

Efecto de sustancias metabólicas de *Actinomyces* orales sobre *Candida albicans*

Susana Gutiérrez de Annan y Laura Benito de Cárdenas

Cátedra de Microbiología y Parasitología, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Tucumán, San Miguel de Tucumán, Argentina

Resumen

Actinomyces naeslundii, *Actinomyces viscosus* y *Candida albicans* se encuentran asociados con caries de raíz. El objetivo de este estudio fue determinar *in vitro* el efecto producido por las sustancias metabólicas elaboradas por *Actinomyces naeslundii* y *Actinomyces viscosus* sobre *C. albicans*. Las cepas fueron aisladas de saliva. Se utilizó el método de difusión en agar con doble placa (MDDP) y el método de difusión radial en agar (MDRP). Se estudió el efecto del tiempo de incubación y el efecto de diferentes concentraciones de sustancias metabólicas producidas por *Actinomyces naeslundii* y *Actinomyces viscosus* sobre la cinética de crecimiento de *C. albicans*. Posteriormente se determinó la naturaleza de las sustancias producidas por las dos cepas de *Actinomyces*. Se encontró que no hubo inhibición del crecimiento de *C. albicans* por *A. naeslundii* y *A. viscosus* por MDDP y por MDRP. Hubo un estímulo del crecimiento de *C. albicans* por las dos cepas de *Actinomyces* cuando se utilizó MDDP. En MDRP los resultados fueron negativos. Las sustancias metabólicas producidas por ambas especies estimulan el crecimiento de *C. albicans* en bajas concentraciones mientras que a altas concentraciones se observa inhibición. La concentración óptima de la sustancia estimulante, que es una sustancia proteica estable a 70 °C, corresponde a una dilución de 1/80. La inhibición del crecimiento de *C. albicans* se produjo por disminución del pH obteniéndose mayor efecto con la dilución 1/5. Las sustancias metabólicas producidas por *A. naeslundii* y *A. viscosus* pueden tener efecto inhibitorio o estimulante sobre *C. albicans*, según la concentración en que se encuentren. Estas interacciones metabólicas podrían condicionar la proporción de *C. albicans* en los ecosistemas microbianos bucales.

Palabras clave

Actinomyces, *Candida albicans*, Interacciones microbianas

Effect of metabolic substances of oral *Actinomyces* on *Candida albicans*

Summary

Actinomyces naeslundii, *Actinomyces viscosus* and *Candida albicans* are associated with root cavity. The aim of this study was to determine, *in vitro*, the effect produced by the metabolic substances elaborated by *Actinomyces naeslundii* and *Actinomyces viscosus* on *Candida albicans*. The strains were isolated of saliva. There were used the double plaque diffusion method (DPDM) and the method of radial diffusion (MRD). The effect of the time of incubation and of different concentrations of metabolic substances elaborated by *Actinomyces naeslundii* and *Actinomyces viscosus* on the kinetics of growth of *C. albicans* were studied. Later, the nature of the substances produced by the two strains of *Actinomyces* was determined. It was found that there was no inhibition of the growth of *C. albicans* by *A. naeslundii* and *A. viscosus* in the DPDM and the MRD. There was stimulation of the growth of *C. albicans* by the two strains of *Actinomyces* when the DPDM was used. In the MRD the results were negative. Metabolic substances produced by both species stimulated the

Dirección para correspondencia:

Dra. Susana Gutiérrez de Annan
Cátedra de Microbiología y Parasitología
Facultad de Odontología
Universidad Nacional de Tucumán
Benjamín Araoz 800, San Miguel de Tucumán
CP T4000FUU, Argentina
Teléfono: 054 0381 226421. Int 454
Correo electrónico: sannan@fo.unt.edu.ar
sannan@arnet.com.ar

Aceptado para publicación el 15 de enero de 2004

growth of *C. albicans* in low concentrations but at high concentrations inhibition was observed. The best concentration of the stimulating factor, a protein substance stable to 70 °C, corresponds to a dilution of 1/80. The inhibition of the growth of *C. albicans* was produced by the decrease of the pH, the higher effect being obtained with the dilution 1/5. The metabolic substances produced by *A. naeslundii* and *A. viscosus* can have both inhibitory and stimulant effects on *C. albicans*, according to their concentration. These metabolic interactions would condition the proportion of *C. albicans* in the oral microbial ecosystems.

Key words *Actinomyces*, *Candida albicans*, Microbial interactions

En la cavidad oral puede vivir una gran variedad de microorganismos que constituyen la microbiota humana. Esto permite que una gran cantidad de especies microbianas orales pueden unirse a las superficies duras y sobrevivir en el medio bucal. Aquéllas que puedan adherirse y colonizar el esmalte dentario como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus* y *Candida albicans* podrán crecer y multiplicarse produciendo lesiones cariosas si las condiciones ambientales lo permiten. Estas especies conviven en el biofilm de la placa supragingival pudiendo interactuar unas con otras produciendo interacciones bacterianas e interacciones metabólicas. Estas interacciones son complejas y se producen en un tiempo determinado, llevando a lo que se conoce como sucesión autógena. [29]

El género *Actinomyces* se encuentra presente en proporciones considerables en la microbiota normal de la cavidad oral [7,19,29]. *A. naeslundii* y *A. viscosus* se encuentran asociados con caries de superficie radicular. [4,11,26,27]. Los *Actinomyces* poseen fimbrias, que permiten la adhesión a las superficies duras y a las mucosas de la cavidad bucal y la interacción con otras bacterias orales [3,8,9,18]. Poseen enzimas extracelulares utilizadas para su crecimiento en ambientes desfavorables. Estas enzimas influyen también sobre otras bacterias de la placa, condicionando los distintos nichos ecológicos bucales. Las características mencionadas de este género favorecen la colonización en la cavidad oral cumpliendo un importante rol en la iniciación del desarrollo de la placa. [10,14,20,22].

