

**RECuento E IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus mutans* DE SALIVA EN NIÑOS CON CARIES DENTAL: SEGUIMIENTO A 3 Y 6 MESES DESPUÉS DE UN PROCESO EDUCATIVO**



**RECuento E IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus mutans* DE SALIVA EN NIÑOS CON CARIES DENTAL: SEGUIMIENTO A 3 Y 6 MESES DESPUÉS DE UN PROCESO EDUCATIVO**

**LEANDRO AUGUSTO PLAZAS CRISTANCHO**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de  
BACTERIÓLOGO**



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA  
Junio de 2015**



**NOTA DE ADVERTENCIA**

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por los alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la Resolución N°13 de Julio de 1946

**RECuento E IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus mutans* DE  
SALIVA EN NIÑOS CON CARIES DENTAL: SEGUIMIENTO A 3 Y 6  
MESES DESPUÉS DE UN PROCESO EDUCATIVO**

---



*A mis Padres, a mi Familia;  
A todo lo que existe e importa más en mí;  
Al porvenir, a todo lo que vendrá más adelante;  
A la vida, que surca los caminos de la realidad anhelante.  
Esto, como un esfuerzo para todos y por todos.*



## **AGRADECIMIENTOS**

El autor expresa sus agradecimientos:

A mis Padres, Martín y Cecilia, por su infinito amor, por el buen ejemplo y por su grandiosa capacidad de auto sacrificio me han proveído de oportunidades que jamás imagine.

A mis hermanos, Julian, Viviana y Martín, por su constante imagen de afecto y gratitud para conmigo.

A mi querida Yesica, compañera de aventuras, por su amor y paciencia en todos los momentos de esta gran travesía.

Al Dr. Fredy Omar Gamboa Jaimes quién con su gran labor docente y académica me brindó la colaboración y orientación en el desarrollo de mi trabajo.

A todo el personal del CIO, especialmente a Jean Carlos Villamil quién me apoyo en lo necesario para la ejecución de este proyecto.

A todos aquellos que supieron brindarme un poco de su interés y preocupación en los desafíos cotidianos que se presentan día a día.



## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	12
3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	12
4. HIPOTESIS .....	14
5. OBJETIVOS .....	14
5.1. Objetivo general .....	14
5.2. Objetivos específicos.....	14
6. MARCO TEÓRICO.....	14
6.1. Ecología microbiana .....	14
6.2. Caries dental .....	18
6.3. Microorganismos cariogénicos.....	20
6.3.1. Caries de la infancia temprana.....	21
6.3.2. Epidemiología de la caries dental .....	22
6.3.3. Factores de riesgo.....	27
6.4. Género <i>Streptococcus</i> .....	29
6.4.1. Generalidades .....	29
6.4.2. Taxonomía.....	29
6.4.3. Estreptococos del Grupo <i>viridans</i> .....	31
6.5. <i>Streptococcus mutans</i> .....	31
6.5.1. Factores de virulencia .....	32
6.5.2. Asociación entre Caries dental y <i>Streptococcus mutans</i> .....	34
6.5.3. Pruebas diagnósticas para el aislamiento, recuento y tipificación de <i>S. mutans</i> .....	35
6.5.4. Metodologías para el recuento de <i>S. mutans</i> usadas en saliva .....	36
6.6. Diagnóstico de la caries dental .....	38
6.6.1. Clasificación de la caries dental .....	39
6.7. Tratamiento .....	41
6.8. Estrategias de prevención.....	41
7. METODOLOGÍA.....	42
7.1. Diseño .....	42
7.2. Población y muestra.....	43
7.3. Población universo .....	43
7.4. Población de estudio .....	43
7.5. Tamaño de muestra .....	43
7.6. Procedimiento.....	43



7.6.1.	Sujetos del estudio .....	44
7.6.2.	Recolección de la muestra y procedimientos biológicos.....	44
7.6.3.	Procesamiento de la muestra (Recuento, aislamiento e identificación de microorganismos) 44	
7.6.4.	Determinación del efecto antagónico .....	46
7.6.5.	Susceptibilidad antimicrobiana.....	46
7.6.6.	Análisis estadístico .....	47
8.	RESULTADOS .....	47
9.	DISCUSION.....	57
10.	CONCLUSIONES.....	65
11.	RECOMENDACIONES .....	65
12.	BIBLIOGRAFÍA.....	66
13.	ANEXOS.....	77
	RESUMEN.....	96

#### LISTA DE TABLAS

Tabla 6-1	Comportamiento del COP-d en Colombia según los cuatro estudios nacionales. ....	24
Tabla 6-2	Prevalencia de caries en niños de 0 a 6 años en ciudades de Colombia 2000 al 2010. .	25
Tabla 6-3	Prevalencia de caries según regiones y subregiones, Colombia 1998. ....	26
Tabla 6-4	Factores de riesgo asociados al desarrollo de caries dental. ....	28
Tabla 6-5	Factores que incrementan la colonización de <i>S. mutans</i> .....	29
Tabla 6-6	Criterios más importantes para la clasificación del Género estreptococo. ....	30
Tabla 6-7	Grupos de especies de estreptococos sobre la base del análisis de secuencia de rRNA de subunidades pequeñas .....	31
Tabla 6-8.	Pruebas diagnósticas para el aislamiento, conteo y tipificación de <i>S. mutans</i> .....	35
Tabla 6-9	Métodos de recuento del número de bacterias .....	37
Tabla 6-10	Criterios ICDAS para la detección de caries dental y evaluación de severidad. ....	40
Tabla 6-11	Comparación de los diagnósticos de caries entre los índices ICDAS y Ceo-d. ....	41
Tabla 7-1	Diseño de investigación .....	42
Tabla 8-1	Características orales y demográficas de los pacientes.....	47
Tabla 8-2	Frecuencia de aislamiento de <i>S. mutans</i> .....	48
Tabla 8-3	Distribución de <i>S. mutans</i> en el tiempo .....	49
Tabla 8-4	Valores promedios del recuento de <i>S. mutans</i> .....	51
Tabla 8-5	Rangos de riesgo de caries dental modificado a partir del método semi-cuantitativo Linoscreen .....	51
Tabla 8-6	Valores promedios del recuento total de <i>Streptococcus spp.</i> .....	53
Tabla 8-7	Determinación del perfil de susceptibilidad antimicrobiana para las cepas de <i>S. mutans</i> aisladas de muestras de saliva .....	55
Tabla 8-8	Efecto antagónico sobre cepas <i>S. mutans</i> de niños con caries dental .....	56
Tabla 8-9	Porcentaje de acción antagónica de cepas productoras .....	56
Tabla 8-10	Identificación de Especies de Enterobacterias en Agar MacConkey .....	57
Tabla 13-1	Interpretación de la zona de inhibición según el CLSI.....	90
Tabla 13-2	Registro fotográfico de aislamientos .....	92

#### LISTA DE FIGURAS



Figura 6-1 Distribución de la microflora humana residente. ....	16
Figura 6-2 Interrelaciones que influyen en la ecología microbiana de la boca. ....	16
Figura 6-3 Representación de las relaciones entre las especies dentro de los complejos microbianos y entre los complejos. ....	17
Figura 6-4 Microflora bacteriana en la cavidad oral. ....	18
Figura 6-5 Diagrama de Venn ....	19
Figura 6-6 Modelo de Caries. ....	20
Figura 6-7 Experiencia de caries Mundial: Índice COP-d 12 años de edad. ....	23
Figura 6-8 Experiencia de caries: Índice COP-d a los 12 años de edad. ....	24
Figura 6-9 Prevalencia de caries – Ensab IV vs Ensab III. ....	26
Figura 6-10 Distribución de los estreptococos en la boca ....	33
Figura 13-1 Formato para el recuento de <i>S. mutans</i> ....	82

### **LISTA DE FOTOGRAFÍAS**

Fotografía 8-1 Tipos de colonias de <i>S. mutans</i> . ....	49
Fotografía 13-1 Agar Mitis Salivarius ....	83
Fotografía 13-2 Cepas de <i>S. mutans</i> en medio MSB al 20% con sacarosa. ....	85
Fotografía 13-3 Cocobacilos Gram positivos de <i>S. mutans</i> en MSB al 20%. ....	85
Fotografía 13-4 Preparación de medios de cultivo ....	86
Fotografía 13-5 Vertimiento de agar en placas de petri. ....	86
Fotografía 13-6 Siembra de muestras ....	87
Fotografía 13-7 Cámara anaeróbica ....	87
Fotografía 13-8 Prueba de la Catalasa y tinción de Gram. ....	87
Fotografía 13-9 Conteo de UFC/ per ml en placas de agar ....	88
Fotografía 13-10 Determinación del efecto antagónico ....	89
Fotografía 13-11 Antibiograma realizado en cepas de <i>S. mutans</i> . ....	90
Fotografía 13-12 Antibiograma realizado en <i>S. mutans</i> ATCC 25175. ....	90
Fotografía 13-13 Agar MacConkey con bacterias Lac+ (A) y Lac- (B) ....	92



## **RESUMEN**

**Introducción:** La caries dental es un proceso infeccioso, localizado y transmisible que se caracteriza por la destrucción del tejido duro del diente. Es considerada una de las enfermedades crónicas más prevalentes a nivel mundial, afectando a cerca de cinco mil millones de personas, y los individuos son susceptibles durante toda su vida. *Streptococcus mutans*, microorganismo normal de la cavidad oral, es el principal agente etiológico asociado con el inicio de esta enfermedad. Diferentes estudios han reportado una relación entre el recuento de *S. mutans* en saliva y la incidencia y prevalencia de la caries. Los tratamientos odontológicos han demostrado disminuir los niveles de este microorganismo en saliva, sin embargo son escasas las intervenciones educativas con el mismo resultado. En Colombia, no existen estudios que evalúen el impacto de una intervención educativa en salud oral sobre la microflora de niños diagnosticados con caries dental. El presente estudio tuvo como objetivo el aislamiento y recuento total de *S. mutans* en muestras de saliva provenientes de 23 niños de 3 a 6 años de edad con caries dental antes y después (0, 3 y 6 meses) de llevarse a cabo un proceso educativo en salud oral.

**Métodos:** Con este fin se tomó saliva no estimulada de niños pertenecientes a un Centro Educativo en la ciudad de Bogotá. Posteriormente, fueron agitadas en vortex y diluidas en base 10, se tomaron 100µl de las 3 últimas diluciones ( $10^{-5}$ ;  $10^{-6}$ ;  $10^{-7}$ ) y se cultivaron en Agar Mitis Salivarius suplementado con Bacitracina y Sacarosa al 20% para el aislamiento selectivo y recuento de *S. mutans* y, Agar Infusión Cerebro Corazón, bhi, suplementado con sangre de cordero al 5% para el recuento total de microorganismos aeróbicos. Las cajas de petri fueron incubadas en anaerobiosis durante 2 días a 37°C. Después de la confirmación por prueba de la catalasa y tinción de Gram, las cepas de *S. mutans* aisladas fueron sometidas a la determinación del efecto antagónico y de susceptibilidad antimicrobiana.

**Resultados:** El examen clínico determinó que 12 niños (52,2%) fueron ICDAS 3 y 11 (47,8%) niños fueron ICDAS 6. La frecuencia de aislamiento de *S. mutans* en saliva fue de 69,6%. Los valores promedios de los recuentos de microorganismos aeróbicos totales y de *Streptococcus spp.*, totales no fueron estadísticamente significativos,  $p > 0.05$ . Sin embargo, los recuentos de *S. mutans* demostraron una reducción significativa del 86% a los 6 meses de haber iniciado el proceso educativo en salud oral,  $p = 0,02$ . Las 20 cepas de *S. mutans* sometidas al ensayo de doble capa en Agar BHI para determinar el efecto antagónico, demostró diferentes tipos de acción antagónica sin obtener inhibición completa sobre alguna de ellas. La mayoría de los aislamientos, 14 (70%), fueron sensibles a los antimicrobianos evaluados por el método de difusión en agar, Kirby-Bauer.

**Conclusión:** Estos resultados indican que la intervención educativa en salud oral produce una reducción significativa en los niveles de *S. mutans* en saliva de niños con caries dental después de 6 meses de iniciar el estudio.

**Palabras claves:** Caries dental, niños, *Streptococcus mutans*, UFC/ml, saliva.





## ABSTRACT

**Introduction:** Dental is a localized, transmissible, pathological infectious process characterized by the destruction of hard tooth tissue. It is considered one of the most prevalent chronic diseases worldwide, affecting about five billion people, and individuals are susceptible throughout their lives. *Streptococcus mutans*, normal microorganism from the oral cavity, is the major etiological agent associated with the onset of this disease. Several studies have reported a relationship between the count of *S. mutans* in saliva and the incidence and prevalence of caries. Dental treatments has been show to decrease the levels of this microorganism in saliva, however are few educational interventions with similar result. In Colombia, there are no studies where evaluating the impact of an educational intervention in oral health on the oral microbiota of children diagnosed with dental caries. The present study aimed to enumerate and isolate *S. mutans* on saliva samples from 3-6 years old children with dental caries over a period of 6 months after an educational process in oral health.

**Methods:** Unstimulated saliva was collected from 3 to 6 years old children from a school in Bogotá. Saliva samples were vortexed and serially diluted, aliquots of 100µl of last three dilution ( $10^{-5}$ ;  $10^{-6}$ ;  $10^{-7}$ ) were cultured on Mitis Salivarius Agar supplemented with 20% sucrose and bacitracin 0.2U/ml to the selective isolation and enumeration of *S. mutans*, and Brain Heart Infusion, bhi, supplemented with 5% sheep blood to total enumeration of aerobic microorganisms. Plates were incubated anaerobically for two days at 37°C. After confirmation by catalase test and Gram stain, *S. mutans* strains isolated were subjected to determination of both the antagonistic effect and antimicrobial susceptibility.

**Results:** Clinical examination determined that 12 children (52,2%) were ICDAS 3 and 11 children (47,8%) were ICDAS 6. The frequency of isolation of *S. mutans* in saliva was 69, 6%. The average values of the counts of total aerobic microorganism and total *Streptococci* were not statistically significant,  $p > 0.05$ . However, the counts of *S. mutans* showed a significant reduction of 86% at 6 months after starting the educational process in oral health,  $p = 0,02$ . Antagonistic effect on the 20 strains of *S. mutans* was determined using double layer agar technique; showed different types of antagonist action without obtain complete inhibition on any of them. Most of the isolates, 14 (70%), were sensitive to the antibiotics studied for agar diffusion test, Kirby-Bauer.

**Conclusions:** These results indicate that the oral health educational intervention produced a significant reduction in levels of *S. mutans* in the saliva of children with dental caries after six months of study began.

**Key words:** Dental caries, child, *Streptococcus mutans*, Colony forming units, saliva.



## 1. INTRODUCCIÓN

La caries dental es una enfermedad infecciosa de origen bacteriano y de carácter multifactorial, que causa la disolución mineral de los tejidos duros del diente por los productos finales del metabolismo ácido de las bacterias acidúricas, capaces de fermentar carbohidratos a ácido láctico, afectando el esmalte, la dentina y el cemento (1). Se reconoce que es una enfermedad ampliamente extendida en el mundo que ha sido y sigue siendo la enfermedad crónica más frecuente del hombre, afectando en mayor medida a niños y por su carácter crónico avanza con la edad si no se hacen esfuerzos para controlar su progresión (2-4). En la actualidad, la distribución y severidad de la misma varía de una región a otra y su aparición está fuertemente asociada con factores socioculturales, económicos, del ambiente y del comportamiento. Además, es considerada como uno de los mayores problemas de salud oral en la mayoría de países en desarrollo, llegando a afectar entre 60% y 90% de la población escolar y adulta (5,6).

