detectar el ADN diana a partir de muestras histológicas antiguas incluidas en parafina

#### **1.7.1.2. Genes específicos en la identificación bacteriana**

Las bacterias son seres procariotas y su genoma es el conjunto total de genes transportados por la bacteria, tanto en su cromosoma como en sus elementos genéticos extracromosómicos (plásmidos o bacteriófagos), cuando los mismos están presentes en dicha bacteria. Las bacterias, al tener en general una sola copia de sus genes en su cromosoma, cualquier alteración (mutación) en el mismo podrá ejercer un efecto importante en la célula. Sus genes son secuencias de nucleótidos que codifican cadenas polipeptídicas que desempeñan una determinada función biológica, como los genes de proteínas estructurales y enzimas, o los genes del RNA ribosómico.

Generalmente, el diagnóstico molecular en bacteriología clínica se centra en la detección cualitativa del microorganismo en un paciente con sintomatología<sup>71</sup>. Por otra parte, la facilidad e incremento del uso de la PCR y la secuenciación de DNA ha permitido que la identificación bacteriana en los laboratorios de microbiología sea la principal aplicación<sup>81</sup>.

Las bacterias contienen tres genes responsables de codificar los RNA ribosómicos: 5S, 16S y 23S rRNA. El gen 16S rRNA ha sido el más utilizado para la detección de bacterias, mediante la amplificación por PCR, por encontrarse en todas las bacterias y tener pequeñas mutaciones a lo largo de su secuencia. Muchas porciones en este gen son auténticas señas de identidad para algunas bacterias y nos permite el acceso a estudiar las relaciones entre ellas<sup>71</sup>, lo que es realmente importante en bacterias con fenotipos no usuales, bacterias raras, que crecen lentamente, que no son cultivables o ante cultivos negativos en infecciones. Todo esto ha aportado avances en la etiología de muchas enfermedades infecciosas, como ayuda al clínico a elegir un tratamiento con antimicrobianos y validar su tiempo de administración<sup>81</sup>. Además, muchas especies bacterianas han sido reclasificadas y su nombre ha cambiado. Más recientemente, el empleo de la región intergénica del 16S-23S rRNA se ha popularizado por presentar un número elevado de copias y aportar una gran variabilidad en su secuencia que permite la detección de especies concretas<sup>71</sup>. Recientemente, muchos estudios han empleado también la subunidad del gen 23S rRNA para la identificación de bacterias específicas. La identificación molecular de las bacterias suele utilizar secuencias específicas de sus genomas bacterianos. Para ello, es necesaria la utilización de primers o cebadores que le confieran un alto grado de especificidad, siendo este el principal objetivo en la identificación bacteriana por parte de los investigadores. En la actualidad, hay numerosos estudios específicos para la identificación de la diversidad bacteriana en

que la cuestión fundamental se centra principalmente en adoptar una metodología diagnóstica precisa para que al final se pueda validar el ensayo.

### **1.7.2. Identificación de *Streptococcus* del grupo *milleri* mediante técnicas de biología molecular**

Respecto a la identificación de las especies del grupo *milleri* mediante técnicas de biología molecular, Jacobs et al.<sup>82</sup> analizaron un conjunto de 399 cepas de este grupo para obtener su identificación a nivel de especie mediante el empleo de una prueba de blot lineal, basada en el uso de la secuencia del gen de 16S rRNA situada entre 213 y 231 pb como sonda oligonucleotídica, específica para cada uno de los miembros del grupo *milleri*, y compararon los resultados de la hibridación con el método fenotípico de referencia. La mayor parte de las cepas (89,5%) reaccionaron de forma inequívoca con una de las sondas, pero el 10,5% (42 cepas) reaccionó tanto con *S. constellatus* como con *S. intermedius*, y 41 de estas fueron identificadas fenotípicamente como *S. constellatus*. El análisis del extremo 5' de la secuencia de 16 S rRNA de estas cepas duales puso de manifiesto que representaba un patrón diferenciado de rRNA, con un 98,1% de similitud con *S. constellatus*.

Chen et al.<sup>83</sup> analizaron la fiabilidad del análisis de la secuencia de la región intergénica 16S-23S del DNA ribosómico para la identificación de especies de *Streptococcus viridans* clínicamente relevantes. La longitud de dicha región y su secuencia se encontraba muy conservada entre las distintas cepas de una especie. El análisis filogenético reveló que la evolución de las regiones de algunas especies del grupo *viridans* no ha discurrido en paralelo con la de los genes de 16S rRNA. Se identificaron 106 cepas clínicas del grupo *viridans* mediante el sistema Rapid ID 32 STREP (bioMerieux) y por secuenciación de la región intergénica. El grado de discrepancia

entre ambos métodos fue del 18%. La mayor parte de cepas con resultados discordantes podían asignarse de forma inequívoca a una especie concreta a partir de su secuencia. Algunas de las discrepancias se dieron en el grupo *milleri*. Así, cuatro cepas identificadas fenotípicamente como *S. intermedius* con el sistema Rapid ID 32 STREP, se asignaron a *S. anginosus* a partir de su secuencia.

De Gheldre et al.<sup>84</sup> han empleado la técnica de análisis del polimorfismo en la longitud de la región intergénica del DNA de transferencia (tDNA), basada en la amplificación mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de la secuencia intermedia entre los genes de tRNA, para la diferenciación de componentes del grupo *viridans*. Pudieron identificar correctamente 66 cepas pertenecientes a 15 especies difíciles de clasificar mediante métodos convencionales. En lo concerniente al grupo *milleri*, esta técnica ofrece un patrón similar para *S. constellatus* y *S. intermedius*, y ligeras diferencias de estos con *S. anginosus*.

Jacobs et al.<sup>85</sup> determinaron las similitudes genéticas entre las cepas clínicas del grupo *milleri* aisladas de forma consecutiva de pacientes individuales, con el fin de evaluar la duración de la infección. Se obtuvieron un total de 97 cepas procedentes de 30 pacientes, de las que el 67% provenían de abscesos. Las cepas se identificaron mediante una prueba de hibridación de blot lineal inverso con secuencias de 16S rRNA, de modo que hubo 34 muestras de *S. anginosus*, 55 de *S. constellatus* y 8 de *S. intermedius*. El análisis de polimorfismo de fragmentos amplificados (AFLP) dio lugar a patrones discriminativos y reproducibles. Se hallaron cepas clínicas consecutivas con variantes similares de AFLP en el 90% de los pacientes, y cepas con un solo tipo de AFLP en el 70% de los casos.

Buscando peculiaridades que permitieran diferenciar cada miembro del grupo *milleri*, Nagamune et al.<sup>86</sup> fueron los primeros en describir una nueva citotoxina a la que

denominaron intermedilisina, dada su presencia exclusiva en *Streptococcus intermedius*. Se trata de una toxina con potencial hemolítico superior en eritrocitos humanos que en los de otros primates, y sin capacidad hemolítica en otras especies animales. Se cree que actúa a través de una proteína de la membrana celular. También han sido Nagamune et al.<sup>87</sup> quienes han investigado la distribución de la intermedilisina entre los miembros del grupo *milleri*, y han demostrado que solo está presente en *Streptococcus intermedius*, y no en *S. constellatus* ni *anginosus*. Además, su nivel es superior en localizaciones con infecciones de cierta gravedad, frente a la de cepas procedentes de placa dental o de flora normal. Macey et al.<sup>88</sup> han investigado otros mecanismos de acción de la intermedilisina, y han podido descubrir que origina la reducción significativa en el número de polimorfonucleares intactos, tras ser expuestos a dicha toxina. La especificidad de unión a células humanas ha sido estudiada en mayor profundidad por Polekhina et al.<sup>89</sup>, los cuales respaldan la estructura similar a otras citolisinas dependientes de colesterol, y determinan como lugar de unión a las células humanas una región de su dominio 4.

Partiendo de la especificidad de la intermedilisina en *S. intermedius*, Goto et al.<sup>90</sup> han diseñado un par de cebadores para la detección de una secuencia de 819 pb del gen de esta citolisina, y han podido comprobar que es exclusiva de esta especie y no da reacciones cruzadas con otras especies del género *Streptococcus*. Además, puede emplearse esta prueba de PCR directamente, sin cultivo previo.

Takao et al.<sup>91</sup> plantea el empleo de la técnica de PCR para la identificación de cada uno de los miembros del grupo *milleri*. Para ello, amplifican el gen de la proteína de unión a la penicilina 2B (*pbp2b*) en cada cepa tipo de las especies del grupo *milleri* mediante un par de cebadores universales, con el fin de poder secuenciar dicho gen, y diseñar

cebadores específicos para el grupo. Posteriormente, utilizan secuencias de los genes de la hialuronato-liasa para diferenciar *S. intermedius* y *S. constellatus*, el gen del RNA ribosómico 16S para distinguir a *S. anginosus*, y un par de cebadores pertenecientes al gen del factor de virulencia intermedilicina, para *S. intermedius*. Los autores obtienen un fragmento de 275 pb específico del grupo *milleri* con los cebadores de *pbp2b*, y ninguna reacción inespecífica con otras especies de estreptococos. Mediante los cebadores específicos, obtienen un fragmento de 105 pb con las cepas de *S. anginosus*, de 428 y 819 pb para las cepas de *S. intermedius* (en función del gen), y de 752 pb para *S. constellatus subsp. constellatus* (430 pb para la subespecie *pharyngis*). Consideran sus resultados satisfactorios para la aplicación en la identificación de estas especies, pero no para el empleo directo sin cultivo.

Liu et al.<sup>92</sup> presentan un experimento de PCR para la distinción de las especies del grupo *milleri* entre sí, y con *Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis* entre los estreptococos beta-hemolíticos de los grupos C y G. El producto resultante de PCR de 742 pb era específico para los miembros del grupo *anginosus*, aunque también se amplificaba una secuencia inespecífica de 361 pb, perteneciente a *S. dysgalactiae subsp. equisimilis*. Para diferenciar los miembros del grupo *milleri*, el fragmento de 742 pb se digería con las enzimas de restricción XbaI y BsmI para identificar *S. anginosus* y *S. constellatus*.

Otro estudio sobre el uso de PCR en detección de secuencias de *S. anginosus* fue publicado por Sasaki et al.<sup>93</sup>. Estos autores habían descrito anteriormente el clonaje de fragmentos de DNA procedente del gen de 16S rRNA de esta bacteria, a partir de muestras quirúrgicas de cáncer de estómago. Diseñaron una prueba de PCR y un análisis de Southern blot a partir de dichas secuencias, y los aplicaron en muestras clínicas procedentes de 15 cánceres de esófago, 43 cánceres de estómago, 16

cánceres de pulmón, 10 cánceres cervicales, 14 carcinomas de células renales, 10 cánceres colorrectales y 19 de vejiga. Encontraron, con frecuencia, secuencias de DNA de *S. anginosus* en muestras de cáncer esofágico y gástrico, así como en aquellas de displasia de esófago. No detectaron secuencias de esta bacteria en tejidos no tumorales de dichos órganos mediante Southern blot. Al utilizar PCR, pudieron encontrar secuencias de *S. anginosus* en el 7% de la porción no tumoral de esófago. No se halló ninguna secuencia en los tumores de pulmón, cerviz y riñón, pero sí una muestra positiva en los tumores colorrectales.

En nuestro estudio, pretendemos obtener conocimientos diagnósticos que, aplicados a nuestra práctica clínica nos permitan mejorar nuestro desempeño, haciendo posible una reducción de las complicaciones asociadas a los *Streptococcus* grupo *milleri* en la pericoronaritis. Con una correcta información microbiológica, podemos emplear una terapéutica más adecuada, evitando en los pacientes con infecciones polimicrobianas complicaciones por prescripciones terapéuticas inadecuadas. La flora bacteriana y el sitio de origen de una infección pueden variar y debe determinarse para que el régimen del tratamiento más eficaz pueda comenzarse.

Podemos trasladar la experiencia y los resultados obtenidos con este estudio a otras aplicaciones de la cirugía, y no solamente a nivel oral, sino a otros campos de la medicina. No podemos olvidar que para diseñar este estudio utilizamos experiencias realizadas en otras áreas de microbiología, ya que las técnicas de diagnóstico molecular tienen un papel importante y significativo en la bacteriología clínica.



## **2. OBJETIVOS**



## **2.1. Objetivo General**

Desarrollar un protocolo de laboratorio, basado en la técnica de PCR, para la detección de *Streptococcus constellatus* en muestras clínicas procedentes de pericoronaritis, con el fin de emplearlo en el ámbito diagnóstico en el futuro

## **2.2. Objetivos específicos**

Los objetivos específicos de este trabajo de investigación son:

1º Seleccionar cebadores específicos para *Streptococcus constellatus* diseñados a nivel bioinformático y comprobar su especificidad frente a otras especies del género *Streptococcus* y otras bacterias frecuentes en la cavidad oral.

2º Detectar inequívocamente y de forma cualitativa mediante el protocolo de PCR diseñado la especie *Streptococcus constellatus* en muestras clínicas de casos de pericoronaritis y sujetos sanos.

3º Realizar una valoración inicial de la prevalencia de la bacteria en cada uno de los grupos.



### **3. HIPÓTESIS DE TRABAJO**



### **Hipótesis conceptual:**

A partir del conocimiento genético actual de *Streptococcus constellatus*, es posible el desarrollo de un método de detección del mismo que podrá suponer una mejora diagnóstica en la pericoronaritis.

### **Hipótesis operativas:**

1. Los cebadores diseñados a nivel bioinformático a partir de las secuencias genéticas conocidas de *Streptococcus constellatus* son específicos frente a otras especies del grupo milleri y otras bacterias orales.
2. El protocolo de PCR puesto a punto para la detección de *Streptococcus constellatus* permite su uso con muestras clínicas procedentes de localizaciones con pericoronaritis.
3. La prevalencia de *Streptococcus constellatus* es mayor en los sujetos con pericoronaritis respecto a los sujetos sanos.



## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**



#### 4.1. Evaluación de la especificidad de secuencias publicadas

Se realizó una revisión bibliográfica hasta diciembre de 2011 empleando la base de datos *Pubmed* (<http://www.pubmed.gov>) para la búsqueda de artículos de investigación que hubieran empleado secuencias genéticas de *Streptococcus constellatus* para su detección mediante PCR, ya fuera directamente desde muestras clínicas o a partir de colonias aisladas mediante cultivo.

Posteriormente, con el fin de detectar posibles apareamientos inespecíficos de dichas secuencias, se llevó a cabo el estudio de cada una de las mismas realizando un enfrentamiento mediante el software *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Anexo 3). De esta forma, se pretendía obtener una perspectiva real de la fiabilidad de los protocolos de PCR empleados hasta el momento actual en la detección de estos patógenos. El algoritmo utilizado fue *blastn (somewhat similar sequences)*, ajustado para realizar la búsqueda en la base de datos *nucleotide collection (nr/nt)*.

#### 4.2. Búsqueda de regiones genómicas específicas y diseño de cebadores

En esta etapa, se realizó una búsqueda de las secuencias depositadas en *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Nucleotide&itool=toolbar>) empleando como palabra clave la denominación *Streptococcus constellatus*. Se realizó una primera criba de secuencias eliminando aquellas de la lista cuya denominación no correspondía directamente con esta especie.

Posteriormente, se llevó a cabo con todas y cada una de las secuencias del listado (Anexo 3) su comparación mediante *BLAST* (*blastn, nucleotide collection*) y con el resto de secuencias inscritas en la base de datos pertenecientes a *Streptococcus.constellatus*, para así determinar regiones lo suficientemente específicas que pudieran emplearse en el posterior diseño de cebadores. El criterio de idoneidad seguido en nuestro estudio, fue la presencia de una región exclusiva de, al menos, 70 pares de bases, con el fin de poder obtener por PCR un producto fácilmente distinguible mediante una electroforesis en gel de agarosa a 1%, que no se confundiera con los dímeros de cebador que suelen aparecer con esta técnica, y que tuviera un tamaño lo suficientemente pequeño para reducir la posibilidad de falsos negativos derivados de la degradación de secuencias excesivamente largas (Anexo 4).

Aquellas secuencias con pequeños tramos diferenciales, de pocas bases, entre especies no se han considerado aptas para el objeto de este estudio. Asimismo, aquellas secuencias que mostraban similitud con otras pertenecientes a clones bacterianos no cultivados han sido descartadas, ante la incertidumbre de etiquetar dichos clones como especies conocidas o bien como nuevas especies aún por clasificar.

Con las secuencias seleccionadas, se realizó un alineamiento múltiple mediante el software *Clustal W* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>), utilizando

secuencias de la misma región genómica procedentes de otras cepas de la misma especie, siempre que estuvieran disponibles, con el fin de examinar el grado de conservación de dichas regiones, para evitar falsos negativos derivados de un mal diseño de cebadores.

A partir de las secuencias que cumplieron el criterio de idoneidad descrito, se llevó a cabo el diseño de cebadores específicos mediante el software de acceso gratuito online *Primer3* ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)). Se realizó el ajuste en dicho software para detectar secuencias diana con tamaño situado entre 100 y 250 pb, de modo que la degradación del DNA de la muestra clínica no supusiera un factor que incidiera de forma importante en la posibilidad de falsos negativos. En caso de que la secuencia de partida fuera de alrededor de 100 pb, el límite inferior del tamaño del producto de PCR se redujo a 70 pb.

De los cinco pares de cebadores que el programa informático ofrece al usuario por cada secuencia introducida, se seleccionó la primera opción (Tabla 5) , como la considerada más idónea por el propio software, y se examinó en *BLAST*, tanto cada cebador por separado, como en conjunto, mediante los pasos que indica el propio manual del software citado.

Región intergénica 16S-23S del RNA ribosómica DQ204524, tramo de 120-230 pb

**HC1:**

LEFT PRIMER 5'-GGCTCCATTATCTAGGATGCAA-3'

RIGHT PRIMER 5'-TGGGCTAATTAGGTTTCGTGTT-3'

AMPLICÓN: 105 pb

---

Gen de una posible proteína y del precursor de la hialuronato-liasa AF385683, tramos de 490-650 pb y 4480-4863 pb

**HC2:**

LEFT PRIMER 5'-TTCGTTACTCGTTTTAAATTCAGG-3'

RIGHT PRIMER 5'-TTTTAAACATTTTATCCTCCTGTCAA-3'

AMPLICÓN: 223 pb

**HC3:**

LEFT PRIMER 5'-TCTGTTTTTGCAGGTGTTGC-3'

RIGHT PRIMER 5'-GGAGTTCAGCTTCCCACAAC-3'

AMPLICÓN: 130 pb

**Tabla 5:** Regiones genómicas tomadas como diana para el diseño de cebadores de *S.*

*constellatus* y cebadores obtenidos a los cuales asignamos un código alfabético para su distinción y que denominamos HC1, HC2 y HC3.

#### **4.3. Estudio empírico de la especificidad del par de cebadores seleccionado**

Todo el trabajo de laboratorio de la presente Tesis fue llevado a cabo en el Laboratorio de Microbiología del Instituto Superior de Ciencias de Saúde Egas Moniz en Portugal.

Dadas las limitaciones intrínsecas del estudio de la especificidad de secuencias genéticas mediante análisis bioinformático, se optó por enfrentar de forma empírica los cebadores seleccionados con cultivos procedentes de distintas cepas del género *Streptococcus* y otras especies orales, según se expone en la tabla 6. Todas ellas fueron obtenidas de la Colección Alemana de Cultivos tipo (DSMZ) (<http://www.dsmz.de/>)

Especie bacteriana	Catálogo DSMZ
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC13813	2134
<i>Streptococcus dysgalactiae subsp. dysgalactiae</i> ATCC 43078	20662
<i>Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis</i> ATCC 35666	6176
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC25175	20523
<i>Streptococcus mitis</i> ATCC49456	12643
<i>Streptococcus oralis</i> NCTC11427	20627
<i>Streptococcus peroris</i> JCM10158	12493
<i>Streptococcus bovis</i> ATCC 33317	20480
<i>Streptococcus gordonii</i> ATCC10558	6777
<i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC10556	20567
<i>Streptococcus parasanguinis</i> ATCC15912	6778
<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 7073	20560
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC12344	20565
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 33400	20566
<i>Streptococcus anginosus</i> ATCC 33397	20563
<i>Streptococcus intermedius</i> ATCC 27335	20573
<i>Streptococcus constellatus subsp. constellatus</i> ATCC27823	20575
<i>Streptococcus constellatus subsp. pharyngis</i> MM9889a	17475
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	20709
<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611	20706

**Tabla 6:** Cepas bacterianas empleadas para la comprobación de la especificidad de los cebadores de *Streptococcus constellatus*.

#### **4.4. Crecimiento de los microorganismos**

Las cepas bacterianas fueron adquiridas en forma liofilizada de la Colección Alemana de Cultivos tipo (DSMZ) (<http://www.dsmz.de/>).