Las infecciones orales por hongos del género *Candida* son una de las enfermedades infecciosas más comunes de la cavidad bucal. La especie *C. albicans* forma parte de la microbiota normal de la boca como patógeno oportunista y se ha encontrado también asociada a caries de raíz [4,29,30]. Su virulencia no se debe a un único factor, sino más bien a un conjunto de atributos relacionados con la habilidad para adherirse a superficies epiteliales y prótesis, y una gran capacidad de variar fenotípica y genotípicamente, lo que le permite invadir los tejidos, evadir las defensas del huésped y cambiar la resistencia a los antifúngicos. Esto explica la patogenicidad de este hongo polimorfo, responsable de una de las infecciones micóticas más frecuentes en la cavidad oral [2,5,6,23,25,28].

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, el estudio de las interacciones metabólicas entre especies de *Actinomyces* y *Candida* es muy importante para conocer mejor el mecanismo de formación de las comunidades del biofilm con el objeto de prevenir la sucesión microbiana que llevaría a lesiones cariosas.

El propósito de esta investigación fue estudiar las interacciones *in vitro* de *A. naeslundii* y *A. viscosus* con una cepa de *C. albicans* aislada de saliva para estudiar las sustancias metabólicas producidas por estos microorganismos que influirían en el establecimiento y crecimiento de esta levadura en el biofilm oral.

Materiales y métodos

Microorganismos. Para esta investigación se utilizaron dos cepas del género *Actinomyces*: *A. naeslundii* y *A. viscosus* y una cepa del género *Candida*: *C. albicans*. Las cepas estudiadas fueron inicialmente aisladas de saliva. El aislamiento de las mismas se realizó de acuerdo a las características de cada una de ellas y la identificación se efectuó basándose en sus propiedades fenotípicas [13,16,21,24]. Una vez identificadas las especies en estudio, se activaron por tres pases sucesivos, cada 24 h en caldo tioglicolato (Britania, Argentina) (CTG) para *A. naeslundii* y *A. viscosus* y en caldo infusión de cerebrocorazón (Britania) (CBHI) para *C. albicans*.

Medios de cultivo. Para investigar el efecto inhibitorio se usaron agar tioglicolato (ATG) y caldo tioglicolato (CTG) para el crecimiento de *A. naeslundii* y *A. viscosus*, y agar glucosado de Sabouraud (Britania) (ASG) y CBHI para el crecimiento de *C. albicans*.

Para estudiar el efecto estimulante se usó agar almidón caseína (ASC) (almidón, 1 g; caseína, 0,1 g; K₂HPO₄, 0,05 g; agar, 1,5 g; agua, 100 ml) y caldo almidón caseína (CSC), en ambos casos medios de cultivo pobres en los que ninguna de las cepas se desarrolló al sembrarlas individualmente (prueba control para estudiar estímulo).

Métodos usados para el estudio de inhibición y estímulo. El efecto de *A. naeslundii* y *A. viscosus* sobre el crecimiento de *C. albicans* se estudió por el método de difusión en agar con doble placa [17] y por el método de difusión radial con pocitos [1,15]. Todas las pruebas fueron realizadas por duplicado. En todos los casos se ajustaron las cepas a una densidad óptica (DO) inicial correspondiente a 1×10^6 UFC por mililitro de medio.

Se realizaron curvas de crecimiento enfrentando *C. albicans*, desarrollando en CBHI y CSC con una DO inicial de 0,05 con el sobrenadante de *A. naeslundii* y *A. viscosus* para medir la cinética del crecimiento de *C. albicans*.

a) **Método de difusión en agar con doble placa (MDDP).** Se sembraron cultivos de 22 h de incubación de *A. naeslundii* y *A. viscosus* por estría en 10 ml de ATG en la zona central de una placa de 9 cm de diámetro y se incubaron en presencia de aire con un 5% de CO₂, durante 72 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se colocaron sobre todos los medios desarrollados 10 ml de ASG (para el estudio de inhibición) y 10 ml de ASC (para estudiar el efecto estimulante). La altura de la capa de ASG y de ASC fue 2,5 mm. Se llevó a 4 °C durante 72 h para permitir la difusión de los metabolitos producidos por *A. naeslundii* y *A. viscosus*. Sobre este medio se sembró la cepa activa de *C. albicans* (DO = a 1×10^6 UFC/ml de medio) por diseminación con espátula en toda la caja. Se incubó en aerobiosis a 37 °C durante 72 h.

