

Relación cuantitativa entre el nivel de *Streptococcus mutans* y *Candida albicans* en niños con síndrome de Down

AUTORES/AUTHORS

A. Linossier (1), A. Vargas (1), R. Villegas (2), E. Chimenos (3).

- (1) Servicio de Odontología y Cirugía Maxilofacial, Escuela de Medicina Pontificia y Católica de la Universidad de Chile. Chile.
- (2) Departamento de Salud Pública, Escuela de Medicina, Universidad de Chile.
- (3) Facultad de Odontología, Universidad de Barcelona. España.

Linossier A, Vargas A, Villegas R, Chimenos E. Relación cuantitativa entre el nivel de *Streptococcus mutans* y *Candida albicans* en niños con síndrome de Down. Medicina Oral 2002; 7: 284-92.
© Medicina Oral. B-96689336
ISSN 1137-2834.

RESUMEN

Objetivo: El presente trabajo intenta establecer una correlación entre el recuento cuantitativo de *Streptococcus mutans* y *Candida albicans* en la saliva de pacientes con síndrome de Down (SD) y en pacientes deficientes mentales (DM), respecto a un grupo normal (C).

Diseño del estudio: Este estudio se realizó en 166 niños (49 SD, 60 DM y 57 C). Las muestras de saliva fueron cultivadas en agar TYCSB y agar Sabouraud y posteriormente se realizaron análisis microbiológicos, pruebas de microscopía electrónica de barrido y de agregación. La valoración estadística de los resultados se realizó mediante análisis de la varianza (ANOVA) y test "T de Student" para datos no apareados.

Resultados: Se encontró una correlación de 0,45 para el grupo C, 0,55 en los pacientes SD y 0,37 en los pacientes MD, en la comparación entre el recuento de *S. mutans* y *C. albicans*, que se confirmó con experimentos *in vitro* de *S. mutans* y *C. albicans* realizados mediante filtros de nitrocelulosa.

Conclusiones: Este tipo de asociación entre bacterias y hongos contribuye a justificar que exista un sinergismo patológico entre diversos microorganismos, con las consiguientes

repercusiones infecciosas, que pueden manifestarse tanto de forma local como sistémica, dependiendo del estado inmunitario del paciente afecto.

Palabras clave: síndrome de Down, *S. mutans*, *C. Albicans*, coagregación.

INTRODUCCIÓN

La cavidad oral es un ecosistema abierto, caracterizado por un grupo de parámetros denominados determinantes ecológicos; esto explica por qué algunos microorganismos son parte de la microflora de la boca (1, 2). Estos parámetros se clasifican como: físicos, nutricionales y factores inhibitorios, así como la adherencia bacteriana. El último factor es un mecanismo mediante el cual los microorganismos son capaces de colonizar los tejidos de la cavidad, en particular los dientes (3). De acuerdo con Kolenbrander y London, la colonización se realiza por dos tipos de microorganismos denominados precoces y retardados, de los cuales ambos forman placa sobre la superficie del diente. Entre los colonizadores precoces se encuentran los *Streptococcus*, los cuales se adhieren a glucoproteínas en la película salival sobre el esmalte (4). La dieta puede influir también en la proporción de las distintas especies bacterianas que constituyen la película (5, 6), especialmente el consumo de sacarosa, que es fermentado por los *S. mutans* y las *C. albicans*, produciendo un entorno acidogénico favorable para ambos (7, 8). Por otra parte, un estudio *in vitro* confirmó que la adhesión de la *C. albicans* se producía cuando el hongo se incubaba simultáneamente con *S. mutans* en presencia de sacarosa (9). Observando la colonización de los hongos en la boca, otros autores determinaron que la placa dental no es el origen primario de la *C. albicans*, debido a que este hongo puede ser un colonizador secundario de la cavidad oral (10). La proporción exacta y el significado de las levaduras en la salud y en la enfermedad orales no está clara, a pesar de que algunos autores afirman que la saliva es una fuente potencial de transmisión de *C. albicans* hacia otras áreas del cuerpo (11).

Los niños con síndrome de Down o con retraso mental se caracterizan por tener un IQ < 70 (cociente de inteligencia menor de 70) en la escala Wechler. Ambos grupos presentan dificultades mecánicas al realizar los procedimientos de higiene oral. Esta situación provoca una gran proliferación de placa dental. El presente trabajo intenta establecer la correlación existente entre el recuento cuantitativo de *S. mutans* y *C. albicans* como marcadores de infecciosidad en la saliva de pacientes con síndrome de Down (SD) y en pacientes deficientes mentales (DM), respecto a un grupo normal (C).

MATERIAL Y MÉTODO

1. Población de estudio: Este estudio se realizó en 166 niños (varones y mujeres, de 5 a 19 años de edad). 49 de estos pacientes presentaban el síndrome de Down, 60 eran retrasados mentales y 57 comprendían el grupo control normal (12).

TABLA 1

Expresión geométrica del recuento en saliva de *Candida albicans* obtenido en los grupos control, síndrome de Down y deficientes mentales

	n	Media geométrica	Desviación estándar	Valor P
Normal	57	3,16	0,57	
Síndrome Down	49	4,08	1,06	<0,01*
Deficiente Mental	60	3,69	1,16	<0,01*

*Comparación entre grupo normal y los grupos estudiados.