Las bacterias fueron sembradas en placas de petri en medio agar Columbia (Biomérieux® Francia) con sangre de oveja a 5% (COS), y crecidas a 37°C en cámara de anaerobiosis 24 horas a excepción de *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia*, que fueron sembradas en placas de petri en medio agar sangre (CDC) y crecidas a 37 °C en cámara de anaerobiosis durante 48-72h.

#### **4.5. Preparo de las suspensiones bacterianas para posterior extracción del DNA.**

Se han hecho diluciones de cada cepa posteriormente al cultivo de cada especie bacteriana.

Solamente después se ha procedido a la extracción de DNA de cada dilución.

Para determinar el número de bacterias en campo, se ha optado por la estandarización de McFarland, por ser muy común en análisis de microbiológicos clínicos. La escala de McFarland relaciona la turbidez (medida por nefelometría) de unos patrones de sulfato bórico (mezcla de cloruro bórico al 1% y ácido sulfúrico al 1%) con el número de bacterias presentes en una muestra (Anexo 5).

Una vez obtenida una cantidad visible de colonias mediante el cultivo, se procedía a recoger directamente de la placa de agar colonias de tamaño mediano para un tubo con 10ml de soro fisiológico estéril que se media en la escala de McFarland (Figura 8) hasta obtener un valor de 0,5, a lo que correspondía un número de bacterias de  $10^8$  ufc/ml.

Esta suspensión se agitaba en vórtex durante 1 minuto para facilitar la dispersión de las colonias, y se removían 100µl para un tubo donde previamente se había añadido 9,9ml de suero fisiológico estéril, para obtener una concentración de  $10^6$  ufc/ml e de igual manera para obtener una concentración de  $10^4$  ufc/ml.



Figura 8: Medidor de la Escala de MacFarland utilizado en nuestro estudio

#### 4.6. Extracción de DNA bacteriano

El DNA ha sido extraído recurriendo al kit comercial Invitek® (bacteria DNA mini kit) (Figura 9), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Anexo 6).

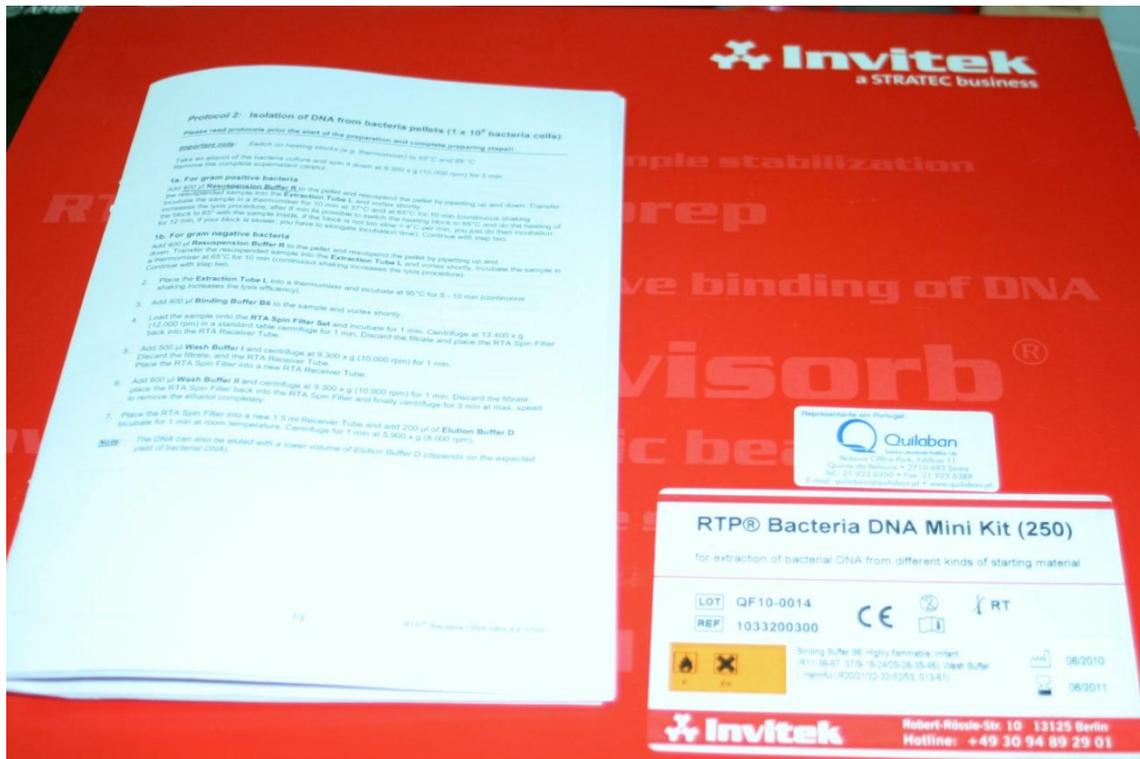


Figura 9: Kit Comercial INVITEK para extracción de DNA bacteriano utilizado en nuestro estudio.

De cada una de las suspensiones de  $10^8$  ufc/ml,  $10^6$  ufc/ml,  $10^4$  ufc/ml se retiraban 1000 $\mu$ l, se centrifugaba a 10.000 rpm durante 3 minutos y se removía delicadamente el sobrenadante, para obtener los pellets bacterianos.

La solución obtenida (o DNA) se conservaba a 4°C hasta su análisis posterior por PCR si este se realizaba en un plazo inferior a 48 horas, o bien se preparaban alícuotas que se conservaban posteriormente a -20°C.

#### 4.7. Amplificación mediante PCR

La PCR es un procedimiento de uso habitual en el diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas y de base genética. Tiene como principal ventaja su gran sensibilidad y especificidad, además de la facilidad del procedimiento, pero su principal inconveniente es la posibilidad de resultados falsos positivos derivados de una práctica poco rigurosa que facilita la contaminación de las muestras con productos procedentes de amplificaciones anteriores. Con el fin de evitar este problema, se preconiza la utilización de dos salas independientes durante el procedimiento, una para la preparación inicial de muestras y otra para el análisis tras la amplificación. En la presente investigación, se realizó en distintas salas (Figuras 10 y 11) la siembra y la recogida de colonias para análisis, la extracción de DNA, y la posterior amplificación y electroforesis de los productos amplificados.



Figura 10: Salas independientes en el laboratorio con medios para evitar contaminaciones.



Figura 11: Sala donde se han procesado las muestras después del cultivo en el laboratorio de microbiología en el INSTITUTO SUPERIOR de Ciências da Saúde EGAS MONIZ.

Asimismo, se utilizaron pipetas y el resto del material de forma específica para cada área. Se procedía a la descontaminación de las superficies con una solución de alcohol a 70°C, tras realizar cada procedimiento, así como al principio y al final de la jornada. Para llevar a cabo la PCR, se empleó el kit comercial illustra™ puretaq Ready-to-go PCR Beads (GE Healthcare), pues reduce significativamente en número de pipeteo, disminuyendo los errores humanos, aumentando la reproductividad. El volumen total en cada reacción contemplaría los 25 µL.

Los reactivos de cada reacción fueran los siguientes:

- 2,5µl de primer forward (10µM)
- 2,5µl de primer reverse (10µM)
- 5µl DNA
- 15µl de H<sub>2</sub>O estéril

que se adicionaban a las “beads”.

Toda la preparación de la mezcla madre se realizaba a temperatura ambiente, ya que la Taq-polimerasa era de tipo hot-start. La metodología al elegir este tipo de polimerasa se basa en lo aumento de especificidad, sensibilidad y reproductividad.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes (Figura 12):

95°C 5 minutos

95°C 30 segundos

Temperatura hibridación primer 30 segundos distintas para cada cebador (Tabla 7)

72°C 30 segundos

72°C 10 minutos

El primer paso de desnaturalación de 5 minutos es recomendado para garantizar la completa desnaturalación da la cadena de DNA.

Los pasos 2, 3 e 4 se repetían 34 veces (desnaturalación, hibridación del cebador e elongación) (Figura 12).



Figura 12: Ciclos de la PCR, para amplificación de ADN con una temperatura de hibridación de 45°C.

#### **4.8. Temperatura annealing**

Las temperaturas annealing o hibridación son dependientes de la secuencia de cada cebador y de sus homologías para las cadenas del DNA.

En la presente tesis doctoral las distintas temperaturas de melting descritas en cada cebador diseñado bioinformaticamente presentan una variación, siendo la amplificación más específica con temperaturas de annealing cerca de las temperaturas de melting. La optimización de las temperaturas de annealing ha sido testada empíricamente para cada cebador, bajando entre 2 a 5°C relativamente a la temperatura de melting.

Los cebadores (Tabla 7) han sido ordenados al Laboratório Stab Vida, en Caparica (Anexo 7), Portugal.

Especie bacteriana	Gen	Secuencia del cebador	Temperatura melting (°C)	Temperatura annealing (°C)	Amplificación (pares de bases)	Código alfabético asignado a cada cebador
<i>S.constellatus</i>	Región intergénica 16S-23S RNA ribosómica DQ204524, tramo de 120-230 pb	GGCTCCATTATCTAGGATGCAA TGGGCTAATTAGGTTTCGTGTT	54	52	105	HC1
<i>S.constellatus</i>	Posible proteína y del precursor hialuronato-liasa	TTCGTTACTCGTTTTAAATTCAGG TTTTAAACATTTTATCCTCCTGTCAA	52	45	223	HC2
<i>S.constellatus</i>	AF385683, tramos de 490-650 pb y 4480-4863 pb	TCTGTTTTTGCAGGTGTTGC GGAGTTCAGCTTCCCACAAC	55	50	130	HC3
<i>Streptococcus</i>	16S rRNA	7-f AGAGTTTGAT(C/T)(A/C)TGGCTCAG 1510-r ACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT	52	45	1500	16S rRNA

**Tabla 7:** Cebadores obtenidos bioinformaticamente para *S.constellatus* y cebador universal del género *Streptococcus*. Se especifica en cada uno de los cebadores su temperatura de melting bien como la de annealing y el tamaño esperado de la banda tras su amplificación por PCR.

#### 4.9. Visualización del producto amplificado.

La visualización se llevó a cabo con un gel de agarosa al 1%. Se preparaba mezclando un gramo de agarosa de media electroendósmosis (Ecogen®) con 100ml de tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE, Applichem®). La mezcla se disolvía en microondas y a continuación se dejaba enfriar ligeramente. Se adicionaba el gel red e se homogenizaba. Para 100ml de gel de agarosa se adicionaba 70µl de gel red diluido previamente (Figura 13).

Se vertía en la bandeja de electroforesis, se colocaba el peine correspondiente y se dejaba que gelificara a temperatura ambiente unos minutos (Figura 14).



Figura 13: Gel red puro y diluido.

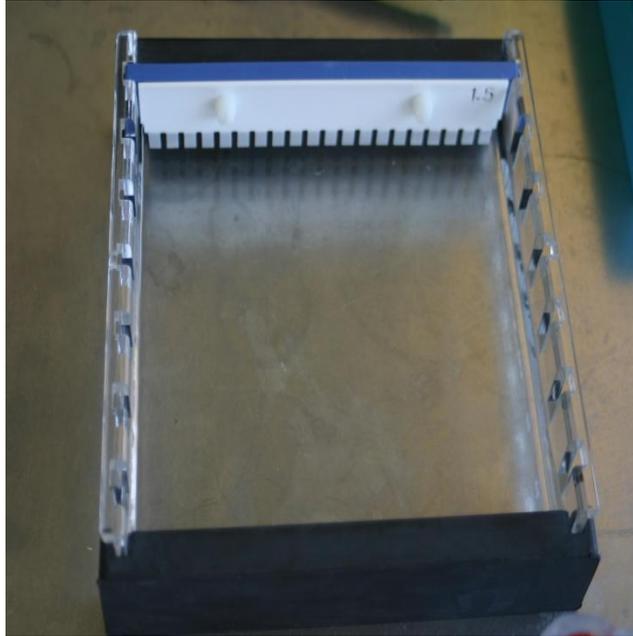


Figura 14: Bandeja de electroforesis con el peine colocado en el gel de agarosa a 1%.

Cada muestra amplificada se mezclaba con un tampón de carga (6X DNA Loading Dye) (Figura 15) de forma previa a la electroforesis, en proporción de 2  $\mu$ L de tampón por cada 10 $\mu$ l de muestra, para hacer un total de 12  $\mu$ L.

Se utilizó un marcador de peso molecular que representa una escalera a intervalos de 100pb (GeneRuler™ Ladder Mix, ready-to-use) (Anexo 8).

Tras la carga del gel (Figura 16, 17), se sometía a una corriente eléctrica de 90 voltios durante 120 minutos (Figura 18).

Por último, el gel era visualizado en un transiluminador de luz UV. El amplicón esperado debía tener un tamaño aproximado hasta 223pb. Se tomó un registro gráfico de cada gel analizado mediante un sistema digital de documentación de geles en una sala propia para este efecto (Figura 19).



Figura 15: Tampón de carga (6X DNA Loading Dye) de Fermentas®

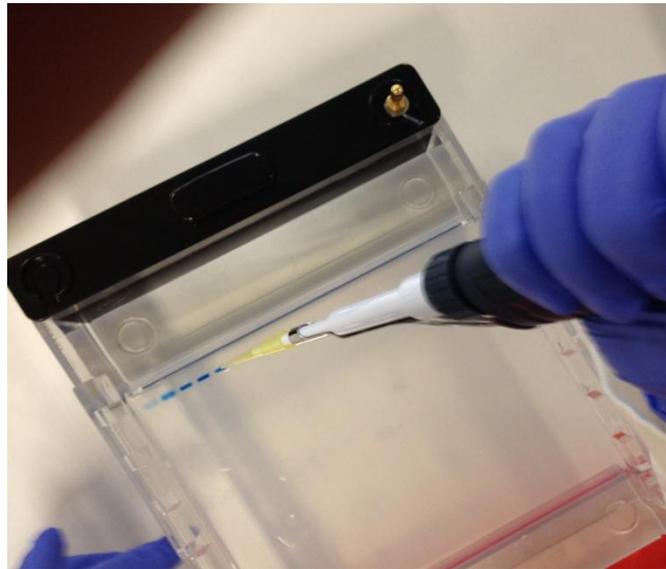


Figura 16: Mezcla de la muestra amplificada con el tampón y su colocación en el gel de agarosa.

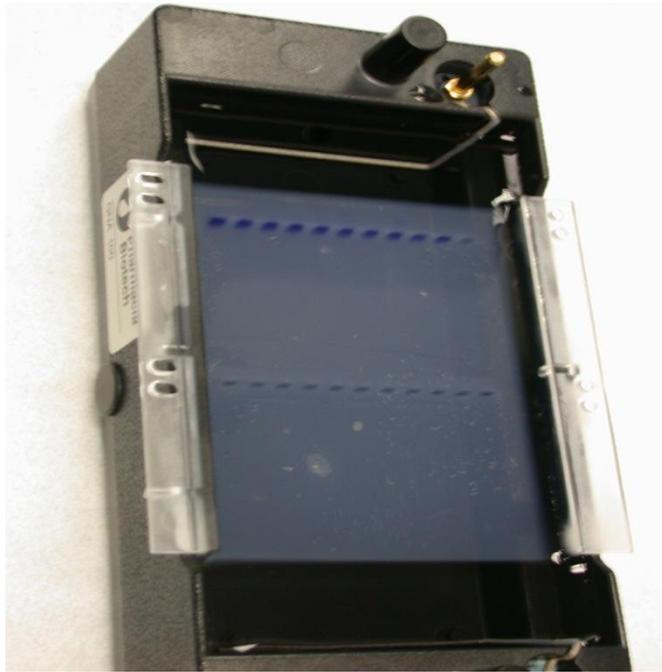


Figura 17: Gel cargado

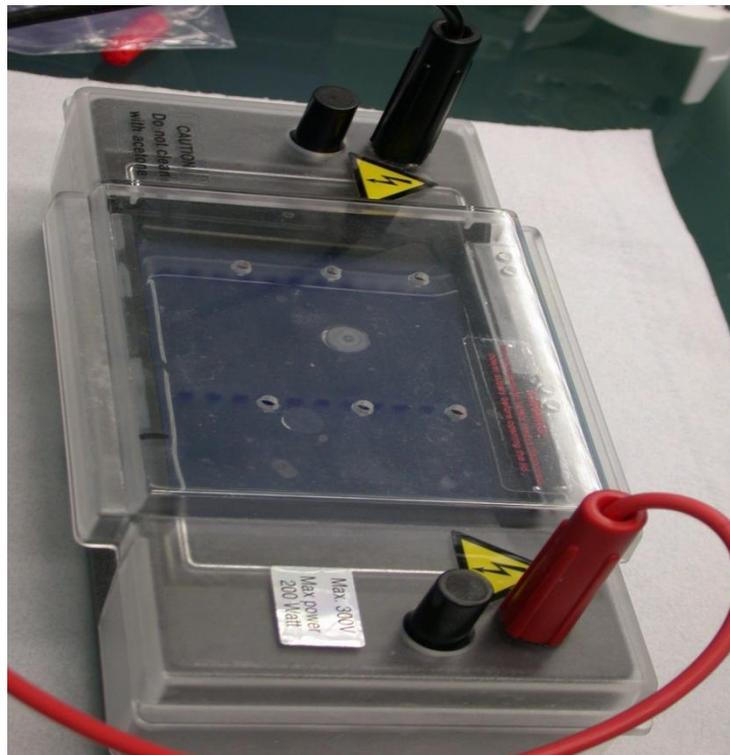


Figura 18: Aplicación de corriente eléctrica para realizar la electroforesis.



Figura 19: Sala específica en el Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, para visualización de geles a través de un transiluminador de luz UV y un sistema digital para documentación de los mismos.

#### **4.10. Aplicación en muestras clínicas:**

Una vez comprobada la especificidad del par de cebadores seleccionado, se procedió a su aplicación en muestras clínicas procedentes de localizaciones de terceros molares inferiores con pericoronaritis (Anexo 1,2). Para la toma de muestras clínicas, se recurrió a la formación de dos pequeños grupos de sujetos, uno de ellos con criterios clínicos de pericoronaritis, y el otro con criterios de salud alrededor del tercer molar.

Los criterios clínicos de **exclusión** de pericoronaritis fueron los siguientes:

- Pacientes que realicen enjuagues con algún colutorio antiséptico en las últimas 24 horas y que hayan sido medicados con antibióticos en los últimos 90 días.
- Pacientes con diabetes, enfermedades tumorales, SIDA o cualquier otra inmunodeficiencia.
- Mujeres embarazadas o en estado de lactancia.
- Pacientes con profundidad de sondaje por mesial del tercer molar superior a 4mm.

##### **4.10.1. Recogida de muestras clínicas**

Las muestras clínicas han sido recogidas en la clínica universitaria del Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, por pacientes que recorrían al departamento de Cirugía Oral (Figura 20) y han sido efectuadas por el mismo clínico, mediante consentimiento informado (Anexo 2) en lo cual se respetaron los criterios de inclusión establecidos previamente.



Figura 20: Pacientes que recorrián al Departamento de Cirugía Oral en la clínica universitaria del Instituto Superior de Ciências de Saúde Egas Moniz, con terceros molares inferiores parcialmente impactados.

Las muestras clínicas se tomaron mediante punta de papel absorbente de diámetro 45 (Figura 21) dado que se ha demostrado que es un tamaño muy adecuado para la adsorción de distintas especies bacterianas<sup>94</sup>.



Figura 21: Puntas de papel absorbente de diámetro 45, utilizadas en nuestro estudio.

La punta se introducía con una pinza por distal del tercer molar, bajo el capuchón mucoso propio de la pericoronaritis, y se dejaba durante un minuto para favorecer la adsorción de bacterias. Posteriormente, se extraía con precaución para evitar la contaminación con otras superficies orales y se introducía en un tubo de microfuga de 1,5  $\mu$ L con medio de transporte **TSB** (medio líquido de tripticasa-soja) que favorece el crecimiento de microorganismos fastidiosos, pues contiene varias peptonas o triptonas, NaCL y dextrosa (Figura 22).



Figura 22: : Colocación de la punta de papel adsorbida con la muestra oral en el tubo de microfuga de 1,5 $\mu$ l en medio de transporte líquido tripticasa-soja.

#### **4.10.2. Crecimiento de los microorganismos**

De inmediato se procedía al procesamiento de las muestras en el laboratorio.

Se vorteaba treinta segundos cada muestra y se hacían diluciones seriadas en caldo Suspension Medium API 20 A (Biomérieux® Francia), hasta obtener: una dilución de 1/10, 1/100 e 1/1000.