Para el estudio de estímulo del crecimiento se consideró como resultado positivo el desarrollo de *C. albicans* sobre el medio SCA. La inhibición del crecimiento de *C. albicans* alrededor de la estría central de la placa de *A. naeslundii* y *A. viscosus*, indicó resultado positivo. El desarrollo de *C. albicans* sobre todo el medio ASG determinó resultado negativo.

b) *Método de difusión radial con pocitos (MDRP)*. En CTG se inoculó *A. naeslundii* y *A. viscosus* durante 48 h a 37 °C. Estos cultivos fueron centrifugados a 10.000 rpm en centrífuga refrigerada a 4 °C durante 15 min. Los sobrenadantes fueron filtrados en filtro Millipore marca Minisart de 0,2 µm. En ASG (10 ml), fundido y enfriado a 45 °C, se sembraron 100 µl de un cultivo activo de *C. albicans* (DO correspondiente a 1×10^6 UFC/ml de medio). Luego de agitar suavemente se vertió el medio inoculado en placas de Petri. Se realizaron orificios de 5 mm de diámetro en los cuales se colocaron 40 µl de sobrenadantes de *A. naeslundii* y *A. viscosus*. Las placas fueron mantenidas, durante 6 h, a temperatura ambiente hasta la difusión de los sobrenadantes en el agar. Las placas se incubaron a 37 °C durante 72 h en aerobiosis.

Desarrollo alrededor del orificio, indicó prueba positiva. Se informó reacción negativa cuando no hubo desarrollo alrededor del orificio. Un halo de inhibición del crecimiento de *C. albicans* indicó resultado positivo. Se consideró resultado negativo cuando alrededor del pocito había desarrollo de *C. albicans*.

c) *Efecto del tiempo de incubación de A. naeslundii y A. viscosus sobre la cinética de crecimiento de C. albicans*. La experiencia se realizó enfrentando el cultivo de *C. albicans* con el sobrenadante obtenido a partir de cultivos, en medio CTG, de 24, 48 y 72 h de incubación de *A. naeslundii* y *A. viscosus*. Se realizó un control de crecimiento de *C. albicans*. Las pruebas se realizaron en CBHI y CSC y la incubación se realizó en aerobiosis. El inóculo de *C. albicans* se preparó a partir de un cultivo activo de 24 h en CBHI. El ensayo se realizó colocando una parte de sobrenadante de *A. naeslundii* en 19 partes de CBHI / CSC (dilución 1/20) más el inóculo. En todos los casos se partió de una DO $\pm 0,05$ ($1,7 \times 10^4$ UFC/ml de medio) para T_0 . Las pruebas se realizaron por duplicado. Las lecturas de DO_{560nm}, se efectuaron a 6, 12, 24 y 31 h de incubación. Se realizó el recuento de colonias y los resultados fueron expresados en logaritmo de UFC.

d) *Efecto de diferentes concentraciones de sobrenadante de A. naeslundii y A. viscosus sobre la cinética de crecimiento de C. albicans*. Se obtuvieron sobrenadantes de *A. naeslundii* y *A. viscosus* de cultivos en CTG de 72 h de incubación y se efectuaron diluciones 1/5, 1/10, 1/20, 1/40 y 1/80. El inóculo de *C. albicans* se preparó de la misma forma como se detalla en el ensayo anterior. Las pruebas se realizaron por duplicado. Las lecturas de DO_{560nm}, se efectuaron a 0, 12 y 24 h. La incubación de los cultivos se realizó en aerobiosis.

e) *Estudio de la naturaleza de los sobrenadantes de A. naeslundii y A. viscosus*. Para el estudio de la naturaleza de las sustancias inhibitorias o estimulantes de *A. naeslundii* y *A. viscosus* sobre *C. albicans*, a los sobrenadantes se les realizaron los siguientes tratamientos: a) Calentamiento a 121 °C durante 15 min, 100 °C durante 30 min y 70 °C durante 60 min b) Neutralización (pH 7) con una solución de hidróxido de sodio 0,1 N. c) Tratamiento con catalasa (concentración final 10 mg/ml). Se incubó a 37 °C durante 30 min. Se empleó un tubo control para probar la actividad de la enzima catalasa. d) Tratamiento con proteinasa tipo II de *Aspergillus oryzae*

(0,12 U/mg): a 2,5 ml de sobrenadante se agregaron 25 µl de la solución de proteinasa y se incubó a 37 °C durante 1 h.

Para estudiar si la inhibición del crecimiento de *C. albicans* se debía a la presencia de sustancias metabólicas producidas por *A. naeslundii* y *A. viscosus* o a la disminución del pH en el medio, que alcanza 3,90 (para *A. naeslundii*) y 3,96 (para *A. viscosus*) en cultivos de 72 h, se hizo crecer a *C. albicans* en estas condiciones de acidez. Esto se consideró como el control de pH.

Para estudiar la naturaleza de la sustancia estimulante se usó la dilución 1/80 de sobrenadante de *A. naeslundii* y *A. viscosus*, y la concentración 1/5 para determinar la sustancia inhibitoria. Las pruebas se realizaron por duplicado. Las lecturas de DO_{560nm}, se efectuaron a 0, 12 y 24 h. La incubación de los cultivos se realizó en aerobiosis.

