

Héctor Alfonso de León Godoy, Elvia Rebeca Grijalva, Carlos Enrique Pomés,
Edwin Milián Rojas, Rodolfo Aguirre Contreras.

PROGRAMA DE DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO
DE PLACA DENTOBACTERIANA DEL GUATEMALTECO

**"DESARROLLO DE TECNICAS DIAGNOSTICAS
PARA DETERMINAR MICROORGANISMOS
PERIODONTOPATICOS".**

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

INDICE

	Página
I. Introducción	1
II. Metodología	1
2.1. Revisión Bibliográfica	1
2.2. Objetivos	2
2.3. Procedimiento	3
III. Comparación de Objetivos y Logros	7
IV. Discusión de Resultados	11
V. Conclusiones y Recomendaciones	13
5.1. Sugerencias de estudios derivados y colaterales	13
VI. Anexos	15
VII. Bibliografía	20

I. INTRODUCCION

Investigaciones realizadas por la Facultad de Odontología evidencian que dos de las enfermedades más prevalentes del guatemalteco, son: caries dental y enfermedad periodontal, las cuales son de naturaleza infecciosa. Los microorganismos se localizan en depósitos mucilaginosos que constituyen la Placa Dentobacteriana, y se adhieren tenazmente a las superficies dentarias y atacan tanto estas últimas como los tejidos de soporte.

En otros países se ha investigado la microbiología de la Placa Dentobacteriana y se han identificado microorganismos asociados con las enfermedades aludidas; como caries y enfermedad periodontopática. En Guatemala, no se ha estudiado este campo. Además, las condiciones socioeconómicas, etno-culturales, demográficas y ecológicas influyen en la flora bucal y que la hacen distinta de los países donde se han hecho algunas de las investigaciones mencionadas. En general, la mayoría de las acciones odontológicas van dirigidas al tratamiento de las secuelas de estas dos enfermedades. Estos tratamientos esencialmente curativos son de alto costo, requieren compleja y costosa tecnología importada de muy baja cobertura en la población y que además no eliminan la enfermedad. Por cuanto, es más difícil con la tecnología actual, atender y dar respuesta a estas enfermedades, resultando importante orientar el esfuerzo a la búsqueda de prevención más temprana de dichas enfermedades.

Con base a lo anterior, se optó por desarrollar técnicas confiables, reproducibles y de bajo costo para el diagnóstico de la enfermedad periodontal. En tal sentido, se orientó este proyecto con el fin de desarrollar estas técnicas enzimáticas para la identificación de los principales microorganismos, que recientemente se han asociado a las fases destructivas de la enfermedad periodontal.

En el presente cuaderno se detalla el desarrollo y elaboración de la técnica diagnóstica, adaptada a nuestro medio, recursos y condiciones de trabajo.

II. METODOLOGIA

2.1. Revisión Bibliográfica

La microbiología periodontal es más compleja que la asociada con caries dental, y en esta área, la tecnología enzimática es prometedora en el área de diagnóstico. Aproximadamente de 200 a 300 especies bacterianas colonizan la placa dental humana (1, 2, 3,), pero sólo un número finito de ellas ha sido asociado con la enfermedad periodontal. El problema del diagnóstico radica en la identificación y cuantificación de los periodontopáticos, además de que la flora bucal es muy compleja y altamente variada (3).

Las especies de bacterias frecuentemente asociadas con la periodontitis adulta son: *Porphyromonas gingivalis* (4, 5); *Bacteroides forsythus* (6,7); *Treponema denticola* (8,9); otras espiroquetas (5,10) y *Actinobacillus actinomycetencomitans*, el cual se ha relacionado

con la periodontitis juvenil localizada y posiblemente con la periodontitis adulta (4, 11).

Las especies de bacterias frecuentemente asociadas con la periodontitis, son organismos gram negativos. Todos son anaerobios, con excepción de *A. actinomycetemcomitans*. Estas similitudes han llevado a la búsqueda de medios que puedan diagnosticar las infecciones anaeróbicas que puedan detectar la actividad enzimática dirigida hacia proteína y péptidos (10, 12, 13). Una de estas enzimas similares a la tripsina, llamada peptidasa, es capaz de hidrolizar el sustrato de tripsina llamado N-Benzoi-DL-arginina-B-naftilamida (BANA); esta capacidad enzimática la poseen: *P.gingivalis*, *B.forsythus*, *T.denticola* (una espiroqueta) y una especie no identificada de *capnocytophaga* (6, 10). Estos hallazgos ofrecen la oportunidad de desarrollar pruebas diagnósticas basadas en la detención y/o cuantificación de uno o más de estos microorganismos.

Una de las primeras pruebas desarrolladas en forma líquida (prueba convencional), mide la actividad enzimática que poseen los principales microorganismos periodontopáticos. Esta actividad se midió por la hidrólisis del sustrato enzimático incoloro: N-benzoil-DL-arginina-B-naftilamida (BANA) que libera el cromóforo B-naftilamina, el cual cambia de anaranjado claro a rojo cuando se agrega una gota de Rojo Garnet. Esta prueba necesita de una noche de incubación a 37°C (3,8,10,14).

Posteriormente se realizaron estudios en los cuales se cambió el ensayo líquido (prueba convencional) que requiere de una noche de incubación, por un ensayo estático/sólido (prueba comercial/importada), la cual puede ser leída después de 15 minutos de incubación. La especificidad y sensibilidad de estas nuevas pruebas fue evaluada en un estudio multi-centros con muestras de 117 pacientes provenientes de clínicas dentales de cuatro diferentes universidades de los Estados Unidos, siendo ellas: University of Michigan School Dentistry, School of Dentistry, University of Missouri at Kansas City, University of Florida School of Dentistry. Los resultados obtenidos demostraron las ventajas clínicas de esta nueva técnica: detecta microorganismos periodontopáticos en ausencia de enfermedad clínica; tiene habilidad para distinguir entre sitios clínicamente saludables y sitios enfermos, además de ser simple y rápida (13, 15, 16).

En la Facultad de Odontología se realizaron diversos esfuerzos y actividades a fin de adquirir experiencia en algunas técnicas microbiológicas de interés en la práctica odontológica. Como resultado de ello se adquirieron muestras comerciales de la técnica anhidra (técnica importada), las cuales están siendo utilizadas en investigaciones con estudiantes que realizan su EPS y se han establecido algunos indicadores que permitan identificar grupos de niños y adolescentes con mayor riesgo de desarrollar enfermedad periodontal (17,18,19,20).

2.2. Objetivos:

2.2.1. Generales

- Obtener conocimiento básico de las enfermedades bucales más prevalentes del guatemalteco a nivel general para desarrollar nuevos servicios de salud, que respondan eficazmente a las necesidades más

importantes de salud bucal de la población guatemalteca.

- Desarrollar técnicas con enfoque preventivo para el ejercicio de la profesión estomatológica.

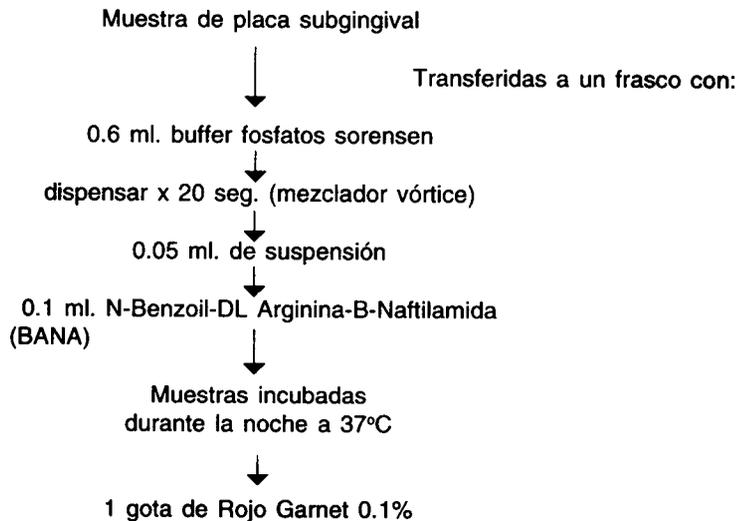
2.2.2. Específicos

- Elaborar una técnica diagnóstica, alternativa y simplificada que permita el diagnóstico rápido, válido y confiable de los principales microorganismos asociados a la enfermedad periodontal activa.
- Desarrollar una prueba diagnóstica simplificada y de bajo costo, que permita identificar grupos de personas con alto riesgo de enfermedad periodontal.
- Identificar y reproducir la reacción enzimática en la cual se basan las técnicas diagnósticas importadas, y crear un recurso de diagnóstico propio.
- Realizar los primeros intentos clínicos para sentar las bases de evaluación en estudios clínicos a gran escala.

2.3. Procedimientos:

Inicialmente se reprodujo la prueba original (técnica convencional) utilizando los reactivos básicos, con el fin de comprobar las ventajas y desventajas que este método conlleva (6).