Los miembros de los tres grupos procedían de Centros de Educación Pública de la Región Sur Central Metropolitana de Santiago de Chile.

2. Muestras de saliva: Las muestras de saliva de todos los individuos fueron recolectadas empleando el siguiente método: dos horas después del desayuno, un dentista cepillaba los dientes del paciente durante treinta segundos. El flujo salival se estimulaba aplicando una solución al 1% de ácido cítrico en la cara dorsal de la lengua. Tras un minuto, las muestras se recogían de cada paciente empleando un embudo de cristal y se conservaban a 0° C para el análisis microbiológico posterior. El volumen mínimo para aceptar una muestra era de 0,5 ml.

3. Muestras microbiológicas: Las muestras de saliva se mezclaban en un mezclador Vortex durante 60 segundos y se diluía en proporción 1:10 en un tampón salino fosfato 20 mM (pH 7,4), y se volvía a diluir durante 60 segundos. Acto seguido, 100 µl de las muestras se cultivaban en TYCSB específico para *Streptococcus mutans* (13). La muestra se sembraba en agar Sabouraud para la estimación de *C. albicans*. Los cultivos de TYCSB se incubaron durante 48 horas a 37° C bajo anaerobiosis (Gas-Pack Jars) (95% N₂/5% CO₂), mientras que los cultivos en Sabouraud se incubaron en condiciones aeróbicas durante 48 horas a 37° C; después de este período, se contó el número de colonias. Para el experimento de coagregación de *S. mutans* a *C. albicans* los microorganismos fueron cultivados en líquido Todd-Hewitt medium en presencia de un 5% de sacarosa (24 horas a 37° C).

4. Análisis microbiológico: La identificación de biotipos de *Streptococcus mutans* fue realizada por la fermentación de manitol, sorbitol, melobiosa, sacarosa, rafinosa y almidón, así como la hidrólisis de esculina y arginina, de acuerdo con el micrométodo descrito previamente (14). Este micrométodo consiste en una técnica que permite el uso de 40 µl de diferentes soluciones de azúcares. Las especies de *Candida* se clasificaron de acuerdo con el cimograma, empleando glucosa, sacarosa, lactosa y maltosa. También observamos el tubo germinal que aparece en el plasma humano al incubar células durante dos horas a 37° C. Se emplearon cepas Ingbritt (serotipo C) y ATCC 10231 como referencia de los cultivos, para el *S. mutans* y la *C. albicans*, respectivamente.

5. Microscopía electrónica de barrido: Para observar la adherencia del *S. mutans* al hongo *C. albicans*, empleamos el

método descrito por Holmes (15). La agregación celular se fijó en un 2,5% (vol/vol) de glutaraldehído en un tampón 0,1 M de cacodilato de sodio (pH 7,4) a 4° C durante 90 minutos. Las células fueron depuradas mediante centrifugación durante un minuto a 12.000xg y lavadas cuatro veces en cacodilato de sodio 0,1 M. Después de esto, las células se fijaron con tetróxido de osmio al 1% a 20° C (una hora). Las muestras fueron deshidratadas en concentraciones seriadas de etanol (30, 50, 70, 95 y 100%) y secadas con CO₂, empleando un aparato de punto crítico (Polaron, England). Las muestras fueron examinadas en un microscopio electrónico Zeiss DSM 940 (15kV).

6. Experimento de agregación: La adherencia de *S. mutans* a *C. albicans* fue determinada de acuerdo con el experimento descrito previamente por Lamont y cols. (16) y modificado en nuestro laboratorio como describimos a continuación. Las células microbianas empleadas en los experimentos fueron obtenidas por centrifugación a 10.000 x g durante 10 minutos y lavadas tres veces mediante un tampón de incubación (5 mM KCl, 2 mM K₂HPO₄, 1mM de CaCl₂ a pH 6,0). En este momento se obtenía una suspensión de 10⁶ células/ml de *C. albicans* y 200 µl de esta suspensión se colocaban en un filtro de nitrocelulosa (0,45 µm) y conectada a un sistema de vacío (Millipore Co.). Los filtros con las células inmovilizadas fueron lavados dos o tres veces durante cinco minutos en el tampón de incubación conteniendo un 0,1% de Tween 20. Otro fue incubado con una suspensión de *S. mutans* (3x10⁸ células/ml) en un tampón con 0,1% de Tween 20 a 37° C durante dos horas. Después de lavarlo en el mismo tampón (tres veces durante cinco minutos) con la intención de eliminar todos los microorganismos no adheridos, los filtros se incubaron con anticuerpos *S. mutans*, diluidos 1/1.000 en un tampón de incubación que contenía Tween 20. A continuación, los filtros se lavaron tres veces con el tampón de incubación Tween 20. Para visualizar la adhesión, una segunda incubación con anti-IgG de conejo conjugada con peroxidasa se colocó durante una hora a 37° C. Después de lavar, se empleó una solución fresca de 4-cloro-1-naptol y de H₂O al 30% como desencadenante de la reacción, durante 30 minutos a la temperatura de la sala (23±2° C).