Resultados y discusión

Se encontró que no hubo inhibición del crecimiento de *C. albicans* por *A. naeslundii* y *A. viscosus* tanto en MDDP como en MDRP. Sin embargo, hubo estimulación del crecimiento de *C. albicans* por las dos cepas de *Actinomyces* probadas en este estudio cuando se utilizó MDDP. En MDRP los resultados fueron negativos. El efecto de las sustancias producidas por *A. naeslundii* y *A. viscosus* en diferentes tiempos de incubación sobre la cinética de crecimiento de *C. albicans* se observa en la figura 1. Los sobrenadantes de los cultivos de *A. naeslundii* producían un estímulo sobre el crecimiento de *C. albicans* en CBHI y en CSC. Se encontró mayor estímulo a las 72 h. Solamente el sobrenadante de 72 h de *A. viscosus* estimuló el crecimiento de *C. albicans* cuando crecía en CBHI. Los sobrenadantes de 24, 48 y 72 h de *A. viscosus* en CSC estimulaban el crecimiento de *C. albicans* (Figura 2).

Las sustancias metabólicas producidas por *A. naeslundii* y *A. viscosus* en CBHI estimulaban el crecimiento de *C. albicans* a bajas concentraciones, mientras que a altas concentraciones se observaba una inhibición. La dilución 1/5 es la que producía mayor inhibición cuando *C. albicans* crecía en CBHI. En CSC, los sobrenadantes de *A. naeslundii* y *A. viscosus* estimulaban el crecimiento de *C. albicans* con todas las concentraciones estudiadas. Se encontró que, en ambos medios, la dilución que producía mayor estímulo era la de 1/80 (Figuras 3 y 4).

Cuando los sobrenadantes de *A. naeslundii* y *A. viscosus* (dilución 1/5 para estudio de inhibición y 1/80 para estímulo) se trataron con proteinasa o calor a 100 °C durante 30 min y 121 °C durante 15 min se produjo una pérdida del efecto estimulante sobre el crecimiento de *C. albicans*. La sustancia estimulante era estable al tratamiento de 70 °C durante 60 min. La neutralización a pH 7 provocó pérdida del efecto inhibitorio. El efecto inhibitorio sobre *C. albicans* no se debía al peróxido de hidrógeno ya que al ser tratadas con catalasa no desaparecía dicho efecto (Figuras 5 y 6).

El género *Actinomyces* es uno de los primeros colonizadores de la placa dental. *A. viscosus*, además, está asociado especialmente a caries radicular. El primer colonizador parece ser *Streptococcus sanguinis*, seguido por *A. viscosus* y, posteriormente, por otras especies del género *Streptococcus* [12]. *A. viscosus* y *A. naeslundii* desempeñan un papel importante en las encías, los espacios interdentales, los surcos y las placas por su capacidad de coagregarse con bacilos gram-negativos periodontopatógenos y con cocos gram-positivos. Las diferentes sustancias producidas por *A. naeslundii* y *A. viscosus* serían determinantes en la composición y sucesión autógena de la microbiota de la cavidad oral, de donde se deduce la

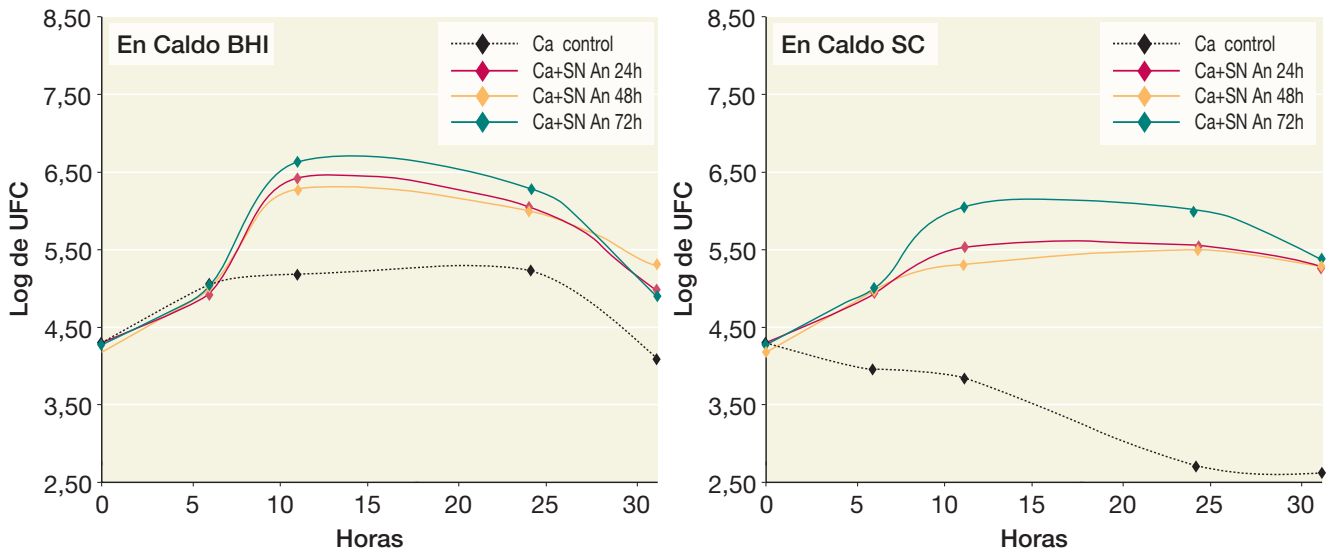


Figura 1. Efecto de *A. naeslundii* sobre el crecimiento de *C. albicans* en CBHI y CSC.