Actualmente se considera como un desequilibrio ecológico dentro del biofilm oral, antes llamado placa dental, que conduce al predominio de ciertos microorganismos "cariogénicos", llamados así por su capacidad de producir ácido y la desmineralización del diente. Ha sido tradicionalmente pensado que dos especies que pertenecen al grupo "*mutans*" de los estreptococos, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, son la etiología responsable de la caries dental (7,8). Sin embargo, *S. mutans* es considerado como el microorganismo cariogénico más importante en el desarrollo de la caries del esmalte. Diversos estudios se han realizado con el fin de establecer la asociación entre *S. mutans* y caries dental, obteniendo como consideración concluyente que es un factor de riesgo en la aparición de la enfermedad según modelos informáticos y métodos para el recuento desarrollados con este fin (9,10). Concretamente, se describe que existe una relación directa entre los altos recuentos de *S. mutans* y la tasa de incremento de caries, reconociéndose como veraz; siendo, por otro lado, la población infantil la más vulnerable e importante al momento de evitar la infección temprana de dicho microorganismo, clave en el riesgo de desarrollo de caries donde estas lesiones tienen una alta prevalencia (11). Sin embargo, pruebas contradictorias han demostrado que los altos recuentos de *S. mutans* se relacionan débilmente o no existe asociación alguna con los patrones de caries. En oposición con el papel asumido de *S. mutans* en la caries dental, recuentos similares se han obtenidos entre los niños de diversos países de África, Europa, y América del Norte con tasas diferentes de caries y en poblaciones radicalmente diferentes una de otra en aspectos raciales, sociales y culturales (7). En consecuencia, la variación en el patrón de caries clínica observada en estas poblaciones divergentes no puede explicarse sólo por el número de *S. mutans*.

La directa relación que existe entre la presencia de microorganismos y la prevalencia de caries, la naturaleza infecciosa de esta patología y el reconocimiento, aislamiento e identificación de características específicas de los gérmenes han permitido determinar el nivel de riesgo frente a la posibilidad de desarrollar caries, como también la severidad o grado de avance que esta puede adquirir (1). Algunos estudios han registrado que a la edad de un año aproximadamente 5% de los niños presentan caries dental, a los 2 años de edad entre 24% y 33%, entre los 3 y 5 años el 40% a 80% presentan dientes deciduos cariados. A los 8 y 10 años, el 60% a 95% de los niños tienen caries dental y a los 12 años cuando la mayor parte de la dentadura ha erupcionado más del 90% de los niños escolares presentan destrucción dental, éstas cifras varían según grupo étnico, estado nutricional, antecedentes natales o nivel socioeconómico, siendo que a mayor edad aumentan las lesiones de caries y su severidad (12).

Los datos más recientes de los países desarrollados demuestran que el rango de porcentaje de niños libres de caries a la edad de 5-6 años va de 50% en EE.UU., hasta 72% en Suecia, mientras que en los países europeos en desarrollo, la experiencia de caries en niños de 5 y 6 años es más alta, con un rango de variación del porcentaje de niños libres entre 10 y 30% (13). Su distribución mundial sigue siendo considerable, aunque hay reportes de una tendencia a la declinación en los países



desarrollados. La población infantil y adolescente es un grupo humano muy vulnerable, y, sin ser un problema que comprometa la vida, constituye actualmente una de las patologías más frecuentes y costosas, que se presenta de por vida (14). Estudios realizados en Colombia en niños con difícil acceso a los servicios de salud revelan que, aproximadamente el 5% de los niños con 1 año de edad, presentan caries, aumentando para el 10% en el segundo año de vida, de manera que a los 5 años, 3 de cada 4 niños en edad preescolar presentan caries en dientes deciduos (2).

En el 2004, la Organización Mundial de la Salud (OMS) al anunciar las conclusiones del informe mundial de salud oral, declaró que alrededor de cinco mil millones de personas en el planeta han sufrido caries dental. Con este panorama, se prevé que esta enfermedad sigue siendo un aspecto fundamental de las condiciones generales de salud en las Américas, por la importancia que tiene como parte de la carga global de morbilidad, los costos relacionados con su tratamiento (operatoria y rehabilitación oral), pérdida de dientes y la posibilidad de aplicar medidas eficaces de prevención (6).

Debido a esto, numerosos esfuerzos se han hecho por parte de las organizaciones internacionales y la comunidad odontológica para prevenir, tratar y controlar una de las enfermedades que más afecta a la población mundial; sin embargo, sigue siendo la enfermedad infecciosa más recurrente en el mundo. El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de *S. mutans* y establecer su recuento en niños con caries dental antes y después de un proceso educativo en salud oral.

Los resultados de esta investigación ayudarán, como fin último, a concluir si el proceso educativo adelantado en estos niños fue eficaz en cuanto a reducción de *S. mutans* y, además, a desarrollar nuevas estrategias para prevenir o retardar la adquisición de este microorganismo.

## **2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Existen diferencias significativas en el recuento de *Streptococcus mutans* en niños con caries dental antes y después de un proceso educativo en salud oral?

## **3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En muchas partes del mundo las acciones realizadas por instituciones de salud, en la prevención y control de la caries dental, no han sido suficientes para lograr una reducción significativa de la enfermedad. La caries dental es una de las mayores enfermedades crónicas y multifactoriales más comunes en el mundo. Esta enfermedad pone en peligro a los seres humanos no solo durante la infancia y la adolescencia sino a lo largo de su vida. La OMS ha definido la caries dental como un proceso localizado que se inicia después de la erupción dentaria, determinando el reblandecimiento del tejido duro del diente y que evoluciona hasta la formación de una cavidad. Su diagnóstico se realiza mediante indicadores internacionales desarrollados para determinar el estado de salud bucal de la población, entre los cuales, los más utilizados a nivel mundial son el ICDAS y COP-D (5,15,16).

La etiopatogenia se asocia con la presencia de ciertos microorganismos. El concepto actual contempla que varios microorganismos se incluyen en la patogénesis de la caries dental (estreptococos del grupo “*mutans*”, *Lactobacillus spp* y *Actinomyces spp*); de los cuales *Streptococcus mutans*, microorganismo normal de cavidad oral, es considerado el principal agente causal de la caries dental (17,18). Diferentes estudios han mostrado una correlación entre los recuentos de *S. mutans* en la cavidad oral y la prevalencia e incidencia de caries, a pesar de que en otros estudios no se ha encontrado correlación entre la cantidad de *S. mutans* y la incidencia de caries dental (19). Aguilera y cols. 1996 (20), determinaron la presencia de *S. mutans* en saliva y su relación con caries dental en niños, lo que permitió establecer que el 71% de sujetos de estudio presentaron un riesgo muy alto de desarrollar caries dental de acuerdo con el recuento de *S. mutans*



(actividad de caries de acuerdo con Unidades Formadoras de Colonias por mililitro, UFC/ml, de *S. mutans*). Por otro lado, Sánchez y cols. 2007 (21), estudiaron la distribución de estreptococos cariogénicos, los niveles de infección y su asociación con la incidencia de caries y encontraron que un 80% de los estreptococos correspondieron al grupo mutans, y el 20% restante correspondió a otros estreptococos. En general, estudios de niveles de colonización e incidencia en grupos de niños, realizados en Latinoamérica han demostrado una significativa correlación entre *S. mutans* y caries dental. Sin embargo, cabe mencionar que la caries dental es multi-causal y no siempre los responsables son estos estreptococos, además también participan factores abióticos en su desarrollo (22).

El reconocimiento de *S. mutans* como el microorganismo más importante en la iniciación de la caries dental, ha conducido al diseño de medidas de prevención y control dirigidas a la eliminación o disminución de este microorganismo en la cavidad oral (15,16). Además de caries dental e infecciones dentales piogénicas relacionadas, *S. mutans* es también un agente de endocarditis bacteriana muy importante. El aforismo <a más *S. mutans*, más caries> permite plantear la utilización de estos conocimientos desde dos perspectivas complementarias: 1. en el diagnóstico, el reconocimiento de *S. mutans* para identificar a los individuos con riesgo; y 2. en prevención, la erradicación de *S. mutans* para eliminar el riesgo de caries (19).

Del mismo modo, estudios epidemiológicos indican una diferencia en la incidencia de caries en varios países (23,24). En países industrializados, se observa una disminución de la prevalencia de hasta del 15% de la enfermedad (11). La razón de la mejora de las condiciones de la salud oral se atribuye a diversos factores, entre ellos la fluoración del agua, el uso de pasta dental con fluoruro, una dieta saludable que contiene sustitutos de sacarosa y educación para la salud oral (23). En los países en desarrollo, la incidencia de la caries dental todavía se mantiene en un nivel alto. Estudios realizados a principios de la década de 1990 en algunos países latinoamericanos como República Dominicana, Argentina, Venezuela, Ecuador, informaban que entre 85% y 97% de la población presentaba esta enfermedad (6). Colombia por desgracia pertenece a este grupo de naciones, donde las acciones realizadas por diferentes entidades de salud no han logrado disminuir la caries dental, que aún persiste en más del 90% de la población (15). Siendo de mayor prevalencia en niños y, sus efectos aumentan en la medida que la edad es mayor. Los factores que influyen en la prevalencia de caries dental son: presencia de microorganismos cariogénicos en saliva y placa dental, diente susceptible y sustrato adecuado –azúcares-.

Según el III Estudio Nacional de Salud Bucal – ENSAB III (1998) realizado en Colombia, se han evidenciado que pese a las reducciones aún hoy se cuenta con altas prevalencias de caries, al pasar de 73.2% en el Ensab II a 65,3%% en el Ensab III, dando cuenta de un panorama de morbilidad que requiere abordarse con nuevas estrategias de promoción y prevención. En la infancia, a pesar de la reducción en la tendencia, aún se mantiene una alta historia de caries en la dentición primaria (60,4% de los niños de 5 años y 73,8% a los 7 años) y una alta prevalencia (54,8% a los 5 años y 63,8% a los 7 años) (25). De momento, los resultados parciales entregados por el Gobierno Nacional con el Ensab IV, realizado a finales del año 2014, reflejan la tendencia a la reducción significativa de la prevalencia en esta enfermedad; especialmente en los niños de 12 años con 38% y, la población adolescente con un 44%. Es importante mencionar que es la primera vez en Colombia que la encuesta se aplica a niños de 1 y 3 años. Por esta razón, la magnitud del problema obliga a una gran inversión de recursos en tratamientos que podrían evitarse si se aumenta las estrategias de educación y prevención (26).

De acuerdo con este panorama, los datos obtenidos a nivel mundial y regional indican que los niños que se encuentran en edad preescolar representan el grupo etario en situación de alto riesgo; razón por la cual es importante diseñar medidas de prevención dirigidas hacia la eliminación o disminución de la caries dental.



En suma, el presente estudio pretende realizar el recuento, aislamiento e identificación de *S. mutans* en muestras de saliva de niños con caries dental en edades de 3 a 5 años que llevan un proceso educativo de salud oral. El recuento e identificación de *S. mutans* permitirá determinar cómo la acción de un proceso educativo en salud oral puede disminuir la prevalencia de *S. mutans* en niños con caries dental.

#### **4. HIPOTESIS**

Los niveles en los recuentos de *Streptococcus mutans* en muestras de saliva de niños con caries dental difieren significativamente antes del proceso educativo en salud oral con relación a las medidas de los recuentos después de someterse al proceso educativo.

H<sub>0</sub>: No hay diferencias significativas en las medidas de los recuentos de *S. mutans* antes y después del proceso educativo.

H<sub>1</sub>: Existen diferencias significativas en las medidas de los recuentos de *S. mutans* antes y después del proceso educativo.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1. Objetivo general**

Determinar la presencia de *Streptococcus mutans* en niños con caries dental antes y después de un proceso de educación en salud oral.

##### **5.2. Objetivos específicos**

1. Identificar *Streptococcus mutans* en muestras de saliva en niños con caries dental antes y después de un proceso educativo en salud oral.
2. Determinar el recuento de *Streptococcus mutans* en niños con caries dental antes y después de un proceso educativo en salud oral.
3. Determinar el recuento de microorganismos aeróbicos totales y estreptococos totales en niños con caries dental antes y después de un proceso de educación.
4. Determinar la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas *S. mutans* aisladas de muestras de saliva en niños con caries dental antes y después de un proceso educativo en salud oral, y determinar el efecto antagónico que producen sobre estas cepas, cepas productoras tipo ATCC.
5. Determinar la presencia de Enterobacterias en muestras de saliva de niños con caries dental antes y después de un proceso educativo en salud oral.

#### **6. MARCO TEÓRICO**

##### **6.1. Ecología microbiana**

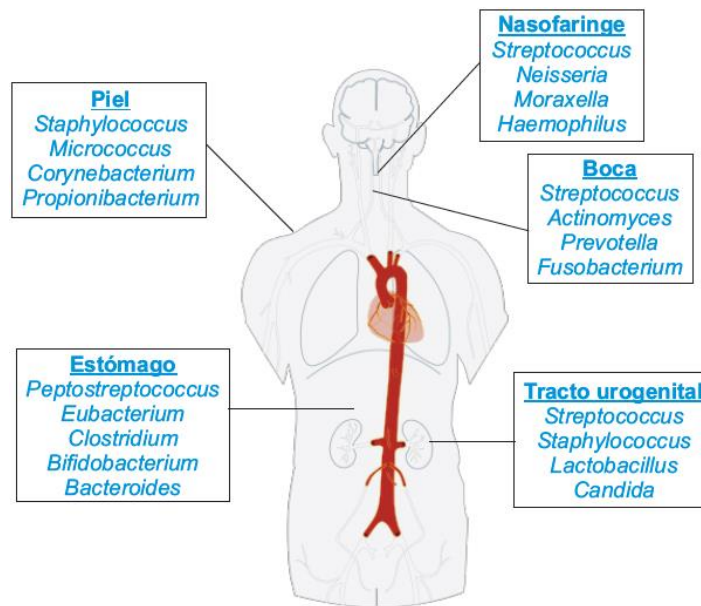


**La boca es la puerta de entrada del cuerpo humano al ambiente externo y representa uno de los mayores complejos biológicos. Consta de una membrana mucosa cubierta con un epitelio escamoso estratificado queratinizado (i.e. paladar) y un epitelio no queratinizado, la superficie papilar de la lengua y las estructuras duras no mudables de los dientes encima y por debajo del margen gingival, con diferentes superficies, ranuras y huecos. Estos sitios constituyen nichos ecológicos o ecosistemas primarios que poseen diferentes características físicas, químicas y nutricionales que permitirán el desarrollo de unas u otras especies microbianas. Los ecosistemas primarios orales son: mucosa, dorso de la lengua, superficies dentales, surco gingival, materiales biocompatibles, saliva, la película adquirida y las placas dentales, además de otros sistemas que comprenden la piel, el sistema digestivo y urogenital como los ilustra la**

Figura 6-1. Aquí es donde las primeras fases del proceso digestivo tienen lugar y, por ende, la boca está abundantemente dotada con funciones sensoriales (gusto, olor, temperatura y textura). Actualmente, estudios de salud oral han reafirmado un concepto anterior que la salud oral se encuentra inextricablemente ligada a la salud general y viceversa. Las enfermedades que se encuentran localizadas en alguna parte del cuerpo pueden reflejarse en la boca y, como resultado, la saliva es cada vez más reconocida como un fluido diagnóstico clave. Por lo tanto, la boca es una de las principales interfaces entre el cuerpo y el ambiente externo, y puede actuar como un sitio de entrada para algunos patógenos microbianos, especialmente a partir del aire o a través de la ingestión de la dieta. El mantenimiento de una cavidad oral saludable, en consecuencia, es de vital importancia para la autoestima de la persona y el bienestar general (27).