Se realizó de acuerdo con el siguiente esquema:

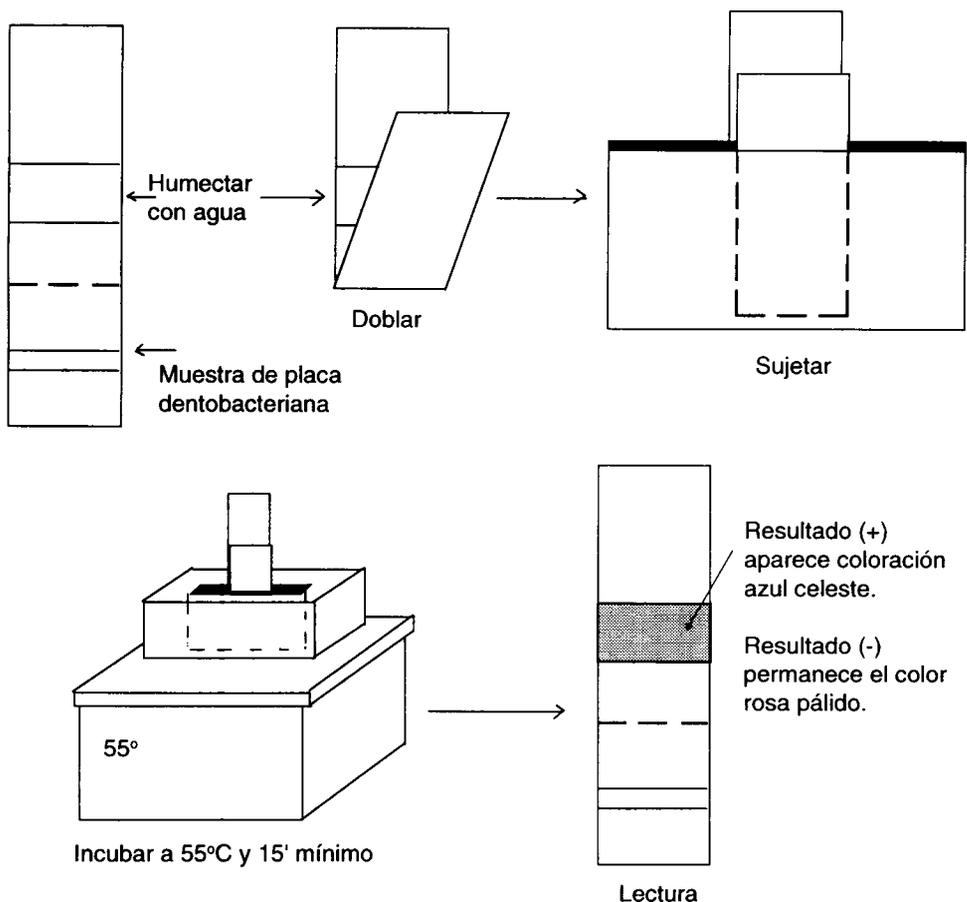


Las muestras fueron leídas por comparación de un muestrario coloreado (de anaranjado claro a rojo).

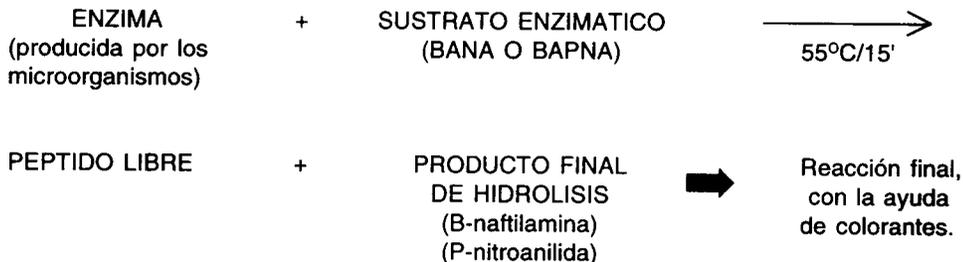
El anterior ensayo se realizó in-vitro e in-vivo.

Posteriormente se obtuvo la información de que existían cambios en la forma de presentación de la técnica diagnóstica (técnica importada); la cual superaba las desventajas de la técnica convencional para transformarlas en ventajas.

Tira reactiva



De la técnica antes descrita y mencionada se conocía su fundamento, el cual se basa en una reacción de hidrólisis de un sustrato enzimático de tripsina: reacción promovida por los principales microorganismos periodontopáticos.



Reacción de la cual se desconocían:

- **Sustrato enzimático utilizado**
 - i Bana o Bapna
 - ii Concentración.
- **Colorante enzimático utilizado**
 - i Concentración
 - ii Solventes.
- Condiciones idóneas para formular la técnica diagnóstica en su nueva presentación anhidra.

Con el fin de evaluar e identificar los componentes químicos y bioquímicos reportados por la literatura, se procedió a trabajar, según el siguiente resumen, en las siguientes etapas:

a) **Preformulación**

Estudio de características fisicoquímicas de los posibles componentes para identificar y reproducir in-vitro la reacción enzimática que se lleva a cabo, para lo cual se evaluaron:

- **Sustratos Enzimáticos**
 - i N-a Benzoil-DL-Arginina-B-Naftilamina BANA¹
 - ii N-a Benzoil Arginina-P-Nitroanilida BAPNA

– **Productos de Hidrólisis**

- i B-Naftilamina
- ii P-Nitroanilida

– **Colorantes**

- i Rojo Garnet¹
- ii Negro K¹

– **Aditivos/solventes**

- i Buffer de fosfatos sorensen
- ii Etanol
- iii Eter

– **Estudio de variables**

- i Concentración
- ii Temperatura
- iii Solventes

b) **Formulación**

- Tamizaje de componentes y concentraciones; selección de los mismos.
- Identificación de la reacción/medio líquido/In-vitro.
- Reproducción de la reacción con los componentes enzimáticos reales/medio líquido/In-vivo.
- Adaptación de la fórmula a un medio estático y anhidro.
 - i Pruebas aisladas en varios tipos de superficie
 - ii Selección de la superficie que demuestre mejores resultados.

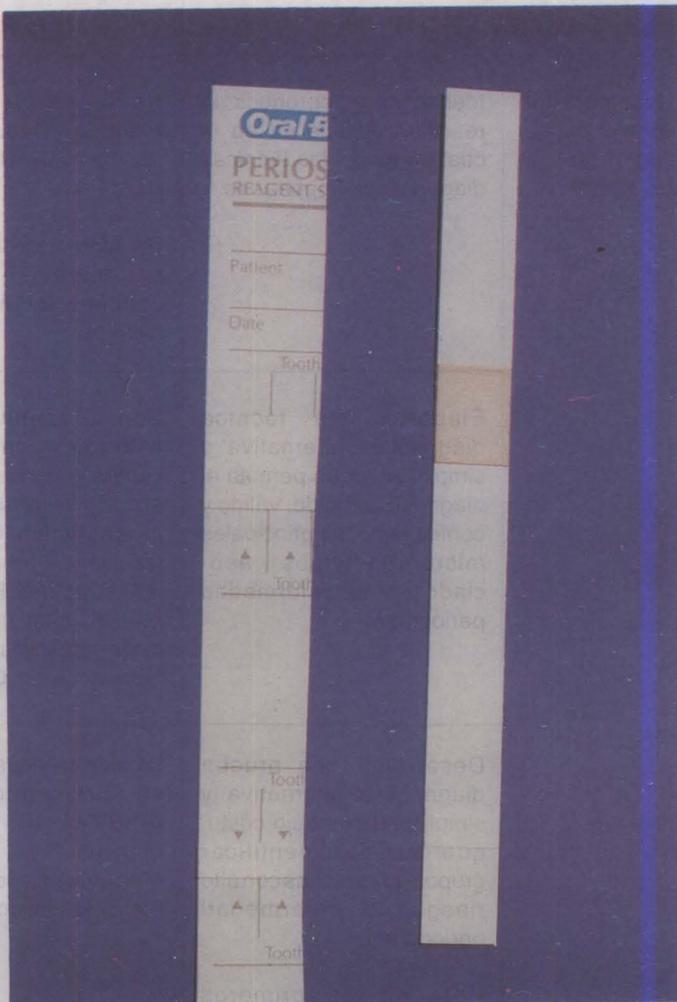
c) **Estudio de Estabilidad Acelerada/con el fin de determinar el tiempo de vida útil de la prueba diagnóstica.**

d) **Evaluación Clínica Preliminar**

Para determinar la sensibilidad efectiva de la técnica experimental vrs. la técnica importada, evaluadas a nivel estudio piloto en un grupo pequeño de pacientes.