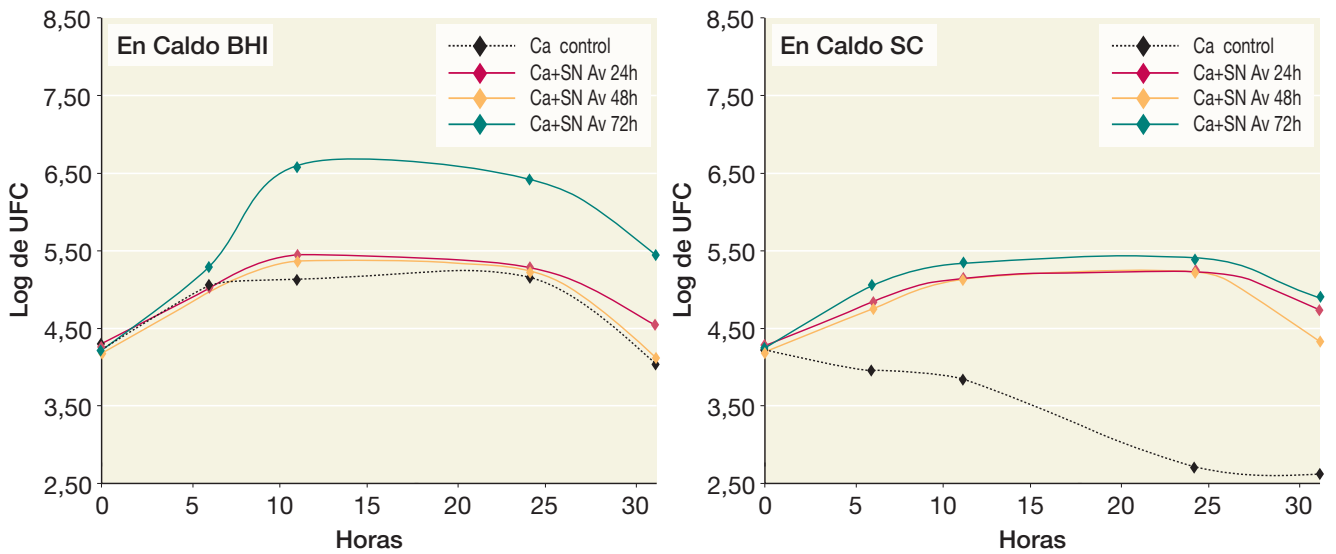


Figura 2. Efecto de *A. viscosus* sobre el crecimiento de *C. albicans* en CBHI y CSC.

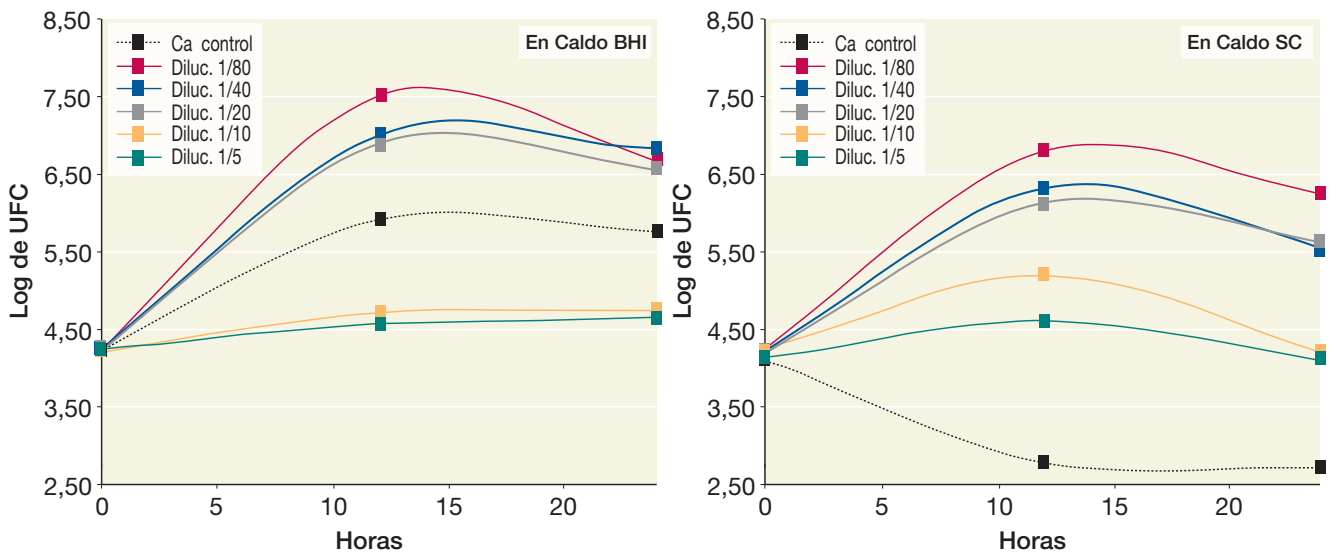


Figura 3. Efecto de diferentes concentraciones de sobrenadantes de *A. naeslundii* sobre el crecimiento de *C. albicans* en CBHI y CSC.