7. Análisis estadístico: La gradación de asociación entre las concentraciones de *S. mutans* y *C. albicans* fue determi-

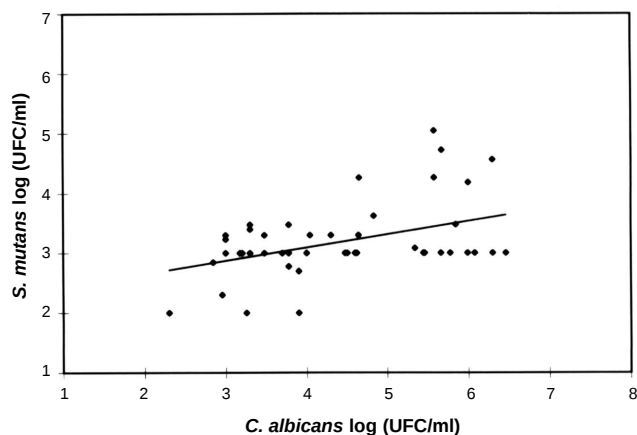


Fig. 1a.

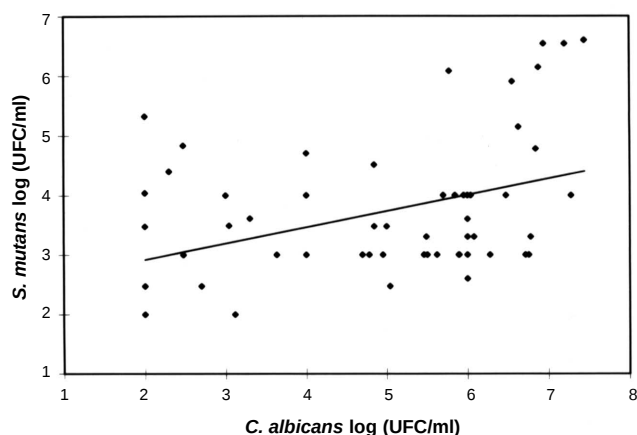


Fig. 1c.

nada de acuerdo con el coeficiente de correlación de Pearson y el método no paramétrico de Kruskal-Wallis. Los resultados logarítmicos de UFC/ml obtenidos fueron analizados empleando el análisis de varianza (ANOVA) y el test de la "T de Student" para datos no apareados ($p < 0,05$), empleando los dos métodos de corte.

RESULTADOS

En las Figuras 1 a, b y c, se observa una correlación moderada entre las cantidades de *S. mutans* y *C. albicans* en los grupos normales (C), síndrome de Down (SD) y deficientes mentales (DM) ($r = 0,45$, $0,55$ y $0,37$, respectivamente). Todas estas correlaciones fueron muy significativas entre ambos microorganismos ($p < 0,01$).

La Tabla 1 muestra la expresión geométrica del recuento de *C. albicans* en los grupos normal, síndrome de Down (DS) y deficientes mentales (DM). Los resultados mostraron una elevada correlación ($p < 0,01$) para las primeras especies de

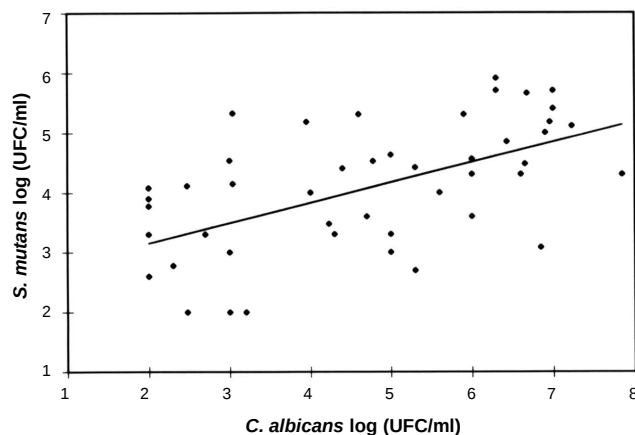


Fig. 1b.

Figs. 1a, b y c.

Relación entre *S. mutans* y *C. albicans* en los grupos normal (a), Síndrome de Down (b), y deficientes mentales (c), respectivamente. En cada figura se observa una correlación moderada de $0,37 < r < 0,55$ entre la concentración de Log UFC de *S. mutans*/ml de saliva y Log CFU de *C. albicans*/ml de saliva, respectivamente.

a: $r = 0,45$ $p < 0,01$

b: $r = 0,55$ $p < 0,01$

c: $r = 0,37$ $p < 0,01$

Relation between saliva *S. mutans* and *C. albicans* in Normal (a), Down's syndrome (b), and Mental Deficiency (c) groups, respectively. In each figure we observe a moderate correlation $0,37 < r < 0,55$ between concentration of Log CFU *S. mutans*/mL saliva and Log CFU *C. albicans*/mL saliva, respectively.

hongos en SD y DM, pero no había correlación para ese tipo de *S. mutans*.

El estudio bioquímico de los *S. mutans* demostró que el 94% pertenecía al biotipo I y el 6% al biotipo IV, respectivamente.

La Figura 2 muestra los resultados obtenidos mediante el microscopio electrónico de barrido (MEB), que confirman los resultados de agregación mostrados en la Figura 3. Los experimentos de agregación empleando anticuerpos anti-*S. mutans* mostraron una ligera acumulación oscura que correspondía a la agregación celular entre el *S. mutans* y la *C. albicans* inmovilizados en los filtros de nitrocelulosa (pocillo N° 4), que diferencia los controles negativos y positivos (pocillos N° 1, 3, y 5) (Figura 3).