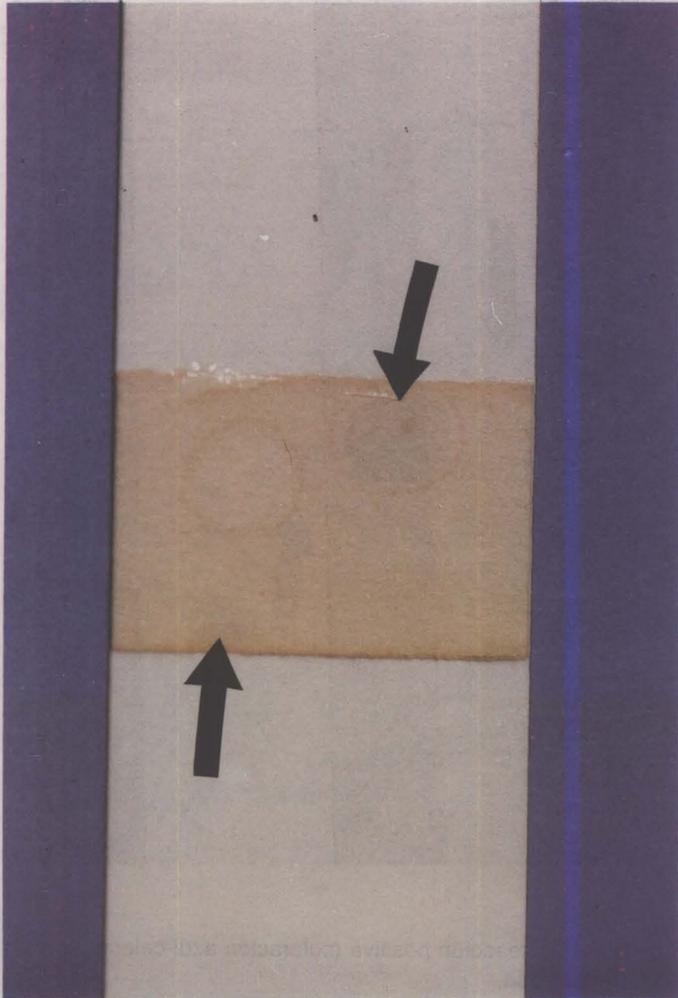
III. COMPARACION DE OBJETIVOS Y LOGROS

OBJETIVOS		LOGROS
Desarrollar técnicas con enfoque preventivo para el ejercicio de la profesión estomatológica.	Identificar y reproducir la reacción enzimática en la cual se basan las técnicas diagnósticas importadas.	Se logró identificar la reacción en la cual se basan las técnicas diagnósticas importadas. Se identificaron los componentes solventes y concentraciones de los mismos.
	Elaborar una técnica diagnóstica alternativa y simplificada que permita el diagnóstico rápido, válido y confiable de los principales microorganismos asociados a la enfermedad periodontal.	Con la identificación de estos componentes, solventes y concentraciones, se logró establecer la presentación final de la técnica en forma de tiras reactivas (PERIOUSAC), para lo cual se utilizaron materiales disponibles y fabricados en Guatemala.
	Desarrollar una prueba diagnóstica alternativa y simplificada de bajo costo, que permita identificar grupos de personas con alto riesgo de enfermedad periodontal. Realizar los primeros intentos clínicos para sentar las bases de estudios clínicos a gran escala.	La técnica desarrollada en su presentación final (PERIOUSAC), es funcional in-vitro y demostró efectividad del 20% en estudios clínicos iniciales.



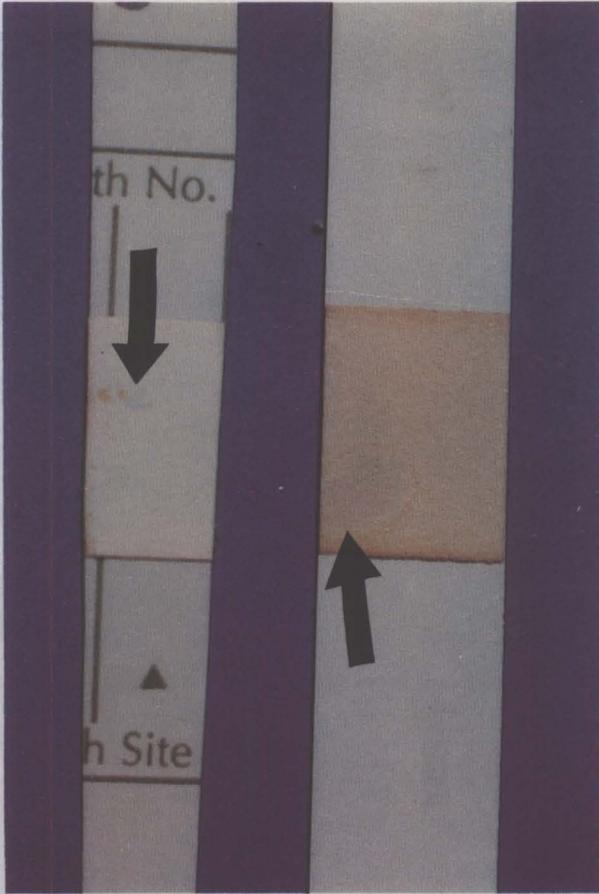
- A la izquierda: se puede observar la técnica diagnóstica importada.
- A la derecha: se observa la técnica diagnóstica experimental (PERIOUSAC), desarrollada en la presente investigación.

Reacción positiva (in-vitro) de la técnica diagnóstica experimental (PERIOUSAC).



En los lugares señalados, se puede observar una reacción positiva (coloración azul), in-vitro de la técnica diagnóstica PERIOUSAC.

Comparación de la prueba diagnóstica importada y técnica diagnóstica experimental (PERIOUSAC).



- A la izquierda: Una reacción positiva (coloración azul-celeste) in-vivo de la prueba diagnóstica importada.
- A la derecha: Reacción positiva (coloración azul) in-vivo de la técnica diagnóstica desarrollada (PERIOUSAC).

Ambas reacciones indican la presencia de microorganismos periodontopáticos en la placa dentobacteriana.

IV. DISCUSION DE RESULTADOS

Los hallazgos de esta investigación demuestran que en Guatemala es posible desarrollar recursos diagnósticos propios, ya que se logró desarrollar una prueba diagnóstica para identificar los principales microorganismos asociados con la periodontitis.

Inicialmente se evaluó la técnica diagnóstica convencional (líquida), con el fin de comprobar sus ventajas y desventajas en nuestro medio. Esta técnica demostró buena efectividad in-vitro; sin embargo, in-vivo es difícil distinguir su viraje de color, lo que da lugar a falsas interpretaciones, además de requerir 24 horas de incubación. También presenta el inconveniente de no ser aplicable en investigaciones de campo por la dificultad de trasladar equipo, el uso de cristalería de alta precisión volumétrica y el inconveniente de preparar reactivos en el lugar de utilización por su corto tiempo de vida e inestabilidad en solución. Todas estas desventajas conducen a eliminar esta prueba como posible alternativa, y por otra parte favorecen la utilización de nuevos recursos diagnósticos.

Posteriormente se identificó la reacción enzimática en la cual se basan otras técnicas diagnósticas importadas, lo cual condujo al estudio y selección de sus componentes, solventes y concentraciones adecuadas, lo que coincide con lo reportado por la literatura, ya que estas nuevas técnicas diagnósticas se fundamentan en la capacidad de hidrolizar sustratos sintéticos de tripsina que poseen tres de los principales patógenos periodontales (4,5,10).

Esta identificación condujo al estudio y selección de los componentes básicos de la técnica, así como a determinar sus concentraciones y solventes adecuados. Sin embargo, el estudio no finalizó aquí, sino que presentó el reto de adaptar estos componentes a una forma de presentación anhidra, lo cual se logró a pesar de no poseer condiciones apropiadas de laboratorio como: ambiente libre de oxígeno, humedad controlada y poca exposición a la luz.

Finalmente se logró establecer la presentación final de la técnica en forma de tiras reactivas, para lo cual se utilizaron materiales disponibles y fabricados en Guatemala. Esta presentación de la técnica permitió comprobar las ventajas reportadas por la literatura (10) (11), ya que es una prueba diagnóstica rápida, que permite disminuir el tiempo de incubación: de 24 horas a 15 minutos, y que además, simplifica el proceso, al eliminar el uso de equipo y cristalería de alta precisión volumétrica, lo cual facilita su utilidad en el consultorio y en investigaciones de campo.

La técnica diagnóstica desarrollada en su presentación final (tiras reactivas PERIOUSAC) es funcional in-vitro y demostró efectividad del 20% en estudios clínicos iniciales. Estos resultados son satisfactorios dada la complejidad de la técnica, a pesar de haber sido desarrollada con limitaciones de recursos, equipo e infraestructura inadecuada. Asimismo, estos hallazgos demuestran la necesidad de continuar este estudio, con el fin de perfeccionar y afinar la técnica y mejorar su sensibilidad-efectividad in-vivo,

y a la vez dar inicio a una evaluación diagnóstica de campo en poblaciones más significativas en conjunto con el Programa de Diagnóstico Microbiológico de Placa Dentobacteriana, realizado con estudiantes de Odontología que realizan su EPS en comunidades identificadas con alta incidencia de enfermedad periodontal, lo cual finalmente, conllevaría a la identificación de pacientes de alto riesgo, y a la búsqueda de tratamientos preventivos adecuados con el consiguiente beneficio de evitar las secuelas de la enfermedad.