Una vez finalizada la primera parte del procedimiento laboratorial se ha procedido a la inoculación en placas de Petri, por sembramiento. Se ha inoculado 100µl/placa de la muestra no diluida en medio agar Columbia (Biomérieux® Francia) con sangre de oveja a 5% (COS), en medio manitol salt agar (MSA) y en medio agar sangre (CDC).

En las diluciones de 1/10, 1/100 e 1/1000 se ha procedido de igual manera pero sin inocular en el medio manitol salt agar (MSA). Así a partir de cada muestra clínica, serían inoculadas 8 placas.

Posteriormente a la inoculación de las placas, se ha procedido a la incubación de las mismas en una atmosfera de anaerobiosis a 37°C, por un periodo de 3 a 4 días (Figura 23) excepto el medio manitol salt agar (MSA) que se ha inoculado en aerobiosis.



Figura 23: Placa de Petri, después de incubada en medio de anaerobiosis con la inoculación de 100µl/placa de la muestra no diluida en medio agar Columbia (Biomérieux® Francia) con sangre de oveja a 5% (COS).

#### **4.10.3. Procedimiento laboratorial para la identificación bacteriana a partir de muestras orales.**

Por las limitaciones de tiempo y costes solo se ha podido seleccionar especies bacterianas que después de incubadas presentasen la misma morfología para su identificación posterior en el sistema API 20 Strep y por eso solamente se repicaban para un nuevo medio agar-sangre cepas bacterianas con crecimiento superior a 5%<sup>95</sup>.

Se ha procedido en una primera fase, la identificación bacteriana segundo algunos de los criterios del manual de Bergey<sup>96</sup>, como la morfología, la consistencia y el color de la cepa bacteriana, bien como la coloración de Gram.

En una segunda fase, se ha procedido a la inoculación del sistema de identificación de galerías API (Biomérieux® Francia) más indicado, basado en la fermentación de azúcares y en la presencia de varios sistemas enzimáticos.

El sistema API 20 Strep es un sistema padronizado que asocia 20 tests bioquímicos que presentan un elevado poder discriminativo y por eso permite efectuar el diagnóstico de grupo o de especie para la mayoría de estreptococos, enterococos y microorganismos similares corrientes. El sistema viene con un listado de todas bacterias posibles de identificar y se utiliza rutinariamente en los laboratorios de microbiología (Figura 24).

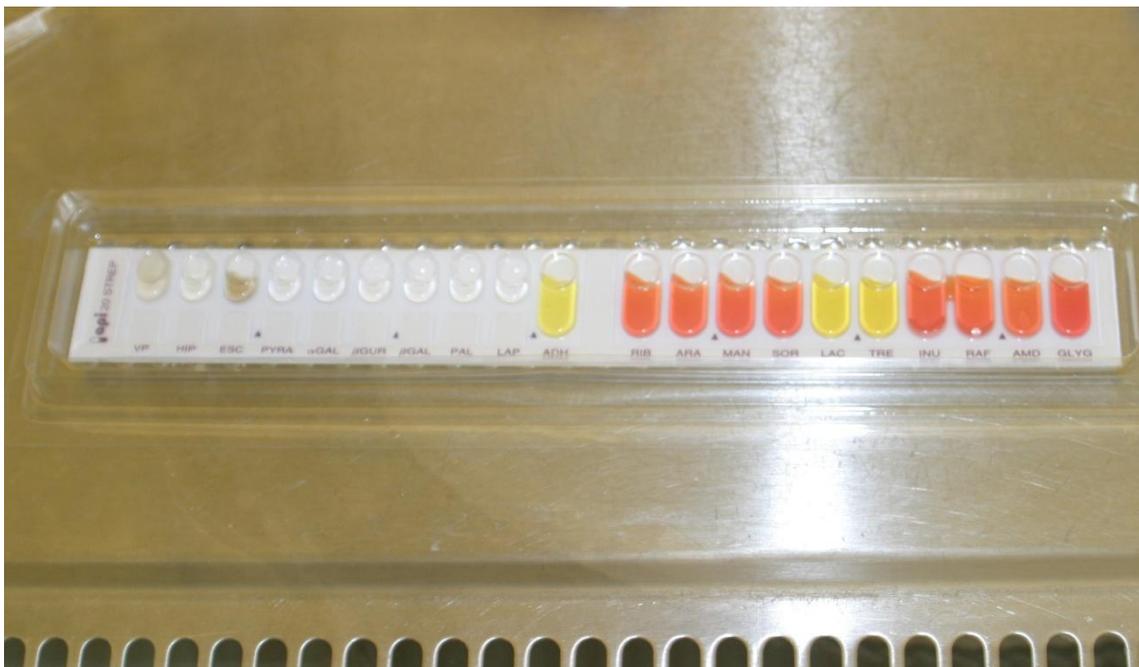


Figura 24: Sistema API 20 Strep

Posteriormente la muestra del paciente se conservaba a -20°C bien como las cepas que se habían aislado microbiológicamente, hasta su análisis posterior mediante PCR. Este procedimiento permitiría hacer una detección de los patógenos orales.

#### **4.10.4. Extracción de DNA de muestras clínicas orales**

Para la extracción de DNA, se siguió un procedimiento similar al descrito previamente en las suspensiones bacterianas. De forma breve, se sometía a agitación en vórtex durante 1 minuto para facilitar el desprendimiento de las células de la punta de papel y se añadía 500µl de la muestra con 500µl de suero fisiológico estéril. A partir de ahí vorteaba nuevamente y se procedía a la técnica de extracción de DNA, con el Kit comercial INVITEK, segundo las instrucciones del fabricante (Anexo 6). De las cepas bacterianas aisladas y identificadas por el sistema API 20 STREP, se ha procedido también a la extracción de DNA.

El resto de pasos durante los procedimientos de extracción, amplificación y visualización es similar a lo expuesto anteriormente.

#### **4.10.5. Amplificación del DNA obtenido de las muestras clínicas**

Se realizaron PCR de muestras obtenidas de tres pacientes con pericoronaritis y tres del grupo control, con los cebadores obtenidos bioinformáticamente para evaluar la especificidad de los mismos frente a los resultados obtenidos a partir de los testes enzimáticos.



## **5. RESULTADOS**



### **5.1. Secuencias de cebadores publicadas previamente en la literatura**

Tras realizar una lectura exhaustiva de las publicaciones que han utilizado alguna metodología de detección de secuencia genética para el reconocimiento de *Streptococcus constellatus*, merece un comentario más exhaustivo el artículo de Takao et al.<sup>91</sup> Respecto al cebador que se considera específico de *S. constellatus* (5'-CTCTCTCTTGAGATTGTTGC-3'), se ha encontrado que coincide con secuencias de esta especie, pero también de *S. anginosus*. Además, uno de los cebadores pertenecientes a la hialuronato-liasa de *Streptococcus intermedius* (5'-GCTGTATCAATTGGAGTGTCTGTC-3') muestra una total similitud con secuencias procedentes de *S. intermedius* y *S. constellatus*. Así pues, no era posible emplear un par de cebadores con alta fiabilidad de los previamente descritos en la literatura.

### **5.2. Estudio bioinformático de regiones genómicas específicas y diseño de cebadores para *Streptococcus constellatus***

Se obtuvieron 102 secuencias procedentes de esta especie a partir de *GenBank*, muchas de las cuales se correspondían con los mismos genes en diferentes cepas de la bacteria (Anexo 3). Los genes más representados fueron: el RNA ribosómico 16S, la región intergénica 16S-23S, RNAr 23S, atpA de la subunidad alfa de la ATP-sintasa, lcd de la beta-C-S-liasa, sodA de la superóxido-dismutasa dependiente de manganeso, rpoA de la subunidad alfa de la RNA polimerasa, rpoB de la subunidad beta de la RNA polimerasa, rnpB de la ribonucleasa P de RNA, pheS de la fenil-alanil-tRNA-sintasa, glutamato-deshidrogenasa, pbp2b de la proteína de unión a la penicilina 2B, la ligasa de D-alanina-D-alanina, la hialuronato-liasa, dnaJ, la región V de la proteína I/II y varias chaperoninas.

Tras aplicar el software **BLAST** para la búsqueda de regiones específicas que tuvieran un mínimo de 70 bases contiguas no homólogas, se descartaron la mayor parte de las secuencias publicadas (Anexo 4), ya que presentaban múltiples homologías con las otras dos especies del grupo y con el resto del género *Streptococcus*. Al final, quedaron secuencias procedentes de la región intergénica 16S-23S, el gen del precursor de la hialuronato-liasa y otra posible proteína no tipificada (Tabla 5).

La secuencia AF385683, perteneciente al gen de una posible proteína sin tipificar y al gen del precursor de la hialuronato-liasa, se alineó con las secuencias AY302596 (perteneciente al gen de la glutatión-peroxidasa de *S. constellatus subsp. pharyngis*), AY302594 (perteneciente a la secuencia parcial del gen precursor de la hialuronato-liasa de *S. constellatus subsp. constellatus*) y AF385684 (perteneciente a los genes de la glutatión-peroxidasa y hialuronato-liasa de *S. intermedius*), y se pudo comprobar que el tramo de 490-650 presenta diferencias notables con AY302596 y AY385684, pero no se haya representado en el caso de AY302594, que sería la secuencia más relevante.

En el tramo comprendido entre 4480-4863 pb, muestra una similitud total con AY302594, pero solo en las primeras bases, pues esta secuencia está incompleta.

La secuencia correspondiente a la región intergénica 16S-23S del DNA ribosómico ha sido DQ204524 entre las bases 120 y 230. Se alineó mediante *CLUSTAL-W* con las secuencias AY347546, AY347545 y L36933, todas ellas pertenecientes a esta especie, y se confirmó que dicha región diana coincidía en las mismas.

Así pues, ante los conocimientos actuales del genoma de esta especie, se consideró estas regiones candidatas para el diseño de cebadores específicos.

Los cebadores obtenidos aplicando el software *Primer3* a partir de las secuencias diana descritas fueron presentados en la tabla 5.

### **5.3. Estudio empírico de la especificidad de los cebadores en las especies bacterianas orales estudiadas**

Se ha decidido enfrentar de forma empírica frente a las bacterias orales anteriormente referenciadas (tabla 6) un par de cebadores universales del género *Streptococcus* complementarios de la región RNA 16S y otros tres pares más, obtenidos a partir del estudio informático a los cuales asignamos un código alfabético para su distinción y que denominamos HC1, HC2 y HC3 (capítulo 4. Material y métodos). Estos tres últimos serían complementarios de las regiones genómicas tomada como diana para *S. constellatus*.

Tras aplicar el protocolo de PCR (capítulo 4. Material y métodos) en las cepas descritas (tabla 6), únicamente el cebador HC2 obtuvo una amplificación totalmente específica, sin amplificaciones inespecíficas de ninguna de las otras especies examinadas. La amplificación se obtuvo en *S. constellatus subsp. constellatus* en la dilución de  $10^8$  y de  $10^4$ , con resultado positivo, al generar el amplicón previsto de 223 pb claramente definido (Figura 25, 26). En la subespecie *pharyngis* de *S. constellatus*, la amplificación no se ha dado. Así mismo, se confirmó de este modo la idoneidad del protocolo diseñado para su aplicación en muestras clínicas.

### 5.3.1. Par de cebadores HC2

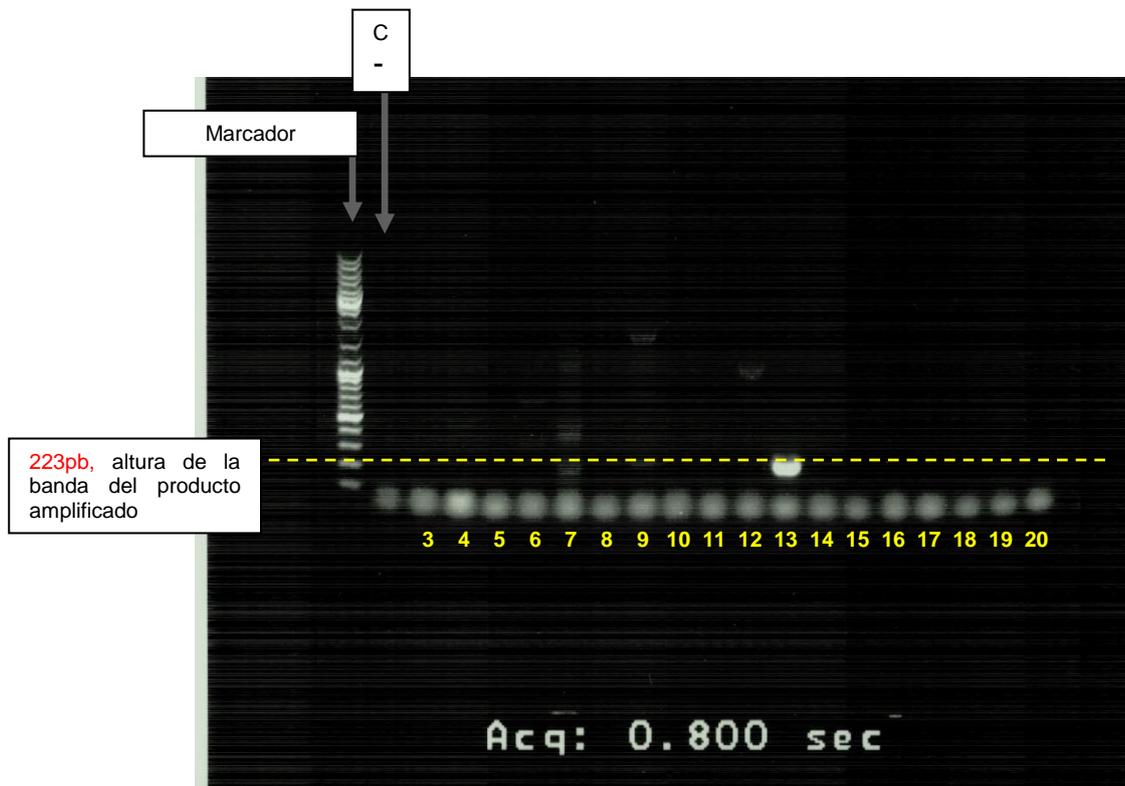


Figura 25: PCR con el par de cebadores HC2 con la temperatura de hibridación de 45°C, con todas las muestras bacterianas orales del estudio (tabla 6) en la dilución de 10<sup>8</sup>.

El gel de agarosa se preparó al 1%. En el primer pocillo, tenemos el marcador y en el segundo el control negativo. Desde el tercer pocillo hasta el vigésimo se han colocado las muestras bacterianas; 3º: *S. mitis*, 4º: *S. anginosus*, 5º: *S. equisimilis*, 6º: *S. salivarius*, 7º: *S. pneumoniae*, 8º: *S. sanguinis*, 9º: *S. parasanguinis*, 10º: *S. agalactiae*, 11º: *S. bovis*, 12º: *S. mutans*, 13º: *S. constellatus subsp. constellatus*, 14º: *S. gordonii*, 15º: *S. intermedius*, 16º: *Prevotella intermedia*, 17º: *Porphyromonas gingivalis*, 18º: *S. constellatus subsp. pharyngis*, 19º: *S. dysgalactiae*, 20º: *S. pyogenes*.

Este cebador es específico para *S. constellatus subsp. constellatus*. En la PCR de la dilución de 10<sup>4</sup> de las muestras bacterianas (tabla 6), aún se observa la banda, haciendo con que este cebador sea específico para *S. constellatus subsp. constellatus* (Figura 26).

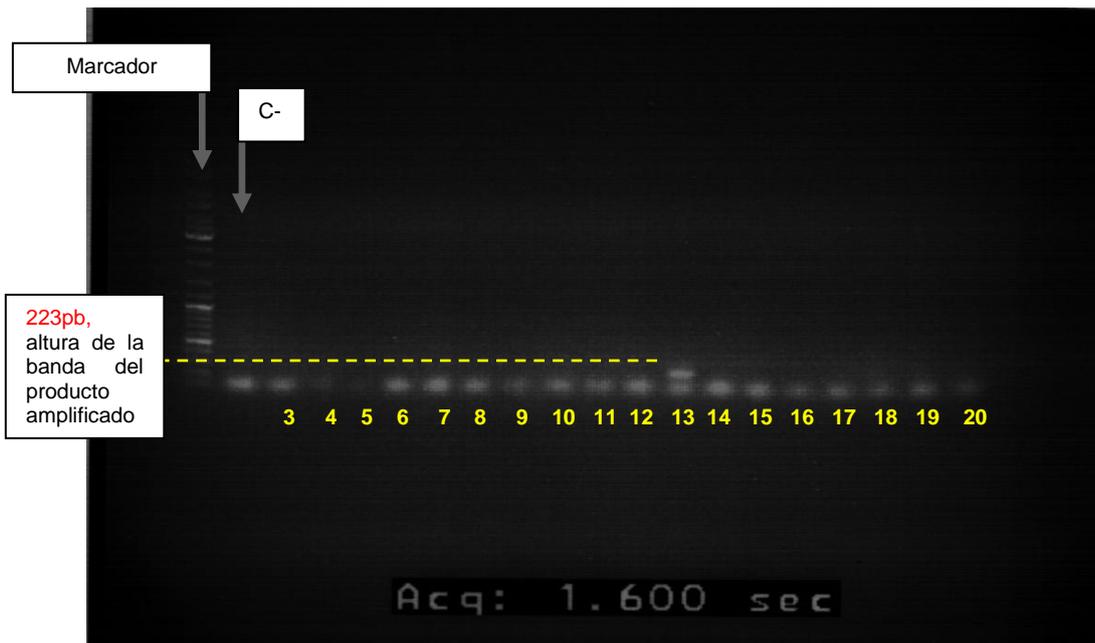


Figura 26: PCR con el par de cebadores HC2 con la temperatura de hibridación de 45°C, con todas las muestras bacterianas orales del estudio (tabla 6) en la dilución de  $10^4$ . Las condiciones fueron las mismas de la figura 25.

### 5.3.2. Par de cebadores HC1

El cebador HC1 (Figura 27) presenta una banda más intensa en los 100 pb en *S.anginosus*, *S.constellatus subsp.pharyngeus* y en *S. mutans*, lo que nos hace descartar su especificidad solamente en *S.constellatus*.

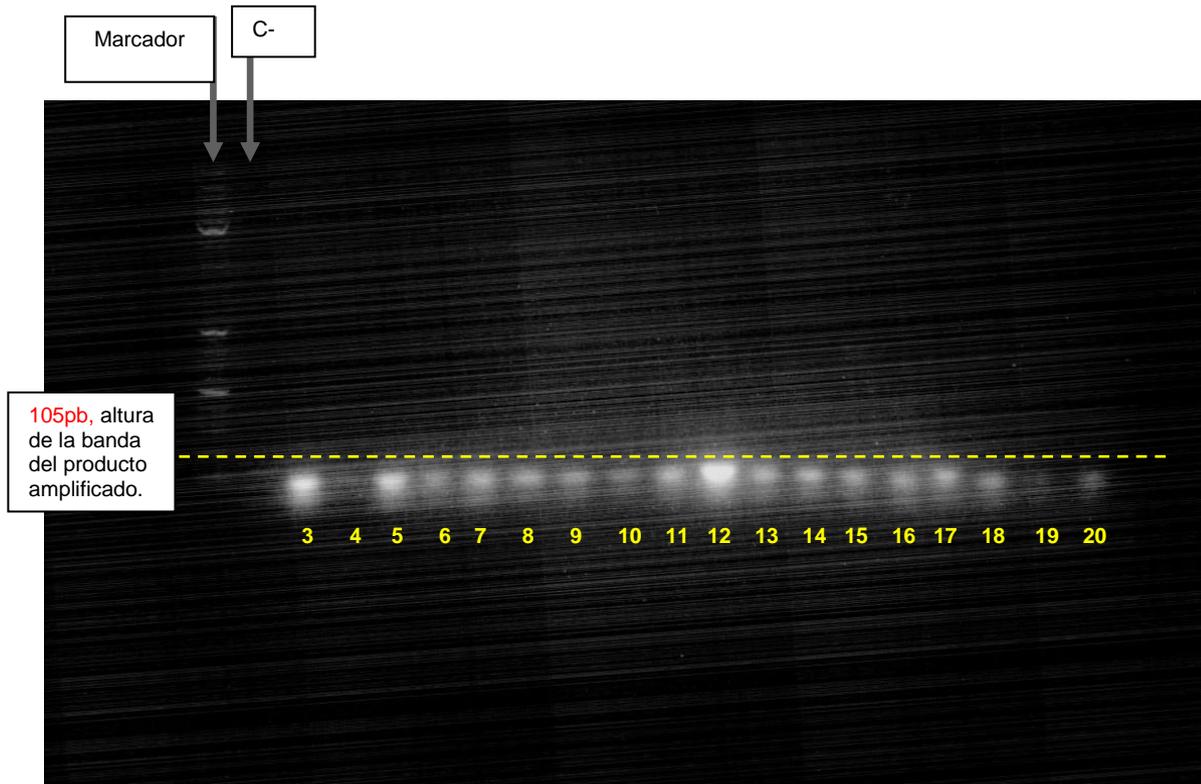


Figura 27: PCR con el par de cebadores HC1 con la temperatura de hibridación de 52°C, con todas las muestras bacterianas orales del estudio en la dilución de 10<sup>8</sup>.