DISCUSIÓN

Según los resultados mostrados en la Figura 1 (a, b y c), es posible establecer una correlación entre el recuento de *S. mutans* y *C. albicans* presentes en la saliva de los niños de los grupos estudiados, de acuerdo con la determinación de coeficientes de correlación ($p < 0,01$). Pretendíamos correlacionar la cantidad de microorganismos con diferencias entre los grupos estudiados. Encontramos diferencias significativas para

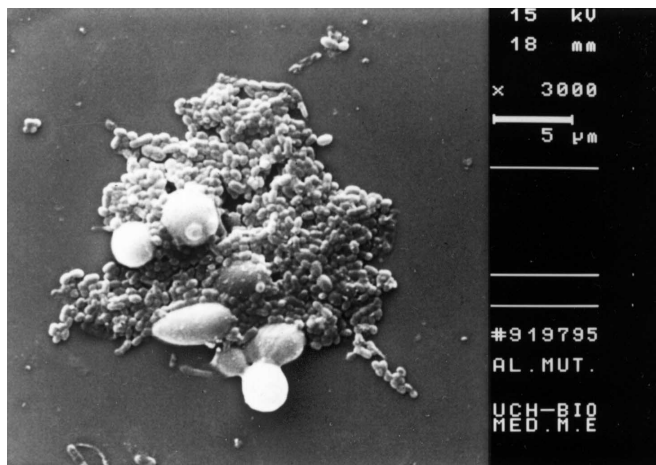


Fig. 2a.

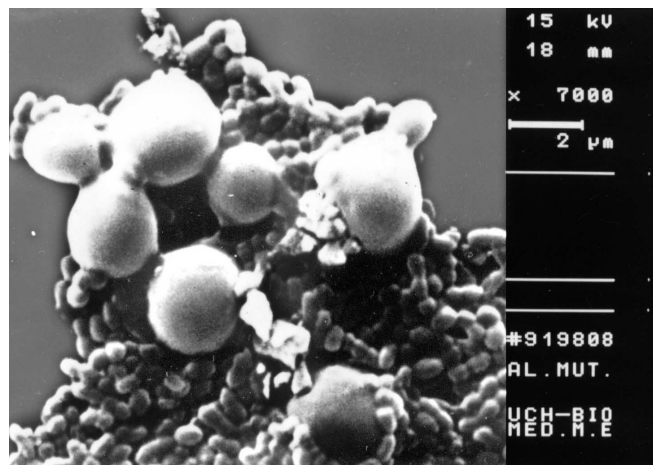
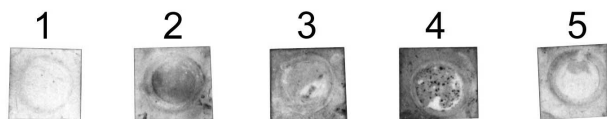


Fig. 2b.

Fig. 2 a y b.

Imagen de microscopía electrónica de barrido (MEB) que muestra la coagregación entre las células de *S. mutans* y de *C. albicans* en muestras de cultivo incubadas en un medio TYCSB. a) 3000x; b) 7000x.

Scanning electron microscopy (SEM) showing the co-aggregation between *S. mutans* and *C. albicans* cells in culture samples growing in TYCSB media. a) 3000x; b) 7000x.

**Fig. 3.**

Adherencia del *S. mutans* a las células de *C. albicans* inmovilizadas en filtros de nitrocelulosa y desarrollados con suero de conejo anti-*S. mutans*, anti-IgG conjugados con peroxidasa, H_2O_2 y 4-cloro-1-naptol como sustrato y reactivo cromogénico, respectivamente.

Pocillo 1: Control de la adherencia del *S. mutans*.

Pocillos 2 y 3: Controles de la especificidad del suero inmune para *S. mutans* y *C. albicans*, respectivamente.

Pocillo 4: Células de *S. mutans* adheridas a *C. albicans*.

Pocillo 5: Control de la reacción inmunoenzimática.

S. mutans adherence to *C. albicans* cells immobilized on nitrocellulose filters, and developed with rabbit anti-*S. mutans* serum, anti-IgG conjugated with peroxidase, H_2O_2 and 4-chloro-1-naptol as substrate and chromogenic reagents, respectively.

Well 1: Control of *S. mutans* adherence.

Wells 2 and 3: Controls for specificity of immune serum for *S. mutans* and *C. albicans*, respectively.

Well 4: *S. mutans* cells adhered to *C. albicans*.

Well 5: Control of immunoenzymatic reaction.

C. albicans en la comparación de los grupos SD y DM con el grupo normal ($p < 0,01$), pero no para *S. mutans*. Esto concuerda con investigaciones previas en niños y adolescentes con síndrome de Down, las cuales mostraban que su cavidad

oral estaba significativamente más densamente colonizada por *C. albicans*, comparando con el grupo normal. Las anomalías de la respuesta inmune en niños SD puede contribuir al incremento de la concentración oral de *C. Albicans* (17).