Los resultados obtenidos en la presente evaluación son el eslabón que posteriormente permitirá la producción y la disponibilidad inmediata de nuestros propios recursos diagnósticos, lo cual incidirá positivamente en la economía del país, así como para que la Universidad de San Carlos, **evalúe y canalice la posibilidad de producir el primer recurso diagnóstico elaborado en Guatemala para identificar microorganismos periodontopáticos.**

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES	RECOMENDACIONES
<ul style="list-style-type: none"> - Se identificaron y ensayaron in-vitro los componentes, concentraciones y solventes de la técnica diagnóstica importada. - La técnica diagnóstica tiene una efectividad in-vivo del 20% hasta este momento. 	<p>Realizar evaluaciones diagnósticas en poblaciones más amplias, para que de esta manera se pueda cotejar la efectividad de la técnica in-vivo con procedimientos de afinamiento y perfeccionamiento de la técnica.</p> <p>Mejorar sensibilidad de la prueba.</p>
<ul style="list-style-type: none"> - Se estudiaron parcialmente las condiciones ambientales idóneas para el desarrollo de la técnica diagnóstica. - Se encontró un tiempo de vida útil de 3 meses. 	<p>Continuar con estudio de estabilidad para mejorar tiempo de vida útil de la prueba. (íntimamente relacionado con las anteriores recomendaciones).</p>
<ul style="list-style-type: none"> - Se logró establecer la forma de presentación final de la técnica (tiras reactivas). - La presentación final de la técnica (tiras reactivas) se efectuó con materiales disponibles y fabricados en Guatemala. 	<p>En base a las anteriores recomendaciones, mejorar material utilizado si fuera necesario.</p>

5.1. Sugerencias de estudios derivados y colaterales:

Estos hallazgos demuestran la necesidad de continuar con este estudio, con el fin de perfeccionar la técnica hasta ahora desarrollada, para mejorar su sensibilidad, efectividad in-vivo, tiempo de vida útil, y a la vez, dar inicio a una evaluación diagnóstica más amplia, en poblaciones donde ya se han identificado pacientes con problemas periodontales, lo cual permitiría una puntual retroalimentación: **entre identificación de pacientes con alto riesgo a desarrollar enfermedad periodontal y perfeccionamiento de la técnica.**

VI
ANEXOS

ANEXO No. 1

PRUEBA CONVENCIONAL VRS. DIF. [COLORANTES]* (1 noche de incubación a 37°C)

COLORANTE	IN VITRO (adicionando prod. de hidrólisis)			IN VIVO (con p.d.b.) (*)		
	Positivo	débil positivo	Negativo	Positivo	débil positivo	Negativo
	- Rojo Garnet 0.1%	+				+
- Negro K 0.05%			-			-
- Negro K 0.1%			-			-
- Negro K 0.2%			-			-
- Negro K 0.3%			-			-

La prueba convencional, solamente es perceptible cuando se usa la combinación BANA+ROJO GARNET.

(*) Placa dentobacteriana.

[*] Concentraciones de colorantes.

ANEXO No. 2

COMPARACION DE SUSTRATOS ENZIMATICOS IN-VITRO

(Adicionando su respectivo prod. de hidrólisis)

SUSTRATO ENZIMATICO	C O L O R A N T E S				
	Rojo Garnet 0.1%	Negro K 0.05% Eter	Negro K 0.1% Eter	Negro K 0.2% Eter	Negro K 0.5% Eter
N-∞ Benzoil DL arginina B Naftilamida/acuosa 0.1M	+	+	+	+	+
N-∞ Benzoil DL arginina P-Nitroanilida 0.1M	-	-	-	-	-

- La combinación BANA-ROJO GARNET y BANA + NEGRO K resulta positiva.
- Se descarta una vez más el uso de N-∞ Benzoil DL arginina P-nitroanilida 0.1M en combinación con los principales colorantes.

ANEXO No. 3

CORRELACION ENTRE CONCENTRACION DE SUSTRATO ENZIMATICO Y CONCENTRACION DE COLORANTE.

SUSTRATO ENZIMATICO	N E G R O K								
	AGUA			ETANOL			ETER		
	0.01%	0.05%	0.1%	0.01	0.05	0.1	0.01	0.05	0.1%
BANA 0.05M	±	+	±	±	+	+	+	+	+
BANA 0.1M	±	±	±	±	+	+	+	+	+
BANA 0.15M	±	±	±	±	+	+	+	+	+

± Débil positivo

+ Positivo

- No se utilizó la relación BANA-negro K en agua por ser este último inestable en dicho solvente.
- La relación BANA 0.1M y negro K ETANOL 0.05% fue la seleccionada para trabajar en forma anhidra.
- La relación BANA 0.1M y negro K en éter, presenta buenos resultados, pero dicho solvente no es funcional en superficie.

ANEXO No. 4

COMPARACION DE LAS DIFERENTES TECNICAS IN-VITRO IN-VIVO (Forma Anhidra)

TECNICA	IN VITRO (con p. de hidrólisis)			IN VIVO (con p.d.b.) (*)		
	Positivo	débil positivo	Negativo	Positivo	débil positivo	Negativo
- Prueba convencional (1 noche incubación a 37°C)	+				+	
- Prueba importada	+			+		
- Prueba experimental	+				+	

0 = Negativo (-) no cambió coloración.

(+) = Azul débil

(++) = Azul fuerte.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Moore, W.E.C., et-al. Subgingival microflora in periodontal disease: cultural studies in host-parasite interactions in periodontal diseases. Amer. Soc. for Microbiol. Washington, D. C. 13-26, 1982.
2. Socransky, S. S., et-al. Present status of studies on the microbial etiology of periodontal diseases. Chapter in host parasite interactions in periodontal disease. Genco R. J. Mergenhagen SE, eds. Am. Soc. Microbiol. 1-12, 1982.
3. Loesche, W.J. The identification of bacteria associated with periodontal disease and dental caries by enzymatic methods. Oral Immunol.: 1:65-70. 1986.
4. Savitt, E.D., et-al. Comparison of cultural methods and DNA probe analysis for the detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides intermedius* in subgingival plaque samples. J. Periodontol. 59:431-438. 1988.
5. Loesche, W.J., et-al. Metronidazole in periodontitis. I. Clinical and bacteriological results after 15 to 30 weeks. J. Periodontol. 55:325-335. 1984.
6. Laughon, B.E., Syed, S. A.; Loesche, W.L. API-ZYM System for identification of *Bacteroides* sp., *Campylobacter* sp. and spirochetes of oral origin. J. Clin. Microbiol. 15:97-102. 1982.
7. Loesche, W.J. The identification of bacteria associated with periodontal disease and dental caries by enzymatic methods. Oral Microbiol. Immunol. 1:65-70. 1986.
8. Tanner, A.C.R., et-al. API-Zym and APIANADENT reactions of fastidious gram negative species. J. Clin. Microbiol. 22:333-335. 1985.
9. Loesche, W.J., Syed S.A., Stoll, J. Trypsin-like activity in subgingival plaque: a diagnostic marker for spirochetes and periodontal disease. J. Periodontol. 58:266-273. 1987.
10. Bretz, W.A., Loesche, W.J. Characteristics of trypsin-like activity in subgingival plaque samples. J. Dent. Res. 66: 1668-1672. 1987.
11. Schmidt, E.F., et-al. Correlation of the hydrolysis of Benzoyl-Arginine Naphthylamide (BANA) by plaque with clinical parameters and subgingival levels of spirochetes in periodontal patients. J. Dent. Res. 67:1505-1509. 1988.
12. Loesche, W.J., et-al. Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. J. Periodontol. 56:447-456. 1985.

13. Loesche, W.J., et-al. Multicenter clinical evaluation of a chairside method for detecting certain periodontopathic bacteria in periodontal disease. *J. Periodontol.* 61:189-196.
14. Bretz, W.A.; Lopatin, D.E.; and Loesche, W.J. Benzoyl-arginine naphthylamide (BANA) hydrolysis by *Treponema denticola* and/or *Bacteroides gingivalis* in periodontal plaques. *Oral Microbiol. Immunol.* 5:275-279. 1990.
15. Loesche, W.J.; Hujoel, P.P. Microbiological-based Diagnostic Test for Periodontitis, Considerations in regard to sensitivity, specificity and accuracy. In: *markers of disease susceptibility and activity for periodontal diseases*. Royal society of Medicine Symposium, London: Cambridge University Press. (March, 1991).
16. Watson, M.R., et-al. Detection of two anaerobic periodontopathogens in children by means of the BANA and ELISA assays.
17. Pomés, C.E.; De León, H.A. Programa de investigaciones de la placa dentobacteriana del guatemalteco. Multicentro de Innovaciones Estomatológicas y Departamento de Educación Odontológica. Facultad de Odontología, Universidad de San Carlos de Guatemala. 1988. 40 p.
18. Pomés, C.E.; De León, H.A. Protocolo para el diagnóstico microbiológico de la enfermedad periodontal. Departamento de Educación Odontológica. Facultad de Odontología. Universidad de San Carlos de Guatemala. 1988.
19. Pomés, C.E.; De León, H.A.; Aguirre, R.; Milián, E.; Werner, C.; Bretz, W. Risk indicator for periodontal disease in guatemalan adolescents (Universidad de San Carlos, Guatemala, University of Michigan, USA). Abstract for 1991. Sometido para la sesión general de la Asociación Internacional de Investigación Dental y Asociación Americana de Investigación Dental. Sep. 1990.
20. Pomés, C.E.; De León, H.A.; Milián, E.; Aguirre, R. Diagnóstico Microbiológico de Placa Dentobacteriana y saliva del Guatemalteco. Multicentro de Innovaciones Estomatológicas, Facultad de Odontología. Universidad de San Carlos de Guatemala. 35 p.