El gel de agarosa se preparó a 1%. Pociello 1: marcador; 2: control negativo, 3: *S. anginosus*, 4: *S. equisimilis*, 5: *S. salivarius*, 6: *S. pneumoniae*, 7: *S. sanguinis*, 8: *S. parasanguinis*, 9: *S. agalactiae*, 10: *S. constellatus subsp. constellatus*, 11: *S. bovis*, 12: *S. mutans*, 13: *S. gordonii*, 14: *S. intermedius*, 15: *Prevotella intermedia*, 16: *Porphyromonas gingivalis*, 17: *S. constellatus subsp. pharyngis*, 18: *S. dysgalactiae*, 19: *S. pyogenes*, 20: *S. mitis*.

De acuerdo con el resultado anterior (Figura 27), este cebador presenta una banda más intensa alrededor de 105 pb en *S.anginosus* y *S. mutans*, no presentando ninguna especificidad.

### **5.3.3. Par de cebadores HC3**

El cebador HC3 no es específico, pues presenta producto amplificado para *S. anginosus*, *S. constellatus subsp. constellatus*, *Prevotella intermedia* y en *S. equisimilis*. No nos parece, pues, indicado para su aplicación en muestras orales, pues no es selectivo solamente para *S. constellatus* y en una dilución menor no parece detectar el DNA de ninguna bacteria del estudio (imágenes no disponibles).

### 5.3.4. Par de cebadores universales para 16S rRNA

El cebador utilizado en nuestro estudio, perteneciente al gen 16S rRNA proporciona una identificación fiable de especies bacterianas<sup>97,98</sup>. La amplificación del DNA a partir de este cebador ha sido conseguida en todas las especies orales estudiadas, siendo este par de cebadores fiable pues hay hibridación en los 1500pb (Figura 28). En la dilución de  $10^4$  aún se observa la hibridación de este cebador (Figura 29).

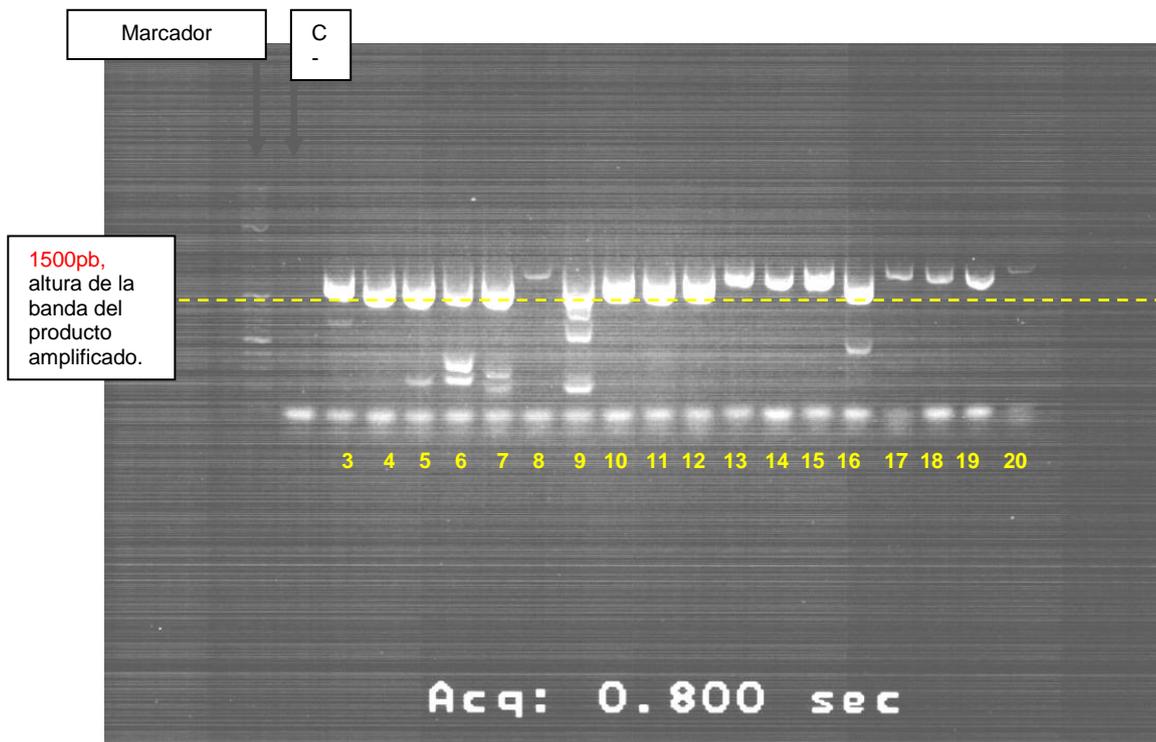


Figura 28: PCR con el cebador 16S rRNA con la temperatura de hibridación de 45°C, con todas las muestras bacterianas orales en la dilución de  $10^8$ .

El gel de agarosa se preparó a 1%. Primer pocillo: marcador; 2: control negativo; 3: *S. mitis*, 4: *S. anginosus*, 5: *S. equisimilis*, 6: *S. salivarius*, 7: *S. pneumoniae*, 8: *S. sanguinis*, 9: *S. parasanguinis*, 10: *S. agalactiae*, 11: *S. bovis*, 12: *S. mutans*, 13: *S. constellatus subsp. constellatus*, 14: *S. gordonii*, 15: *S. intermedius*, 16: *Prevotella intermedia*, 17: *Porphyromonas gingivallis*, 18: *S. constellatus subsp. pharyngis*, 19: *S. dysgalactiae*, 20: *S. pyogenes*.



Figura 29: PCR con el cebador 16S rRNA con la temperatura de hibridación de 45°C, con todas las muestras bacterianas orales en la dilución de  $10^4$ , con la misma descripción.

#### 5.4. Aplicación en muestras clínicas

Tal como se ha expuesto en la sección de Material y métodos de la presente Tesis, se realizó una toma de muestras clínicas en dos grupos de sujetos, con o sin pericoronaritis. El grupo de casos estaba constituido por 6 sujetos, con edades comprendidas entre 18 y 28 años. El grupo control estaba constituido por 3 sujetos, con edades situadas entre 18 y 21 años. Todas las muestras procedían de terceros molares inferiores.

En el grupo control no había señales de inflamación del tejido pericoronario y la profundidad de sondaje por mesial del tercer molar era menor o igual a 3 mm, sin sintomatología previa.

Se ha procedido al cultivo microbiológico de estas muestras y a la identificación bacteriana por el sistema API20 Strep.

En el grupo control se identificaron *Streptococcus salivarius*, *Aerococcus viridans*<sup>2</sup>, y *Lactococcus lactis ssp cremoris* respectivamente. En el grupo de pericoronaritis la identificación dio lugar a *Streptococcus oralis*, *Aerococcus urinae* y *Streptococcus mitis* (Anexo 9). No se ha identificado ningún *Streptococcus constellatus*, por el sistema Api20 Strep.

En las PCR efectuadas, a partir de las mismas muestras orales, el par HC2 identifica, en el grupo control, *Streptococcus constellatus*, lo que determina el carácter comensal de esta especie bacteriana. Se observan también bandas en el grupo de pericoronaritis lo que indica una alta prevalencia de esta especie bacteriana y la especificidad del par de cebadores HC2 (Figura 30).

#### 5.4.1. PCR de las muestras clínicas no diluidas, con todos los cebadores diseñados

##### 5.4.1.1. Con el par de cebadores HC2:

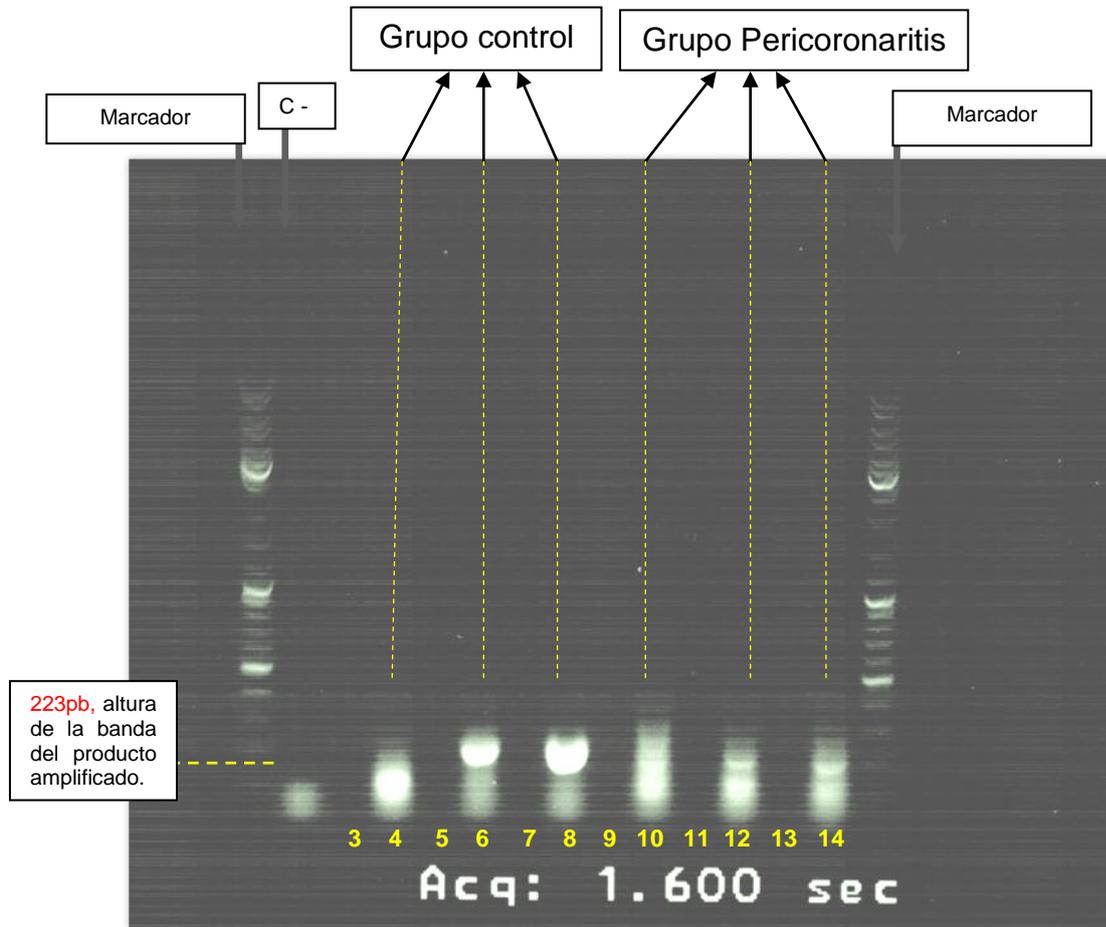


Figura 30: PCR de las muestras clínicas no diluidas con el par de cebadores HC2. Grupo control (pocillo 4, 6 y 8). Grupo de pericoronaritis (pocillo 10,12 y 14).

Ha habido hibridación del cebador y se observan bandas en la orden de 200pb, lo que detecta *S. constellatus subsp.constellatus* en esto grupo. En el grupo de pericoronaritis (pocillo 10,12 y 14), las bandas son más ténues, pero no se descarta la identificación de *S. constellatus subsp.constellatus*, por la amplificación de su DNA.

### 5.4.1.2. Con el par de cebadores: 16S rRNA

En el caso del cebador universal 16S rRNA, ha detectado *microorganismos* tanto en el grupo control, como en pericoronaritis.

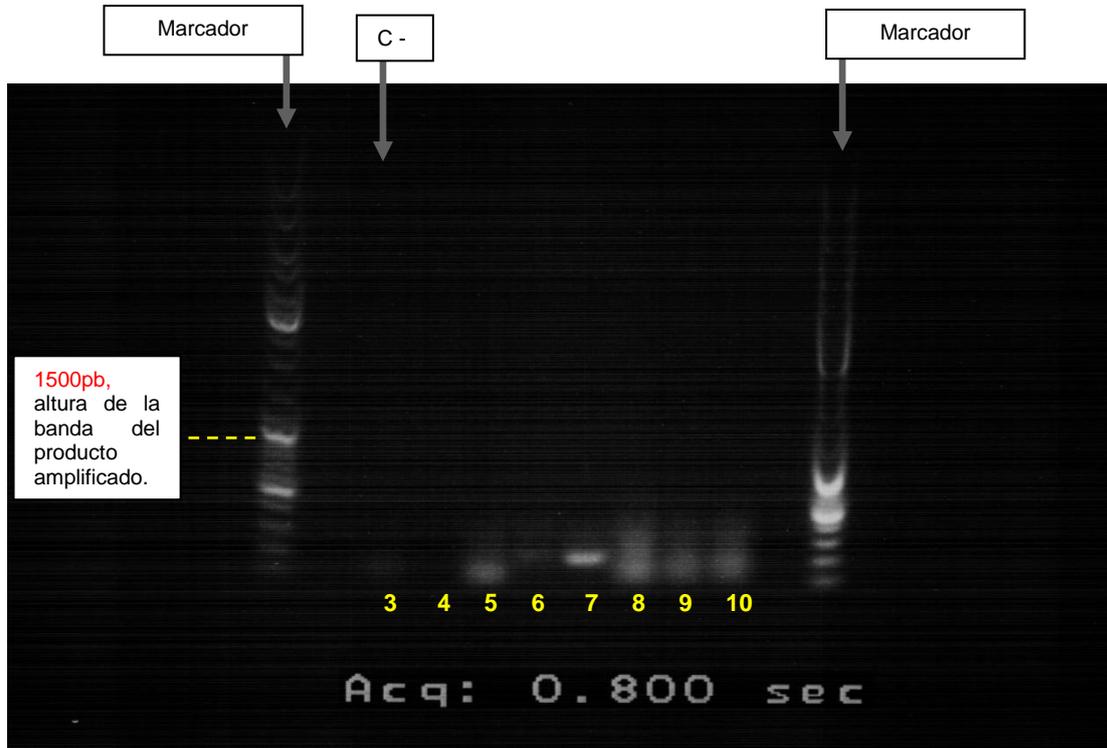


Figura 31: PCR utilizando el cebador 16S rRNA con las muestras orales no diluidas. Primero y último pocillo: Marcador. El 3 representa el tercer pocillo; con el control negativo.

El pocillo 5, 6, 7: grupo control y el 8, 9,10: grupo de pericoronaritis.

#### **5.4.1.3. Con el par de cebadores: HC3 y HC1.**

Este cebador no hay producido amplificación de DNA de los microorganismos orales presentes en la muestra (imágenes no disponibles).

#### 5.4.2. PCR de las muestras clínicas de cepas aislados, con todos los cebadores utilizados en el estudio.

En la PCR de las muestras clínicas de cepas aisladas a partir de las muestras orales (Figura 32), no se ha producido amplificación con ninguno de los cebadores examinados, lo que confirma los resultados del sistema API20 Strep, ya que estas muestras no correspondían a *S. constellatus*. Este resultado también nos confirma la especificidad del cebador HC2 y los demás cebadores, pues los últimos no han demostrado su especificidad frente a otras bacterias del grupo *milleri* y las orales presentes en el estudio.

##### 5.4.2.1. Con el par de cebadores HC2

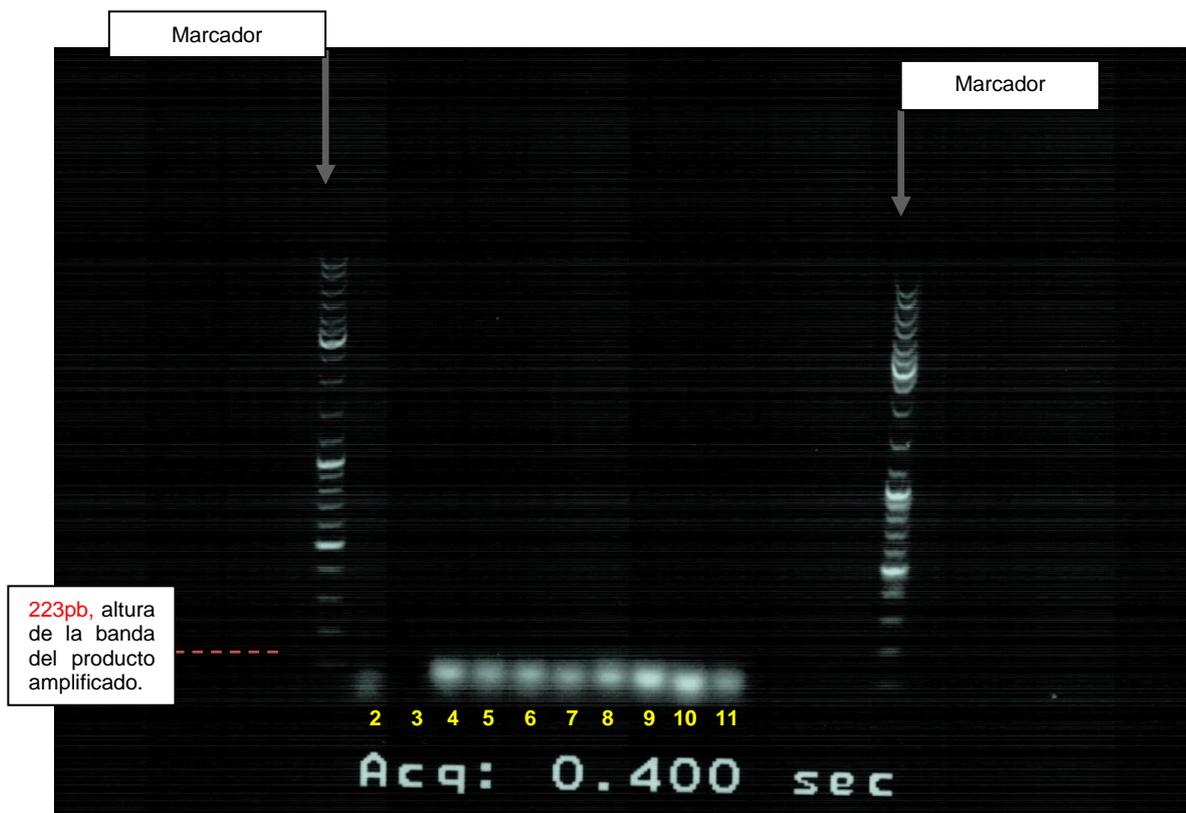


Figura 32: PCR con el par de cebadores HC2 en muestras clínicas aisladas e identificadas microbiológicamente por el Sistema API 20 STREP (Anexo 7). El pocillo 4, 5, 6, 7 son muestras del grupo control y el 8, 9, 10, 11 son del grupo de pericoronaritis.

## **6. DISCUSIÓN**



Desde un punto de vista del laboratorio de microbiología, la diferenciación de las tres especies del grupo *milleri* es problemática (pues fenotípicamente presentan gran diversidad) y el tiempo requerido no proporciona resultados muy precisos<sup>99,100</sup>.

El uso de sistemas de identificación automatizados han sido históricamente descritos como problemáticos incluso en el grupo *viridans*, siendo el principal factor asociado a la falta de la representación de las especies en sus bases de datos<sup>101</sup>.

En la actualidad, existe un medio de cultivo que permite el aislamiento de las cepas del grupo *milleri* de otras más complejas, denominado agar McKay. Sin embargo, otros organismos, principalmente otras cepas de estreptococos, pueden crecer en este medio<sup>100</sup> y por ello, es posible no diferenciar correctamente la especie *S. constellatus* de forma sencilla. La dificultad en la diferenciación, de la  $\alpha$  hemólisis y de la ausencia de hemólisis en las placas de agar sangre utilizada como medio de crecimiento bacteriano en nuestro estudio, es un factor importante en la diferenciación del grupo *milleri* a pesar de que *S. constellatus* se asocia frecuentemente con hemólisis  $\beta$ . En nuestro estudio hemos aislado cepas con crecimiento de al menos 5%, pues la mayoría de las bacterias periodontogénicas pueden ser encontradas en menores cantidades, incluso en salud periodontal<sup>95</sup>, pues las especies de estreptococos pertenecientes al grupo *milleri* han sido descritas<sup>102</sup> por presentar un grado moderado de patogenicidad periodontal.