Es posible que el individuo se convierta en un portador de *C. albicans*, y el *S. mutans* se convierta en sustrato del hongo, y que estas infecciones por *Candida albicans* estén causadas por una alteración de la homeostasis (factores inmunológicos o no inmunológicos) (11).

En este caso establecimos una relación entre los recuentos de *S. mutans* y de *C. albicans* (*S. mutans*/*C. albicans*), que presentaba un valor constante ($1,22 \pm 0,08$). Su valor probablemente sea independiente de la edad y del estado psicológico de los grupos estudiados, representando un estado "normal" de la flora de la cavidad oral, siendo, de ese modo, ambas especies colonizadoras de la boca. También es sabido que la proporción de *C. albicans* se reduce en la primera infancia y se incrementa durante las edades medias y avanzadas, por razones que todavía no están claras (11).

Un estudio bioquímico selectivo de *S. mutans* muestra que el 94% pertenecían al biotipo I y el 6% al biotipo IV, lo cual está de acuerdo con los estudios realizados en otras partes del mundo, en los cuales el biotipo I es más prevalente y es uno de los principales agentes etiológicos en la caries dental (8). En Chile, los niños con síndrome de Down muestran una gran frecuencia de caries (18).

Los resultados observados mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) demostraron una coagregación entre *S. mutans* y *C. albicans* similar a la descrita por Holmes, quien demostró la adherencia de *C. albicans* a las células de *S. gordonii* (15). Nuestros posteriores experimentos de coagregación son diferentes de los descritos previamente y demuestran la capacidad de *Streptococcus* y de *C. albicans* de unirse entre sí (16, 19).

Los resultados obtenidos en este estudio confirman la existencia de una coagregación heterotípica entre *S. mutans* y *C. albicans*, similar a la descrita por Holmes, quien, empleando *S. gordonii* como bacteria adherente, indicaba que *C. albicans* puede adherirse a la placa dental mediante los polisacáridos formados por el grupo *Streptococcus* (15). Podría ser que hubiese otras coagregaciones, por ejemplo, aquellas independientes de los polisacáridos extracelulares formados por el *S. mutans*. Podría apuntarse que la adherencia de la *Candida* está determinada por receptores, proteínas de la matriz extracelular y por azúcares específicos de superficie, tanto en la pared celular del hongo, como en la membrana epitelial de las células de la cavidad oral, respectivamente (8). Particularmente, la adhesión de *Candida albicans* a los tejidos duros y a las células epiteliales puede jugar un papel importante en la colonización de la mucosa y del diente (20). Esto demuestra que la placa bacteriana es una fuente potencial o reservorio de patógenos oportunistas, entre los cuales podemos encontrar el grupo de *Streptococcus mutans* y de *Candida albicans*.

En conclusión, y teniendo en cuenta que la cavidad oral es un entorno colonizado por microorganismos diversos, nuestro estudio apoya la existencia de una relación o sinergismo entre algunos de ellos. Esta relación no parece depender del estado mental del individuo, pero sí de su estado inmunitario. Por tanto, la acción sinérgica de los microorganismos en general y de *Streptococcus mutans* y *Candida albicans* en particular puede manifestarse, en individuos inmunocomprometidos temporal o definitivamente, en forma de infecciones locales, que, al diseminarse por diversas vías, pueden dar lugar a procesos infecciosos de otros órganos o sistemas (3, 21).

Agradecimientos: Al Dr. Dennis Lopatin, profesor de la Universidad de Michigan, Ann Arbor, por su generosa cesión de anticuerpos frente a *S. mutans*. Asimismo, apreciamos los comentarios y las sugerencias del Dr. Philip March, de la Universidad de Leeds, que amablemente revisó este manuscrito. Este trabajo ha sido subvencionado por la beca N° 1960842 de Fondecyt.

Quantitative relationship between salivary level of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* in children with Down's syndrome

SUMMARY

Objective: The actual work intends to establish a correlation between quantitative counts for *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* in the saliva of patients with Down syndrome (DS), and in mentally deficient (MD) patients, with respect to a normal group (C).

Design of the study: This study was performed in 166 children (49 DS, 60 MD and 57 C), whose saliva samples were grown on TYCSB agar and Sabouraud agar. Subsequently, microbiological analysis, scanning electron microscopy and aggregation assays were made. The results were statistically evaluated using the variance analysis (ANOVA) and the Student "t" test for unpaired data.

Results: A correlation of 0.45 was found for group C, 0.55 in DS patients and 0.37 in MD patients, when comparing counts of *S. mutans* and *C. albicans* in saliva. Scanning electron microscopy analysis showed coaggregation between *S. mutans* and *C. albicans* and this was confirmed by in vitro experiments of *S. mutans* and *C. albicans* made on nitrocellulose filters.

Conclusions: This kind of association between bacteria and fungi contributes to justify a pathogenic synergy among several microorganisms, as well as some infectious local or systemic manifestations, depending on the immunity status of the patient.

Key words: Down's syndrome, *S. mutans*, *C. albicans*, coaggregation.