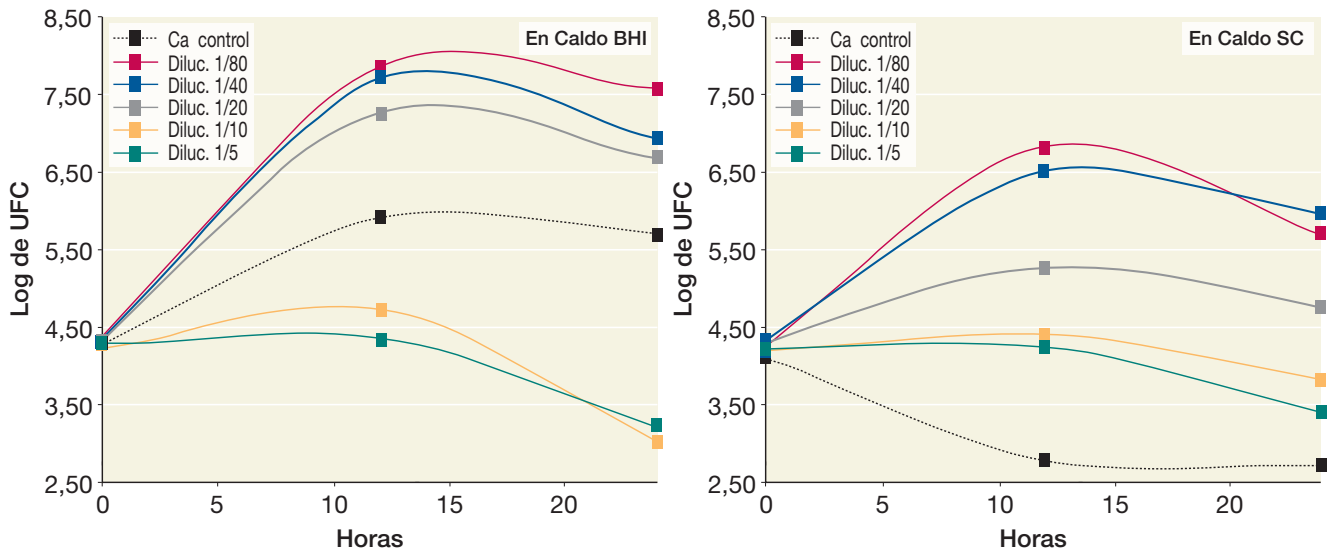


Figura 4. Efecto de diferentes concentraciones de sobrenadantes de *A. viscosus* sobre el crecimiento de *C. albicans* en CBHI y CSC.

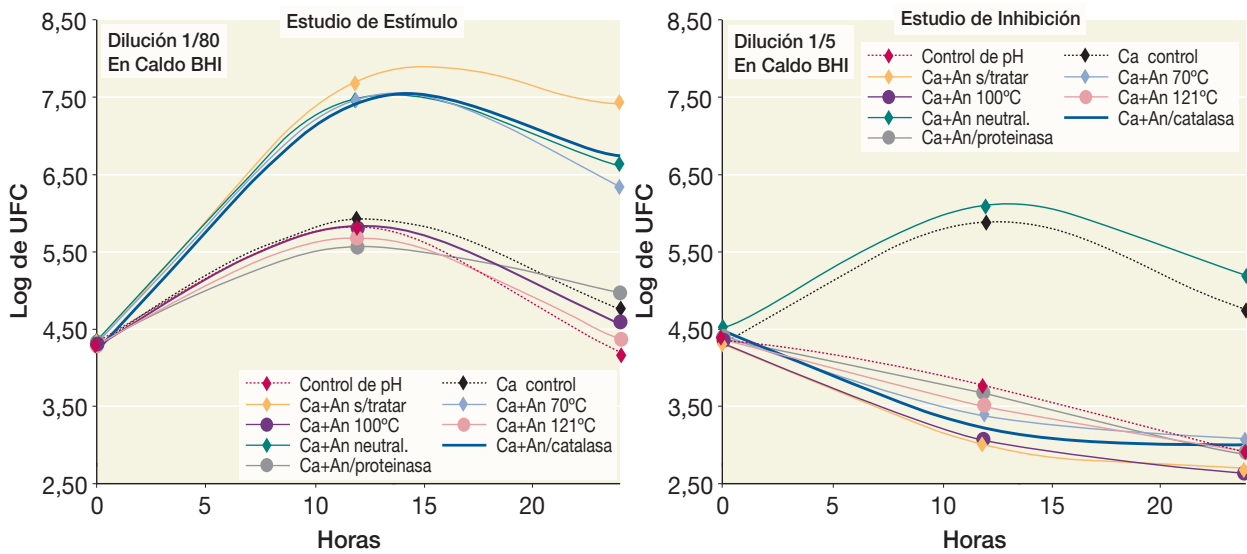


Figura 5. Estudio de la naturaleza de las sustancias estimulantes e inhibitorias de *A. naeslundii* sobre *C. albicans*.