De los métodos comerciales disponibles para la identificación del grupo *milleri*, todos tienen dificultades<sup>101</sup> pues pocas veces se obtiene un porcentaje de identificación alto lo que coincide con el resultado del API 20 strep, utilizado en nuestro estudio, pues no ha identificado *S. constellatus* en ninguna de las muestras clínicas orales. En el estudio de Clarridge et al. en 2001<sup>43</sup> han descrito el Sistema API 20 Strep con utilidad en la identificación del grupo *milleri*, pero no para las especies del grupo entre sí mismas.

Otros métodos han sido descritos produciendo resultados seguros en la identificación de cocos gram positivos, en más de 94% de muestras aisladas, como la tarjeta de identificación VITEK 2 GP a pesar de esto, otro estudio ha demostrado resultados falsos positivos en este sistema<sup>103</sup>.

La detección de cada especie del grupo *milleri* supone un problema clínico, que al resolverse, facilitaría un tratamiento más adecuado<sup>104</sup>.

Las técnicas moleculares son las más sensibles y específicas en la identificación del grupo *viridans*<sup>103</sup>.

Los últimos avances en tecnología de secuenciación y PCR ofrecen una identificación más rápida que la obtenida con métodos fenotípicos estándar que dependen del crecimiento bacteriano<sup>105</sup>. Takao et al.<sup>91</sup> han identificado mediante PCR cada uno de los miembros del grupo *milleri* y consideran sus resultados satisfactorios para la aplicación en la identificación de estas especies, pero no para el empleo directo sin cultivo. En nuestro estudio solamente procedemos al cultivo de distintas cepas del género *Streptococcus* y otras especies orales, por las limitaciones intrínsecas del estudio de la especificidad de secuencias genéticas mediante el análisis bioinformático. En medicina, la PCR se emplea fundamentalmente como herramienta de diagnóstico<sup>106</sup> al permitir genotipar la especie o especies que provocan un determinado cuadro infeccioso: para ello, se amplifica una zona del genoma bacteriano cuyo producto de PCR posea unas características de tamaño o temperatura de fusión que permitan identificarlo de forma inequívoca<sup>107</sup>. Si bien la PCR es ampliamente utilizada en todas las áreas de la medicina, sus limitaciones inherentes apenas se comentan. En el presente estudio, se optó por describir como específico aquel par de cebadores que solo amplifica material procedente de la especie examinada, y no de otras, y dicha decisión solo se basa en la presencia del amplicón correspondiente en el gel de

agarosa. Es preciso ser cautos en ese sentido, pues de forma habitual el uso diagnóstico de la PCR implica que las secuencias amplificadas no son secuenciadas (es decir, identificadas determinando el orden único de sus nucleótidos) para demostrar que en realidad representan sólo la secuencia diana y no otras. Mientras los segmentos amplificados tengan la longitud correcta, se dice que la PCR es positiva. No obstante, la longitud de la secuencia no indica la composición de nucleótidos de la misma.

Garnier et al.<sup>108</sup>, en 1997, examinaron mediante PCR 91 cepas del grupo de *Streptococcus viridans*, e identificaron 60 cepas, entre las cuales 25 eran *S.* del grupo *milleri* (10 de *S. anginosus*, 9 de *S. constellatus* y 6 de *S. intermedius*). Su estudio, a pesar de haber contribuido a la identificación de los estreptococos del grupo *viridans* clínicamente relevantes, presenta variaciones al identificar *S. constellatus* a partir de la comparación de las secuencias del 16s rRNA, sin cultivo previo. Asimismo, supone una alternativa a los estudios fenotípicos o a los métodos de hibridación DNA-DNA.

Teniendo en cuenta que la elección de una técnica diagnóstica es a menudo un compromiso que depende de varios factores (entre ellos los recursos del laboratorio, las limitaciones financieras, los conocimientos técnicos disponibles, limitaciones de tiempo y lo más importante, los objetivos de la investigación), todos ellos se deben considerar para evitar una elección inapropiada<sup>109</sup>. En el presente estudio se ha optado por una PCR convencional, se han revisado secuencias de cebadores para *S. constellatus* existentes en la literatura y se ha podido concluir que ninguna de ellas permitía una fiabilidad suficiente para su empleo en diagnóstico, pues no eran totalmente específicos para dicha especie. Por ello, se decidió diseñar un nuevo par de cebadores a partir de regiones genómicas específicas para esta bacteria mediante un estudio bioinformático previo.

A partir de GenBank, se obtuvieron 102 secuencias de *S. constellatus*. Al emplear el software BLAST, se aplicó el criterio de especificidad de un mínimo de 70 bases contiguas no homólogas, y se descartó la mayor parte de las secuencias publicadas. Finalmente, quedaron ciertas secuencias procedentes de la región intergénica 16S-23S, el gen del precursor de la hialuronato-liasa y otra posible proteína no tipificada. Tras compararlas mediante CLUSTAL-W con las secuencias pertenecientes a esta especie, se confirmó una secuencia diana coincidente con ellas, siendo esta la elegida para el diseño de cebadores específicos. Se aplicó el software Primer3 que permitió obtener secuencias que darían un amplicón mínimo de 105 pares de bases. Tras aplicar nuestro protocolo de PCR con cebadores específicos para *Streptococcus constellatus* a todas las cepas examinadas (tabla 1), no se obtuvo ninguna amplificación inespecífica con el cebador que denominamos de HC2. Así mismo, lo bajo número de muestras orales en nuestro estudio, ha sido el primer paso para la confirmación de dicho cebador, pero nuestros resultados han limitado el análisis estadístico entre grupos, razón por lo cual la validación de los mismos se ha basado en la descripción de lo que ha sido observado.

Goto et al.<sup>90</sup>, en 2002, identificaron por PCR *S. intermedius* partiendo de la especificidad de la intermedilina. Diseñaron un par de cebadores para la detección de una secuencia del gen de esta citolisina y pudieron comprobar que es exclusiva de esta especie y no da reacciones cruzadas con otras especies del grupo *milleri*, pudiendo emplearse esta prueba de PCR sin cultivo previo. En nuestro estudio, hemos diferenciado *S. constellatus* también de otras especies orales, no solamente del grupo *milleri*.

Se han efectuado muchos estudios moleculares para diferenciar las cepas de estreptococos del grupo *milleri*, usando genes como el *cpn60*, *rnpB*, 16s RNA

ribosómico, región intergénica 16S-23S del RNA ribosómico y la proteína de unión a la penicilina. Estos ensayos presentan limitaciones importantes para la práctica rutinaria por la necesidad de técnicas posteriores de análisis para la diferenciación de las especies del grupo *milleri*<sup>99</sup>. Más recientemente, varios estudios han presentado métodos basados en el empleo de la técnica de PCR para la detección de secuencias de varias regiones genómicas características de cada una de las especies para aumentar la especificidad<sup>40,99,110-113</sup>, lo que sigue suponiendo un obstáculo para el empleo habitual en el diagnóstico odontológico.

El análisis filogenético del gen 16S rRNA ha demostrado miembros del grupo *milleri* más cercanos entre sí, como *S. constellatus* e *intermedius*, y más alejados de *S. anginosus*<sup>43,100,114</sup>. En el gen *cpn60*, también se puede observar lo mismo, pero hay un aumento de diversidad entre las especies del grupo *milleri*<sup>100,114</sup>. Otro estudio más reciente ha descrito una mayor diversidad en este gen para *S. anginosus* y *constellatus* que para *S. intermedius*<sup>99</sup>. Otra investigación ha descrito que este gen en *S. constellatus* está muy conservado<sup>100</sup>. Uno de los estudios más recientes del tema<sup>99</sup> sugiere una variabilidad en este gen, para todos los miembros del grupo *milleri*, que puede mostrar reacciones cruzadas con otras especies del grupo *viridans*. La PCR en tiempo real en el grupo *milleri* a partir del gen *cpn60* puede emplearse para identificar conjuntamente los miembros del grupo, pero no detecta cada especie del mismo, pues algunos miembros del grupo tienen alelos similares del gen *cpn60*. El uso de productos resultantes de genes universales, puede dar falsos positivos como resultado<sup>99</sup>. En nuestro estudio, se ha distinguido *S. constellatus* de las otras especies del grupo, con una metodología sencilla e inequívoca, pues no hay reactividad cruzada, y empleando una sola región genómica.

Los procedimientos de diseño de cebadores son importantes, pues mejoran la obtención de productos de PCR y evitan la formación de productos inespecíficos. Si los cebadores son demasiado cortos, pueden unirse en otro lugar, además del lugar correcto (amplificando así otras secuencias que no sean las secuencias diana). Si son demasiado largos, pueden no unirse en absoluto, o no hacerlo a tiempo. Si hay secuencias similares en el DNA que se investiga, entonces los cebadores se unirán ahí también, dando un resultado poco claro. Es por ello recomendable un tamaño máximo de amplicón de 250 pb. En nuestro estudio se han diseñado cebadores que dan lugar a amplicones de un tamaño aproximado de 100-150 pb, lo cual facilita el análisis de muestras en las que ha podido existir degradación del DNA. En el presente estudio el resultado fue positivo solo para la subespecie *constellatus* y no para la *pharyngis*, pues han generado el amplicón previsto de 223 pb, lo que ha confirmado la idoneidad del protocolo diseñado para su aplicación en muestras clínicas procedentes de terceros molares inferiores con enfermedad (pericoronaritis) y sin ella (grupo control). Ambos grupos resultaron positivos para *S. constellatus* subespecie *constellatus*, lo que va de acuerdo con algunos estudios moleculares<sup>115</sup> que hacen la asociación de esta bacteria existente en la flora subgingival, en la enfermedad periodontal, en poblaciones de distintas nacionalidades. Las especies bacterianas, a pesar de su compatibilidad con el hospedador, pueden contribuir a la patogénesis de la enfermedad<sup>116</sup> lo cual se entiende que en el presente estudio, respecto a los resultados de las muestras clínicas de flora microbiana alrededor del tercer molar inferior en pacientes con enfermedad (pericoronaritis) y sin pericoronaritis se ha podido concluir que resultaron claramente positivos. Estos datos indican la elevada prevalencia de *S. constellatus*, tanto en salud como en enfermedad. A pesar del pequeño tamaño muestral en este estudio piloto, se ha detectado esta especie en esta localización, lo que orienta al clínico a considerarla

como comensal de la orofaringe sin relevancia patógena<sup>59</sup>. En la literatura, hay estudios<sup>54,59,65,117</sup> que, a pesar de atribuir una localización específica a *S. constellatus*, describen su notable capacidad de formar abscesos, pero se desconocen sus mecanismos. Se trata de una especie que está asociada especialmente a abscesos dentales, aunque también ha sido aislada en casos de periimplantitis<sup>57</sup>, lo que respalda la presencia de esta especie en nuestro estudio.

Se piensa que puede actuar sinérgicamente con otros anaerobios de la región en que se presenta<sup>118,119</sup>. En el caso de localizarse en la boca y en el tracto respiratorio superior, se ha sugerido que al menos un anaerobio, como *Prevotella intermedia*, puede actuar junto con *S. constellatus*, al estimular el crecimiento de este último y suprimir la actividad bactericida del hospedador<sup>59</sup>. Otro estudio<sup>120</sup> sobre infecciones orales e maxilofaciales, confirma la presencia y participación de *Streptococcus* del grupo *milleri* en estas infecciones, pudiendo presentarse solo o en asociación con bacterias aerobias e anaerobias. Otra teoría acerca de su poder patógeno se centra en la cápsula bacteriana de los *Streptococcus* del grupo *milleri*, que está constituida por polisacáridos, siendo uno de los principales factores de virulencia de estos estreptococos, ya que las cepas de *S. milleri* encapsuladas han sido descritas como más patógenas que las no encapsuladas, al producir abscesos más frecuentemente<sup>54,121</sup>. La importancia clínica de los distintos estreptococos del grupo *viridans* es distinta entre las especies del grupo, siendo importante identificar una especie en una patología y reconocer su patogénesis<sup>100</sup>.

Dado el carácter polimicrobiano de la infección pericoronaria y el tipo de muestra de la que se parte, la sensibilidad es un factor a tener en cuenta en el diagnóstico de esta patología. Esta ha sido una limitación importante del presente estudio, que no ha determinado el umbral de detección de este patógeno mediante el protocolo descrito.

Asimismo, el presente estudio solo emplea una PCR con un enfoque cualitativo basado únicamente en detectar la presencia de *S. constellatus* en muestras de pericoronaritis y en los grupos control, y no su cantidad, un factor que podría tener valor diagnóstico, y se reserva para futuras investigaciones mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

Así pues, en la presente tesis, se presenta un método de detección inequívoco para detección de *S. constellatus* mediante la técnica de PCR en muestras orales.

## **7. CONCLUSIONES**



### **Conclusión general:**

Se ha desarrollado un método de detección de *Streptococcus constellatus* basado en la técnica de PCR que podría aportar nueva información diagnóstica en las pericoronaritis

### **Conclusiones específicas:**

1. Se ha demostrado la especificidad de uno de los cebadores diseñados para distinguir *Streptococcus constellatus* frente a otras especies del grupo milleri y otras bacterias orales.
2. El protocolo de PCR diseñado puede emplearse para la detección cualitativa de *Streptococcus constellatus* en muestras clínicas procedentes de localizaciones con pericoronaritis y controles.
3. La alta prevalencia de esta especie en ambos grupos, casos y controles, respalda su papel como comensal, aunque son necesarios estudios a mayor escala.



## **8. PERSPECTIVAS DE FUTURO**



El proyecto llevado a cabo mediante esta tesis doctoral debería complementarse con cebadores diseñados para *S. constellatus* frente a otras regiones genómicas, que aumentara la especificidad del test, además de considerar el desarrollo de nuevos protocolos de PCR para el resto de miembros del grupo *milleri*.

También sería importante considerar el desarrollo de una PCR en tiempo real que determine si la cantidad de esta especie puede tener un significado diagnóstico y pronóstico en la pericoronaritis. El empleo de un tamaño muestral más amplio, para determinar la prevalencia de esta especie en la población, sería fundamental para establecer criterios más fiables respecto a su carácter comensal o patógeno.

El proyecto de la presente tesis doctoral ha sido realizado en un laboratorio de Microbiología de la Universidad Egas Moniz. Sería necesario aun que se estableciese de forma conjunta con los departamentos clínicos protocolos de investigación sencillos y rápidos para detectar enfermedades infecciosas como la pericoronaritis, que en la clínica suele ser problemática y muy frecuente. Con bases metodológicas para iniciar la investigación en odontología molecular, campos como la periimplantitis en implantología estarían más desarrollados.



## **9. BIBLIOGRAFÍA**



1. Jimenez Y, Bagan JV, Murillo J, Poveda R. Odontogenic infections. Complications. Systemic manifestations. Med Oral Patol Oral Cir Bucal [Internet]. 2004;9 Suppl:143. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15580132](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15580132)
2. Peltroche-Llacsahuanga H, Reichhart E, Schmitt W, Lutticken R, Haase G. Investigation of infectious organisms causing pericoronitis of the mandibular third molar. J Oral Maxillofac Surg [Internet]. 2000;58(6):611–6. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10847281](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10847281)
3. Peterson LJ, E. EIII, Hupp JR, Tucker MR. Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea. Princípios de tratamento e prevenção das infecções odontogénicas. 2nd ed. Guanabara Koogan S.A.; 1996.
4. Zou D, Zhao J, Ding W, Xia L, Jang X, Huang Y. Wisdom teeth: mankind's future third vice-teeth? Med Hypotheses [Internet]. 74(1):52–5. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19765911](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19765911)
5. Hurlen B, Olsen I. A scanning electron microscopic study on the microflora of chronic pericoronitis of lower third molars. Oral Surg Oral Med Oral Pathol [Internet]. 1984;58(5):522–32. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6595611](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6595611)
6. Gutierrez-Perez JL. Third molar infections. Med Oral Patol Oral Cir Bucal [Internet]. 2004;9 Suppl:122. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15580130](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15580130)
7. Mombelli A, Buser D, Lang NP, Berthold H. Suspected periodontopathogens in erupting third molar sites of periodontally healthy individuals. J Clin Periodontol [Internet]. 1990;17(1):48–54. Available from:

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2295708](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2295708)

8. Nitzan DW, Tal O, Sela MN, Shteyer A. Pericoronitis: a reappraisal of its clinical and microbiologic aspects. *J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 1985;43(7):510–6. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3859594](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3859594)
9. Maestre JR. [Mixed bacterial infections of the oral cavity]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2002;20(2):98–101. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11886687](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11886687)
10. Smiledoc.co.za. Patient Education - Wisdom Teeth [Internet]. Available from: [http://www.smiledoc.co.za/wisdom\\_teeth.html](http://www.smiledoc.co.za/wisdom_teeth.html)
11. Coello R. Review of publication: Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en los Hospitales Espanoles EPINE 1990--1994. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 1996;2(1):70. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11866818](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11866818)
12. Duarte HN, Sato FRL, Moraes M de. Pericoronarite e infecções das vias aéreas superiores: revisão. *Rev. Clín. Pesq. Ondontol.* 2007;3(2):125–32.
13. Morán López Elena CPY. Pericoronaritis: Criterios actuales. Revisión bibliográfica. [Internet]. *Rev Cubana Estomatol.* 2001;38(3):192–204. Available from: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75072001000300007&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072001000300007&lng=es&nrm=iso)
14. Mohammed-Ali RI, Collyer J, Garg M. Osteomyelitis of the mandible secondary to pericoronitis of an impacted third molar. *Dent Update* [Internet]. 37(2):106–8. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20415010](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20415010)

15. Sixou JL, Magaud C, Jolivet-Gougeon A, Cormier M, Bonnaure-Mallet M. Microbiology of mandibular third molar pericoronitis: incidence of beta-lactamase-producing bacteria. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* [Internet]. 2003;95(6):655–9. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12789143](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12789143)
16. Bascones Martinez A, Aguirre Urizar JM, Bermejo Fenoll A, Blanco Carrion A, Gay-Escoda C, Gonzalez-Moles MA, et al. Consensus statement on antimicrobial treatment of odontogenic bacterial infections. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* [Internet]. 2004;9(5):369. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15580113](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15580113)
17. Sawalha W, Ahmad M. Bilateral pleural empyema following pericoronitis. *Ann Saudi Med* [Internet]. 2001;21(3-4):228–9. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17264561](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17264561)
18. Moloney J, Stassen LF. Pericoronitis: treatment and a clinical dilemma. *J Ir Dent Assoc* [Internet]. 2009;55(4):190–2. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19753908](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19753908)
19. Fuster Torres MA, Berini Aytés L., Gay Escoda C. GAJ. Evaluation of the indication for surgical extraction of third molars according to the oral surgeon and the primary care dentist. Experience in the Master of Oral Surgery and Implantology at Barcelona University Dental School. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008;13(8):E499–504.
20. Kandasamy S, Rinchuse DJ. The wisdom behind third molar extractions. *Aust Dent J* [Internet]. 2009;54(4):284–92. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20415925](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20415925)

21. Yamalik K, Bozkaya S. The predictivity of mandibular third molar position as a risk indicator for pericoronitis. *Clin Oral Investig* [Internet]. 2008;12(1):9–14. Available from:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17619915](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17619915)
22. Kurkivuori J, Salaspuro V, Kaihovaara P, Kari K, Rautemaa R, Gronroos L, et al. Acetaldehyde production from ethanol by oral streptococci. *Oral Oncol* [Internet]. 2007;43(2):181–6. Available from:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16859955](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16859955)
23. Fisher LE, Russell RR. The isolation and characterization of milleri group streptococci from dental periapical abscesses. *J Dent Res* [Internet]. 1993;72(8):1191–3. Available from:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8360361](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8360361)
24. Blakey GH, White Jr. RP, Offenbacher S, Phillips C, Delano EO, Maynor G. Clinical/biological outcomes of treatment for pericoronitis. *J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 1996;54(10):1150–60. Available from:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8859232](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8859232)
25. Yoshii T, Hamamoto Y, Muraoka S, Kohjitani A, Teranobu O, Furudo S, et al. Incidence of deep fascial space infection after surgical removal of the mandibular third molars. *J Infect Chemother* [Internet]. 2001;7(1):55–7. Available from:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11406759](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11406759)
26. Sixou JL, Magaud C, Jolivet-Gougeon A, Cormier M, Bonnaure-Mallet M. Evaluation of the mandibular third molar pericoronitis flora and its susceptibility to different antibiotics prescribed in france. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2003;41(12):5794–7. Available from:

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14662986](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14662986)