INTRODUCTION

The oral cavity is an open ecosystem characterized by a group of parameters called ecological determinants, that explain why some microorganisms are part of the bacterial microflora of the mouth (1, 2). These parameters may be classified as: physical, nutritional and inhibitory factors, as well as bacterial adherence. This latter factor is a mechanism by which microorganisms may be capable of colonizing cavity tissues, in particular the teeth (3). According to Kolenbrander and London, colonization is done by two groups of microorganisms called earlier and later colonizers, both of which form bacterial plaque on the tooth surfaces. Among earlier colonizers are streptococci. They adhere to glycoproteins in the enamel salivary pellicle (4). The diet can later influence

the proportions of different bacterial species in biofilm development (5, 6), especially sucrose consumption, which is fermented by *S. mutans* and *C. albicans*, producing an acidogenically favorable environment for both (7, 8). Moreover, an in vitro study confirmed that firm adhesion of *C. albicans* occurred when the yeast was incubated simultaneously with *S. mutans*, in presence of sucrose (9). Regarding colonization of fungi in the mouth, other authors have determined that dental plaque is not a primary source of *C. albicans*, because this fungus could be a secondary colonizer of the oral cavity (10), but the exact proportion and significance of these yeasts in oral health and disease, is unclear, although some authors state that saliva is a source for potential transmission of *C. albicans* to other areas of the body (11).

Children with Down's syndrome or with mental retardation are characterized by having a < 70 Wechsler scale IQ (12) (Intelligence Quotient less than 70). Both groups have great difficulties in performing their oral hygiene procedures. This situation results in a great proliferation of dental plaque. The present work intends to establish whether a correlation exists between quantitative counts for, *S. mutans* and *C. albicans* as markers of infectiousness in saliva of patients with Down syndrome (DS) and in mentally deficient (MD) patients with respect to a normal group (C).

MATERIALS AND METHODS

1. Subjects : This study was performed in 166 children (male and female, 5-19 years old). From these, 49 patients presented with Down's Syndrome, 60 were mental retarded and 57 comprised the normal group (12). The members of the groups were distributed in Public Educational Centers of the Southern Central Metropolitan Region of Santiago de Chile.

2. Saliva samples: Whole saliva samples of all individuals were collected using the following procedure: 2 h after breakfast, a dentist brushed the patient's teeth for 30 s. Saliva flow was stimulated by adding a solution of 1% citric acid on the dorsal side of the tongue. After 1 min, samples were collected from each patient using a glass funnel and then stored at 0° C for subsequent microbiological analysis. The minimum volume of acceptable sample was 0.5 ml.

3. Microbiological samples: Saliva samples were mixed gently in a Vortex-mixer for 60 s and were diluted 1:10 in 20 mm saline-phosphate buffer (pH 7.4), and then mixed again for 60 s. Afterwards, 100 µL of diluted samples were grown on TYCSB specific for *S. mutans* (13). The same sample was applied to Sabouraud agar for estimation of *C. albicans*. TYCSB cultures were grown for 48 h at 37° C under anaerobiosis (Gas-Pack Jars) (95% N₂/5% CO₂) while cultures in Sabouraud agar were incubated in aerobic conditions for 48 h at 37° C, after which time the number of colonies were counted. For the co-aggregation assay of *S. mutans* to *C. albicans*, microorganisms were grown in liquid Todd-Hewitt medium in the presence of 5% sucrose (24 h at 37° C).

4. Microbiological analysis: Identification of *Streptococcus mutans* biotypes were performed by manitol, sorbitol, melobio-

TABLE 1

Geometric mean of *Candida albicans* saliva counts obtained for control, Down's syndrome and Mentally Deficient groups

	n	Geometric mean	Standard deviation	P-Value
Normal	57	3.16	0.57	
Down syndrome	49	4.08	1.06	<0.01*
Mentally deficient	60	3.69	1.16	<0.01*

*Comparison between normal group and groups studied.

se, sucrose, raffinose and starch fermentation as well as esculin and arginine hydrolysis, according to the micromethod previously described (14). This micromethod consists of a technique that allows the use of 40 μ L of different sugar solutions. *Candida* species were classified according to zymogram using glucose, sucrose, lactose and maltose. Also, we observed the germinal tube appearing in human plasma by incubating cells for 2h at 37° C. Strains Ingbritt (serotype c) and ATCC 10231 were used as reference cultures, for *S. mutans* and *C. albicans*, respectively.

5. Scanning electron microscopy: To see the adherence of *S. mutans* to *C. albicans* yeast cells, we used the method described by Holmes (15). Cellular aggregations were fixed with 2.5% (vol/vol) glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate (pH 7.4) buffer at 4° C for 90 min. Cells were harvested by centrifugation for 1 min at 12000 x g and washed 4 times in 0.1 M sodium cacodylate. After this, cells were fixed with 1% osmium tetroxide at 20° C (1 h). Samples were dehydrated in different serial concentrations of ethanol (30, 50, 70, 95 and 100%) and dried with CO₂, using a critical point apparatus (Polaron, England). Samples were examined in a Zeiss DSM 940 electron microscope (15 kV).