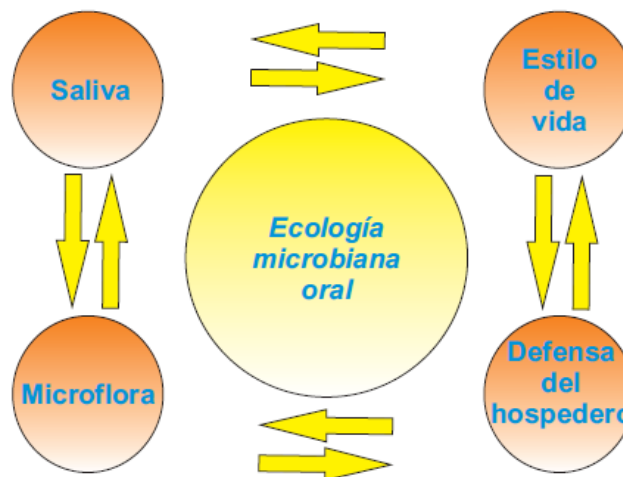
Como se ha descrito, la cavidad oral posee la característica similar a otros sitios en el cuerpo en tener una microflora natural con una composición característica y existente, en su mayor parte, en una relación armoniosa con el anfitrión. Tal vez con más frecuencia que en otras partes del cuerpo, esta relación puede romperse en la boca y la enfermedad se puede originar. Esto generalmente está asociado con cambios importantes en la biología de la boca de fuentes exógenas (tratamiento antibiótico o el consumo frecuente de carbohidratos fermentables en la dieta) o endógenas (alteraciones en la integridad de las defensas del huésped luego de terapia con drogas que perturban la estabilidad natural de la microflora, además de la presencia de microorganismos que normalmente no son accesibles para ellos accesos o endocarditis) como se puede observar de manera esquemática en la Figura 6-2. Así, la composición y el metabolismo de las bacterias en un sitio estarán influenciados por la tasa de flujo y las propiedades de la saliva, el estilo de vida (tratamiento con antibióticos, tabaquismo y, consumo de carbohidratos en la dieta, etc.), y la integridad de las defensas del huésped (27).





**Figura 6-1 Distribución de la microflora humana residente.**  
Fuente: (27)

Las bacterias con potencial para causar enfermedad de esta manera se denominan “patógenos oportunistas”, y muchos microorganismos orales tienen la capacidad de comportarse de esta manera. De hecho, la mayoría de las personas sufren en algún momento de su vida episodios localizados de enfermedad en la boca causada por desequilibrios en la composición de su microflora residente, en los que ciertos microorganismos se ven favorecidos por las condiciones establecidas a partir del hospedero y el ambiente. Las manifestaciones clínicas más comunes de dichos desequilibrios son la caries dental y la enfermedad periodontal, las cuales son muy frecuentes en sociedades industrializadas y ahora se encuentran en aumento en países en desarrollo; otras infecciones agudas y crónicas se originan pero con menos frecuencia (27).

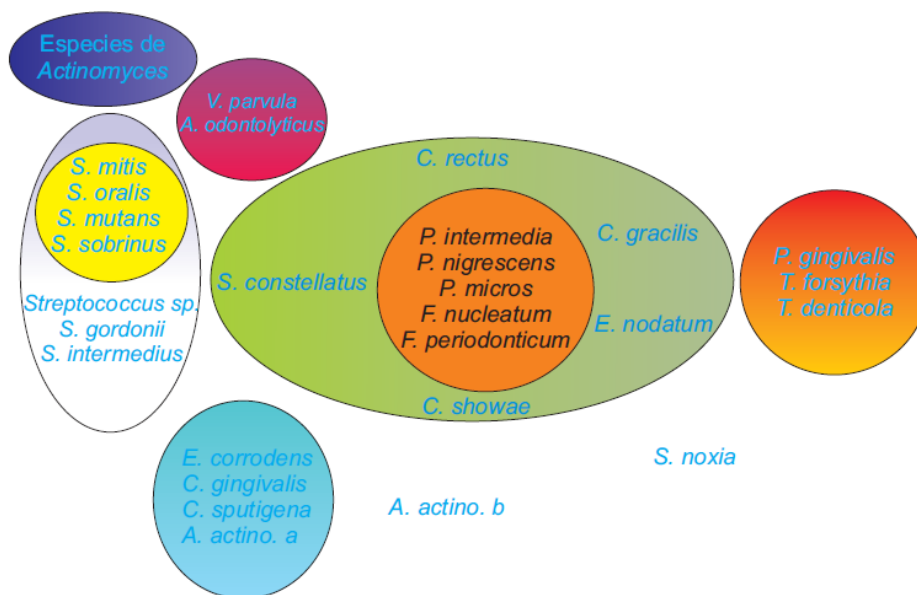


**Figura 6-2 Interrelaciones que influyen en la ecología microbiana de la boca.**  
Fuente: (27)



La cavidad oral es un ecosistema donde cohabitan principalmente comensales –aproximadamente  $10^{10}$  bacterias, siendo el 60% cultivables – pertenecientes a aproximadamente entre 500 y 700 especies, que colonizan las mucosas y dientes donde forman el biofilm, entre las cuales están los miembros del género *Streptococcus*. Las especies más importantes en el humano en caries dental son *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*. Estos se han caracterizado como colonizadores secundarios del biofilm que rodea a los dientes y su patogenicidad se ha demostrado en relación a la producción de caries del esmalte, debido a la capacidad que poseen de producir ácidos a partir de la sacarosa (22).

La mayoría de las enfermedades de la boca tienen una etiología poli-microbiana (múltiples especies). La habilidad de los consorcios de bacterias para causar la enfermedad depende del resultado de diversas interacciones tanto entre los propios microbios, y entre estos microorganismos y el hospedero. Puede ser necesario, por lo tanto, tomar un enfoque más global cuando relacionamos la microflora oral a la enfermedad. La actividad y el comportamiento de estos microorganismos están íntimamente ligados a otros sistemas biológicos en la boca. Socransky y cols. (28) describieron cinco complejos microbianos, en el cual las especies que conforman estos complejos están estrechamente asociadas, como se ilustra en la Figura 6-3. Según él, la colonización inicial parece involucrar a los miembros de los complejos verde, naranja y púrpura junto con las especies de *Actinomyces*. Esto lleva a la sucesión autogénica, luego colonizan los miembros del complejo azul celeste y posteriormente los del naranja pasan a ser dominantes y actuarían como puentes entre los colonizadores tempranos y los colonizadores más tardíos constituidos por el complejo rojo (27,29).



**Figura 6-3 Representación de las relaciones entre las especies dentro de los complejos microbianos y entre los complejos.**

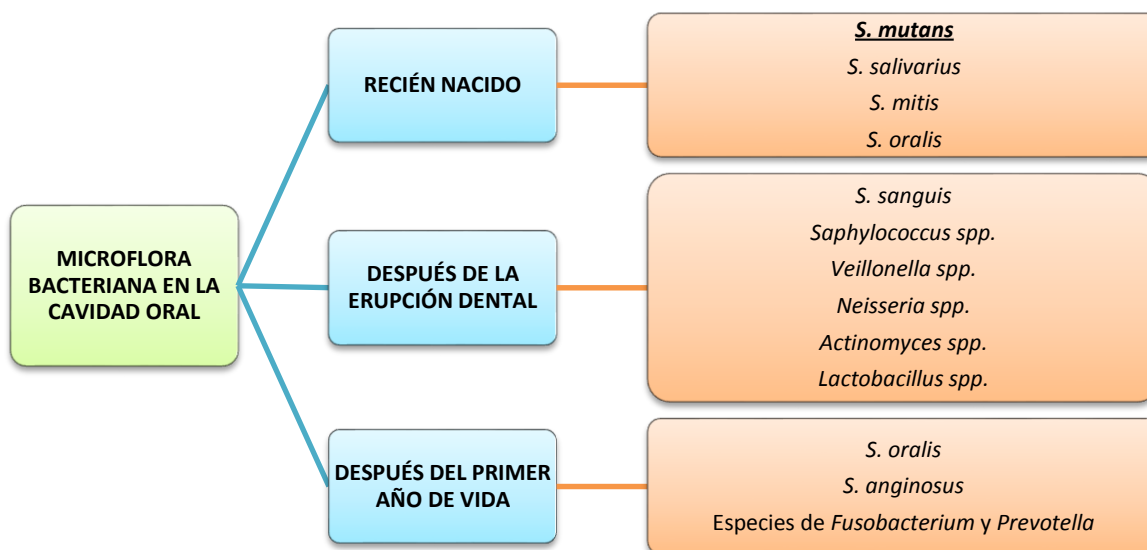
Fuente:(28)

El ambiente de la cavidad oral se transforma constantemente con la edad, y a su vez el microbioma oral se modifica. Durante los dos primeros meses de vida del bebe, las bacterias colonizan sólo las superficies mucosas, y con la erupción de los dientes temporales, aparecen las superficies duras no mudables, que también están colonizadas por microorganismos provenientes del contacto directo con la madre. Con la erupción de los dientes origina al mismo tiempo la aparición de un nuevo





entorno – un surco gingival con una fuente separada de nutrientes. Así, con el paso del tiempo se van estableciendo complejos de microorganismos en la boca del infante, véase en la Figura 6-4. Las condiciones ambientales tales como la temperatura, la salinidad, el acceso a oxígeno, el acceso a nutrientes, condiciones de pH y el potencial redox tiene un impacto sobre el ecosistema y contribuyen a la composición de las especies del biofilm presentes en cada lugar. Además, toda la cavidad bucal está constantemente humedecida con saliva, una secreción rica que contiene innumerables cantidades de diferentes tipos de ingredientes biológicamente activos. La saliva es utilizada por el biofilm oral como un sistema de entrega, en el cual, el flujo de saliva permite la admisión de nutrientes esenciales para las bacterias, pero por otro lado, promueve la eliminación mecánica de las bacterianas de las superficies colonizadas. Por tanto, la tasa de flujo de saliva y su capacidad como buffer son críticos no sólo en el inicio y desarrollo de la caries dental sino también en el proceso de re-mineralización de las lesiones de caries tempranas. Considerada, también, como el principal vehículo de transmisión de *S. mutans* por contacto físico entre madre-hijo (transmisión vertical) y entre personas del entorno (transmisión horizontal) que podrían actuar como reservorio de microorganismos de la cavidad oral (30).



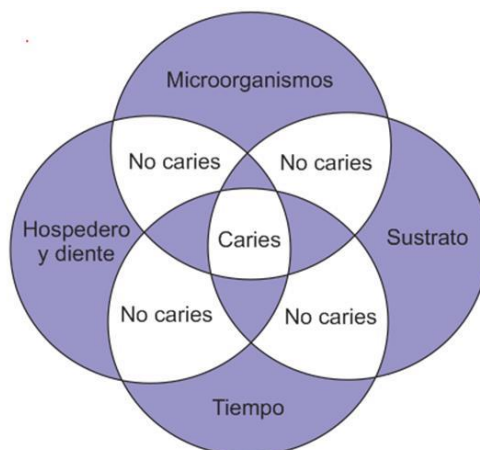
**Figura 6-4 Microflora bacteriana en la cavidad oral.**

Fuente: (31)

La flora comensal, característica de un ecosistema en equilibrio, mantiene relaciones estables con el huésped, sin consecuencias patológicas. En la cavidad oral, constituye una flora compatible con el estado de salud bucodental. Aprovechando un desequilibrio del ecosistema al que pertenecen, algunas bacterias comensales pueden convertirse en patógenas. El desequilibrio proviene de una modificación del medio. Puede producirse por disminución de algunos factores de inhibición, con lo que el huésped ofrece un terreno debilitado del que se aprovechan una o varias especies. También puede producirse un aumento importante de un aporte nutritivo exógeno que favorece a una especie determinada en su competencia con las otras especies (32).

## 6.2. Caries dental

Es una de las enfermedades infecciosas multifactoriales más comunes en todo el mundo, caracterizada por la progresiva desmineralización de los dientes o de las superficies radiculares después de la acción del ácido producido principalmente del metabolismo de los carbohidratos fermentables en la dieta por las bacterias que colonizan la superficie del diente (placa dental). Los principales factores que predisponen al inicio del proceso de las caries son: 1) la presencia de las especies bacterianas capaces de disminuir el pH hasta valores críticos de 5.5, 2) la ausencia de higiene oral adecuada, 3) una respuesta inmune anti-caries ineficiente, 4) el tipo de dieta alimentaria y 5) la estructura de los dientes (27,33). En el modelo clásico desarrollado por Keyes en el año 1960, el cual se representa por medio del diagrama de Venn - Figura 6-5, los microorganismos de la placa, el sustrato fermentable de carbohidratos, una superficie susceptible de diente, y el tiempo están implicados en la iniciación y progresión de la caries dental; este último factor fue después agregado, el cual es fundamental para el desarrollo de la enfermedad. Es imprescindible que los cuatro factores deban estar presentes y actuar juntos para que se produzca y progrese la caries.



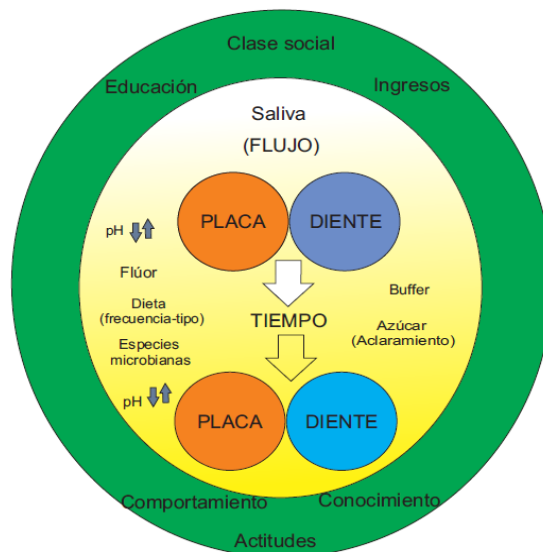
**Figura 6-5 Diagrama de Venn**

Fuente: (34)

Es considerada como un proceso patológico complejo de origen infeccioso y transmisible que afecta a las estructuras dentarias y se caracteriza por un desequilibrio bioquímico; de no ser revertido a favor de los factores de resistencia, conduce a cavitación y alteraciones del complejo dentino-pulpar. Este proceso patológico, bajo ciertas circunstancias, puede considerarse como una enfermedad infecciosa causada por la flora normal de la cavidad bucal. Como muchas enfermedades infecciosas, una masa crítica de bacterias cariogénicas es un pre-requisito, y esta masa crítica puede obtenerse solamente en presencia de sacarosa, un sustrato en el cual la bacteria cariogénica se desarrolla. Así, la caries dental involucra la interacción en el tiempo de una superficie dental susceptible, las bacterias cariogénicas y la disponibilidad de una fuente de carbohidratos fermentables, especialmente sacarosa. Además de factores propios del huésped y su relación con el entorno, existen factores sociales, económicos, y educativos que están involucrados en el establecimiento, desarrollo y progreso de la caries dental. A partir de esto, se plantea un modelo biopsicosocial en odontología, en el cual se comienza a considerar la cavidad bucal como un ecosistema, cambiando el enfoque de tratamiento curativo a preventivo. En la Figura 6-6 podemos observar el modelo claramente representado (35).