27. Rajasuo A, Sihvonen OJ, Peltola M, Meurman JH. Periodontal pathogens in erupting third molars of periodontally healthy subjects. *Int J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2007;36(9):818–21. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17629461](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17629461)
28. Leung WK, Theilade E, Comfort MB, Lim PL. Microbiology of the pericoronal pouch in mandibular third molar pericoronitis. *Oral Microbiol Immunol* [Internet]. 1993;8(5):306–12. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8265205](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8265205)
29. Moloney J, Stassen LF. The relationship between pericoronitis, wisdom teeth, putative periodontal pathogens and the host response. *J Ir Dent Assoc* [Internet]. 2008;54(3):134–7. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18649731](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18649731)
30. Rajasuo A, Jousimies-Somer H, Savolainen S, Leppanen J, Murtomaa H, Meurman JH. Bacteriologic findings in tonsillitis and pericoronitis. *Clin Infect Dis* [Internet]. 1996;23(1):51–60. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8816129](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8816129)
31. Rajasuo A, Leppanen J, Savolainen S, Meurman JH. Pericoronitis and tonsillitis: clinical and darkfield microscopy findings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* [Internet]. 1996;81(5):526–32. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8734697](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8734697)
32. Rajasuo A, Meurman JH, Murtomaa H. Periodontopathic bacteria and salivary microbes before and after extraction of partly erupted third molars. *Scand J Dent Res* [Internet]. 1993;101(2):87–91. Available from:



[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8567909](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8567909)

40. Yoshida Y, Ito S, Sasaki T, Kishi M, Kurota M, Suwabe A, et al. Molecular and enzymatic characterization of betaC-S lyase in *Streptococcus constellatus*. *Oral Microbiology and Immunology* [Internet]. 2008;23(3):245–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18402612>
41. Lefort A, Lortholary O, Casassus P, Selton-Suty C, Guillevin L, Mainardi JL. Comparison between adult endocarditis due to beta-hemolytic streptococci (serogroups A, B, C, and G) and *Streptococcus milleri*: a multicenter study in France. *Arch Intern Med* [Internet]. 2002;162(21):2450–6. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12437404](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12437404)
42. Whiley RA, Beighton D, Winstanley TG, Fraser HY, Hardie JM. *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus*, and *Streptococcus anginosus* (the *Streptococcus milleri* group): association with different body sites and clinical infections. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1992;30(1):243–4. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1734062](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1734062)
43. Tracy M, Wanahita A, Shuhatovich Y, Goldsmith EA, Clarridge 3rd JE, Musher DM. Antibiotic susceptibilities of genetically characterized *Streptococcus milleri* group strains. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2001;45(5):1511–4. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11302819](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11302819)
44. Bantar C, Fernandez Canigia L, Relloso S, Lanza A, Bianchini H, Smayevsky J. Species belonging to the “*Streptococcus milleri*” group: antimicrobial susceptibility and comparative prevalence in significant clinical specimens. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1996;34(8):2020–2. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8818904](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8818904)

45. Ruoff KL. Streptococcus anginosus ("Streptococcus milleri"): the unrecognized pathogen. Clin Microbiol Rev [Internet]. 1988;1(1):102–8. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3060239](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3060239)
46. Young KA, Allaker RP, Hardie JM, Whiley RA. Interactions between Eikenella corrodens and "Streptococcus milleri-group" organisms: possible mechanisms of pathogenicity in mixed infections. Antonie Van Leeuwenhoek [Internet]. 1996;69(4):371–3. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8836435](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8836435)
47. Casariego E, Rodriguez A, Corredoira JC, Alonso P, Coira A, Bal M, et al. Prospective study of Streptococcus milleri bacteremia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis [Internet]. 1996;15(3):194–200. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8740852](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8740852)
48. Williams BL, McCann GF, Schoenknecht FD. Bacteriology of dental abscesses of endodontic origin. J Clin Microbiol [Internet]. 1983;18(4):770–4. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6630460](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6630460)
49. Okayama H, Nagata E, Ito HO, Oho T, Inoue M. Experimental abscess formation caused by human dental plaque. Microbiol Immunol [Internet]. 2005;49(5):399–405. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15905601](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15905601)
50. Han JK, Kerschner JE. Streptococcus milleri: an organism for head and neck infections and abscess. Arch Otolaryngol Head Neck Surg [Internet]. 2001;127(6):650–4. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11405863](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11405863)

51. Claridge 3rd JE, Attorri S, Musher DM, Hebert J, Dunbar S. Streptococcus intermedius, Streptococcus constellatus, and Streptococcus anginosus ("Streptococcus milleri group") are of different clinical importance and are not equally associated with abscess. Clin Infect Dis [Internet]. 2001;32(10):1511–5. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11317256](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11317256)
52. Gomez-Garces JL, Alos JI, Cogollos R. Bacteriologic characteristics and antimicrobial susceptibility of 70 clinically significant isolates of Streptococcus milleri group. Diagn Microbiol Infect Dis [Internet]. 1994;19(2):69–73. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7805358](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7805358)
53. Jacobs JA, Stobberingh EE. In-vitro antimicrobial susceptibility of the "Streptococcus milleri" group (Streptococcus anginosus, Streptococcus constellatus and Streptococcus intermedius). J Antimicrob Chemother [Internet]. 1996;37(2):371–5. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8707750](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8707750)
54. Ng KWP, Mukhopadhyay A. Streptococcus constellatus bacteremia causing septic shock following tooth extraction: a case report. Cases journal [Internet]. 2009;2:6493. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19829816](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19829816)
55. Bert F, Bariou-Lancelin M, Lambert-Zechovsky N. Clinical significance of bacteremia involving the "Streptococcus milleri" group: 51 cases and review. Clin Infect Dis [Internet]. 1998;27(2):385–7. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9709892](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9709892)

56. Chiang WC, Tsai JC, Chen SY, Hsu CY, Wu CT, Teng LJ, et al. Mycotic Aneurysm Caused by *Streptococcus constellatus* subsp. *constellatus*. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2004;42(4):1826–8. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15071061](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15071061)
57. Ichikawa T, Hirota K, Kanitani H, Miyake Y, Matsumoto N. In vitro adherence of *Streptococcus constellatus* to dense hydroxyapatite and titanium. *J Oral Rehabil* [Internet]. 1998;25(2):125–7. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9576596](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9576596)
58. Bonnet EP, Arista S, Archambaud M, Boot B, Clave D, Massip P, et al. *Streptococcus milleri* group infection associated with digestive fistula in patients with vascular graft: report of seven cases and review. *Infection* [Internet]. 2007;35(3):182–5. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17565461](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17565461)
59. Diaz Peromingo JA, Sanchez Leira J, Garcia Suarez F, Padin Paz E, Saborido Frojan J. [*Streptococcus constellatus* as a causative agent of empyema. Report of one case]. *Rev Med Chil* [Internet]. 2006;134(8):1030–2. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17130992](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17130992)
60. Marques da Silva R, Caugant DA, Josefsen R, Tronstad L, Olsen I. Characterization of *Streptococcus constellatus* strains recovered from a brain abscess and periodontal pockets in an immunocompromised patient. *J Periodontol* [Internet]. 2004;75(12):1720–3. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15732877](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15732877)
61. Legout L, Senneville E, Yazdanpanah Y, Viget N, Baclet V, Berha J-M, et al. [Multiple liver abscesses caused by *Streptococcus constellatus* in association with diverticulitis]. *La Revue de médecine interne / fondée ... par la Société nationale*

- francaise de médecine interne [Internet]. 2003 Sep [cited 2012 Jun 21];24(9):627–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12951186>
62. Carrere S, Deneve E, Bouyabrine H, Marchand JP, Navarro F. [Streptococcus constellatus, epidural abscess and colovesical fistula]. *Gastroenterol Clin Biol* [Internet]. 2008;32(8-9):786–7. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18603391](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18603391)
  63. Rodrigues AL, Soares MC, Ramos FL, Crociati Meguins L. Multiple pyogenic liver abscesses caused by *Streptococcus constellatus* in the Amazon region. Case report. *Ann Hepatol* [Internet]. 2009;8(3):255–7. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19841508](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19841508)
  64. Senses Z, Yokuşoğlu M, Oz BS, Güçlü AU, Erdem H, Baysan O, et al. A rare pathogen causing endocarditis: *Streptococcus constellatus*. *Anadolu kardiyoloji dergisi AKD the Anatolian journal of cardiology*. 2008;8(4):315–6.
  65. Ortiz de Saracho J, Barbancho S, Mostaza JL. [Mediastinitis and pleural empyema caused by *Streptococcus constellatus*]. *Arch Bronconeumol* [Internet]. 2004;40(12):602. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15574277](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15574277)
  66. Bringas-Bollada M, Ortuno-Anderiz F, Munoz-de Cabo C, Garcia-Sanchez E. [Bacteremia, pneumonia and meningitis due to *Streptococcus constellatus*]. *Med Clin (Barc)* [Internet]. 2006;126(18):719. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16759585](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16759585)
  67. Validación y control de calidad de los métodos de la reacción en cadena de la polimerasa utilizados para el diagnóstico de enfermedades infecciosas [Internet]. In: *Manual de la OIE sobre animales terrestres 2004*. OIE; 2004. p. 32–9. Available from: [www.oie.int](http://www.oie.int)

68. Videira A. Engenharia Genética - Princípios e aplicações. Lisboa: Lidel - Edições técnicas, Lda; 2001.
69. Belak S, Thoren P. Molecular diagnosis of animal diseases: some experiences over the past decade. *Expert Rev Mol Diagn* [Internet]. 2001;1(4):434–43. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11901858](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11901858)
70. Louie M, Louie L, Simor AE. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. *CMAJ* [Internet]. 2000;163(3):301–9. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10951731](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10951731)
71. Millar BC, Xu J, Moore JE. Molecular diagnostics of medically important bacterial infections. *Curr Issues Mol Biol* [Internet]. 2007;9(1):21–39. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17263144](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17263144)
72. Reacción en cadena de la polimerasa [Internet]. [cited 2012 Jun 22]; Available from: <http://www.educarchile.cl/portal.base/web/vercontenido.aspx?id=94737>
73. Neumaier M, Braun A, Wagener C. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. International Federation of Clinical Chemistry Scientific Division Committee on Molecular Biology Techniques. *Clin Chem* [Internet]. 1998;44(1):12–26. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9550553](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9550553)
74. PCR Polymerase Chain Reaction [Internet]. [cited 2012 Jun 22]; Available from: <http://www.molecularstation.com/pcr/>
75. Instituto de Investigaciones Biomédicas-IDIBAM-: ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA [Internet]. [cited 2012 Jun 22]; Available from: <http://idibam.blogspot.pt/2008/09/electroforesis-en-gel-de-agarosa.html>

76. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* [Internet]. 1975;98(3):503–17. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1195397](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1195397)
77. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* [Internet]. 1996;6(10):986–94. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8908518](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8908518)
78. Lyons SR, Griffen AL, Leys EJ. Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2000;38(6):2362–5. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10835003](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10835003)
79. Martin FE, Nadkarni MA, Jacques NA, Hunter N. Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and real-time PCR: association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2002;40(5):1698–704. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11980945](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11980945)
80. Post JC, Ehrlich GD. The impact of the polymerase chain reaction in clinical medicine. *JAMA* [Internet]. 2000;283(12):1544–6. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10735373](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10735373)
81. Woo PC, Leung SY, To KK, Chan JF, Ngan AH, Cheng VC, et al. Internal transcribed spacer region sequence heterogeneity in *Rhizopus microsporus*: implications for molecular diagnosis in clinical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2010;48(1):208–14. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19906897](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19906897)

82. Jacobs JA, Schot CS, Bunschoten AE, Schouls LM. Rapid species identification of "Streptococcus milleri" strains by line blot hybridization: identification of a distinct 16S rRNA population closely related to Streptococcus constellatus. J Clin Microbiol [Internet]. 1996;34(7):1717–21. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8784576](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8784576)
83. Chen CC, Teng LJ, Chang TC. Identification of clinically relevant viridans group streptococci by sequence analysis of the 16S-23S ribosomal DNA spacer region. J Clin Microbiol [Internet]. 2004;42(6):2651–7. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15184447](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15184447)
84. De Gheldre Y, Vandamme P, Goossens H, Struelens MJ. Identification of clinically relevant viridans streptococci by analysis of transfer DNA intergenic spacer length polymorphism. Int J Syst Bacteriol [Internet]. 1999;49 Pt 4:1591–8. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10555340](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10555340)
85. Jacobs JA, Tjhie JH, Smeets MG, Schot CS, Schouls LM. Genotyping by amplified fragment length polymorphism analysis reveals persistence and recurrence of infection with Streptococcus anginosus group organisms. J Clin Microbiol [Internet]. 2003;41(7):2862–6. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12843013](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12843013)
86. Nagamune H, Ohnishi C, Katsuura A, Fushitani K, Whiley RA, Tsuji A, et al. Intermedilysin, a novel cytotoxin specific for human cells secreted by Streptococcus intermedius UNS46 isolated from a human liver abscess. Infect Immun [Internet]. 1996;64(8):3093–100. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8757839](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8757839)

87. Nagamune H, Whiley RA, Goto T, Inai Y, Maeda T, Hardie JM, et al. Distribution of the intermedilysin gene among the anginosus group streptococci and correlation between intermedilysin production and deep-seated infection with *Streptococcus intermedius*. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2000;38(1):220–6. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10618091](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10618091)
88. Macey MG, Whiley RA, Miller L, Nagamune H. Effect on polymorphonuclear cell function of a human-specific cytotoxin, intermedilysin, expressed by *Streptococcus intermedius*. *Infect Immun* [Internet]. 2001;69(10):6102–9. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11553548](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11553548)
89. Polekhina G, Giddings KS, Tweten RK, Parker MW. Insights into the action of the superfamily of cholesterol-dependent cytolysins from studies of intermedilysin. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2005;102(3):600–5. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15637162](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15637162)
90. Goto T, Nagamune H, Miyazaki A, Kawamura Y, Ohnishi O, Hattori K, et al. Rapid identification of *Streptococcus intermedius* by PCR with the *ily* gene as a species marker gene. *J Med Microbiol* [Internet]. 2002;51(2):178–86. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11863269](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11863269)
91. Takao A, Nagamune H, Maeda N. Identification of the anginosus group within the genus *Streptococcus* using polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 2004;233(1):83–9. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15043873](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15043873)
92. Liu LC, Tsai JC, Hsueh PR, Teng LJ. Rapid differentiation between members of the anginosus group and *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* within

beta-hemolytic group C and G streptococci by PCR. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2006;44(5):1836–8. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16672416](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16672416)

93. Sasaki H, Ishizuka T, Muto M, Nezu M, Nakanishi Y, Inagaki Y, et al. Presence of *Streptococcus anginosus* DNA in esophageal cancer, dysplasia of esophagus, and gastric cancer. *Cancer Res* [Internet]. 1998;58(14):2991–5. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9679961](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9679961)
94. Hartroth B, Seyfahrt I, Conrads G. Sampling of periodontal pathogens by paper points: evaluation of basic parameters. *Oral microbiology and immunology* [Internet]. 1999 Oct [cited 2012 Apr 23];14(5):326–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10551161>
95. Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *Journal of clinical periodontology* [Internet]. 2000 Sep [cited 2012 Jun 18];27(9):648–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10983598>
96. Holt J, Krieg N, PHA S, Staley J, Williams S. *Bergey's Manual® for determinative bacteriology*. Williams & Wilkins; 1994.
97. Siqueira JF, Rôças IN, Oliveira JC, Santos KR. Detection of putative oral pathogens in acute periradicular abscesses by 16S rDNA-directed polymerase chain reaction. *Journal of endodontics* [Internet]. 2001 Mar [cited 2012 Jun 24];27(3):164–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11487143>
98. Satokari RM, Vaughan EE, Akkermans AD, Saarela M, de Vos WM. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and environmental microbiology* [Internet]. 2001 Feb [cited 2012 Jul 28];67(2):504–13. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=92614&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

99. Olson AB, Sibley CD, Schmidt L, Wilcox MA, Surette MG, Corbett CR. Development of real-time PCR assays for detection of the *Streptococcus milleri* group from cystic fibrosis clinical specimens by targeting the *cpn60* and 16S rRNA genes. *Journal of clinical microbiology* [Internet]. 2010 Apr [cited 2011 Aug 6];48(4):1150–60. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2849594&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  
100. Teng LJ, Hsueh PR, Tsai JC, Chen PW, Hsu JC, Lai HC, et al. *groESL* sequence determination, phylogenetic analysis, and species differentiation for viridans group streptococci. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2002;40(9):3172–8. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12202549](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12202549)
  
101. Doern CD, Burnham C-AD. It's not easy being green: the viridans group streptococci, with a focus on pediatric clinical manifestations. *Journal of clinical microbiology* [Internet]. 2010 Nov [cited 2012 May 10];48(11):3829–35. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3020876&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  
102. Teles RP, Haffajee AD, Socransky SS. Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontology 2000* [Internet]. 2006 Jan [cited 2012 Jun 18];42:180–218. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16930311>
  
103. Siegman-Igra Y, Azmon Y, Schwartz D. *Milleri* group streptococcus-a stepchild in the viridans family. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology [Internet]. 2012 Mar 6 [cited 2012 Jun 18]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22391759>
  
104. Reissmann S, Friedrichs C, Rajkumari R, Itzek A, Fulde M, Rodloff AC, et al. Contribution of *Streptococcus anginosus* to infections caused by groups C and G streptococci, southern India. *Emerging infectious diseases* [Internet]. 2010 Apr [cited 2012 Jun 22];16(4):656–63. Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3321935&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

105. Kommedal O, Kvello K, Skjåstad R, Langeland N, Wiker HG. Direct 16S rRNA gene sequencing from clinical specimens, with special focus on polybacterial samples and interpretation of mixed DNA chromatograms. *Journal of clinical microbiology* [Internet]. 2009 Nov [cited 2012 Jun 22];47(11):3562–8. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2772595&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
106. Tsongalis GJ, Coleman WB. Clinical genotyping: the need for interrogation of single nucleotide polymorphisms and mutations in the clinical laboratory. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2006;363(1-2):127–37. Available from:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16102741](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16102741)
107. Huber JA, Morrison HG, Huse SM, Neal PR, Sogin ML, Mark Welch DB. Effect of PCR amplicon size on assessments of clone library microbial diversity and community structure. *Environ Microbiol* [Internet]. 2009;11(5):1292–302. Available from:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19220394](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19220394)
108. Garnier F, Gerbaud G, Courvalin P, Galimand M. Identification of clinically relevant viridans group streptococci to the species level by PCR. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1997;35(9):2337–41. Available from:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9276413](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9276413)
109. Pereira F, Carneiro J, Amorim A. Identification of species with DNA-based technology: current progress and challenges. *Recent Pat DNA Gene Seq* [Internet]. 2008;2(3):187–99. Available from:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19075956](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19075956)

110. Hartmeyer GN, Justesen US. Direct 16S rRNA gene sequencing of polymicrobial culture-negative samples with analysis of mixed chromatograms. *Journal of medical microbiology* [Internet]. 2010 Apr [cited 2012 Mar 5];59(Pt 4):486–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20035024>
111. Glazunova OO, Raoult D, Roux V. Partial recN gene sequencing: a new tool for identification and phylogeny within the genus *Streptococcus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* [Internet]. 2010 Sep [cited 2012 Jun 24];60(Pt 9):2140–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19880633>
112. Summanen PH, Rowlinson M-C, Wooton J, Finegold SM. Evaluation of genotypic and phenotypic methods for differentiation of the members of the Anginosus group streptococci. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*: official publication of the European Society of Clinical Microbiology [Internet]. 2009 Sep [cited 2011 Aug 24];28(9):1123–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2758201&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
113. Ito S, Nagamune H, Tamura H, Yoshida Y. Identification and molecular analysis of beta-C-S lyase producing hydrogen sulfide in *Streptococcus intermedius*. *Journal of medical microbiology* [Internet]. 2008 Nov [cited 2012 Jun 24];57(Pt 11):1411–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18927421>
114. Hill JE, Gottschalk M, Brousseau R, Harel J, Hemmingsen SM, Goh SH. Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*. *Vet Microbiol* [Internet]. 2005;107(1-2):63–9. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15795078](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15795078)
115. Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H, Feres M, Lopez NJ, Socransky SS. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *Journal of clinical periodontology* [Internet]. 2004 Nov [cited 2012 Jun

24];31(11):996–1002. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15491316>

116. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000 [Internet]. 2005 Jan [cited 2012 Mar 11];38:135–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15853940>
117. Jacobs JA, Pietersen HG, Stobberingh EE, Soeters PB. *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* and *Streptococcus intermedius*. Clinical relevance, hemolytic and serologic characteristics. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 1995;104(5):547–53. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7572815](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7572815)
118. Shinzato T, Saito A. The *Streptococcus milleri* group as a cause of pulmonary infections. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* [Internet]. 1995 Dec [cited 2012 Jun 22];21 Suppl 3:S238–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8749672>
119. Nagashima H, Takao A, Maeda N. Abscess forming ability of *streptococcus milleri* group: synergistic effect with *Fusobacterium nucleatum*. *Microbiology and immunology* [Internet]. 1999 Jan [cited 2012 Jun 22];43(3):207–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10338189>
120. Băncescu G, Dumitriu S, Băncescu A, Skaug N. *Streptococci* species of *anginosus* group isolated from oral and maxillofacial infections. *Roumanian archives of microbiology and immunology* [Internet]. [cited 2012 Jun 22];58(1):49–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11845444>
121. Kanamori S, Kusano N, Shinzato T, Saito A. The role of the capsule of the *Streptococcus milleri* group in its pathogenicity. *J Infect Chemother* [Internet]. 2004;10(2):105–9. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15160304](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15160304)

## **10. ANEXOS**



**Anexo 1:** Aprovação del estudio de la presente tesis doctoral por el Comité de Ética del Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.