Héctor Alfonso de León Godoy
Elvia Rebeca Grijalva
Carlos Enrique Pomés.

**DESARROLLO DE TECNICAS SIMPLIFICADAS
PARA DETERMINAR AGENTES CARIOGENICOS:**

**MICROMETODO DE HUELLA O IMPRESION
PARA EL AISLAMIENTO Y CUANTIFICACION
DE AGENTES CARIOGENICOS.**

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

INDICE

	Página
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	1
OBJETIVOS	2
METODOLOGIA	3
RESULTADOS	5
DISCUSION	10
CONCLUSIONES	10
RECOMENDACIONES	11
ANEXOS	13
BIBLIOGRAFIA	16

1. INTRODUCCION:

Las enfermedades caries dental y periodontal son las de mayor prevalencia en el mundo. En el campo de las caries dental, se ha comprobado que la etiología de esta enfermedad es multifactorial y que juegan un papel importante tres factores interdependientes y esenciales: **la susceptibilidad del huésped, la dieta rica en azúcares** (carbohidratos artificiales) **y la presencia de microorganismos cariogénicos**. Se ha estudiado extensamente el papel que juegan dos grupos de microorganismos: *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus* en la producción de la caries dental; diversos hallazgos clínicos y experimentales han permitido considerarlos como patógenos primarios, principalmente el primero de los nombrados y por ello, son ahora utilizados como indicadores de riesgo de caries dental (1-7).

Investigaciones realizadas en la Facultad de Odontología evidencian la alta prevalencia de caries dental y de Enfermedad Periodontal en el Guatemalteco. Dado el papel determinante que éstas dos enfermedades tienen en la prevalencia de enfermedades bucales, se hace necesario dirigir esfuerzos hacia la prevención de dichas entidades, para lo cual es necesario entre otras acciones, el desarrollar pruebas diagnósticas basadas en la determinación y/o cuantificación de los principales agentes etiológicos (8-11).

El presente trabajo describe el desarrollo de técnicas simplificadas para aislar y cuantificar *S. mutans* y *L. acidophilus*; dichas técnicas fueron evaluadas **in vitro** e **in vivo** con microorganismos etiológicos de cepas conocidas y de saliva de pacientes con alta prevalencia de caries. Los resultados obtenidos de sensibilidad y efectividad de las técnicas fueron comparados con métodos de cultivo convencionales.

2. ANTECEDENTES:

El concepto previo sobre la etiología de la caries dental involucraba a la flora acidogénica en general. Actualmente este concepto se ha reemplazado por opiniones más específicas de este proceso infeccioso (12,13).

S. mutans y *L. acidophilus* han sido ampliamente asociados con el desarrollo de caries. Experimentos realizados en animales utilizando ratas gnotobióticas (16,17) y hamsters (18), demuestran que ciertas cepas de lactobacilos pueden causar caries dentaria. Estudios recientes indican que la cantidad de lactobacilos puede ser relacionada en combinación con otras pruebas, para predecir la actividad de caries en niños (19,20). También se conoce que un grupo de estreptococos formadores de placa dental, específicamente *S. mutans*, representa un riesgo de particular importancia (7,21).

Estudios epidemiológicos realizados en poblaciones humanas han demostrado que existe una fuerte correlación entre *S. mutans* oral y la prevalencia de caries dentaria (22). La reducción de poblaciones de *S. mutans* en los dientes por medio de medidas antibacterianas específicas es seguido por una reducción en la actividad de caries. Estos experimentos

colectivos y resultados clínicos apoyan la opinión de que *S. mutans* es un patógeno dental importante, el cual puede servir como útil indicador de riesgo microbiológico en el proceso de caries (23).

Los métodos microbiológicos actualmente emplean medios de cultivo diferenciales, los cuales han sido ampliamente usados en estudios clínicos para investigar varios aspectos de relación entre *S. mutans* y caries dental (24-30). En años recientes se han propuesto varios métodos simplificados de laboratorio para la determinación y cuantificación de *S. mutans*. Se describió un micrométodo, el cual utiliza pequeñas cantidades de una dilución de saliva sobre la superficie de un medio de cultivo específico, utilizando una pipeta semiautomática y contando las microcolonias que aparecen en la superficie; su uso primordial está dirigido a estudios en gran escala de tipo epidemiológico; no pudiendo utilizarse en la clínica, por requerir equipo costoso de laboratorio (31). Kohler y Bratthall, desarrollaron una técnica en la cual se utilizan espátulas de madera que son humectadas con saliva en la boca y se presionan directamente en la superficie del medio selectivo para *S. mutans* (32).

Se han propuesto otros métodos con el fin de simplificar las determinaciones de dicho microorganismo. Una prueba basada en un medio selectivo coloreado, fue desarrollado por Shklair y Walter, la cual utilizaba una escala grande con parámetros epidemiológicos que indicaban la presencia o ausencia de *S. mutans* (33). Matsukubo y colaboradores, describió una prueba para determinaciones semicuantitativas de *S. mutans*, la cual se basa en la habilidad de este microorganismo para desarrollar colonias adhesivas que se forman en las paredes del recipiente en el que se hace el cultivo (34). Otro método para estudiar la presencia de *S. mutans* en saliva fue descrito por Alaluusua y colaboradores, en el cual la saliva estimulada por medio de trozos de parafina, es vertida sobre una placa especial cubierta con agar mitis salivarius-sacarosa. Posteriormente se ponen discos impregnados con bacitracina sobre las placas inoculadas y la densidad del crecimiento de colonias de *S. mutans*, se miden por su desarrollo en zonas de inhibición, luego de haber sido incubadas (35).

3. OBJETIVOS:

3.1. General.

Desarrollar técnicas específicas que permitan el aislamiento, purificación y cuantificación de microorganismos cariogénicos asociados a una de las enfermedades bucales más prevalentes y significativas en Guatemala, y por consiguiente, aplicar un tratamiento científico al proceso de la caries dental del guatemalteco.

3.2. Específicos.

Elaborar técnicas diagnósticas para:

- a) Identificar en forma rápida, cualitativa y cuantitativamente los principales microorganismos cariogénicos.

- b) Aplicar un diagnóstico válido, temprano y efectivo, incluso en la fase preclínica de la enfermedad.

4. METODOLOGIA:

4.1. Hipótesis.

En Guatemala es factible desarrollar técnicas simplificadas para determinar cualitativa y cuantitativamente agentes cariogénicos.

4.2. Procedimientos y Técnicas Microbiológicas.

4.2.1. Aislamiento de agentes cariogénicos (*S. mutans* y *L. acidophilus*). Se procedió a tomar muestras de placa dentobacteriana y/o saliva de pacientes con alta prevalencia de caries, evaluados en las clínicas de la facultad de Odontología de la USAC.

4.2.2. Identificación y caracterización de los agentes. Se hizo por medio de comparación con cepas control y pruebas básicas de identificación microbiológica, morfológica y bioquímica.

4.2.3. Cepario/almacenamiento: después de la purificación de las cepas, se procedió a su almacenamiento para la evaluación de la técnica **in vitro**.

4.2.4. Medios de cultivo: se utilizaron dos medios de cultivo selectivos para el aislamiento de *S. mutans* y *L. acidophilus*; para el primero, Agar Mitis Salivarius, según Gold (29); para el segundo, Agar Rogosa, descrito por Rogosa y colaboradores (36).

Desarrollo, Evaluación y Análisis de la Técnica del Micrométodo.