A diferencia de la mayoría de las enfermedades infecciosas, la caries dental es transmitida verticalmente de madre a hijo. El genotipo del *Streptococcus mutans* de los niños se equipara al de sus madres en el 70% de las veces siendo el mayor reservorio de estas cepas. También existe la

transmisión horizontal, ya que en estudios recientes se encontró que los niños compartían los mismos genotipos de *S. mutans* con las personas de su entorno (21,36).



**Figura 6-6 Modelo de Caries.**

Fuente: (4)

Finalmente, este tipo de patología plantea distintos desafíos a la hora de determinar su etiología microbiana. Esta enfermedad se produce en sitios con una diversidad pre-existente, microflora natural residente, que es re-emplazada por otra microflora aún más compleja pero con un consorcio de microorganismos diferente que se encuentra implicada en la patología. Es necesario, por lo tanto, determinar qué especies microbianas se encuentran directamente implicadas en el proceso de la enfermedad, cuáles están presentes como resultado de la enfermedad y cuáles son simplemente transeúntes comensales. Importantes estudios han demostrado que estas enfermedades comunes son causadas por cambios en el equilibrio de la microflora residente, en la que algunos componentes menores de la placa dental se vuelven predominantes debido a un cambio en las condiciones ambientales locales (27).

### 6.3. Microorganismos cariogénicos

Aunque se considera a *S. mutans* como el primer responsable de la caries del esmalte, esto no quiere decir que sea el único microorganismo responsable del proceso carioso, ni que él sea siempre cariogénico. Actualmente, se reconoce que tres géneros de bacterias son patógenas para los tejidos duros del diente, descritas en orden de frecuencia como sigue: 1. *S. mutans* (principalmente el serotipo c y en menor proporción *S. sanguis*, *S. cricetus*, *S. sobrinus*, y *S. gordonii*); 2. Especies de *Lactobacillus* y; 3. *Actinomyces* (15,32,35,37).

Para que cualquiera de ellas sea patógena debe cumplir con algunos requisitos:

1. Adherirse a receptores específicos
2. Poseer una tasa de reproducción alta
3. Invadir o elaborar sustancias nocivas
4. Cumplir los postulados de Koch



En un estudio de investigación realizado por Cephas y cols. 2011 (38), alta diversidad bacteriana se observó en la saliva de adultos e infantes. *Streptococcus* fue el género predominante en la saliva de infantes. *Veillonella*, *Neisseria*, *Rothia*, *Haemophilus*, *Gemella*, *Granulicatella*, *Leptotrichia* y *Fusobacterium* fueron también los géneros predominantes en muestras de infantes, mientras que *Haemophilus*, *Neisseria*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Oribacterium*, *Rothia*, *Treponema* y *Actinomices* fueron predominantes en adultos.

La colonización en la cavidad oral de los niños por microorganismos que se consideran asociados con el desarrollo de caries está relacionada con su transferencia por la saliva de personas cercanas con el entorno íntimo del niño. Muchos datos sugieren que la colonización oral por *S. mutans* sucede a través del contacto directo e indirecto con personas relacionadas con el niño, quienes en su cavidad oral están colonizados por dichos microorganismos. Usualmente la madre es el primer transmisor de microorganismos cariogénicos, sucediendo en aproximadamente el 60% de los infantes cuando el nivel de microorganismos en la saliva de la madre asciende a  $10^5$  o más unidades formadoras de colonias por mililitro de saliva (UFC/ml) en comparación con el 6% cuando el nivel bacteriano en la saliva de la madre es de  $10^3$  CFU/ml de saliva (38). Estudios de adquisición temprana de *S. mutans* por infantes (30) demostraron que a los 18 meses del nacimiento el 20,8% de los niños tenían el microorganismo.

### **6.3.1. Caries de la infancia temprana**

En los últimos años se ha descrito como una enfermedad de origen multifactorial presente en infantes menores de 6 años de edad. También conocida como “caries del biberón”, “caries del lactante”, “caries de la botella de crianza”, “caries del hábito de lactancia prolongada”, entre otras. Actualmente se define como “la presencia de una o más lesiones de caries activas (cavitadas, no cavitadas), dientes ausentes por caries y obturaciones en cualquier diente temporal. La característica de la etiología de la caries de infancia temprana, radica en la influencia de factores únicos en los infantes, relacionados a la implantación temprana de los microorganismos cariogénicos, a la inmadurez del sistema de defensa del huésped, así como a los patrones del comportamiento asociados a la alimentación y la deficiente higiene oral en los infantes. Los factores socioculturales presentan una marcada influencia en la instauración, progresión y severidad de la enfermedad; adicionalmente, ciertos condicionantes externos, como la conducta del niño, el nivel de conocimiento y actitudes de los padres, malnutrición y la presencia de enfermedades crónicas o procesos infecciosos específicos como la otitis, se han relacionado con un mayor riesgo de caries dental en infantes (31,39,40).

En Colombia una de las principales causas de morbilidad encontrada en consultas externas odontológicas son las enfermedades orales, más específicamente la caries dental, la cual es la primer causa de consulta, ilustrado en los 3 Estudios Nacionales de Salud Bucal (Ensab III), en los que resalta, a su vez, que la población escolar de 5, 6,7 y 12 años presentó una prevalencia de caries de 45.7% en dentición temporal y 28% en permanente. Estas enfermedades influyen negativamente en el ámbito social y económico, pues el tratamiento de las mismas es costoso; a su vez crean malestar; dolor y no toda la población es consciente de la necesidad de su prevención (39,41).

Además de afectar a la población adulta es muy común en la población infantil, siendo la más vulnerable; observando la tendencia de esta dolencia al afectar a los niños menores de 5 años y teniendo presente que esta población no fue contemplada en el Ensab y otros estudios a nivel nacional son escasos, el personal de la salud es el principal canalizador de las acciones educativas orientadas a este grupo poblacional. En la actualidad se considera un problema de salud pública que afecta a los infantes en todo el mundo (39,41).

A pesar de los esfuerzos y los avances en los conocimientos sobre la enfermedad, su prevención y control, se reporta que el problema no ha mejorado en las últimas décadas en los niños con dentición



primaria, como sí ha ocurrido en la población en edad escolar. Algunos autores afirman que por su carácter prevenible, la presencia de caries en la primera infancia debería verse como una falla en el sistema de salud y que la salud bucal de los niños, en particular de aquellos en edad preescolar, es reflejo de inequidades en salud en la población, por cuanto éstos constituyen el grupo con mayores necesidades insatisfechas en salud bucal. Es así, que las acciones en la prevención y/o diagnóstico precoz deben estar enfocadas a la población infantil con el fin de reducir su prevalencia, especialmente en países en desarrollo (42).

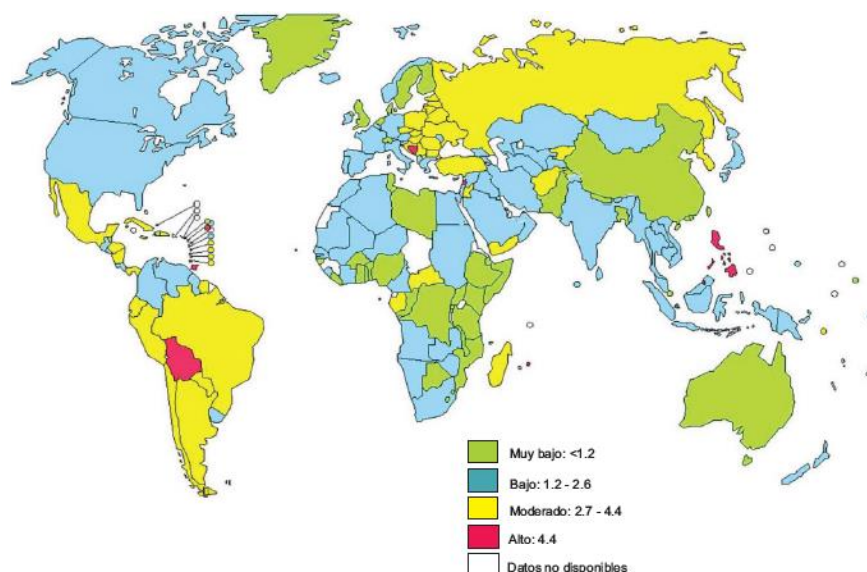
### **6.3.2. Epidemiología de la caries dental**

La caries se ha considerado un problema de salud pública por ser uno de los motivos de consulta más frecuente, debido a las altas prevalencias reportadas en la población. La frecuencia es ampliamente variable en los diferentes países y ciudades, en función a factores culturales, étnicos y de las diferentes metodologías empleadas para la recolección de datos. La comparación entre estudios de diferentes regiones debe ser cuidadosa debido a la falta de consistencia metodológica en los estudios realizados (31).

Los estudios de prevalencia de la caries de la infancia temprana a nivel mundial han mostrado cifras variables, hasta el 15% en países desarrollados, pero en países en vías de desarrollo, como el nuestro, estas cifras ascienden al 70%. En estos últimos, se encuentra un detrimento mayor en la salud, más aún en la cavidad oral, daño comprobado con los índices de caries elevados y el avance de la lesión cariosa más rápido, como lo muestra el caso de un estudio realizado en Guatemala con niños de seis años de edad, en el que se determinó un índice de caries en la dentición primaria de 5.38 dientes afectados, mientras que niños en EE.UU., en ese mismo rango de edad se presentó un índice de 2.55 dientes afectados. Otro estudio realizado en México con 934 niños de entre 1 y 6 años de edad, encontró una prevalencia de caries de 37.1% con un índice ceo-d de 0.71 (39). Por su parte, en la comuna de Peñaflor ubicada en la zona metropolitana de Santiago de Chile, se realizó un estudio para evaluar la prevalencia de caries dental en 512 niños de entre 3 y 5 años en el 2009, lo que reflejó que un 50% de los niños a la edad de 3 años se encontraban libres de caries comparado a un 42,2% en los niños a la edad de 5 años (43). En otro estudio realizado en Chile, en el que se quería determinar el compromiso de salud bucal en 130 niños de 4 y 5 años de edad, se observó que el 49,2% de los niños presento caries, con un índice ceo-d de 2,4, resaltando que se requieren más esfuerzos en educación y promoción de la salud bucal, así como aumentar recursos para atender estos pacientes con el fin de disminuir el impacto de las enfermedades orales en el futuro (44).

En Colombia, durante los últimos años se le ha dado importancia a la caries en los niños porque su prevalencia y aspecto clínico están comenzando a ser informados y valorados, lo cual se ha percibido a partir de estudios realizados como la Investigación Nacional de Morbilidad Oral entre 1965 1966 y el II Estudio de Morbilidad Oral adelantado entre 1977 y 1980 donde se informó aumento en el número de personas con historia de caries en relación con el primer estudio (al pasar de 95.5% a 96.7%), lo cual condujo a la OMS a clasificar a Colombia dentro de los países con alto índice de caries. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la edad establecida por la OMS para comparación mundial del comportamiento de la caries fue 12 años. En el reporte de esta organización en el año 2003, resaltó que todos los países informaron un índice Cop-d entre bajo y moderado en ese mismo año para Latinoamérica, a excepción de Bolivia catalogado en un rango alto, como se observar en la Figura 6-7. Esto, probablemente debido a las acciones educativas en salud bucal, al uso de medidas preventivas individuales y colectivas, así como a la educación de los padres en el cuidado e importancia de la salud bucal (11,39).





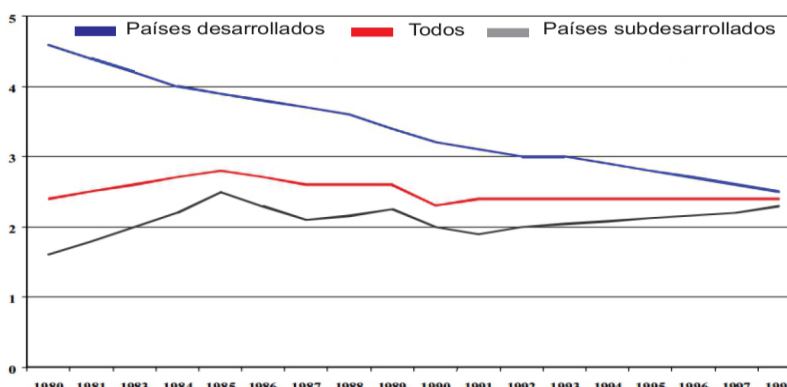
**Figura 6-7 Experiencia de caries Mundial: Índice COP-d 12 años de edad.**

*Fuente: (11)*

Además, la OMS comparó la tendencia del Cop-d a los 12 años longitudinalmente a partir de 1980 de los países desarrollados frente a los países en vía de desarrollo, donde los países desarrollados, en 1980, presentaban un índice promedio de 4,6 aproximadamente, el cual fue descendiendo hasta llegar a 2,5 en 1998; en contraste los países en vía de desarrollo reportaron inicialmente un índice de 1,7, que se incrementó a 2,3 con picos en algunos años como 1985 y 1989. En general, se observa una tendencia a tener un Cop-d entre 2,3, considerado bajo según lo observado en la Figura 6-8 (11). Por motivo de verificar estos resultados, se adelantó el Ensab III en 1998, con el fin de establecer la situación de salud y de morbilidad bucal para el año 2000, en el que se encontró que 60.4% de niños de 5 años tenían historia de caries, proporción que aumentó a 73.8% a los 7 años, resultados que presentan grandes diferencias a nivel regional como se describe más adelante. El número de dientes temporales afectados por niño de 5 años (ceo-d) fue de 3.0 a nivel nacional (39,41).

Es importante precisar que los estudios nacionales hasta la fecha utilizaron como índice el Cop-d (cariado, obturado y perdido por caries por diente), que no contempla las lesiones iniciales de mancha blanca, lo que motivó a partir del 2000 que algunos estudios locales emplearan el Sistema ICDAS, para establecer un diagnóstico preciso y temprano de la presencia de caries dental en los escolares. El uso de estos índices debe tenerse en cuenta en el momento de comparar los diferentes datos epidemiológicos reportados (11).