Ex.ma Senhora  
Dra. Helena Isabel F. Borges da Costa  
Rua Joaquim Ereira, Lote 16 – 1ºEsq.  
2750-390 CASCAIS

Monte de Caparica, 26 de Julho de 2007

Ex.ma Senhora

Venho comunicar-lhe que o projecto à realização de um estudo clínico "Prevalência de Strobotococos Milleri na Pericoronarite" que submeteu à apreciação da Comissão de Ética do ISCSEM foi aprovado por unanimidade.

Com os melhores cumprimentos,

O Director do ISCSEM

Prof. Doutor Manuel Jorge de Queiroz Medeiros



## **Anexo 2:**

Todos los sujetos procedían de la Clínica Universitaria de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Egaz Moniz de Lisboa y firmaron su consentimiento informado para su participación en este estudio.

Consentimento informado do doente Sr.<sup>a</sup>/Sr.<sup>a</sup> \_\_\_\_\_  
para o Sr. Dra. Helena Isabel Fernandes Borges da Costa para executar o seguinte  
procedimentos clínico:

Realizar uma colheita a mesial do terceiro molar inferior, com um cone de papel 45,  
que demorará cerca de 1 minuto a fim de obter a amostra clínica microbiológica.

Foi-me explicado que a realização das colheitas microbiológicas não apresentam  
quaisquer riscos por não serem invasivas e só se justificam com a finalidade de um  
estudo microbiológico.

Compreendo que os procedimentos clínicos que me foram previamente explicados e  
que eu entendi.

Tive a possibilidade de discutir com a Dra. Helena Costa a minha história clínica e os  
meus antecedentes pessoais e familiares.

Fui informado(a) que este estudo tem por objectivo identificar a flora microbiana da população que recorre a esta clínica universitária e contribui para estudos académicos.

Fui informado(a) que posso retirar a autorização do consentimento informado em qualquer altura sem ser por isso prejudicado nos meus tratamentos.

Nome \_\_\_\_\_ do

Doente: \_\_\_\_\_

BI Nº: \_\_\_\_\_ De \_\_\_\_\_ Arquivo de \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do Doente

\_\_\_\_\_

Data: / /

Dra. Helena Costa.

### **Anexo 3:**

Lista de secuencias de *S. constellatus* analizadas mediante BLAST para la búsqueda de regiones específicas que permitieran el posterior diseño de cebadores

- Gen del RNA ribosómico 16S

AB355605 *Streptococcus constellatus* gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: ATCC 27823

AB355606 *Streptococcus constellatus* gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: IMU104

AB355607 *Streptococcus constellatus* gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: IMU106

AB355608 *Streptococcus constellatus* gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: IMU116

AB355618 *Streptococcus constellatus* gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: IMU120

AB355619 *Streptococcus constellatus* gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: IMU108

AF104676 *Streptococcus constellatus* strain ATCC27823 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

AF104677 *Streptococcus constellatus* strain 206 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

AF169353 *Streptococcus constellatus* strain VAMC5464 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

AF169356 Streptococcus constellatus strain VAMC3868 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

AJ514251 Streptococcus constellatus partial 16S rRNA gene, isolate MBRG 5.1

AY277937 Streptococcus constellatus strain 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

AY277938 Streptococcus constellatus strain 857 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

AY277939 Streptococcus constellatus strain 15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

AY277940 Streptococcus constellatus strain 1192 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

AY277941 Streptococcus constellatus strain 919 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

AY277942 Streptococcus constellatus strain 1259 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

AY309095 Streptococcus constellatus subsp. pharyngis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

DQ232520 Streptococcus constellatus subsp. constellatus strain CIP 105032 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

DQ232521 Streptococcus constellatus subsp. constellatus strain CIP 105046 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

EF474002 Streptococcus constellatus strain C88 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

X58310 S.constellatus 16S rRNA

Z69041 S.constellatus 16S ribosomal RNA

- Región intergénica del RNA ribosómico 16S-23S

AY347545 *Streptococcus constellatus* subsp. *constellatus* strain ATCC 27513 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer

AY347546 *Streptococcus constellatus* subsp. *constellatus* strain ATCC 27823 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer

DQ204524 *Streptococcus constellatus* subsp. *pharyngis* strain CCUG 46377 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer

L36933 *Streptococcus constellatus* 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer and transfer RNA-Ala

- Gen del RNA ribosómico 23S

D63801 *Streptococcus constellatus* gene for 23S rRNA, partial sequence

- Gen *atpA* de la subunidad alfa de la ATP-sintasa

AM269678 *Streptococcus constellatus* subsp. *pharyngis* partial *atpA* gene for ATP synthase alpha subunit, type strain LMG 19538T

AM269707 Unknown partial *atpA* gene for ATP synthase alpha subunit, type strain LMG 14507T

AM286983 *Streptococcus constellatus* subsp. *constellatus* partial *atpA* gene for ATP synthase alpha subunit, strain LMG 17665

AM286984 *Streptococcus constellatus* subsp. *constellatus* partial *atpA* gene for ATP synthase alpha subunit, strain LMG 17835

- Gen rpoA de la subunidad alfa de la RNA polimerasa

AM269640 *Streptococcus constellatus* subsp. *pharyngis* partial rpoA gene for RNA polymerase alpha subunit, type strain LMG 19538T

AM269649 Unknown partial rpoA gene for RNA polymerase alpha subunit, type strain LMG 14507T

AM286906 *Streptococcus constellatus* subsp. *constellatus* partial rpoA gene for RNA polymerase alpha subunit, strain LMG 17835

AM286938 *Streptococcus constellatus* subsp. *constellatus* partial rpoA gene for RNA polymerase alfa subunit, strain LMG 17665

- Gen rpoB de la subunidad beta de la RNA polimerasa

AB199924 Streptococcus constellatus subsp. pharyngis gene for RNA polymerase beta subunit, partial cds, strain: CCUG46377

AB200037 Streptococcus constellatus gene for RNA polymerase beta subunit, partial cds, strain: 941

AB200038 Streptococcus constellatus gene for RNA polymerase beta subunit, partial cds, strain: 2395

AF194511 Streptococcus constellatus RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds

AF194512 Streptococcus constellatus RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds

AF535184 Streptococcus constellatus strain CIP 103247 RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds AH008393 Streptococcus constellatus RNA polymerase beta subunit (rpoB) and RNA polymerase beta subunit (rpoB) genes

DQ232495 Streptococcus constellatus subsp. constellatus strain CIP 105032 RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene

DQ232496 Streptococcus constellatus subsp. constellatus strain CIP 105046 RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene

- Gen pheS de la subunidad alfa de la fenilalanil-tRNA-sintasa

AM269592 Unknown partial pheS gene for phenylalanyl-tRNA synthase alpha subunit, type strain LMG 14507T

AM269593 *Streptococcus constellatus* subsp. *pharyngis* partial *pheS* gene for phenylalanyl-tRNA synthase alpha subunit, type strain LMG 19538T

AM286829 *Streptococcus constellatus* subsp. *constellatus* partial *pheS* gene for phenylalanyl-tRNA synthase alpha subunit, strain LMG 17835

- Gen *sodA* de la superóxido-dismutasa dependiente de manganeso

AB200049 *Streptococcus constellatus* subsp. *pharyngis* gene for manganese dependent superoxide dismutase, partial cds

AB200159 *Streptococcus constellatus* gene for manganese dependent superoxide dismutase, partial cds

AB200160 *Streptococcus constellatus* gene for manganese dependent superoxide dismutase, partial cds

DQ232579 *Streptococcus constellatus* subsp. *constellatus* strain CIP 105032 manganese-dependent superoxide dismutase (*sodA*) gene, partial cds

DQ232580 *Streptococcus constellatus* subsp. *constellatus* strain CIP 105046 manganese-dependent superoxide dismutase (*sodA*) gene, partial cds

Z95897 *Streptococcus constellatus* *sodA* gene

Z99181 *Streptococcus constellatus* partial *sodA* gene, strain NEM1164

Z99182 *Streptococcus constellatus* partial *sodA* gene, strain NEM1166

Z99183 *Streptococcus constellatus* partial *sodA* gene, strain NEM1124

Z99184 *Streptococcus constellatus* partial *sodA* gene, strain NEM1162

Z99185 *Streptococcus constellatus* partial *sodA* gene, strain NEM1165

Z99186 *Streptococcus constellatus* partial *sodA* gene, strain NEM1275

Z99187 *Streptococcus constellatus* partial *sodA* gene, strain MG19

- Gen lcd de la beta-C-S-liasa

AB271059 Streptococcus constellatus lcd gene for bC-S lyase, complete cds

AB326999 Streptococcus constellatus lcd gene for betaC-S lyase, complete cds,  
strain: ATCC 27823

AB327001 Streptococcus constellatus lcd gene for betaC-S lyase, complete cds,  
strain: IMU104

AB327002 Streptococcus constellatus lcd gene for betaC-S lyase, complete cds,  
strain: IMU106

AB327003 Streptococcus constellatus lcd gene for betaC-S lyase, complete cds,  
strain: IMU108

AB327005 Streptococcus constellatus lcd gene for betaC-S lyase, complete cds,  
strain: IMU116

AB327006 Streptococcus constellatus lcd gene for betaC-S lyase, complete cds,  
strain: IMU120

- Gen de hialuronato liasa

AF385683 Streptococcus constellatus hypothetical protein gene, partial cds; and  
hyaluronate lyase precursor, gene

AY302594 Streptococcus constellatus subsp. constellatus strain C-19 truncated  
hyaluronate lyase precursor, gene

AY302596 Streptococcus constellatus subsp. pharyngis strain MM9889a glutathione  
peroxidase gene, partial cds; and hyaluronate lyase precursor, gene, complete cds

- Gen pbp2b de la proteína de unión a penicilina 2B

AY289799 Streptococcus constellatus subsp. constellatus strain ATCC 27823 penicillin-binding protein 2B (pbp2b) gene

AY289800 Streptococcus constellatus subsp. pharyngis strain MM9889a penicillin-binding protein 2B (pbp2b) gene, partial cds

Gen dnaJ

AB238808 Streptococcus constellatus dnaJ gene for DnaJ, partial cds

AB238809 Streptococcus constellatus dnaJ gene for DnaJ, partial cds

- Gen de la ligasa de D-alanina-D-alanina

AB199341 Streptococcus constellatus gene for D-alanine:D-alanine ligase, partial cds, strain: SK53 (ATCC 27823)

AB199342 Streptococcus constellatus subsp. pharyngis gene for D-alanine:D-alanine ligase, partial cds, strain: CCUG 46377

AB199442 Streptococcus constellatus gene for D-alanine:D-alanine ligase, partial cds, strain: 941

AB199443 Streptococcus constellatus gene for D-alanine:D-alanine ligase, partial cds, strain: 2395

U91914 Streptococcus constellatus D-alanine:D-alanine ligase gene, partial cds

- Gen de la glutamato deshidrogenasa

AB199454 Streptococcus constellatus gene for glutamate dehydrogenase, partial cds, strain: SK53 (ATCC 27823)

AB199455 Streptococcus constellatus subsp. pharyngis gene for glutamate dehydrogenase, partial cds, strain: CCUG 46377

AB199547 Streptococcus constellatus gene for glutamate dehydrogenase, partial cds, strain: 941

AB199548 Streptococcus constellatus gene for glutamate dehydrogenase, partial cds, strain: 2395

- Gen rnpB de la ribonucleasa P de RNA

AJ511727 Streptococcus constellatus partial rnpB gene for ribonuclease P RNA, isolate UMU KE

AJ511728 Streptococcus constellatus partial rnpB gene for ribonuclease P RNA, strain ATCC 27823 (CCUG 24889)

AJ511730 Streptococcus constellatus partial rnpB gene for ribonuclease P RNA, strain CCUG 9569

AJ511741 Streptococcus constellatus partial rnpB gene for ribonuclease P RNA, strain CCUG 4215

AJ511742 Streptococcus constellatus partial rnpB gene for ribonuclease P RNA, strain CCUG 28196

- Genes de chaperoninas

AF378196 Streptococcus constellatus GroES (groES) and GroEL (groEL) genes, complete cds

AY123653 Streptococcus constellatus subsp. constellatus strain ATCC 27823 Cpn60 (cpn60) gene, partial cds

AY344502 Streptococcus constellatus chaperonin GroEL gene, partial cds

- Gen de la V-región de la proteína I/II

AF192468 Streptococcus constellatus strain NCTC 10714 protein I/II V-region gene, partial cds

AF192470 Streptococcus constellatus strain NCTC 10708 protein I/II V-region gene, partial cds

- Otros genes

AF129761 Streptococcus constellatus DNA topoisomerase IV subunit C (parC) gene, partial cds

AF276259 Streptococcus constellatus elongation factor Tu (tuf) gene, partial cds

AF485859 Streptococcus constellatus NSRT23 M protein (emm) gene, partial cds

AJ000867 Streptococcus constellatus comC, comD genes, strain NCTC 11325

AY686729 Streptococcus constellatus M-like protein emmLC1904 gene, partial cds

#### **Anexo 4:**

**Regiones genómicas descartadas de *S. constellatus*, tras aplicar el criterio de idoneidad de presencia de una región específica con una longitud mínima de 70 nucleótidos**

- Gen del RNA ribosómico 16S
- Gen del RNA ribosómico 23S
- Gen atpA de la subunidad alfa de ATP-sintasa
- Gen de beta-C-S-liasa
- Genes comC y comD
- Gen de la ligasa de D-alanina-D-alanina
- Gen de la subunidad C de la DNA topoisomerasa IV
- Gen dnaJ
- Gen tuf del factor de elongación Tu
- Gen de la glutamato-deshidrogenasa
- Genes de la glutatión-peroxidasa/ hialuronato-liasa
- Genes de chaperoninas GroES y groEL (cpn60)
- Gen de la proteína de tipo m
- Gen pcp2b
- Gen pheS
- Gen de la región V de la proteína I/II
- Gen rnpB de la ribonucleasa P
- Genes rpoA y rpoB de las subunidades alfa y beta de la RNA polimerasa
- Gen sodA de la superóxido-dismutasa



## Anexo 5:

Escala de McFarland.

Escala de McFarland	BaCl <sub>2</sub> al 1 % (ml)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 1 % (ml)	UFC/ml (×10 <sup>8</sup> )
1	0,1	9,9	3
2	0,2	9,8	6
3	0,3	9,7	9
4	0,4	9,6	12
5	0,5	9,5	15
6	0,6	9,4	18
7	0,7	9,3	21
8	0,8	9,2	24
9	0,9	9,1	27
10	1,0	9,0	30



## **Anexo 6:**

Protocolo de extracción de ADN con el kit comercial INVITEK.

El protocolo de extracción bacteriano consistía en varias etapas:

- 1- Adicionar 400µl de **Resuspension Buffer R** al pellet y re suspender pipeteando de arriba abajo, transfiriendo la muestra para un tubo de extracción (**Extraction Tube L**) y voltear un poco.
- 2- Incubar la muestra en un bloque térmico durante 10 minutos a 37°C, pasando para 65°C otros 10 minutos.
- 3- Incubar a 95°C por 5 a 10 minutos (el proceso de agitar el tubo aumenta la eficacia de lisis celular).
- 4- Adicionar 400µl de **Binding Buffer B6** y voltear un poco.
- 5- Colocar la muestra en un **RTA Spin Filter Set** y incubar por 1 minuto, después centrifugar a 12.000rpm por 1 minuto. El filtrado es descartado y se coloca el **RTA Spin Filter Set** en un **RTA Receiver Tube**.
- 6- Inicio de los lavados. Se adiciona 500µl de **Wash Buffer I**. Se centrifuga a 10.000rpm por 1 minuto, se descarta el filtrado y el RTA Receiver tube y se coloca el RTA Spin Filter en un nuevo RTA receiver Tube.
- 7- Se adiciona 600µl de **Wash Buffer II**, se centrifuga a 10.000rpm por 1 minuto, se descarta el filtrado, se coloca el RTA Spin Filter otra vez y se centrifuga al final para remover totalmente el etanol por 3 minutos a la máxima velocidad.
- 8- El RTA Spin Filter se coloca en un nuevo tubo (**1.5 receiver tube**) y se adiciona 200µl de **Elution Buffer D**. Se incuba por 1 minuto a la temperatura ambiente y se centrifuga por 1 minuto a 8.000rpm.



## Anexo 7:

Gráficos representativos de los cebadores ordenados al Laboratório Stab Vida, en Caparica, Portugal.

### Sequence - HC1 L

25 nmole DNA Oligo, 22 Bases

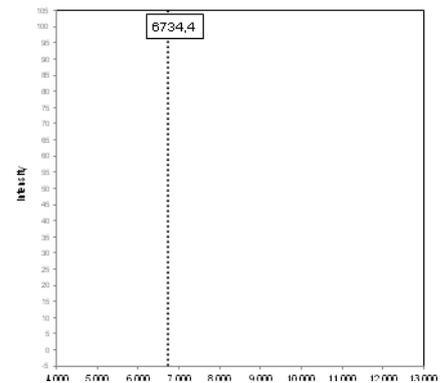
5- GGC TCC ATT ATC TAG GAT GCA A -3

#### Properties

*T<sub>m</sub>* (50 nM NaCl): 54,4 °C  
 GC Content: 45,5%  
 Molecular Weight: 6734,4  
*n*moles/OD<sub>260</sub>: 4,7  
 ug/OD<sub>260</sub>: 31,4  
 Ext. Coefficient: 214600 L/(mole-cm)

#### Amount of Oligo

5,7 = 26,7 = 0,18  
 OD<sub>260</sub> nMoles mg



#### Oligo Base Types

*Quantity*

DNA Bases 22

#### Modifications and Services

*Quantity*

Standard Desalting 1

### Sequence - HC1 R

25 nmole DNA Oligo, 21 Bases

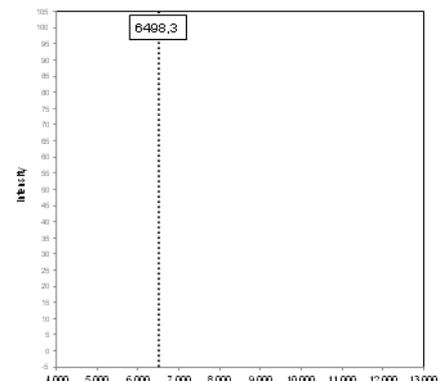
5- TGG GCT AAT TAG GTT CGT GTT -3

#### Properties

*T<sub>m</sub>* (50 nM NaCl): 54,1 °C  
 GC Content: 42,9%  
 Molecular Weight: 6498,3  
*n*moles/OD<sub>260</sub>: 5  
 ug/OD<sub>260</sub>: 32,5  
 Ext. Coefficient: 199800 L/(mole-cm)

#### Amount of Oligo

6 = 30 = 0,2  
 OD<sub>260</sub> nMoles mg



#### Oligo Base Types

*Quantity*

DNA Bases 21

#### Modifications and Services

*Quantity*

Standard Desalting 1

**Sequence - HC2 L**

25 nmole DNA Oligo, 24 Bases

**5- TTC GTT ACT CGT TTT AAA TTC AGG -3****Properties***T<sub>m</sub>* (50 nM NaCl): 51,6 °C

GC Content: 33,3%

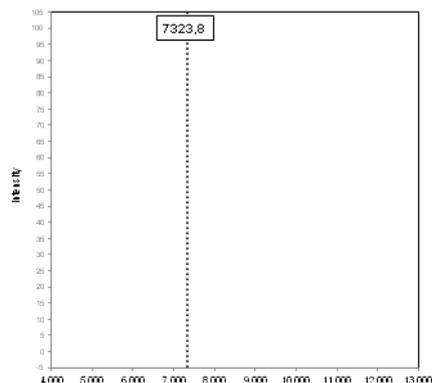
Molecular Weight: 7323,8

nmoles/OD<sub>260</sub>: 4,7ug/OD<sub>260</sub>: 32,4

Ext. Coefficient: 225900 L/(mole-cm)