6. Aggregation assay: Adherence of *S. mutans* to *C. albicans* cells was determined according to assays previously described by Lamont et al. (16) and modified in our laboratory as described below. Microbial cells used in the experiments were obtained by centrifugation at 10000 x g for 10 min and washed 3 times with an incubation buffer (5 mM KCl, 2 mM K₂ HPO₄, 1 mM CaCl₂ at pH 6.0). Then, a suspension of 10⁶ cells/mL of *C. albicans* was obtained, and 200 μ L of this suspension were placed on a nitrocellulose filter (0.45 μ m) and connected to a vacuum system (Millipore Co.). Filters with immobilized cells were washed 3 times for 5 min in the incubation buffer containing 0.1% Tween 20, another incubated with a suspension of *S. mutans* (3x10⁸ cells/mL) in buffer with 0.1% Tween 20 at 37° C for 2 h. After washing in the same buffer (3 times for 5 min) in order to eliminate the non-adhered microorganisms, filters were incubated with *S. mutans* antibody, diluted 1/1000 in incubation buffer containing Tween 20. Then, filters were washed 3 times with incubation-Tween 20 buffer. To visualize binding, a second incubation with rabbit Anti IgG conjugated to peroxidase was performed for 1 h at 37° C. After washing, a fresh solution of

4-chloro-1 naphthol and 30% H₂O₂ was used as reaction developer for 30 min at room temperature (23 $\pm$ 2° C).

7. Statistical analysis : The degree of association between *S. mutans* and *C. albicans* concentrations was determined according to Pearson's correlation coefficient and the non parametric method of Kruskal-Wallis. Results obtained for Log CFU/mL were analyzed using the variance analysis (ANOVA) and the Student "t" test for unpaired data, (p< 0.05) using the two tail method.

RESULTS

Figure 1 a, b and c, show moderate correlations between quantities of *S. mutans* and *C. albicans* in normal (C), Down's syndrome (DS) and mentally deficient (MD) groups (r=0.45, 0.55 and 0.37, respectively). All these correlations were highly significant between both microorganisms (p< 0.01).

Table 1 shows geometric mean for counts of *C. albicans* in normal, Down's syndrome (DS) and mentally deficient (MD) groups. The results show a high correlation (p< 0.01) for the first species of fungus in DS and MD, but there is no correlation of that kind for *S. mutans*.

Biochemical study for *S. mutans* demonstrated that 94% belongs to biotype I and 6% to biotype IV, respectively.

Figure 2 shows the results obtained by scanning electron microscopy (SEM), confirming the results of aggregation experiments shown in Figure 3. Aggregation experiments using anti-*S. mutans* antibodies showed a little dark accumulation corresponding to cellular aggregation between *S. mutans* and *C. albicans* immobilized into nitrocellulose filters (well N° 4), different to negative and positive controls (wells N° 1, 3 and 5) (Figure 3).

DISCUSSION

According to the results shown in Figure 1 (a, b and c), it is possible to establish a correlation between *S. mutans* and *C. albicans* counts present in the saliva of children of the groups studied, which is compatible with determinations of correlation coefficients (p< 0.01).

We intended to correlate the quantity of microorganisms with the differences between the groups studied. We found sig-

nificant differences for *C. albicans* when comparing SD and MD groups to normal group ($p < 0.01$), but not for *S. mutans*. This is in agreement to previous research on children and adolescents with Down's syndrome, which showed that their oral cavity was significantly more densely colonized by *C. albicans* compared to the normal group. Abnormalities of the immune response in DS children may contribute to increased oral carriage of *C. albicans* (17).

It is possible that the individual becomes a carrier for *C. albicans* and *S. mutans* becomes a supporter for the fungus, and that infections by *Candida albicans* are caused by a breakdown of microbial homeostasis (immunological or non-immunological factor) (11).

In this case, we established a ratio between *S. mutans* and *C. albicans* counts (*S. mutans*/*C. albicans*), which presented a constant value (1.22 ± 0.08). This value is probably independent of the age and physiological status of the groups studied, representing a "normal" stage of the oral cavity flora. Hence, both species are maintained as colonizers of the mouth. It is also known that the carriage rate of *C. albicans* falls in early childhood and increases during middle and later life, for reasons that remain yet unclear (11).

A selective biochemical study of *S. mutans* shows that 94% belonged to biotype I and 6% to biotype IV, which is in agreement with studies performed in other parts of the world, where biotype I is highly prevalent and has been one of the main etiological agents in dental caries (8). In Chile, children with Down's syndrome show a very high occurrence of dental decay (18).

Results obtained by using scanning electron microscopy (SEM) showed the co-aggregation between *S. mutans* and *C. albicans*, similar to those described by Holmes, who demonstrated the adherence of *C. albicans* to *S. gordonii* cells (15). Subsequently, our co-aggregation experiments are different with respect to those previously described, and demonstrate the ability of streptococci and *C. albicans* to bind each other (16, 19).

The results obtained in this study confirm the existence of an heterotypic co-aggregation between *S. mutans* and *C. albicans*, similar to those described by Holmes using *S. gordonii*

as the adherent bacteria, suggesting that *C. albicans* can adhere to bacterial plaque through polysaccharides formed by the streptococcal group (15). There might be other co-aggregations, for example, those independent from extracellular polysaccharides formed by *S. mutans*.

It can be pointed out that *Candida* adherence is determined by receptors, extracellular matrix proteins and specific sugars of the surface, both in the cell wall of the fungi and in the cell membrane of the epithelial cells of the oral cavity, respectively (8). Particularly, *Candida albicans* adhesion to hard tissues and epithelial cells, can play an important role in the colonization of oral mucosa and teeth (20). This shows that the bacterial plaque is a potential source or reservoir of opportunistic pathogens, among which we can find the *S. mutans* group and *Candida albicans*.