**RECUESTO E IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus mutans* DE SALIVA EN NIÑOS CON CARIES DENTAL: SEGUIMIENTO A 3 Y 6 MESES DESPUÉS DE UN PROCESO EDUCATIVO**



**Figura 6-8 Experiencia de caries: Índice COP-d a los 12 años de edad.**  
Fuente: (11)

Por otro lado, en los cuatro estudios nacionales realizados en el país, la prevalencia de caries dental reportada en los dos primeros estudios en los escolares, pasó del 90,5% al 96%; mientras que en el último estudio, Ensab IV, en las edades de 5 y 12 años, fue del 5,3% y del 5,7%, respectivamente. En cuanto al índice Cop-d a los 12 años, en el primer estudio fue de 7,1, descendió a 4,8 en el segundo disminuyó a 2,3 en el Ensab III, y siguió disminuyendo de acuerdo a la tendencia observada en los nuevos resultados arrojados en el Ensab IV, hecho en el año 2014, lo que evidencia una reducción por encima del 50% en este índice. En cuanto al general, el índice pasó de 15,4 a 9,8. Ello permite concluir que el índice Cop-d en esta población se ha reducido de manera significativa, aunque no de la misma forma que en las edades más tempranas, véase Tabla 6-1 (11).

Estudio	Año	COP-d General	COP-d 12 años
Investigación Nacional de Morbilidad oral (5,45)	1966 – 1967	15,4	7,1
II Estudio de Morbilidad Oral(46)	1977 – 1980	12,7	4,8
III Estudio Nacional de Salud Bucal – Ensab III (41)	1998	10,3	2,3
IV Etudio Nacional de Salud Bucal – Ensab IV (26)	2014	9,8	2,0

**Tabla 6-1 Comportamiento del COP-d en Colombia según los cuatro estudios nacionales.**  
Fuente: (11,26)

En cuanto a la dentición primaria en los niños de 5 años (edad índice) la prevalencia fue del 54,8%, en el Ensab III, lo cual indica que este evento está presente desde edades muy tempranas, con un índice ceo-d de 4,2 en el período 1977-1980, y de 3 en 1998 (11). Además, cabe destacar que a partir del Ensab III se exploró por primera vez las representaciones sociales, las prácticas en salud oral y los cuidados en torno a la salud bucal. Demostrando que el 64,9% de los colombianos entiende por tener una boca sana como no tener caries; también se observó que la mayoría de las personas encuestadas (88%) que “el mal cepillado o no cepillado” era la causa de la caries dental. Con respecto al cuidado bucal de los niños, llama la atención que los padres (99,4%) se consideraban responsables de cuidar la boca de sus hijos y de enseñarles a cepillar y, sólo el 16% consideraban que una práctica adecuada es llevarlos al odontólogo. Ello permite concluir que a pesar de tener un gran número de personas conscientes del cuidado bucal y de las prácticas adecuadas para evitar el desarrollo de la caries dental, aún se siguen presentando altos porcentajes de desconocimiento en cuanto a las prácticas de higiene y promoción de la salud dental, especialmente en la población infantil, la cual presenta las tasas de incidencia más altas observadas en estudios anteriores (11).

**RECUESTO E IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus mutans* DE SALIVA EN NIÑOS CON CARIES DENTAL: SEGUIMIENTO A 3 Y 6 MESES DESPUÉS DE UN PROCESO EDUCATIVO**



Dado que no se cuenta con datos nacionales recientes sobre la tendencia de la caries dental en escolares, algunos estudios locales de población escolar en caries dental, con diferentes metodologías que limitan la interpretación y comparación de los resultados, permiten plantear una idea del comportamiento actual de la caries dental (11). A continuación se observan los resultados de los principales estudios realizados y publicados a nivel nacional desde el año 2000 al 2010 en la Tabla 6-2, demostrando que aún se siguen presentando altas prevalencias en la población infantil.

Autor y año de publicación	Ciudad	Tamaño de la muestra	Edad	Prevalencia de caries (%)
(40), 2011	Villavicencio	589 niños	1 a 5 años	93% total 97% CIT* no cavitadas 67% caries cavitacional
(47), 2010	Medellín	162 niños	1 a 5 años	77,8%
(48), 2010	Medellín	93.700 escolares	14 a 17 años	68% colegios públicos 39% colegios privados
(49), 2010	Cartagena	243 niños	3 a 13 años	51%
(42), 2008	Medellín	659 niños	1 a 5 años	68,7%
(50), 2006	Medellín	1569 niños	5 a 13 años	5 años 11,3% 12 años 33,5%
(51), 2005	Cali	784 niños	5 a 13 años	67,7%
(52), 2004	Bogotá	Localidades	Escolares de grado 0 y 1	68,3%
(53), 2004	Medellín	365 niños	1 a 5 años	48,4% Estrato Medio-Alto (MA) 58,3% Estrato Bajo (B)
(54), 2004	Amazonas	110 niños	5 a 12 años	28,8% en dientes temporales 27% en dientes permanentes
(55), 2000	Manizales	Niños escolares	3 a 5 años	22,64% dentición temporal 14,1% dentición permanente

\*CIT, Prevalencia en lesiones iniciales de caries

**Tabla 6-2 Prevalencia de caries en niños de 0 a 6 años en ciudades de Colombia 2000 al 2010.**

Según esto, se observa en la mayoría de los estudios realizados en las ciudades más importantes de Colombia, que prevalece en gran parte de la población infantil valores altos de historia de caries. Esto como resultado de una falta de políticas de promoción y prevención de la enfermedad, como lo indican los investigadores. Demostrando que en nuestro país, los problemas de salud bucodental tienen una alta prevalencia, al igual que los existentes en otros países en vías de desarrollo.

En los resultados del Ensab III, fue evidente la diferencia entre regiones, zona urbana y rural y estrato socioeconómico. En la zona urbana, la prevalencia de caries fue de 63,4% en comparación con 70,8% en la zona rural. Por regiones, la mayor prevalencia se encontró en la región oriental (Orinoquía y Amazonía), seguida por la región Atlántica, la Occidental y la Central, ver Tabla 6-3. Sin embargo, la gran diferencia que se presentó entre las ciudades de Medellín y Bogotá sugirió que condiciones socioeconómicas y culturales particulares de cada región, así como programas y políticas de salud regionales, pueden influir en las condiciones de salud bucal, más allá de las posibilidades de acceso a los servicios de salud (4).

Región y subregión	Prevalencia (%)
--------------------	-----------------



**RECUESTO E IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus mutans* DE SALIVA EN NIÑOS CON CARIES DENTAL: SEGUIMIENTO A 3 Y 6 MESES DESPUÉS DE UN PROCESO EDUCATIVO**

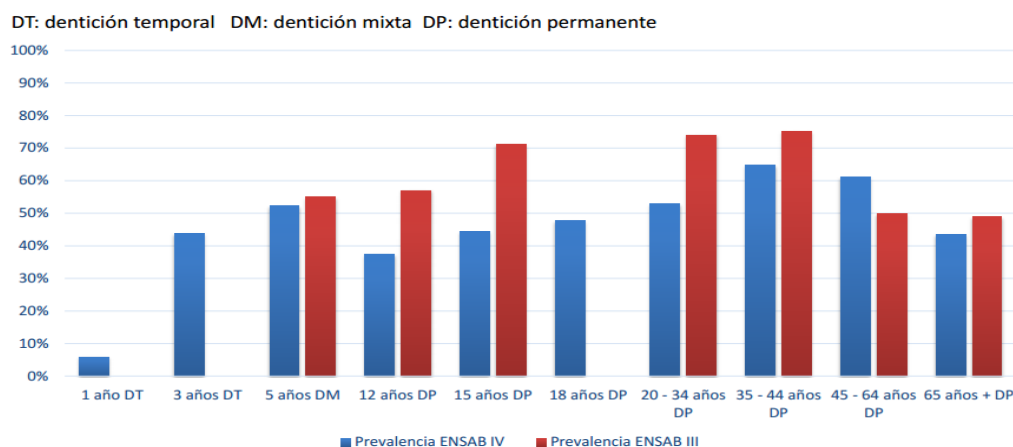


San Andrés	63,9%
Barranquilla	62,8%
Resto de la Costa Atlántica	69,5%
<b>Total Atlántica</b>	<b>68,5%</b>
Orinoquia y Amazonia	84,2%
Resto de la región Oriental	69,8%
<b>Total Oriental</b>	<b>72,5%</b>
Andén Pacífico	68,4%
Cali	63,6%
Resto de la región Occidental	62,6%
<b>Total Occidental</b>	<b>63,7%</b>
Medellín	49,2%
Resto de la región Central	57,7%
<b>Total Central</b>	<b>56,1%</b>
Santafé de Bogotá	<b>68,1%</b>

**Tabla 6-3 Prevalencia de caries según regiones y subregiones, Colombia 1998.**

*Fuente: (41)*

Según los resultados anunciados por el Ministerio de Salud y la protección Social en el Ensab IV, que se realizó entre 20.534 colombianos (80% de ellos ubicados en centros urbanos y el 20% en zonas rurales) durante junio de 2013 y mayo de 2014, evaluando y valorando la salud bucal en los 32 departamentos del país, se determinó que la prevalencia de caries se redujo significativamente. Pasó de 57% en 1998, en el Ensab III (41), a 37% de la población de 12 años en 2014. Esa misma tendencia se observó en el rango de edad de 20 a 24 años que redujo la presencia de 74% a 53%, respectivamente. En adultos mayores, la caries también se redujo aunque en un margen menor, al pasar de 49% a 43% de afectados, como se evidencia en la Tabla 6-8. Cabe mencionar como indicador positivo, que la caries dental disminuyó de 2.3 cop-d a 1.5 cop-d a los 12 años, siendo la edad trazadora definida por la OMS como hizo mención anteriormente. Por último, es la primera vez en Colombia que la encuesta se aplica a niños de 1 y 3 años (26). Evidenciando que, cada vez más, la caries se presenta con menor gravedad y en estados iniciales.



**Figura 6-9 Prevalencia de caries – Ensab IV vs Ensab III.**

*Fuente: (26)*

Desde el punto de vista social la elevada prevalencia de la enfermedad, probablemente es el resultado de la interacción de múltiples factores de riesgo como los bajos niveles de ingreso económico de las grandes mayorías, que impide atender sus necesidades de salud bucal, los altos costos de los servicios odontológicos, las condiciones geográficas y culturales que no permiten un

## RECuento E IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus mutans* DE SALIVA EN NIÑOS CON CARIES DENTAL: SEGUIMIENTO A 3 Y 6 MESES DESPUÉS DE UN PROCESO EDUCATIVO



acceso adecuado a los servicios odontológicos, el deficiente estado nutricional y de saneamiento de estas enfermedades. A todo ello podemos agregar que la mayoría de las intervenciones odontológicas se han enfocado más en reparar el daño que en la prevención de la enfermedad (31).

### 6.3.3. Factores de riesgo

A partir de 1988 la Comisión de Salud Bucal, Investigación y Epidemiología de la Federación Dental Internacional, recomendó que las investigaciones sobre caries se apoyaran en métodos de identificación de riesgos, debido a la multifactorialidad de la enfermedad (39).

Los factores de riesgos son aquellas características o atributos (variables) que se presentan asociados diversamente con la enfermedad o el evento estudiado; ellos no son necesariamente las causas (o la etiología necesaria), sólo sucede que están asociados con el evento. Es importante reconocer que los factores de riesgo no actúan aisladamente, sino en conjunto con las causas de la enfermedad, interrelacionadamente y que pueden presentarse en cualquier etapa de la vida (39).

Diversos estudios (18,56) abordan el tema de factores de riesgo a padecer caries, así como las actividades a desarrollar para prevenir la aparición y desarrollo de estas en edades tempranas, por constituir en esta etapa la enfermedad dental de mayor importancia y prevalencia; además por ser un aspecto primordial en la elaboración de métodos pronósticos certeros que son la base para introducir y evaluar nuevas estrategias preventivas.

En estudios que evaluaron intervenciones preventivas frente a la incidencia de caries en preescolares han demostrado la correlación existente entre diferentes factores de riesgo frente a la incidencia de caries. En un ensayo comunitario de intervención realizado en Perú con niños preescolares sujetos a un programa educativo-preventivo, se midió la experiencia e incidencia de caries dental. Encontraron que la incidencia de caries dental entre la evaluación inicial y final en el grupo de intervenido fue 30,7%, con un OR= 0,283 (IC95%: 0,147 – 0,544), y en el grupo control de 68,9%, revelando que el programa de intervención fue un factor protector, teniendo el grupo control 3 veces más riesgo relativo de desarrollar caries. Así, se confirma la importancia de desarrollar programas preventivos integrales, que incluyan en su intervención educación y medidas preventivas, para lograr una mayor eficacia en el control de la incidencia de caries dental (12).

En otro estudio realizado en Japón (57), probaron la capacidad de un método sitio específico para el screening de *S. mutans* presente en placa en niños 129 niños, con el fin de predecir el riesgo de caries, encontrando que un recuento alto de *S. mutans* en placa (OR=12.59, IC95%: 3.18 – 67.08) y la experiencia de caries al inicio del estudio (OR=5.02, IC95%: 1.81 – 14.59) se correlacionó significativamente con la incidencia de caries a diferencia de otros indicadores de riesgo de caries importantes.

Existen múltiples factores vinculados con el riesgo o protección contra la caries dental, entre ellos tenemos: los microbiológicos, los relacionados con la actividad previa de caries, con la higiene bucal, con las características macroscópicas y microscópicas del esmalte dental humano, con los patrones dietéticos, con las propiedades y funciones de la saliva, con el estado sistémico y con la situación socio-económica como se representa esquemáticamente en la Tabla 6-4 . En los últimos años además se hace referencia al tabaquismo como factor promotor de caries en la temprana infancia y a la nicotina que a concentración similar a la que hay en la boca de los fumadores favorece el crecimiento y multiplicación de *S. mutans* (58).

Factor de riesgo	Descripción
Factor microbiológico	Los <i>S. mutans</i> y <i>S. sobrinus</i> , se han reconocido como las principales bacterias orales responsables de la iniciación y el desarrollo de caries dental

**RECuento E IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus mutans* DE SALIVA EN NIÑOS CON CARIES DENTAL: SEGUIMIENTO A 3 Y 6 MESES DESPUÉS DE UN PROCESO EDUCATIVO**



<b>Factores dietéticos</b>	Existe suficiente evidencia para afirmar que los azúcares son los principales elementos de la dieta diaria que influyen en la prevalencia y el avance de las lesiones de caries dental
<b>Factores condicionantes externos</b>	Educación, clase social, ingreso económico, conducta, conocimiento y actitud, acceso y calidad a los servicios de salud, dieta alta en carbohidratos, entorno familiar, estado nutricional, donde los componentes socio-culturales presentan una marcada influencia. Además de la presencia de enfermedades crónicas y otros factores internos biológicos que puedan afectar la salud general y bucal
<b>Placa dental bacteriana</b>	Excesiva presencia de placa bacteriana debido a técnicas de higiene oral inadecuadas
<b>Hábitos deficientes de higiene bucal</b>	Los estudios informan que la frecuencia de caries disminuye conforme aumenta la frecuencia de cepillado y con la técnica adecuada (59)
<b>Cantidad y calidad de la saliva</b>	Disminución del flujo de saliva, especialmente durante el sueño, puede dar lugar a un ambiente altamente cariogénico sino se maneja una buena higiene al momento de acostarse
<b>Baja concentración de flúor</b>	Disminuye la re-mineralización del esmalte y el pH evitando de este modo una "acción cariostática"
<b>Mal posición dentaria</b>	Proporcionan un ambiente propicio por el grado de retención de placa bacteriana

**Tabla 6-4 Factores de riesgo asociados al desarrollo de caries dental.**

Fuente: (31,39)

Sin embargo, la determinación del riesgo de caries dental es difícil debido a la existencia de complejas interacciones entre múltiples factores, así mismo, el reconocimiento de marcadores de riesgo puede ser extremadamente útil en la identificación de grupos de bajo-alto riesgo, para la prevención secundaria, cuando están disponibles los medios de detección precoz y tratamiento rápido (58).