**Amount of Oligo**

5,3	=	23,3	=	0,17
OD <sub>260</sub>		nMoles		mg

**Oligo Base Types**

Quantity

DNA Bases

24

**Modifications and Services**

Quantity

Standard Desalting

1

**Sequence - HC2 R**

25 nmole DNA Oligo, 26 Bases

**5- TTT TAA ACA TTT TAT CCT CCT GTC AA -3****Properties***T<sub>m</sub>* (50 nM NaCl): 51,5 °C

GC Content: 26,9%

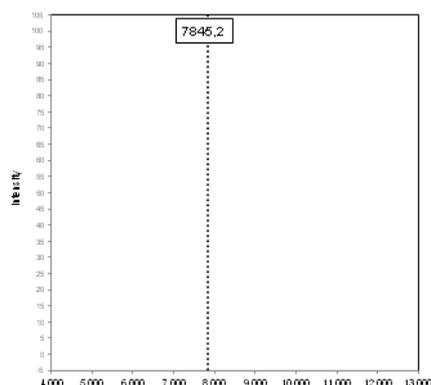
Molecular Weight: 7845,2

nmoles/OD<sub>260</sub>: 4,7ug/OD<sub>260</sub>: 4,1

Ext. Coefficient: 242200 L/(mole-cm)

**Amount of Oligo**

6,1	=	25	=	0,2
OD <sub>260</sub>		nMoles		mg

**Oligo Base Types**

Quantity

DNA Bases

26

**Modifications and Services**

Quantity

Standard Desalting

1

**Sequence - HC3 L**

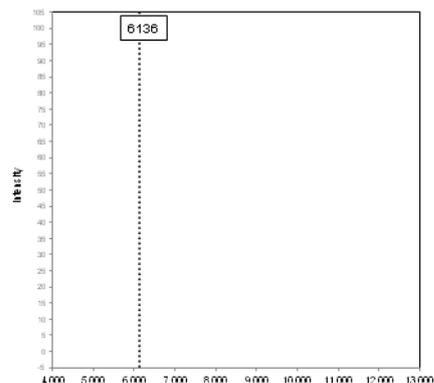
25 nmole DNA Oligo, 20 Bases

**5- TCT GTT TTT GCA GGT GTT GC -3****Properties**

*Tm* (50 nM NaCl): 54,4 °C  
 GC Content: 45%  
 Molecular Weight: 6136  
*nmoles/OD<sub>260</sub>*: 5,7  
*ug/OD<sub>260</sub>*: 34,7  
 Ext. Coefficient: 176900 L/(mole-cm)

**Amount of Oligo**

4,8 = 27 = 0,17  
 OD<sub>260</sub> nMoles mg

**Oligo Base Types***Quantity*

DNA Bases 20

**Modifications and Services***Quantity*

Standard Desalting 1

**Sequence - HC3 R**

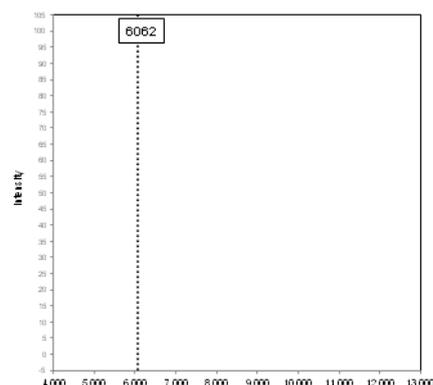
25 nmole DNA Oligo, 20 Bases

**5- GGC TCC ATT ATC TAG GAT GCA A -3****Properties**

*Tm* (50 nM NaCl): 56 °C  
 GC Content: 55%  
 Molecular Weight: 6062  
*nmoles/OD<sub>260</sub>*: 5,3  
*ug/OD<sub>260</sub>*: 32,3  
 Ext. Coefficient: 187500 L/(mole-cm)

**Amount of Oligo**

6,3 = 33,5 = 0,2  
 OD<sub>260</sub> nMoles mg

**Oligo Base Types***Quantity*

DNA Bases 20

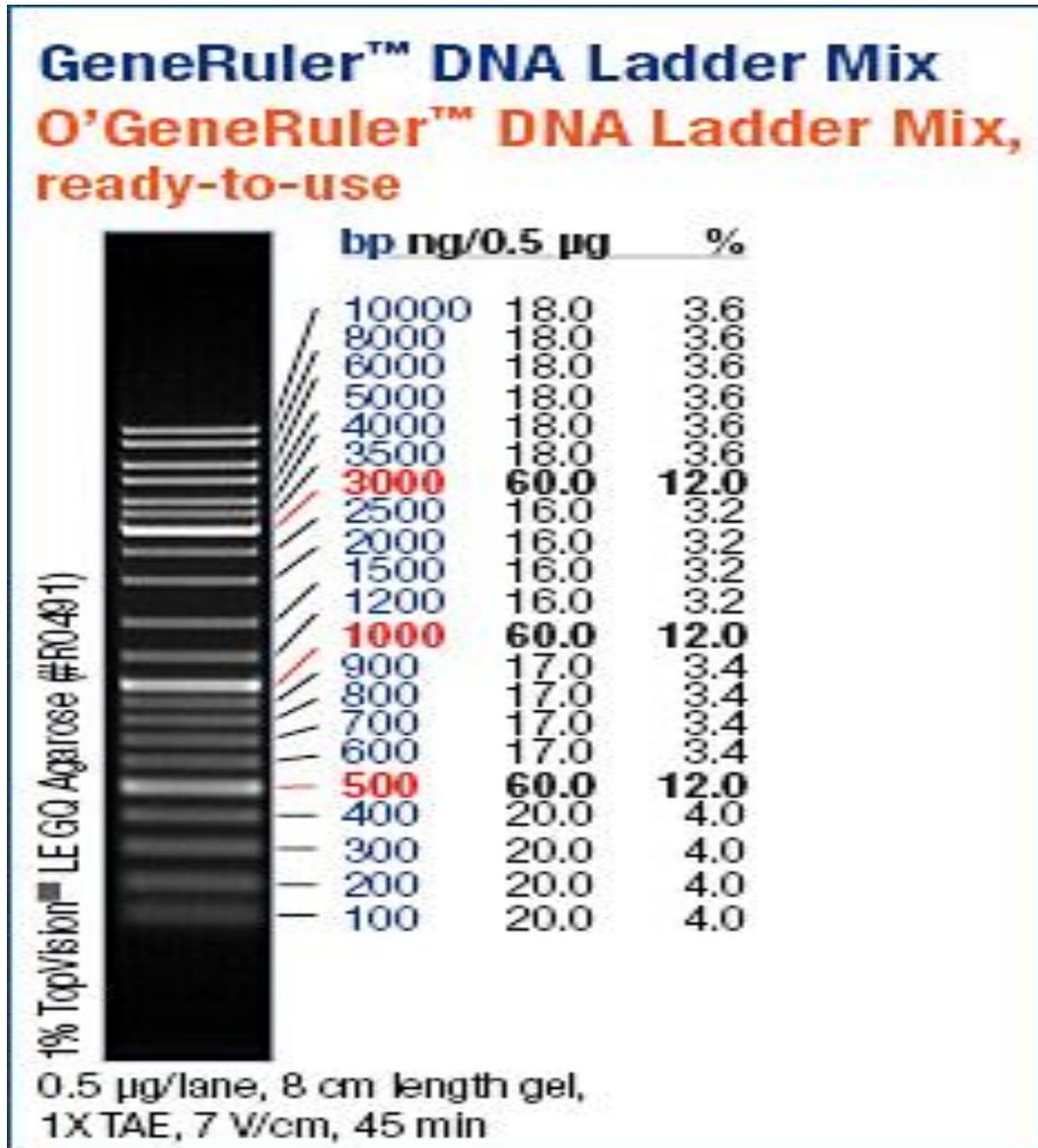
**Modifications and Services***Quantity*

Standard Desalting 1



**Anexo 8:**

Marcador de peso molecular utilizado en nuestro estudio, GeneRuler™ Ladder Mix, ready-to-use.



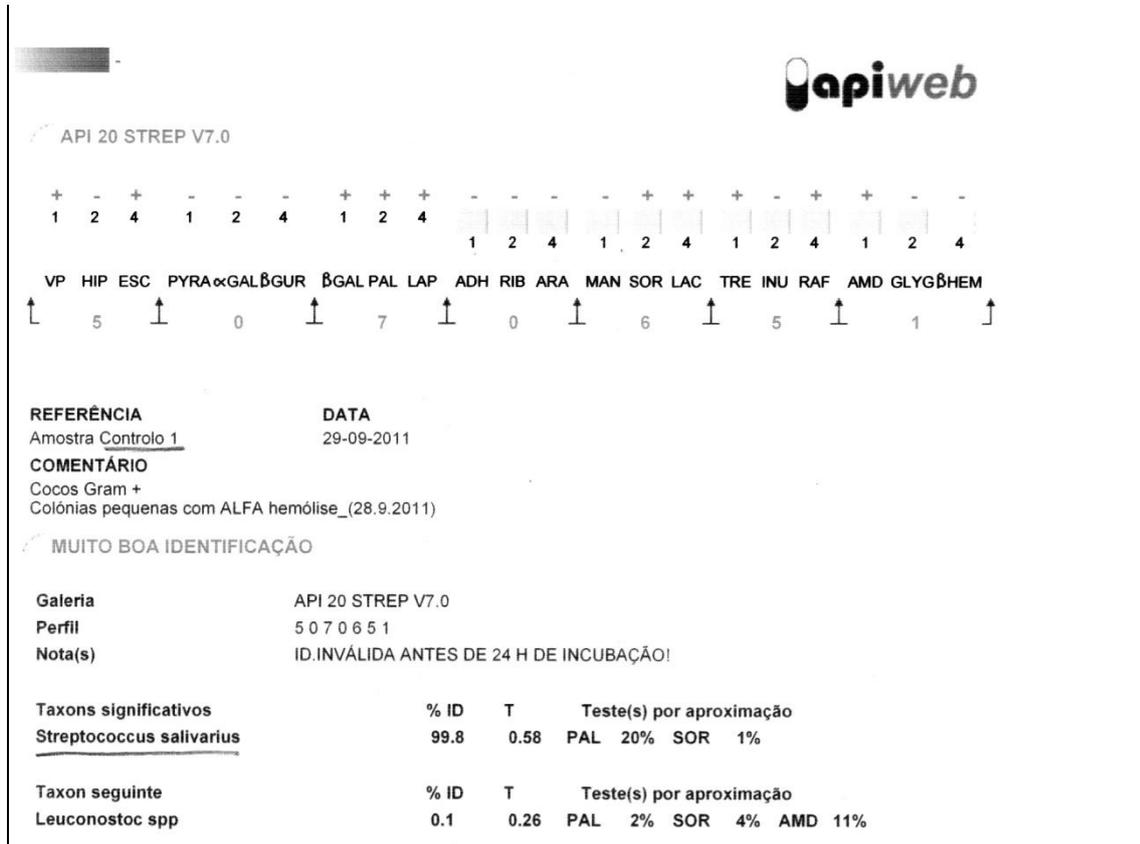


## Anexo 9:

### RESULTADOS DEL SISTEMA API20 STREP

#### Grupo Control

##### Muestra 1



## Grupo Control

### Muestra 2 (repicage 1)

REFERÊNCIA	DATA		
	18-10-2011		
COMENTÁRIO			
BOA IDENTIFICAÇÃO			
Galeria	API 20 STREP V7.0		
Perfil	4 0 0 0 4 1 0		
Nota(s)			
<b>Taxons significativos</b>	<b>% ID</b>	<b>T</b>	<b>Teste(s) por aproximação</b>
Aerococcus viridans 2	90.4	0.86	PYRA 76%
<b>Taxon seguinte</b>	<b>% ID</b>	<b>T</b>	<b>Teste(s) por aproximação</b>
Listeria spp	3.4	0.48	VP 97% HIP 79% LAP 85%

### Muestra 2 (repicage 2)

REFERÊNCIA	DATA		
	18-10-2011		
COMENTÁRIO			
PERFIL DUVIDOSO			
Galeria	API 20 STREP V7.0		
Perfil	0 0 0 1 6 1 1		
Nota(s)	ID.INVÁLIDA ANTES DE 24 H DE INCUBAÇÃO!		
<b>Taxons significativos</b>	<b>% ID</b>	<b>T</b>	<b>Teste(s) por aproximação</b>
Streptococcus sanguinis	98.5	0.61	LAP 100%
<b>Taxon seguinte</b>	<b>% ID</b>	<b>T</b>	<b>Teste(s) por aproximação</b>
Aerococcus viridans 2	0.7	0.29	PYRA 76% ADH 5% SOR 2% AMD 24%

## Grupo Control

### Muestra 3 (repicage 1)

+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
VP	HIP	ESC	PYRA	αGAL	βGUR	βGAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLY	βHEM
↑	1	↑	0	↑	4	↑	0	↑	4	↑	1	↑	4	↑	1	↑	0	↑	0	↑

**REFERÊNCIA**                      **DATA**  
 Dra. Helena Costa                      02-11-2011

**COMENTÁRIO**  
 Amostra C3 repicagem 1  
 Cultura alfa-hemólise, coccus Gram+

**BOA IDENTIFICAÇÃO**

**Galeria**                                      API 20 STREP V7.0  
**Perfil**                                        1 0 4 0 4 1 0  
**Nota(s)**                                    ID.INVÁLIDA ANTES DE 24H/POSSIBILIDADE DE Str.thermophilus

<b>Taxons significativos</b>	<b>% ID</b>	<b>T</b>	<b>Teste(s) por aproximação</b>
Lactococcus lactis ssp cremoris	92.7	0.94	
<b>Taxon seguinte</b>	<b>% ID</b>	<b>T</b>	<b>Teste(s) por aproximação</b>
Leuconostoc spp	4.1	0.87	

<b>Teste(s) complementare(s)</b>	<b>10°C</b>	<b>45°C</b>	<b>40% BILES</b>
Lactococcus lactis ssp cremoris	+	-	+
Streptococcus thermophilus	-	+	-

### Muestra 3 (repicage 2)

**REFERÊNCIA**                                      **DATA**  
 Helena Costa                                      20-10-2011

**COMENTÁRIO**  
 Amostra C3 (2)  
 Coccus Gram +  
 Colónias s/ hemólise

**MUITO BOA IDENTIFICAÇÃO**

**Galeria**    API 20 STREP V7.0  
**Perfil**    5 0 7 0 6 5 1  
**Nota(s)**    ID.INVÁLIDA ANTES DE 24 H DE INCUBAÇÃO!

<b>Taxons significativos</b>	<b>% ID</b>	<b>T</b>	<b>Teste(s) por aproximação</b>
<u>Streptococcus salivarius</u>	99.8	0.58	PAL 20% SOR 1%
<b>Taxon seguinte</b>	<b>% ID</b>	<b>T</b>	<b>Teste(s) por aproximação</b>
Leuconostoc spp	0.1	0.26	PAL 2% SOR 4% AMD 11%

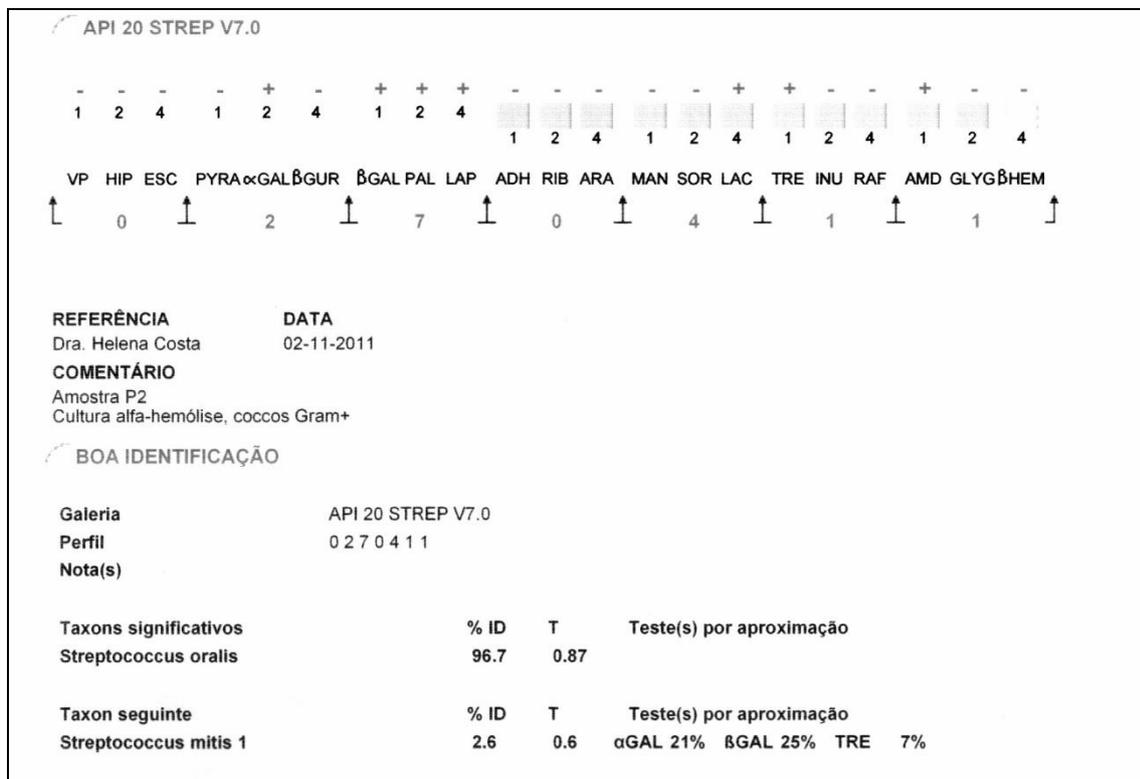
## Grupo Pericoronaritis

Muestra 1

REFERÊNCIA	DATA
Helena Costa	20-10-2011
COMENTÁRIO	
Amostra P1	
Coccus Gram+	
Colônias com alfa-hemólise	
MUITO BOA IDENTIFICAÇÃO NO GÉNERO	
Galeria	API 20 STREP V7.0
Perfil	0 0 7 0 4 0 1
Nota(s)	ID.INVÁLIDA ANTES DE 24H/POSSIBILIDADE DE Str.pneumoniae
<b>Taxons significativos</b>	<b>% ID</b> <b>T</b> <b>Teste(s) por aproximação</b>
<u>Streptococcus oralis</u>	59.2    0.92
<u>Streptococcus mitis 1</u>	37.8    0.88 $\beta$ GAL 25%
<u>Streptococcus mitis 2</u>	2.7    0.67    ADH 99%
<b>Taxon seguinte</b>	<b>% ID</b> <b>T</b> <b>Teste(s) por aproximação</b>
<u>Aerococcus urinae</u>	0.1    0.61    HIP 99%
<b>Teste(s) complementare(s)</b>	<b>NaCl 4%</b> <b>DEXTRANO</b> <b>OPTOQUINAR</b> <b>SALICIN.ac</b>
<u>Streptococcus mitis</u>	-    -    +    +(-)
<u>Streptococcus oralis</u>	100%    78%    NT    -(+)
<u>Streptococcus pneumoniae</u>	NT    -    -(+)    -

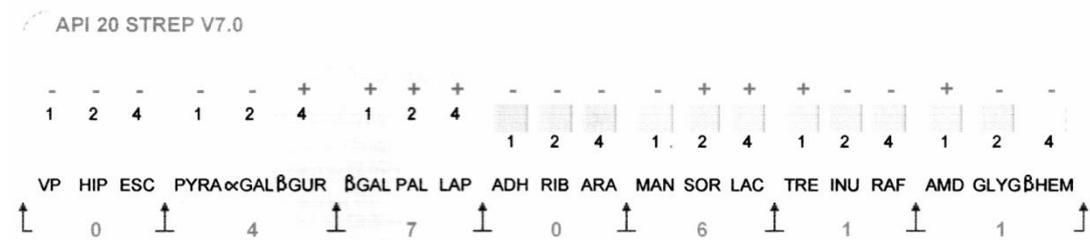
## Grupo Pericoronaritis

### Muestra 2



# Grupo Pericoronaritis

## Muestra 3



**REFERÊNCIA** Helena Costa  
**DATA** 20-10-2011

**COMENTÁRIO**  
Amostra (P3)  
Cocos Gram +  
Colônias com alfa-hemólise

**BOA IDENTIFICAÇÃO**

**Galeria** API 20 STREP V7.0  
**Perfil** 0 4 7 0 6 1 1  
**Nota(s)** POSSIBILIDADE DE *Str.acidominimus* OU *Str.pluranimalium*

Taxons significativos	% ID	T	Teste(s) por aproximação
<u><i>Aerococcus urinae</i></u>	98.9	0.53	HIP 99% SOR 13%
<b>Taxon seguinte</b>	% ID	T	Teste(s) por aproximação
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> ssp <i>dysgalactiae</i>	0.6	0.0	βGAL 0% ADH 100% RIB 99%