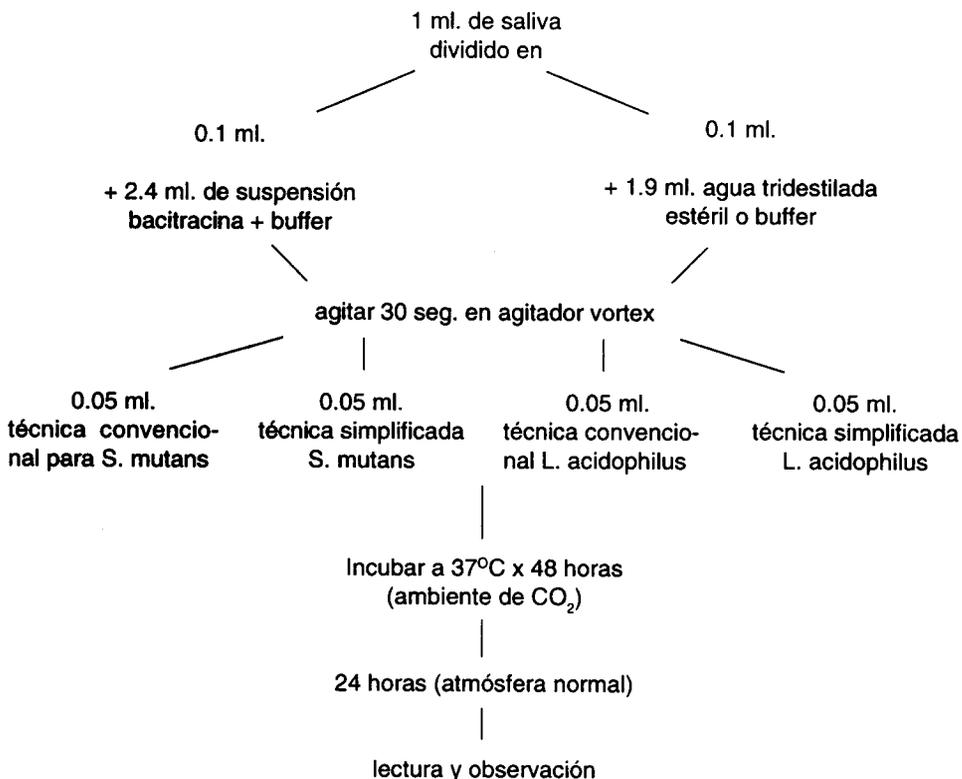
4.2.5. Desarrollo de Técnicas: se realizaron diversas pruebas de laboratorio (ensayos de certeza y error) con el fin de disminuir costos, volumen y encontrar sencillez, efectividad y confiabilidad en las posibilidades estudiadas. Se ensayaron tres materiales: madera, vidrio y plástico.

Se descartaron los ensayos que presentaron dificultad de esterilización, necesidad de envase para volúmenes grandes, presentación sofisticada y dificultad de manipulación. Se descartaron la madera y el vidrio; y finalmente se eligieron envases de plástico desechables, los cuales además de cumplir con las cualidades propuestas, presentaron la ventaja de poder utilizar un volumen pequeño (3 ml. en lugar de 15 ml.), se utilizaron otros aditamentos sencillos como: discos de papel copia o periódico, para el transporte de las muestras diluidas; pinzas de disección para colocar y retirar los discos de papel (pinzas que normalmente hay en consultorios dentales y puestos de salud).

4.2.6. Evaluación **in vitro**: la técnica que presentó mejores cualidades fue la seleccionada para realizar las evaluaciones **in vitro**. Se utilizó para ello los agentes del cepario. Se hicieron diluciones, desde 1:10 hasta 1:100,000 y se sembraron en sus respectivos medios de cultivo: *S. mutans* en Mitis Salivarius y *L. acidophilus* en Agar Rogosa, todo en duplicado. La incubación se hizo a 37° centígrados, 48 horas en una atmósfera con Dióxido de Carbono y 24 horas en atmósfera normal. Finalmente se realizaron los recuentos de colonias y se procedió a realizar la correlación estadística con las técnicas convencionales.

4.2.7. Evaluación **in vivo**: para el efecto, se recolectaron 15 muestras de saliva provenientes de niños cuyas edades oscilaron entre 4 y 9 años, todos asistentes a la Clínica Dental de la Facultad de Odontología. El tamaño de la muestra se determinó en función de costos y disponibilidad de tiempo.

Las muestras se procesaron de la siguiente manera:

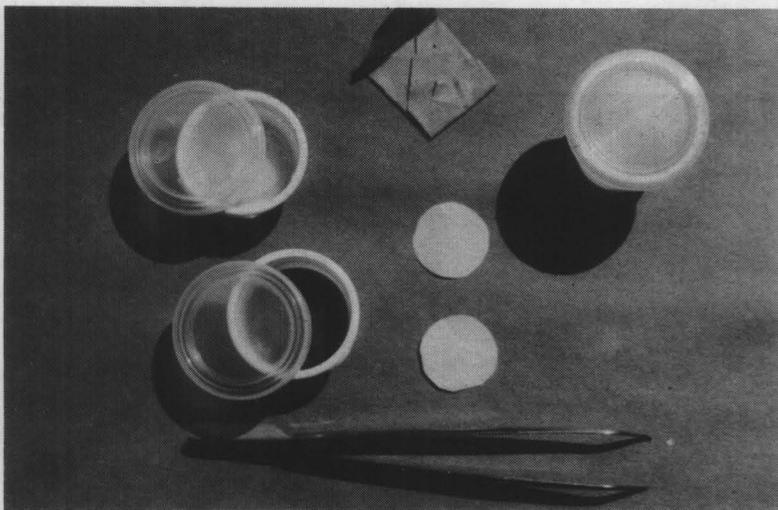


La muestra suspendida o diluida de saliva se humecta en su respectivo disco de papel estéril, el cual se presiona suavemente a la superficie de cada agar y se retira con la ayuda de la pinza. Procedimiento identificado en el estudio como: "**Método de huella o impresión**".

4.2.8. Análisis estadístico: para comparar las dos técnicas **in vitro** y evaluar su efectividad y sensibilidad, se aplicó el análisis de regresión. Para comparar las dos técnicas in vivo (efectividad, especificidad, confiabilidad), se aplicó prueba de Chi cuadrado con corrección de Yates a un nivel de significancia del 5%.

RESULTADOS

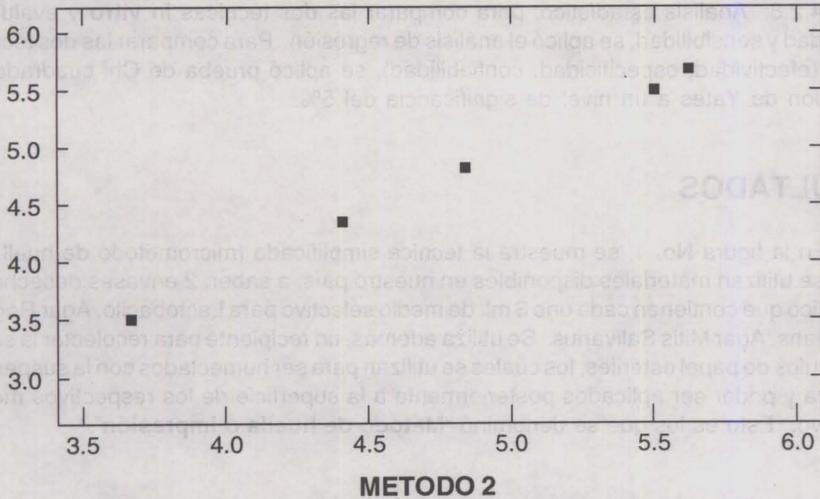
En la figura No. 1, se muestra la técnica simplificada (micrométodo de huella) en la cual se utilizan materiales disponibles en nuestro país, a saber: 2 envases desechables de plástico que contienen cada uno 3 ml. de medio selectivo para Lactobacilo, Agar Rogosa; y S. mutans, Agar Mitis Salivarius. Se utiliza además, un recipiente para recolectar la saliva; dos círculos de papel estériles, los cuales se utilizan para ser humectados con la suspensión de saliva y poder ser aplicados posteriormente a la superficie de los respectivos medios de cultivo. Esto es los que se denominó "**Método de huella o impresión**".*



(*) En el cual los círculos de papel estériles humectados con suspensión de saliva más el diluyente, solamente se presionan suavemente sobre la superficie del medio de cultivo y son retirados con una pinza.

En la gráfica No. 1 se muestra la **correlación existente** entre la **técnica convencional** (Método 1) y la **simplificada** (Método 2) **para determinar el número de S. mutans**. Dichos resultados son más ilustrativos en las figuras No. 2 y No. 3.

METODO 1



Coefficiente de correlación $r = 0.99$

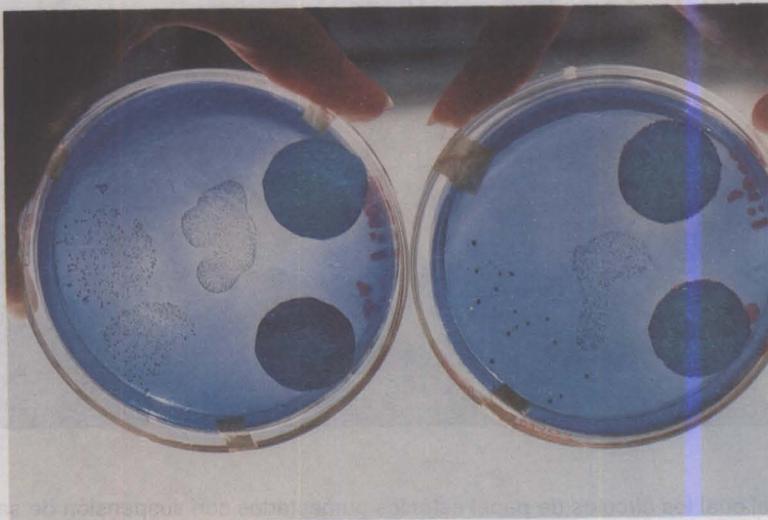


Figura No. 2 El micrométodo utilizando el equipo convencional, distintas diluciones.