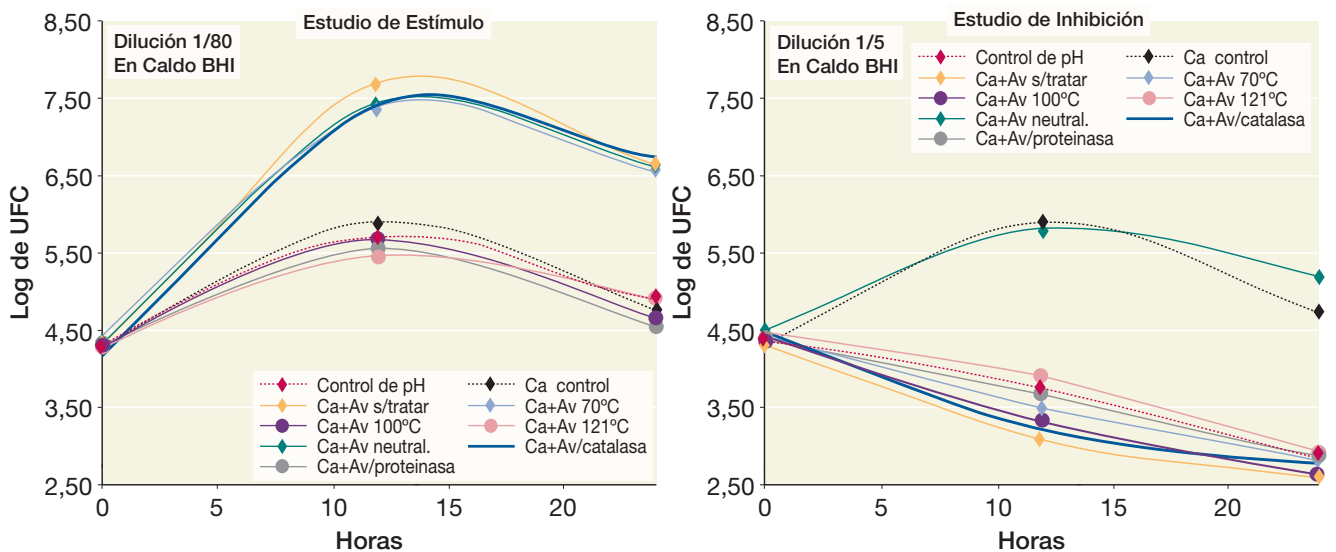


Figura 6. Estudio de la naturaleza de las sustancias inhibitorias o estimulantes de *A. viscosus* sobre *C. albicans*.

importancia de las interacciones nutricionales en la composición del biofilm de la placa.

En este trabajo determinamos que *A. viscosus* y *A. naeslundii* producen sustancias de naturaleza proteica resistentes a 70 °C que a bajas concentraciones estimulan el crecimiento de *C. albicans*. El desarrollo posterior de los *Actinomyces* produce sustancias inhibitorias que descienden el pH, lo que inhibe el crecimiento de *C. albicans*. Las mismas podrían inhibir también la actividad de los factores estimulantes.

El efecto estimulante del crecimiento de *C. albicans* por las cepas de *Actinomyces* estudiadas es producido por sustancias extracelulares y difusibles. No todos los métodos de difusión permiten detectar el efecto de las sustancias metabólicas producidas por estos *Actinomyces*. Dicho estímulo se observó al utilizar el MDDP. Esto estaría indicando que cuando se realizan estos estudios *in vitro* deben probarse varios métodos para ofrecer resultados fiables. Los cultivos en caldo fueron necesarios para determinar el efecto estimulante y/o inhibitorio.

Si los resultados obtenidos en este trabajo son directamente trasladables al ecosistema oral, la colonización de *Actinomyces* en etapas tempranas de formación de la placa supragingival podría entonces aumentar el número de *C. albicans* y otras especies del género *Candida*. Cuando prosigue el crecimiento y la proporción de *Actinomyces* aumenta, la formación de ácidos, que producen descenso de pH, regularían el desarrollo de *C. albicans* inhibiendo su número. Dichas interacciones metabólicas condicionarían la proporción de esta levadura patógena oportunista en los ecosistemas microbianos bucales.

Este trabajo fue subsidiado por el Consejo de Investigación de la Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.