Evidentemente, existe un amplio reconocimiento de la importancia de los factores microbiológicos en relación con la caries dental, y *S. mutans* parece tener un papel muy importante como se describe en la Tabla 6-5 . Son numerosos y diferentes los estudios realizados sobre el tema, sin embargo, todos los autores coinciden en que la génesis de la caries dental requiere la presencia de varios factores de riesgo, de manera más significativa, la colonización por *S. mutans*, una deficiente higiene oral y un alto consumo de alimentos ricos en sacarosa (14).

<b>Factores bacterianos</b>	1. Transmisión
	2. Número incrementado de <i>S. mutans</i> por contacto cercano con la madre
	3. Frecuencia incrementada de contactos con portadores de <i>S. mutans</i>
	Cadenas de <i>S. mutans</i> Virulencia de las cadenas de <i>S. mutans</i>
<b>Factores del huésped</b>	Biofilm – placa dental
	Poca competencia con otras especies
	Lugares ecológicos viables para la colonización
	Hereditarios
	Genes HLA con efectos inmunológicos desfavorables en la saliva, dientes y mucosa
	Superficies para la adherencia microbiana
<b>Factores del huésped</b>	Incremento en las superficies dentales
	Superficies mucosas alteradas
	Saliva
	Cantidad y calidad de la saliva reducida



	Inmunológicos
	Inmunidad oral reducida por condiciones congénitas y adquiridas
	Dieta
	Ingesta frecuente de tentempiés y bebidas dulces
	Higiene oral
	Ausencia de higiene oral

**Tabla 6-5 Factores que incrementan la colonización de *S. mutans***

Fuente: (31)

Se ha acordado que los principales microorganismos asociados a la producción de caries son los *Streptococcus* del grupo *viridans*, llamados también *Streptococcus* orales, además de *Lactobacillus spp.*, y *Actinomyces spp.* Dentro de los cuales, *S. mutans* es la especie más importante, debido a que es el principal factor de riesgo, descrito hasta ahora, cuando se encuentra presente en recuentos altos.

#### 6.4. Género *Streptococcus*

##### 6.4.1. Generalidades

Los estreptococos son cocos Gram positivos que se asocian en parejas y cadenas cortas o largas, dependiendo del producto patológico y del medio de cultivo; no tienen movimiento, no forman esporas. Carecen de catalasa y son anaerobios facultativos; cuando se desarrollan en presencia de aire, su crecimiento se ve favorecido por una atmósfera de 5-10 por 100 CO<sub>2</sub>. La temperatura óptima de crecimiento es de 36 ±1°C. Su metabolismo es fermentativo, produciendo abundantes ácidos que descenden el pH, lo que obliga a utilizar medios amortiguados para evitar su muerte. Son catalasa y oxidasa negativos, propiedad que, junto con la tinción de Gram, diferencia los estreptococos de las especies de *Neisseria* (35,37,60).

Representan un amplio grupo de microorganismo: algunos forman parte de la microbiota normal, sin que se haya demostrado su patogenicidad; otros, por el contrario, se comportan como saprófitos, comensales e incluso como patógenos, produciendo diversas infecciones en los mamíferos (35).

##### 6.4.2. Taxonomía

La clasificación de los estreptococos se ha realizado basándose en diversos criterios, lo que ha motivado que exista una importante confusión en cuanto a su taxonomía y nomenclatura (35). A continuación se muestra los criterios más importantes para su clasificación:

<b>Criterio</b>	<b>Fundamento</b>
<b>Tipo de hemólisis en Agar sangre de cordero</b>	Distingue los estreptococos alfa, beta y gama hemolíticos.
<b>Estructura antigénica</b>	En función de los antígenos de grupo, es posible dividirlos estreptococos grupo-específicos y no agrupables que carecen de dichos antígenos (serogrupos de Lancefield). Estos a su vez, pueden dividirse en serotipos en función de proteínas parietales superficiales o asociadas a ácidos lipoteicoicos y fimbrias. Por otro lado, los estreptococos no agrupables pueden dividirse en serotipos en función de polisacáridos capsulares, parietales o proteínas superficiales.
<b>Características fisiológicas</b>	Mediante un número específico de pruebas convencionales se pueden relacionar estas características con determinados serogrupos.
<b>Características nutricionales</b>	Algunos dependen para su desarrollo de compuestos azufrados (dependientes de tiol).

**RECuento E IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus mutans* DE SALIVA EN NIÑOS CON CARIES DENTAL: SEGUIMIENTO A 3 Y 6 MESES DESPUÉS DE UN PROCESO EDUCATIVO**



<b>Características genéticas y químicas estructurales</b>	Se basan en estudios de proporciones de C + G en el ADN cromosómico, de homología ADN-ADN, ARN-ARN o ARN-ADN, y la secuencia de ARNr (16 S). También se fundamentan en el análisis de perfiles proteicos, de la estructura de la pared celular o de ácidos grasos.
<b>Criterios clínicos</b>	Diferenciación entre estreptococos piogénicos y no piogénicos.
<b>Estreptococos no <i>viridans</i></b>	Habitualmente $\beta$ -hemolíticos, diferenciables por los antígenos de los grupos de Lancefield. Tiene escaso interés en la cavidad oral.
<b>Estreptococos <i>viridans</i></b>	Habitualmente no $\beta$ -hemolíticos y difícilmente diferenciables por los serogrupos de Lancefield. A nivel ecológico y desde el punto de vista de su patogenicidad, los estreptococos <i>viridans</i> son los más importantes en la cavidad oral.

**Tabla 6-6 Criterios más importantes para la clasificación del Género estreptococo.**

Fuente: (35)

El género *Streptococcus*, que contiene los patógenos humanos más importantes, puede ser dividido operacionalmente en siete grupos, como se observa a continuación:

Grupo	Nombre	Miembros	Hábitats
I	Grupo piógeno	<i>S. pyogenes</i> ; <i>S. agalactiae</i> ; <i>S. equi</i> subespecie <i>equi</i> ; <i>S. equi</i> subespecie <i>zooepidemicus</i> ; <i>S. dysgalactiae</i> subespecie <i>dysgalactiae</i> ; <i>S. dysgalactiae</i> subespecie <i>equisimilis</i> ; <i>S. canis</i> ; <i>S. iniae</i> ; <i>S. porcina</i> ; <i>S. phocae</i> ; <i>S. didelphis</i> ; <i>S. urinalis</i>	Seres Humanos Caballos, burros Muchos animales Cerdos, ganado bovino
II	Grupo <i>sanguis</i>	<i>S. parasanguis</i> ( <i>S. paransanguinis</i> ) <i>S. sinensis</i>	Seres Humanos
III	Grupo <i>mitis</i>	<i>S. mitis</i> <i>S. oralis</i> <i>S. crista</i> ( <i>S. cristatus</i> ) <i>S. peroris</i> <i>S. infantis</i> <i>S. australis</i> <i>S. oligofermentans</i> <i>S. gordonii</i> <i>S. sanguis</i> ( <i>S. sanguinis</i> ) <i>S. sinensis</i>	Seres Humanos
IV	Grupo <i>mutans</i>	<b><i>S. mutans</i></b> <i>S. sobrinus</i> <i>S. cricetus</i> <i>S. downei</i> <i>S. rattus</i> ( <i>S. rattus</i> ) <i>S. macacae</i> <i>S. ferus</i>	<b>Seres Humanos</b> Seres Humanos Hámsters, ratas (Humanos) Monos Ratas, Seres Humanos Monos Ratas
V	Grupo <i>salivarius</i>	<i>S. salivarius</i> <i>S. vestibularis</i> <i>S. infantarius</i> <i>S. thermophilus</i> <i>S. hyointestinalis</i>	Seres Humanos Seres Humanos Seres Humanos Productos lácteos Hembras porcinas
VI	Grupo <i>anginosus</i>	<i>S. constellatus</i> , subespecies <i>S. anginosus</i> <i>S. intermedius</i>	Seres Humanos
VII	Grupo <i>bovis</i>	<i>S. bovis</i> / <i>S. equinus</i> <i>S. gallolyticus</i> subespecies <i>gallolyticus</i> ( <i>S. bovis</i> I)	Ganado bovino, caballos Humanos, koalas, osos Seres Humanos Ambiental (quesos)



	<i>S. gallolyticus</i> subespecie <i>pasteurianus</i> ( <i>S. bovis</i> II.2) <i>S. gallolyticus</i> subespecie <i>macedonicus</i> <i>S. infantarius</i> subespecie <i>infantarius</i> ( <i>S. bovis</i> II.1) <i>S. infantarius</i> subespecie <i>coli</i> <i>S. alactolyticus</i> <i>S. suis</i>	Seres Humanos, ganado Seres Humanos Cerdos, Perros, Pollos Cerdos, Ganado, Humanos
Otros	<i>S. uberis</i> / <i>S. parauberis</i> <i>S. hyointestinalis</i> <i>S. hyovaginalis</i> <i>S. thoralensis</i> <i>S. pluranimalium</i> <i>S. enteriticus</i> <i>S. ovis</i> <i>S. gallinaceus</i> <i>S. minor</i>	Ganado bovino Cerdos Cerdos Cerdos Ganado bovino, ovejas Ganado bovino Ganado bovino Ovejas Pollos Perros, Gatos, Ganado

Tabla 6-7 Grupos de especies de estreptococos sobre la base del análisis de secuencia de rRNA de subunidades pequeñas

Fuente: (60).

La gran mayoría de estreptococos comensales de la cavidad oral no son agrupables. Sin embargo, se han agrupado bajo la denominación de “estreptococos orales”.

#### 6.4.3. Estreptococos del Grupo *viridans*

El grupo *viridans* incluye varias especies de estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos y no hemolíticos, la mayoría de los cuales constituyen parte de la flora normal de las vías respiratorias altas y del aparato urogenital; su hábitat principal es la cavidad oral, y están claramente implicados en la colonización de superficies duras y blandas de la misma. Causan el 30-40% de los casos de endocarditis bacteriana subaguda, lo que conduce a su aislamiento de múltiples conjuntos de hemocultivos. Por conveniencia, los estreptococos *viridans* pueden ser ubicados en grupos sobre la base de características bioquímicas comunes. Estos grupos incluyen el grupo sanguis, el grupo *mitis*, el grupo *mutans*, el grupo *salivarius*, el grupo *anginosus* y el grupo *bovis* (35,60).

Su significación patógena más importante se encuentra ligada a la formación de placas, a la génesis de caries, gingivitis, periodontitis y otros procesos odontológicos. Fuera del ámbito oral, participan cada vez más en procesos sistémicos y focales, si bien su mayor importancia radica en su relación con las endocarditis subagudas. Los factores de virulencia más destacados de estos microorganismos son: la síntesis de polisacáridos extracelulares solubles e insolubles, la síntesis de polisacáridos intracelulares y su capacidad para iniciar el desarrollo a pH5 (35).

En el pasado eran sensibles a penicilina, ampicilina y a la mayoría de los otros antibióticos. Sin embargo, en las dos últimas décadas los estudios de sensibilidad a los antibióticos han mostrado con claridad que está aumentando la resistencia a penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos y otras clases de antibióticos, sobre todo entre las cepas de *S. mitis* (60). De todas estas especies, *S. mutans* ha sido la más estudiada por su poder acidógeno, acidófilo y acidúrico, además de su propiedad de síntesis de polisacáridos extracelulares de tipo glucanos insolubles y solubles en agua y fructanos, facilitando la formación del biofilm dental.

#### 6.5. *Streptococcus mutans*





Es un coco Gram positivo dispuesto en cadena, no móvil, catalasa negativo, productor rápido de ácido láctico con capacidad de cambiar un medio de pH 7 a 4.2 en aproximadamente 24 horas. Fue aislado e identificado por Clarke en 1924 a partir de lesiones cariosas en humanos. Lo denominó *S. mutans* por las formas mutantes en que se presenta: cocobacilo (forma ovalada) en un medio ácido y coco (forma redonda) en un medio alcalino. Fermentador de glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina con la producción de ácido. Normalmente no desamina la arginina para producir amoníaco. Esta bacteria es anaeróbica facultativa, es decir, puede utilizar el oxígeno para crecer, pero si este no está presente también puede sobrevivir; sin embargo, su crecimiento óptimo ocurre en anaerobiosis (21).

Usualmente no producen hemólisis ni decoloración en agar sangre, es principalmente alfa o gamma hemolítico en agar sangre de cordero, aunque se han reportado unas pocas cepas hemolíticas. En estos cultivos, las colonias son fácilmente diferenciadas: altas, convexas, pulvinadas, mucoides, de 0.5 a 1 mm de diámetro, y opacas con un aspecto que recuerda al vidrio esmerilado. Tiene la habilidad de sobrevivir, crecer y mantenerse en condiciones ácidas, aunque es especialmente acidogénico, y no es tan acidúrico como *S. sobrinus*. Esto es debido a una proteína llamada F-ATPasa unida a la membrana que transloca los protones fuera de la célula, evitando la disminución del pH intracelular. Esta característica hace que *S. mutans* sea bastante cariogénico y es por esta razón que los tratamientos específicos sean requeridos. Presenta proteínas fijadoras de glucanos, antígenos I/II (Ag I/II), que intervendrían en la adhesión a la película adquirida, cuando en ella existen glucanos adsorbidos, y en los procesos de agregación bacteriana. Su nombre lo recibe por su tendencia a cambiar de forma, que se puede encontrar como coco o de forma más alargada, como bacilo (33,35,37).

Se ha sub-clasificado en varios tipos con base en las propiedades inmunológicas, biológicas y genéticas: Los serotipos de *S. mutans* son c, e, f y k. El hospedador principal es el humano, en el que al igual que en diversos animales gnotobióticos ha mostrado su poder cariogénico. Coloniza especialmente las superficies duras de la cavidad oral (esmalte o cemento). *S. mutans* induce lesiones cariosas tanto de superficies lisas, de fosas y fisuras, como en zonas interproximales y en cemento radicular, siendo más que posible su papel en la progresión del proceso. Esta especie sigue siendo sensible a una amplia gama de antibióticos (i.e. betalactámicos, macrólidos y lincosamidas). En los últimos años, se ha observado una lenta y progresiva pérdida de sensibilidad, y se han descrito cepas con elevados grados de resistencia a los aminoglucósidos, y tolerantes a la penicilina (35). Aunque no se distribuye ampliamente en animales salvajes, se ha aislado en monos, murciélagos, ratas salvajes y de monos Rhesus (17).

Es el principal agente etiológico de la caries dental. Aunque otro factor de riesgo para el desarrollo de caries dental es la infección por *Streptococcus sobrinus*. De hecho, una co-infección de *S. sobrinus* y *S. mutans* causa un incremento en la incidencia de la enfermedad. En Colombia según el III Estudio Nacional de Salud Bucal, el 95% de la población mayor de 20 años tiene historia de caries, lo que convierte esta patología en un problema de salud pública. Para profundizar en el conocimiento del microorganismo y aportar a la solución, es necesario contar con medios de cultivo que garanticen el crecimiento y la recuperación del patógeno causal (33,61).