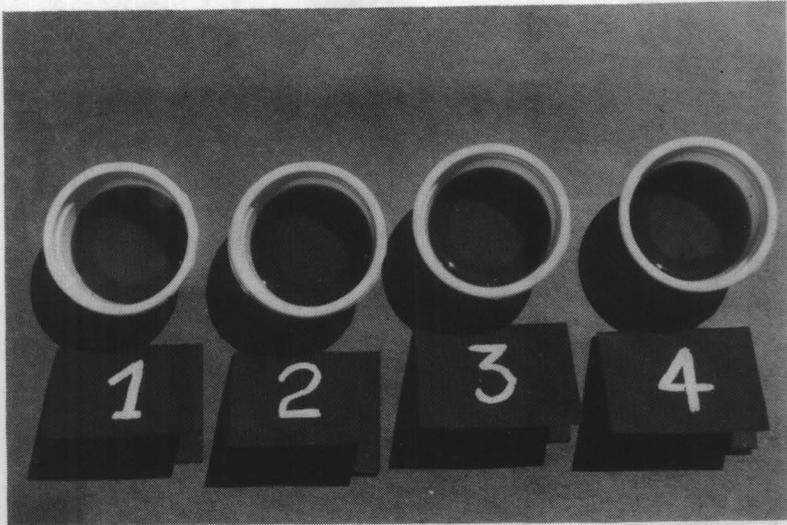
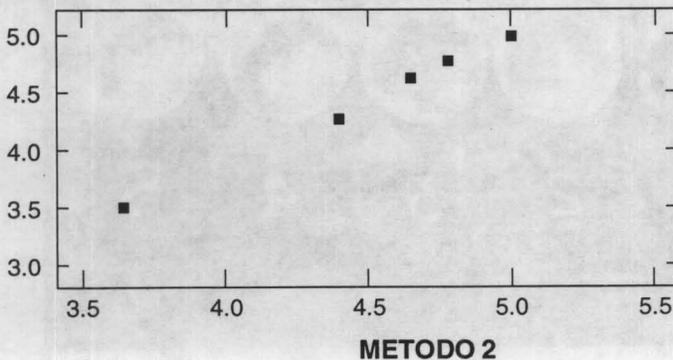


Figura No. 3 Forma en que se presenta el micrométodo de huella o impresión, distintas diluciones.

En la Gráfica No. 2 se observa la correlación entre la técnica convencional y la de Huella o Impresión, para la determinación del número de Lactobacilos. Los resultados se ilustran mejor en las Figuras No. 4, 5 y 6.

METODO 1



Coefficiente de correlación $r = 0.99$

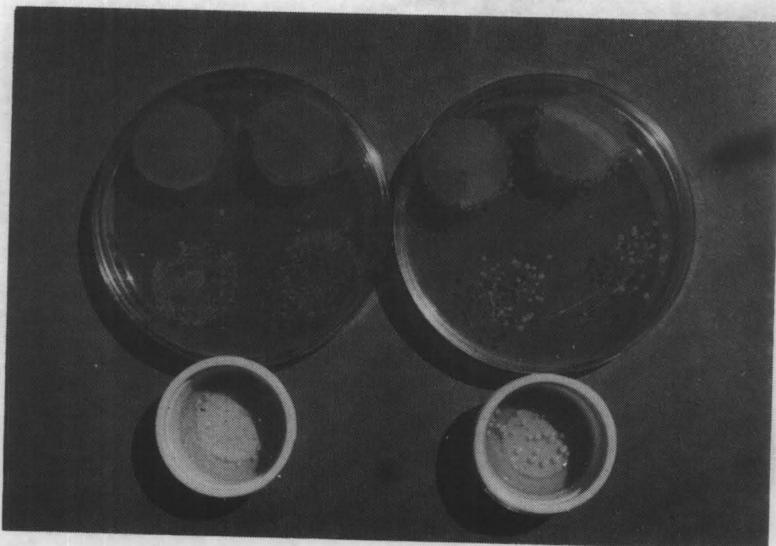
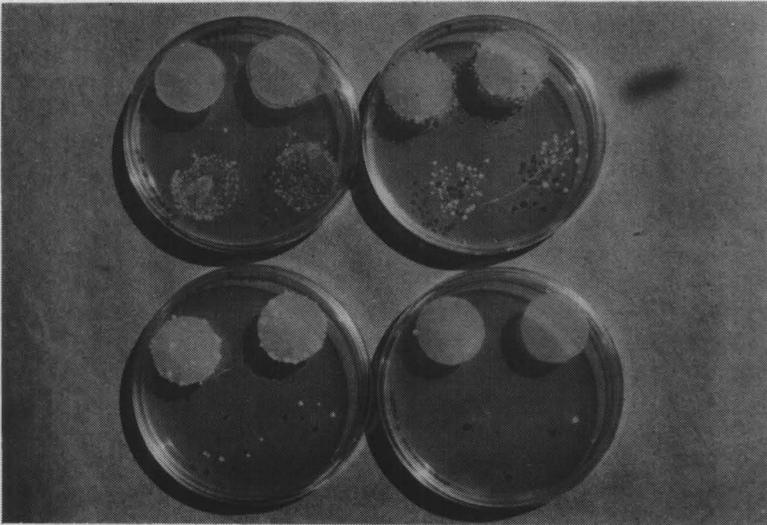


Figura No. 4. Comparación entre la técnica convencional en la parte superior y el micrométodo de Huella o Impresión, en la parte inferior. La densidad de crecimiento es similar en ambas técnicas.



Figura No. 5. Esta figura muestra una serie de diluciones que fueron hechas directamente en la presentación final de la técnica del micrométodo de Huella o Impresión.

Figura No. 6. Evaluación clínica de la técnica de micrométodo de Huella o Impresión, muestras de saliva. No se encontraron diferencias entre la técnica convencional y el micrométodo. Ver anexos 1 y 2.



CONCLUSIONES

Las técnicas mostraron sensibilidad para los patógenos oportunistas y bacterias cariogénicas. Se realizó una comparación estadística entre las técnicas convencionales y el micrométodo de Huella o Impresión. No se encontraron diferencias estadísticas entre las técnicas convencionales y el micrométodo de Huella o Impresión para el aislamiento y cuantificación de especies cariogénicas. Las técnicas mostraron sensibilidad para los patógenos oportunistas y bacterias cariogénicas.

DISCUSION

Los resultados obtenidos demuestran que en Guatemala es posible desarrollar técnicas simplificadas para el aislamiento, identificación y cuantificación de microorganismos cariogénicos. Estas técnicas desarrolladas pueden ser aplicadas para el estudio de *S. mutans* y *L. acidophilus* **in vitro** e **in vivo**; esto fue comprobado estadísticamente con un índice de correlación $r=0.99$ para ambos. Asimismo, la prueba estadística de **Chi Cuadrado** demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas al comparar las técnicas convencionales versus las técnicas simplificadas desarrolladas en este estudio, a un nivel de significancia del 5%. Esto permite visualizar la efectividad, confiabilidad y sensibilidad de las técnicas desarrolladas.

Estas técnicas simplificadas además de poseer las anteriores características, presentan las ventajas de utilizar material sencillo y económico, disponible en el país, lo cual apoya uno de los objetivos planteados. Puede colegirse que las técnicas simplificadas cumplen con varios requisitos: **sencillez, economía, y pueden ser aplicadas tanto en la investigación como en la práctica de la Odontología a nivel individual o comunitario.**

La alta sensibilidad de las técnicas, permite realizar un diagnóstico temprano, válido, efectivo, y por ende, brindar un tratamiento científico al proceso de la caries dentaria y un mejor abordaje de este problema del guatemalteco (8,9,10,11,36,39 y 40).

Paralelamente a estos hallazgos, también se creó un cepario de ambos microorganismos, aislados de pacientes Guatemaltecos con alta prevalencia de caries; esto con el fin de tener cepas propias y purificadas, que posteriormente se puedan comparar con cepas extranjeras. Lo anterior permitirá una mejor comprensión de la microbiota oral del guatemalteco.

CONCLUSIONES

- Se desarrollaron técnicas simplificadas para el aislamiento y cuantificación de agentes cariogénicos.
- Las técnicas mostraron sensibilidad para los principales agente cariogénicos.
- Se encontró correlación estadística entre las técnicas convencionales y el micrométodo de Huella o Impresión.
- No existen diferencias estadísticamente significativas entre las técnicas convencionales y el micrométodo de Huella o Impresión para el aislamiento y cuantificación de *S. mutans* y *L. acidophilus*.

- Las técnicas desarrolladas son efectivas, confiables y sensibles, lo que permite realizar un diagnóstico temprano y confiable de la actividad microbiana relacionada con el proceso de la caries dentaria.
- Las técnicas simplificadas son sencillas y aplicables, tanto para la investigación microbiológica, como para realizar diagnóstico de la actividad de caries en la clínica dental.

RECOMENDACIONES

- Realizar una evaluación clínica más amplia de las técnicas de Huella o Impresión.
- De acuerdo a los resultados que se obtengan del estudio clínico, depurar y simplificar aún más las técnicas hasta ahora desarrolladas, si este fuera el caso.
- Buscar otras técnicas para aplicarlas a niños con diferentes tiempos de vida, como una forma de seguir y controlar el proceso de la caries dentaria.