Bibliografía

- Apella MMC, Gonzalez SN, Nader de Macias ME, Romero N, Oliver G. *In vitro* studies on the inhibition of the growth of *Shigella sonnei* by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. J Appl Bacteriol 1992; 73: 480-483.
- Barturen B, Quindós G, San Millán R, Aguirre JM, Pontón J. Distribución de los serotipos de *Candida albicans* en aislamientos clínicos de personas inmunocompetentes e inmunosuprimidas. Rev Iberoam Micol 1996; 13: 10-13.
- Beighton D, Lynch E, Heath MR. A microbiological study of primary root-carries lesions with different treatment needs. J Dent Res 1993; 72: 623-629.
- Brailsford SR, Tregaskis RB, Leftwich HS, Beighton D. The predominant *Actinomyces* spp. Isolated from infected dentin of active root caries lesions. J Dent Res 1999; 78: 1525-1534.
- Butz-Jørgensen E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. Acta Odontol Scand 1990; 48: 61-69.
- Cannon RD. Oral colonization by *Candida albicans*. Crit Rev Oral Biol Med 1999; 10: 359.
- Castillo Pérez AM, Liébana Ureña J. Bacterias anaerobias facultativas. En: Liébana Ureña J. (Ed.) Microbiología Oral. Primera Edición. Madrid, Interamericana. Mc Graw-Hill, 1995: 256-258.
- Cisar JO, Sandberg AL, Clark WB. Molecular aspects of adherence of *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii* to oral surfaces. J Dent Res 1989; 68: 1558-1559.
- Ellen RP, Sivendra R. *In vitro* attachment, salivary agglutination, and surface fibril density of fresh *Actinomyces* isolates from two distinct oral surfaces. J Dent Res 1985; 64: 799-803.
- Fiehn NE, Moe D. Sucrose and maltose activities in supragingival dental plaque in humans of streptococcal, *Actinomyces* and *Lactobacillus* species. Scand Dent Res 1984; 92: 97-108.
- Fure S, Romaniec M, Emilson CG, Krasse B. Proportions of *Streptococcus mutans*, lactobacilli and *Actinomyces* spp in root surface plaque. Scand J Dent 1987; 95: 119-123.
- Gonzalez SN, Apella MMC, Romero N, Nader de Macias ME, Oliver G. Inhibition of enteropathogens by lactobacilli strains used in fermented milk. J Food Protect 1993; 56: 773-776.
- Gutiérrez de Annan S, Ruiz de Valladares R, Benito de Cárdenas L. Effect of the conditions of incubation in the recovery of oral *Actinomyces*. Rev Anaerobe 1999; 5: 101-104.
- Hamilton IR, Ellwood DC. Carbohydrate metabolism by *Actinomyces viscosus* growing in continuous culture. Infect Immun 1983; 42: 19-26.
- Hinton A Jr, Hume ME. Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth by *Veillonella* cultured on tartrate medium. Clin Infect Dis 1997; 25: 120.
- Kandler, O. and Weiss, N. Regular, nonsporng Gram-positive rods. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (9ª Ed). Baltimore, Williams and Wilkins Co, 1986: 1208-1219.
- Klaus P. Schaal. The genera *Actinomyces*, *Aracnobacterium* and *Rothia*. En: The Prokaryotes, 1992: 867-873
- Kolenbrander PE, Andersen RN, Moore LV. Intrageneric coaggregation among strains of human oral bacteria: potential role in primary colonization of the tooth surface. Appl Environ Microbiol 1990; 56: 3890-3894.
- Könönen E, Kanervo A, Takala A, Asikainen S, Jousimies-Somer H. Establishment of oral anaerobes during the first year of life. J Dent Res 1999; 78: 1634-1639.
- Marsh PD. Dental plaque as a biofilm. J Ind Microbiol 1995; 15: 169-175.
- Negróni P. Micosis superficiales. En: Negróni P. Micosis Cutáneas y Viscerales (6ª Ed). Buenos Aires, López Libreros SRL, 1975: 82-87.
- Nesbitt WE, Fukushima H, Leung KP, Clark WB. Coaggregation of *Prevotella intermedia* with oral *Actinomyces* species. Infect Immun 1993; 61: 2011-2014.
- Odds FC. *Candida* species and virulence. ASM News 1994; 60: 313-318.
- Quindós G, Pontón J. Candidiasis de la cavidad oral: etiología, patogenia y diagnóstico de laboratorio. Med Oral 1996; 1: 21-31.
- Rinaldi M.G. Biology and pathogenicity of *Candida* species. En: Bodey GP (Ed.) Candidiasis: pathogenesis, diagnosis and treatment. New York, Raven Press, 1993: 1-20.
- Sarkonen N, Könönen E, Summanen P, Kanervo A, Takala A, Jousimies-Somer H. Oral colonization with *Actinomyces* species in infants by two years of age. J Dent Res 2000; 79: 864-867.
- Schiiphach P, Osterwalder V, Guggenheim B. Human root caries: microbiota in plaque covering sound, carious and arrested carious root surfaces. Caries Res 1995; 29: 382-395.
- Shepherd MG. The pathogenesis and host defence mechanisms of oral candidiasis. N Z Dent J 1986; 82: 78-81.
- Valle Rodríguez JL, Gómez-Lus Centelles ML, Prieto Prieto J, Liébana Ureña J. Composición y ecología de la microbiota oral. En: Liébana Ureña J (Ed.) Microbiología Oral (1ª Ed). Madrid, Interamericana Mc Graw-Hill, 1995: 402-407.
- Yeung MK. Molecular and genetic analyses of *Actinomyces* spp. Crit Rev Oral Biol Med 1999; 10: 120-125.