#### **6.5.1. Factores de virulencia**

En general, algunos estreptococos *viridans* que habitan en la cavidad bucal han surgido como patógenos importantes asociados predominantemente con la iniciación y la patogenia de las caries dentales. *S. mutans*, principalmente, junto con *S. sobrinus* y otros miembros del "grupo *mutans*" de estreptococos bucales son capaces de producir enzimas denominadas glucosiltransferasas (GTF) y

**RECuento E IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus mutans* DE SALIVA EN NIÑOS CON CARIES DENTAL: SEGUIMIENTO A 3 Y 6 MESES DESPUÉS DE UN PROCESO EDUCATIVO**



Fructosiltransferasas (FTF), que hidrolizan la sacarosa de la dieta y conectan las porciones de glucosa entre sí en uniones  $\alpha 1,6$  y  $\alpha 1,4$  glucosídicas para formar glucanos insolubles. Estos glucanos permiten a los microorganismos adherirse a las superficies lisas de los dientes y forman la matriz de la placa dental, el denominado biofilm. La fijación específica e inespecífica de *S. mutans* y otros microorganismos a los glucanos adherentes e insolubles y la formación ulterior de ácidos conduce a la desmineralización del esmalte dental y a la iniciación de lesiones de caries. El medio más común para el aislamiento de *S. mutans* es el Agar Mitis Salivarius con un suplemento de bacitracina y sacarosa al 20%, el cual hace la selección de otros estreptococos (36,60).

*El biofilm como mecanismo de adherencia:*

El Biofilm se describe como una comunidad compleja de microorganismos, cerca de 700 especies bacterianas, adheridos a una superficie; estos microorganismos se encuentran embebidos en una matriz extracelular que deriva de ellas mismas (29). Forman dos tipos de biofilm en la superficie del diente: La placa supragingival y la placa subgingival, que difieren significativamente en la composición de la flora bacteriana. La placa supragingival es dominada por bacterias Gram positivas, incluyendo a *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. salivarius*, *S. mitis* y *Lactobacillus*, mientras que la placa subgingival es dominada por bacterias anaeróbicas Gram negativas, tales como *Actinobacillus*, *Campylobacter spp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*. La causa de la caries dental generalmente es causada por el microbioma de la placa supragingival. El microbioma subgingival está asociado con la gingivitis y la enfermedad periodontal (38). Los datos de la Tabla 6-9, indican que el hábitat preferente de los estreptococos del grupo *mutans* es la placa supragingival, donde constituyen el 13% de los estreptococos, y que no se encuentra con frecuencia ni en la mejilla ni en la lengua. En cambio, el *S. salivarius* está casi ausente en la placa, pero aparece en gran número en la saliva y lengua.(32).

<b>Microorganismo</b>	<b>Mejilla</b>	<b>Lengua</b>	<b>Saliva</b>	<b>Placa supragingival</b>	<b>Placa subgingival</b>
<i>S. mutans</i>	ND	ND	+	++	+
<i>S. sanguis</i>	+++	0	++	++	+
<i>S. mitis</i>	+++	+++	+++	++	+
<i>S. anginosus</i>	+	++	++	++	+++
<i>S. salivarius</i>	+	++	++	+	ND

**+, Menos del 10% del total de bacterias; ++, del 10 al 20%; +++, más del 20%; ND, no detectable.**

**Figura 6-10 Distribución de los estreptococos en la boca**

Fuente: (32)

Para que se dé la formación y desarrollo del biofilm existen tres etapas principales: 1) La fijación de las especies pioneras iniciales, lo que conduce a un aumento en la masa del biofilm debido a la colonización, co-adhesión, co-agregación de otras especies de microorganismos; 2) La producción de polisacáridos extracelulares y; 3) La separación de las bacterias de la superficie del biofilm y su propagación en el medio ambiente de la cavidad oral (27).

La acumulación de microorganismos en el biofilm es muy rápido, como resultado de la agregación entre especies de estreptococos con actinomicetos, así como la aglutinación de microorganismos dentro de una especie, que conduce a la agregación de nuevas especies bacterianas con los ya establecidos. Entre los primeros colonizadores del biofilm se encuentran, diferentes especies de *Streptococcus spp.*, principalmente *S. mutans*, *Eikenella spp.*, *Actinomyces spp.*, *Haemophilus spp.*, *Prevotella spp.*, *Capnocytophaga spp.*, *Priopionibacterium spp.*, y *Veillonella spp.*, han sido identificados en un 60-90% de los casos. Los colonizadores tardíos incluyen a *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus spp.*, *Prevotella spp.*, *Eubacterium spp.*, *Treponema spp.* y *Porphyromonas spp* (38).





Un papel importante en la formación del Biofilm es atribuido a los polisacáridos extracelulares (EPS) que contiene, entre otros, manosa y residuos glicosídicos, que forman una capsula bacteriana o se liberan en el medio ambiente, donde se convierten en parte del moco. La composición del EPS varía dependiendo de la cepa bacteriana y las condiciones ambientales. Los polisacáridos extracelulares son creados también por otras bacterias en la cavidad oral, tales como *S. sanguis* y *A. viscosus*, pero un papel importante en su producción se atribuye a *S. mutans*. Una de las funciones importantes del EPS, es la protección de estos microorganismos contra el sistema de defensa del huésped y esto es significativo para la naturaleza patógena de los microorganismos cariogénicos (38).

Otra propiedad importante del biofilm bacteriano, es la capacidad de comunicarse entre sí y regular los procesos metabólicos. El Quorum sensing (QS) representa una vía de señalización que se activa como respuesta a la densidad celular. Los estímulos del sistema del QS son moléculas de señal llamadas auto-inductores, y su concentración es una función de la densidad microbiana. Las bacterias son capaces de identificar con precisión la naturaleza química de las señales y su umbral de concentración en el ambiente, lo que permite su crecimiento y control específico de procesos fisiológicos y metabólicos de toda la población. Las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas han desarrollado diferentes sistemas de transmisión del QS para las moléculas de señalización. La función de auto-inductores en bacterias Gram-negativas se cumple por la Acil-homoserin lactona (AHLs), y en Gram-positivos por oligopéptidos específicos y auto-inductores 2 (AI-2) (38).

La formación del biofilm dental puede conducir a el desarrollo de enfermedades infecciosas orales, tales como a caries, gingivitis e inflamación periodontal. *S. mutans* pertenecen al grupo de colonizadores de dientes humanos y tiene la habilidad para metabolizar varios carbohidratos en ácidos orgánicos, los cuales pueden conducir a la destrucción cariogénica de la superficie dental (62).

Otro de los principales factores de virulencia de *S. mutans* son la producción de Bacteriocinas, péptidos antibióticos de bajo peso molecular, con tamaños que oscilan entre 30 y 40 aminoácidos, capaces de entrar en las células diana mediante la unión con los receptores de la superficie celular. El término “mutacinas” fue acuñado por primera vez por Hamada & Ooshima en 1975 y se refiere específicamente a las bacteriocinas producidas por *S. mutans* (63). De hecho, *S. mutans* es uno de los productores más prolíficos de bacteriocinas dentro de todo el género *Streptococcus*. Muchos estudios de secuenciación del genoma bacteriano, sugieren que la producción de mutacinas probablemente juega un rol fundamental en la supervivencia de la especie. Las mutacinas pueden ayudar a *S. mutans* a competir con otros estreptococos en biofilms dental tempranos y le permitirán establecer o mantener la colonización de la superficie del diente.

Finalmente, la capacidad metabólica de este microorganismo para sintetizar glucanos a partir de la sacarosa, además de su capacidad de producir ácido y bacteriocinas, tiene gran importancia en el proceso de iniciación y desarrollo de la caries dental (64).

### **6.5.2. Asociación entre Caries dental y *Streptococcus mutans***

*S. mutans* ha ocupado el interés de muchos investigadores desde épocas remotas; en 1890, W. Miller, microbiólogo británico, propuso la teoría quimioparasitaria para explicar el fenómeno de la caries dental, relacionando microorganismos, carbohidratos de la dieta y enfermedad dental; en 1924, Kilian Clarke, otro microbiólogo británico, asiló la bacteria *S. mutans* de lesiones cariosas. Más tarde, en la mitad del siglo XX, los esfuerzos investigativos del National Institute of Health (NIH) de Estados Unidos y de los países escandinavos confirmaron las propiedades cariogénicas de este



microorganismo, demostrando su transmisibilidad y distribución mundial. Aunque la presencia de esta bacteria es una causa determinante, no es suficiente para el desarrollo de la enfermedad (14).

*S. mutans* se encuentra en forma permanente en la cavidad oral después de la erupción dental, debida fundamentalmente a que requiere de tejido duro no descamativo para su colonización. La principal fuente de adquisición y transmisión de este microorganismo en los niños es la saliva de sus madres. Se ha demostrado que el tiempo exacto de colonización de esta bacteria es a los 26 meses de edad, período que ha sido denominado “ventana de infectividad”. Por lo anterior, es importante recordar que *S. mutans* forma parte de la flora oral microbiana, por lo que se puede encontrar tanto en pacientes con y sin caries (36).

Diferentes estudios epidemiológicos han mostrado relación del *S. mutans* con caries dental en humanos entre un 74% y 100% en diversas poblaciones, lo que ha conducido a proponer a este microorganismo como el más importante en la iniciación de caries. En estudios previos realizados por Köhler y cols. (1984; 1994) (65,66), demostraron que el éxito en la reducción de *S. mutans* en madres altamente colonizadas por *S. mutans* durante la aparición de los dientes primarios en sus hijos pudo prevenir o retrasar la colonización de los niños por esta bacteria durante un período de tiempo prolongado. Por otra parte, también demostraron que el retraso en la colonización por *S. mutans* estaba aún asociado con una menor prevalencia de caries en los niños a los 7 años de edad en comparación con los niños que habían sido colonizados tempranamente.

Las asociaciones entre la experiencia de caries en la dentición temporal y permanente con *S. mutans* se han demostrado en varios estudios. Sin embargo, pese a existir evidencia que sustenta la asociación de *S. mutans* con caries inicial y avanzada, se ha observado que esta enfermedad puede ocurrir en ausencia de esta bacteria, y que individuos con altos recuentos de ella no necesariamente desarrollan lesiones cariosas (67). Debido a su relación con la caries dental, la evaluación de la concentración de *S. mutans* en placa y saliva puede ayudar al diagnóstico de las actividades de caries, especialmente en la población más vulnerable que es la infantil.

### **6.5.3. Pruebas diagnósticas para el aislamiento, recuento y tipificación de *S. mutans***

Existen diversos métodos y técnicas para el estudio y la identificación de patógenos asociados con caries dental, utilizados especialmente para *S. mutans*, los cuales incluyen: desde microscopía, cultivos, inmunología, hasta los más modernos como son las técnicas moleculares. A continuación se exponen las técnicas más importantes para el diagnóstico de este microorganismo.

<b>Técnica</b>	<b>Descripción</b>
<b>Microscopía directa</b>	Morfología tradicional que permite clasificarlos como estreptococos Gram positivos. La principal es que sólo es posible establecer morfotipos y no género ni especies bacterianas.
<b>Inmunoensayos</b>	Posee una alta sensibilidad a la hora de identificar <i>S. mutans</i> , pero su principal desventaja es debido a que la especificidad se puede dificultar en reacciones cruzadas entre los sueros y otras bacterias.
<b>Técnicas moleculares</b>	Tiene dos objetivos: 1. Detección y cuantificación rápida y eficaz 2. Estudio de variaciones en los genes Sirven para estudios epidemiológicos, y la identificación de especies difíciles de cultivar o no cultivables, entre otros.

**Tabla 6-8. Pruebas diagnósticas para el aislamiento, conteo y tipificación de *S. mutans***

Fuente: (17)



Con la identificación de estos microorganismos cariogénicos ya sea en saliva, en la superficie dental o en placa, desde hace unos años se han desarrollado metodologías para establecer el riesgo que existe entre el recuento de *S. mutans*, principal agente etiológico, y el desarrollo de la caries dental.

#### **6.5.4. Metodologías para el recuento de *S. mutans* usadas en saliva**

Actualmente, los estudios no solo están enfocados en la búsqueda de *S. mutans* en saliva y placa dental, también en su cuantificación. Algunos de ellos han mostrado una correlación entre los recuentos de este microorganismo en la cavidad oral con la incidencia de la caries (68); Sin embargo, otros estudios no han encontrado correlación entre la cantidad de *S. mutans* y la incidencia de caries (69). Hoy en día, el hallazgo de un recuento alto de *S. mutans* es un factor de riesgo a tener en cuenta en la prevención y control de la caries dental (36).

Es posible estimar a través de técnicas microbiológicas, como son los métodos cuantitativos y semi-cuantitativos, los rangos de infección -grados de colonización- por *S. mutans* según las edades, siendo de gran utilidad para identificar la población de alto riesgo y el desarrollo de caries dental (17). Se han descrito diversos métodos para cultivar y cuantificar a *S. mutans*, tanto en placa bacteriana como en saliva.

Linossier y cols. 2003 (9), estandarizaron un método semi-cuantitativo para su validación a través de la medición del rango de infección por *S. mutans* en saliva, en niños pre-escolares entre 2 y 6 años, usando el medio de cultivo TYCBS de forma líquida. Concluyeron que el recuento de *S. mutans*, usando el método evaluado es predictivo para detectar la presencia de caries en la población. Otro estudio realizado por Köhler & Andréen en el 2010 (70) en el que evaluaron la eficacia de la prevención temprana de la caries materna en sus hijos, determinaron el nivel de *S. mutans* en la saliva por medio de cultivos de la muestra diluida en Agar Mitis Salivarius suplementado con bacitracina, Agar Mitis-Salivarius y Agar Rogosa selectivo para *Lactobacillus spp.*, con el objetivo de incluir en el estudio a madres con altos números salivares de *S. mutans* ( $\geq 10^6$  UFC/ml de saliva).

Existen diferentes metodologías desarrolladas que permiten determinar el número de bacterias directamente por el recuento total de células o indirectamente por la estimación del número más probable, por filtración o por el recuento de células viables en placa (células capaces de dividirse en un medio de cultivo sólido, también se refieren como Unidades Formadoras de Colonias, UFC's); utilizadas generalmente en la industria alimentaria (71). A continuación se encontrarán los principales métodos de recuento del número de bacterias en una muestra utilizados:

<b>Método</b>	<b>Tipo de medición</b>	<b>Descripción</b>
Recuento directo de bacterias al microscopio	Directa	Determina el número total de microorganismos de una muestra: Se utilizan cámaras de recuento (Cámara de Petroff-Hauser) y visualización al microscopio. No distingue entre células viables o no viables
Recuento directo con contadores electrónicos	Directa	Se utiliza el contador Coulter, que utiliza impedancia eléctrica para determinar el recuento del número de células suspendidas en un líquido.
Recuento en filtros de membrana	Indirecta	Se realiza por filtración de un volumen de la muestra a través de un filtro de membrana de tamaño adecuado para retener a las bacterias (0.22-0.45 $\mu$ ). El recuento del número de colonias formadas sobre el filtro determina el número total de bacterias en la muestra.
Recuento de bacterias viables en placa	Indirecto	Cuantifica sólo a las bacterias viables presentes en la muestra. Implica la dilución seriada de la muestra en una solución, su inoculación e incubación en un medio sólido.