Agradecimiento

Se deja constancia de agradecimiento a la Ing. Guisela Gaytán por su valiosa ayuda en el análisis estadístico de este estudio.

ANEXOS

ANEXO 1

Comparación de las dos técnicas in-vivo para determinar S. mutans.

Prueba de Chi cuadrado con corrección de Yates a un nivel de significancia del 5%.

		TECNICA CONVENCIONAL (a)		TOTAL
		CRECIMIENTO		
		Positivo	Negativo	
Micro- mé- to- do de hue- lla (b)	C r e c i m i e n t o	13 (a ₁)	2 (a ₂)	15 (na)
		14 (B ₁)	1 (b ₂)	15 (nb)
TOTAL		27 (N ₁)	3 (N ₂)	30 (n)

Chi cuadrado obtenido: $X^2 = 1.113$

Chi cuadrado crítico para 1 gl. 5% de significancia $X^2 = 3.84$

Comparando $1.113 < 3.84$

Por lo tanto, las diferencias no son significativas al 5%.

ANEXO 2

Comparación de las dos técnicas in-vivo para determinar *L. acidophilus*.

Prueba de Chi cuadrado con corrección de Yates a un nivel de significancia del 5%.

		TECNICA CONVENCIONAL (a)		TOTAL
		CRECIMIENTO		
		Positivo	Negativo	
Micro- mé- to- do de hue- lla (b)	C r e c i m i e n t o	12 (a ₁)	3 (a ₂)	15 (na)
		13 (b ₁)	2 (b ₂)	15 (nb)
TOTAL		25 (N ₁)	5 (N ₂)	30 (n)

Chi cuadrado obtenido: $X^2 = 0.96$

Chi cuadrado crítico para 1 gl. 5% de significancia $X^2 = 3.84$

Comparando $0.96 < 3.84$

Por lo tanto, las diferencias no son significativas al 5%.

BIBLIOGRAFIA

1. Burnett, G. and Schueter G. *Oral Microbiology and Infectious disease*. The Williams & Wilkins Col, Baltimore, MA. 1978.
2. Loesche, W. *Role of Streptococcus mutans in human dental decay*. Microb. Rev. 50(4):353-380. 1986.
3. Otalora, B.M. *Recuento de Streptococo mutans de la placa dental y su relación con la experiencia de caries dental*. Rev. Odontológica UN Colombia 12(1):27-39. 1986.
4. Bone, D., Armn, E., Tiraby G. *A bacteriological study of rampant caries in children*. 1 Dent, Rev. 66(1):23-28. 1987.
5. Sabelli, C.A., et al. *Is Streptococcus mutans adherence saliva test predictive for caries?* Acta, Odontol. Pediat. 8(2):53-56. 1987.
6. Hirasawa, M. *Virulence of Streptococcus mutans: In vivo reversion of a low virulence mutant in partial displacement and pathogenesis*. Infect. Inmun. 27(3):1003-1011. 1980.
7. Loesche, W.J., Straffon DH. *Longitudinal investigation of the role of Streptococcus mutans in human fissure decay*. Infect. Inmun. 26(2):498-507. 1976.
8. Encuentro Nacional sobre la Salud Bucal en los escolares de Guatemala. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá -INCAP- y Facultad de Odontología de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala, 1989.
9. González, M.; Villacorta L.; Pomés C.; Gereda R. *Prevalencia de Caries Dental y su relación de fluoruro en el agua de bebida de 43 poblaciones de Guatemala*. Perspectiva. USAC(5):98-121. Guatemala, 1984.
10. Alfaro, A. *Prevalencia de caries dentaria en escolares de 26 comunidades rurales de la República de Guatemala 1972*. Tesis (Cirujano Dentista). Guatemala. Universidad de San Carlos. Facultad de Odontología. 1973.
11. González, O. *Patología Oral guatemalense en el Siglo XX*. Tesis (Cirujano Dentista). Guatemala. Universidad de San Carlos. Facultad de Odontología. 1975.
12. Gibbons, R.J., Van Houte J. V. *Dental Caries*. Annu. Rev. Med. 26:121-136. 1975.
13. Scherp, H.W. *Dental Caries prospects for prevention*. Science 173:1199-1205. 1971.

14. Keyes, P. H. *The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications.* Arch. Oral Biol. 1:304-320. 1960.
15. Fitzgerald, R.J., Keyes P.H. *Demostration of the etiological role of streptococci in experimental caries in the hamster.* J. Am. Dent. Assoc. 61:9-19. 1960.
16. Fitzgerald, R. J., Jordan, H.V., Archade. *Dental, Caries in gnotobiotic rats infected with a variety of Lactobacillus acidophilus.* Arch. Oral. Biol. 11:473-476. 1966.
17. Rosen, S., Lenny W.S., Omalley J.W. *Dental caries in gnotobiotic rats inoculates with Lactobacillus casei.*
18. Fitzgerald, R. J., et al. *Cariogenicity of human oral lactobacilli in hamsters.* J. Dent. Res. 59:832-837. 1980.
19. Crossner, C.G. *The usefulness of salivary Lactobacillus counts in prediction of caries activity.* In: Försök Till Tidig Diagnosav Kariessjukdomen. Thesis. Umea University. Odontological Dissertations. 12ISSN 0934-7532. 1980.
20. Klock, B., Krasse B. *A comparisson between different methods for prediction of caries activity.* Scan. J. Dent. Res. 87:129-139. 1979.
21. Gibbons, R.J. *Ecology and Cariogenic Potential of Oral Streptococci In: Streptococci and Streptococcal Diseases.* L. W. Wannamaker and J.M. Matsen, Eds., NY: Academic Press. 1972.
22. Zickert, I., Emilson, C.G. and Krasse, B. *Streptococcus mutans Lactobacilli and Dental Health in 13-14 Year-Old Sewdish Children.* Community Dent. Oral Epidemiol. 10:77-81. 1982.
23. Krasse, B. *Can Microbiological Knowledge be Applied in Dental Practice for the Treatment and Prevent of Dental Caries.* J. Can Dent. Assoc. 50:221-223. 1984.
24. Jordan, H.V., Krasse, B., and Moller, A. *A Method of Sampling Human Dental Plaque for Certain "Caries-inducing" Steptococci.* Arch. Oral Biol. 13:919-927. 1968.
25. Woods, R. *A Dental Caries Susceptibility Test Based on the Occurrence of Streptococcus mutans in Plaque Material.* Aust. Dent. J. 16:116-121. 1971.
26. Loesche, W.J. and Syed, S. A. *The Predominant Cultivable Flora of Carious Plaque and Carious Dentine.* Caries Res. 7:201-216. 1973.
27. Carlsson, J. *A Medium for Isolation of Streptococcus mutans.* Arch. Oral Biol. 12:1657-1658. 1967.

28. Ikeda, T. and Sandham, H.J. *A High-sucrose Medium for the identification of Streptococcus mutans*. Arch. Oral Biol. 17:781-783.1972.
29. Gold, O.G., et al. *A Selective Medium for Streptococcus mutans* . Arch. Oral Biol. 18:1357-1364. 1973.
30. Tanzer, J.M., et al. *Glucose - Sucrose - Potassium Tellurite - Bacitracin Agar, an Alternative to Mitis Salivarius - Bacitracin Agar for Enumeration of Streptococcus mutans*. J. Clin. Microbiol. 20:653-659. 1978.
31. Westergren, G. and Krasse, B. *Evaluation of a Micromethod for Determination of Streptococcus mutans and Lactobacillus Infection*. J. Clin. Microbiol. 7:82-83. 1978.
32. Kohler, B. and Bratthall, D. *Practical Method to Facilitate Estimation of Streptococcus mutans Levels in Saliva*. J. Clin. Microbiol. 9:584-588. 1979.
33. Shklair, I.L. and Walter, T. *Evaluation of a Selective Medium - Color Test for Streptococcus mutans*. IADR Prog & Abst. 55:No. 241. 1976.
34. Matsukubo, T.; Ohta, K.; Maki, Y.; Takeuchi, M.; and Takazoe, I. *A Semi-quantitative Determination of Streptococcus mutans Using its Adherent Ability in a Selective Medium*. Caries Res. 15:40-45. 1981.
35. Alaluusua, S.; Savolainen, J.; Tuompo, H.; and Gronroos, L. *Slide-scoring Method for Estimation of Streptococcus mutans Levels in Saliva*. Scand. J. Dent. Res. 92:127-133. 1984.
36. Rogosa, M., et al. *Selective medium for the isolation and enumeration of oral Lactobacilli*. J. Dent. Res. 30:682-689. 1951.
37. Pomés, C.E., et al. *Programa de Investigación "Diagnóstico Micribiológico de Placa Dentobacteriana del guatemalteco."* Facultad de Odontología. Multicentro de Innovaciones Estomatológicas. USAC. Guatemala, enero 1991.

Este Cuaderno de Investigación se terminó de imprimir el 5 de noviembre de 1993, en Centro Editorial Vile y consta de 500 ejemplares. La edición estuvo al cuidado de Daniel Alarcón y Juan Argueta.