In conclusion, the oral cavity is an environment heavily colonized by microorganisms and our study supports the evidence of a synergical relation between some of them. This relationship seems not to be related to the mental status of the individual, but to the immunity status. Therefore, the synergic action of microorganisms in general and by *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* in particular can become apparent, in temporarily or definitively immunocompromised patients, as local infections, that, if disseminate, can produce infections or of several organs or systems (21).

Acknowledgements: To Dr. Dennis Lopatin, Professor of University of Michigan, Ann Arbor, who generously donated the *S. mutans* antibodies. We are also grateful for the comments and suggestions of Dr. Philip March, University of Leeds, who kindly revised this manuscript. This work was supported by grant N° 1960842 (Fondecyt).

CORRESPONDENCIA/CORRESPONDENCE

Dr. Alfredo Linossier
Echaurren 475, Depto. 44, Block 3
Santiago (Chile)
E-mail: alinossi@terra.cl

Dr. Eduardo Chimenos Küstner
Vía Augusta 124, 1° 3ª
08006 – Barcelona (España)
E-mail: 13598eck@comb.es

BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES

1. Fitzgerald RJ. Introduction: Ecology, Adhesion and Indigenous Microflora. In: Mergenhagen SE, and Rosan B (eds). Molecular Basis of Oral Microbial Adhesion. Washington DC. American Society for Microbiology, Editores; 1985. p. 1-4.
2. Midtvedt T. Ecosystems: development, functions and consequences of disturbances with special reference to the oral cavity. J Clin Periodontol 1990; 17: 474-8.
3. Mouton CH, Robert JC, eds. Bactériologie bucco-dentaire. Collection des Abrégés d'Odontologie et de Stomatologie. Paris. Masson, Editores; 1995. p. 3-33.
4. Kolenbrander P, London J. Adhere today. Here tomorrow: Oral bacteria adherence. J Bacteriol 1993; 175: 3247-52.
5. Bowden G, Li Y. Nutritional Influence on Biofilm Development. Adv Dent Res 1997; 11: 81-99.
6. Linossier A, Gajardo M, Olavarria J. Paleomicrobiological study in dental calculus: *Streptococcus mutans*. Scann Micros 1996; 10: 1005-14.
7. Saltarelli C. *Candida albicans*. Philadelphia. The Pathogenic Fungus Hemisphere Publishing Company, 1989.
8. Loesche W. Role of *Streptococcus mutans* in Human Dental Decay. Microbiol Rev 1986; 50: 353-80.
9. Branting C, Sund ML, Linder LE. The influence of *Streptococcus mutans* on adhesion of *Candida albicans* to acrylic surfaces *in vitro*. Arch Oral Biol 1986; 34: 347-53.

10. Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, Monk BC. Oral Candida: Clearance, Colonization, or Candidiasis? J Dent Res 1995; 74: 1152-61.
11. Marsh P, Martin M, eds. Oral Microbiology. Wright, Oxford. Reed Educational and Professional Publishing, Editores; 1999.
12. Kaplan HI, Sadock BJ. Psicología y Psiquiatría: Psicometría y tests neuropsicológicos. En: Sinopsis Psiquiátrica. Madrid. Médica Panamericana, Editores; 1999. p. 221-34.
13. Van Palenstein WH, Helderma M, Ijsseldijk M, Huis IT, Veld JH. A selective medium for the two major subgroups of the bacterium *Streptococcus mutans* isolated from human dental plaque and saliva. Archs Oral Biol 1983; 28: 599-603.
14. Linossier A, Carvajal P, Donoso E, Orrego M. Fluorosis dental: recuento de *Streptococcus mutans* en escolares provenientes de la primera Región de Chile. Estudio longitudinal. Rev Med Chile 1999; 127: 1462-8.
15. Holmes AR, Pramod KG, Howard FJ. Adherence of *Candida albicans* to a cell surface polysaccharide receptor on *Streptococcus gordonii*. Infect Immun 1995; 63: 1827-34.
16. Lamont RJ, Rosan B. Adherence of *Mutans Streptococci* to other oral bacteria. Infect Immun 1990; 58: 1738-43.
17. Carlstedt K, Krekmanova L, Dahllof G, Ericsson B, Braathen G, Modeer T. Oral carriage of *Candida* species in children and adolescents with Down's. Int J Paediatr Dent 1996; 6: 95-100.
18. Jara L, Ondarsa A, Blanco R, Rivera L. Composition of the parotid saliva in Chilean Children with Down's syndrome. Arch Biol Med 1991; 24: 57-60.
19. Jenkinson HF, Lala HC, Shepherd MG. Coaggregation of *Streptococcus sanguis* and other streptococci with *Candida albicans*. Infect Immun 1990; 58: 1429-36.
20. Sen BH, Safavi KE, Spangberg LSW. Colonization of *Candida albicans* on cleaned human dental hard tissues. Arch Oral Biol 1997; 42: 513-20.
21. Linossier A, Thumann A, Bustos-Obregón E. Sperm Immobilization by Dental Focus Microorganisms. Andrologia 1982; 14: 250-5.