**RECUESTO E IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus mutans* DE SALIVA EN NIÑOS CON CARIES DENTAL: SEGUIMIENTO A 3 Y 6 MESES DESPUÉS DE UN PROCESO EDUCATIVO**



		Estimación en Unidades Formadoras de Colonias, UFCs. Existen dos técnicas:
Recuento en placa por siembra en profundidad	Indirecto	Se añade una cantidad determinada de la muestra diluida a un medio de cultivo fundido y enfriado a 50°C sobre una placa de Petri. Cuando el agar se solidifica se incuban las placas. Las colonias crecen dentro del agar y sobre la superficie. Es utilizado para determinar el recuento de microorganismos anaerobios facultativos o microaerófilos.
Recuento en placa por siembra en superficie	Indirecto	Consiste en la siembra de un volumen conocido de la dilución de la muestra sobre la superficie de un medio sólido. En este método todas las colonias crecen sobre la superficie del medio.

**Tabla 6-9 Métodos de recuento del número de bacterias**

Fuente: (71)

También existen otros métodos diferentes al recuento en placa, reportados en estudios previos que han sido útiles para medir los niveles de *S. mutans* en saliva o placa dental con la finalidad de predecir el riesgo de caries dental en niños. Es así, que Seki y cols. 2003 (RW.ERROR - Unable to find reference:213), evaluaron la prevalencia de caries dental en dos ocasiones, con seis meses de diferencia, en 129 niños escolares de 1 a 5 años de edad, usando los métodos Dentocult SM® Strip Mutans y Site Strip para evaluar los niveles de *S. mutans* en muestras de saliva no estimulada y placa dental. Los resultados obtenidos, sugirieron que el método evaluado es efectivo para el screening en niños preescolares con un alto riesgo de desarrollar caries.

Estos dos métodos, tanto el Dentocult SM® Strip Mutans y Site Strip, fueron diseñados para el monitoreo de infección de bacterias causantes de la caries dental permitiendo una fácil y rápida detección, lo que conlleva a la intervención oportuna y la prevención de la caires. A continuación, se describe con detalle el fundamento del procedimiento del método semi-cuantitativo que permite el recuento rápido de estreptococos del grupo *mutans* en saliva:

El Dentocult SM en tira®, consta de un vial de cristal con un medio de cultivo selectivo líquido (*Mitis Salivarius*) y una tira de soporte que está tratada en uno de sus extremos para que sea adherente. Antes de su utilización se introduce en el vial un disco de bacitracina, que ejerce un efecto antimicrobiano frente a otras bacterias que no son estreptococos del grupo *mutans*. La tira de soporte se impregna de saliva y se introduce en el medio selectivo, procediéndose a su incubación. La interpretación se realiza por densidad de crecimiento en UFC/ml de saliva. Unos recuentos altos de esta bacteria indican un riesgo microbiológico muy elevado, debiendo el odontólogo controlar a este paciente con todos los medios que tenfa a su alcance (35).

Aunque actualmente existen muchos métodos diseñados para el recuento de microorganismos en cualquier espécimen, sin embargo, el cultivo en agar es considerado como el estándar de oro ya que permite realizar recuentos bacterianos para establecer proporciones relativas, mediante métodos cuantitativos en medios no selectivos y/o selectivos (17). Estudios han confirmado que la sensibilidad demostrada por cultivos microbiológicos es similar que la encontrada en técnicas moleculares como el PCR en tiempo real, utilizadas para la cuantificación de estreptococos del grupo *mutans*. No obstante, es necesario señalar que para ambas metodologías, la sensibilidad varía dependiendo del volumen de la muestra aplicado a la placa de cultivo o a la mezcla de reacción de PCR (72,73).

Debido a que el número de *S. mutans* en saliva se utiliza para estimar el riesgo y la actividad de caries desde un punto de vista microbiológico, la mayoría de estrategias metodológicas implementadas para el recuento de este microorganismo se han desarrollado en Agar Mitis Salivarius, MSA, suplementado con Bacitracina y sacarosa al 20%. El MSA, es uno de los primeros



medios de cultivo desarrollado para la recuperación y aislamiento de *S. mutans*, obtenido comercialmente *Difco*®; base para la elaboración de MSB (MSA con Bacitracina), MSKB (MSA con Bacitracina y Kanamicina) y MS-MUT, y utilizado en otros estudios. Existen otros medios de cultivo selectivos utilizados para la recuperación de *S. mutans* como el TYS20B (Agar Trypticase de soya con sacarosa y bacitracina), TYCSB (Agar tripton extracto de levadura cisteína y bacitracina), GSTB (Agar glucosa-sacarosa-telurito bacitracina) (61).

Actualmente el recuento de *S. mutans* se usa como ayuda diagnóstica para seleccionar grupos de pacientes con riesgo de caries. Recuentos superiores a 100.000 UFC/ml de Estreptococos en saliva, se consideran indicadores caries, y recuentos salivales más bajos concuerdan con una tendencia mínima a contraer esta enfermedad. Los altos grados de infección por *S. mutans* ( $>10^5$  UFC/ml de saliva), significan elevado riesgo de caries y de transmisión del microorganismo. Los Lactobacilos también se relacionan con la progresión de la lesión cariosa en corona y/o raíz. El alto grado de infección por *Lactobacillus spp.* ( $10^6$  UFC/ml de saliva), se relaciona con elevada actividad de caries y con elevada ingestión de carbohidratos fermentables (1,36). Los recuentos de saliva por mililitro aceptados son los siguientes:

Valor alto  $>1$  millón *S. mutans*,  $>100.000$  *Lactobacillus spp.*  
Valor bajo  $<100.000$  *S. mutans*  $<1.000$  *Lactobacillus spp.*

Es preciso por tal motivo, establecer un diagnóstico precoz tanto a nivel clínico y por medio de otros apoyos diagnósticos, como la identificación de microorganismos cariogénicos, el examen radiográfico, entre otros, para dar oportuno tratamiento y prevenir el progreso de la enfermedad.

#### **6.6. Diagnóstico de la caries dental**

Existen diferencias sustanciales en la forma en la que los odontólogos afrontan el diagnóstico, prevención y manejo de las lesiones cariosas. El método de diagnóstico más utilizado es la exploración clínica, el cual se hace con un instrumental. Los hallazgos serán diferentes en función del estadio en el que se encuentre la enfermedad, pudiéndose observar desde cambios de coloración en las lesiones incipientes ("mancha blanca", pigmentaciones pardas, amarillentas, etc.) hasta cavidades en el esmalte y dentina en lesiones severas (74).

Otros métodos de diagnóstico que se utilizan son: el examen radiográfico, fibra óptica de transiluminación, separación interproximal temporal, pruebas microbiológicas usadas como un medio de identificación de riesgo a caries; las principales pruebas involucran el conteo de *Lactobacillus spp.* y *Streptococcus mutans*. Actualmente se está trabajando con electrorresistencia magnética y laser de baja densidad para la detección temprana de caries y para magnificar la extensión de la lesión cariosa. Existen otros sistemas por computadora, los cuales analizan la densidad dentaria y sus variaciones en los sitios de desmineralización en zonas de dentina y esmalte. Sin embargo, el juicio clínico basado en la historia clínica, en la inspección visual, en los hallazgos radiológicos y en el riesgo personal de desarrollar la enfermedad es, todavía, el aspecto más importante para un óptimo cuidado del paciente. Las nuevas tecnologías pueden aportar información suplementaria para el diagnóstico integral, pero aún no pueden reemplazar a los métodos convencionales para el diagnóstico de caries (75).

La posibilidad de detener un proceso carioso está relacionada con un diagnóstico temprano y el factor de riesgo cariogénico individual que posea cada paciente. Si la enfermedad puede ser detectada antes de que se produzca la cavitación, el proceso puede ser revertido por una terapia remineralización, sin necesidad de tratamiento restaurador. Por otro lado, el tipo de lesión justificará la intervención a realizar, según características individuales de cada paciente (76).





### 6.6.1. Clasificación de la caries dental

Actualmente el sistema de clasificación más utilizado en el mundo es el de G.V. Black (77), que tiene en cuenta la localización de la lesión cariosa en la corona del diente. Además tiene en cuenta:

- Evolución: puede ser lenta o rápida, lo cual depende de los factores de riesgo del individuo y su interacción
- Actividad y compromiso tisular: se puede clasificar en activa o detenida y cavitacional o superficial
- Localización: la lesión puede ser de fosetas y fisuras, de superficies lisas, incluyendo la caries radicular e inter-proximal.

Dependiendo de la fisiopatogenia, se determina que un diente está sano cuando se presenta translucidez, dureza, color sin alteración y continuidad de superficies. La caries activa se caracteriza por presentar cambios en la translucidez, con apariencia blanco-tiza (lesión de mancha blanca), donde se inicia la pérdida aún sin cavitación del esmalte; esta lesión se ubica en oclusal, superficies lisas e inter-proximales (75).

Tradicionalmente, se diagnosticaba en la etapa de cavitación o más recientemente en la fase de lesión que se extiende en la dentina, siendo este el punto donde la mayoría de los Odontólogos concuerdan en que se requiere una restauración como tratamiento. Sin embargo, la enfermedad está presente mucho antes, cuando comienza el proceso de desmineralización del esmalte, por lo tanto, la enfermedad puede ser diagnosticada, registrada y tratada de manera adecuada en sus etapas iniciales. Estas diferencias en los criterios de diagnóstico, han impedido la comparación entre los estudios epidemiológicos o ensayos de investigación. Debido a esto, en los últimos años se han desarrollado diferentes métodos de diagnóstico de la caries dental, consensuados por organizaciones internacionales en salud oral, para la estandarización de medidas que permitan su comparación y el estudio de manera más global.








Existen diversos indicadores reconocidos internacionalmente para determinar y cuantificar el estado de salud bucal de las poblaciones, en relación a la caries dental. Entre ellos, tenemos principalmente al índice ICDAS, el índice Ceo-d y el índice DMFT, entre otros. En Colombia, el sistema de clasificación más utilizado para medir la experiencia de caries es el Ceo-d y COP-D, también llamado índice DMFT; sin embargo, en el presente estudio se utilizó el índice ICDAS, ya que permite una valoración visual de la caries más precisa, diferenciando caries coronaria primaria, de caries secundaria y de caries radicular en sus estadios iniciales; la última actualización realizada por la fundación ICDAS fue en el año 2013. A continuación se hace una breve descripción de los 3 principales índices ya mencionados.

El índice ICDAS (Sistema Internacional de Valoración y Detección de Caries) llamado por sus siglas en inglés, es un nuevo sistema internacional de detección y diagnóstico de caries, consensuado en Baltimore, USA en el año 2005, para la práctica clínica, la investigación y el desarrollo de programas de salud pública. El objetivo fue desarrollar un método visual para la detección de caries, en fase temprana como fuera posible, y que además detectara la gravedad y el nivel de actividad de la misma. Este sistema de diagnóstico diferencia las lesiones tempranas no cavitadas (ICDAS 1 y 2) de las cavitadas o dentinales (ICDAS 3 a 6) como se puede observar en la Tabla 6-10, y permite establecer los diferentes niveles de avance de las lesiones de caries dental (42,78).

Código	Descripción	Ejemplo
--------	-------------	---------

**RECuento E IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus mutans* DE SALIVA EN NIÑOS CON CARIES DENTAL: SEGUIMIENTO A 3 Y 6 MESES DESPUÉS DE UN PROCESO EDUCATIVO**



<b>0</b>	Superficie dental sana	
<b>1</b>	Primer cambio visual en el esmalte, visible solo después del secado prolongado con aire. Cuando la superficie dental está húmeda no hay evidencia de algún cambio de color atribuible a lesión de caries	
<b>2</b>	Cambio visual distinguible en esmalte. Hay una opacidad o decoloración cuando la superficie dental está húmeda, condición que no es consistente con la apariencia clínica del esmalte sano	
<b>3</b>	Pérdida de estructura dental debido a caries, localizada en el esmalte, sin dentina visible	
<b>4</b>	Superficie no cavitada con sombra oscura subyacente desde la dentina	
<b>5</b>	Superficie cavitada con dentina visible. Cavitación en esmalte opaco o decolorado con dentina expuesta	
<b>6</b>	Superficie con cavidad extensa. Puede ser profunda o amplia y la dentina es claramente visible en las paredes y la base. Al menos la mitad de la superficie dental está afectada y posiblemente se extiende a la pulpa	

\*International Caries Detection and Assessment System.

**Tabla 6-10 Criterios ICDAS para la detección de caries dental y evaluación de severidad.**  
Modificado de: (42,77)

Este índice posee entre un 70% a 85% de sensibilidad y una especificidad entre 80 a 90% en detección de caries, tanto en dentición permanente como temporal, variando el rango de acuerdo al grado de entrenamiento y calibración del examinador y, con un índice de concordancia Kappa igual o mayor a 0,65 (67).

A diferencia del índice ICDAS, el índice Ceo-d (cariado, obturado y perdido por caries por diente) no contempla las lesiones iniciales de mancha blanca, impidiendo establecer un diagnóstico preciso y temprano de la presencia de caries dental. En la Tabla 6-10, se puede observar las notables diferencias que existe entre un índice y el otro. Además, no se consideran los dientes ausentes y la restauración por medio de una corona se considera diente obturado. En aquellos niños con dentición mixta, se debe considerar tanto el índice DMFT o CPOD como el Ceo-d, ya que consideran toda la dentición, tanto temporal como permanente (79).



Índice ICDAS	Índice Ceo-d
<b>0: Sano</b>	Sano
<b>1w: Lesión blanca en superficie seca</b>	Sano
<b>1b: Lesión café en confinada</b>	Sano
<b>2w: Lesión blanca en superficie húmeda</b>	Sano
<b>2b: Lesión café más allá del surco</b>	Sano
<b>3: Pérdida integridad superficie</b>	Sano
<b>4: Sombra subyacente</b>	Sano
<b>5: Cavidad distinguible</b>	Cariado
<b>6: Cavidad extendida</b>	Cariado

**Tabla 6-11 Comparación de los diagnósticos de caries entre los índices ICDAS y Ceo-d.**

*Fuente: (79)*

Por último, el índice DMFT por sus siglas en inglés que significan (sum of decay, missing, and filling tooth in primary and permanent dentition) o CPOD por sus siglas en español (suma de dientes cariados, perdidos/extraídos y obturados en la dentición temporal y permanente) es el más utilizado y difundido de los indicadores de caries dental, tanto presente como pasada, en la dentición permanente. Considera toda la historia de la patología en el individuo, pues señala la experiencia de caries tanto presente como pasada, pues toma en cuenta los dientes con lesiones de caries y con tratamientos previamente realizados. Fue desarrollado por Klein, Palmer y Knutson durante un estudio del estado dental y la necesidad de tratamiento de niños asistentes a escuelas primarias en Hagerstown, Maryland, EE.UU., en 1935. Se ha convertido en el índice fundamental de los estudios odontológicos que se realizan para cuantificar la prevalencia de caries dental (7,80).

La utilización de estos indicadores para la detección y el diagnóstico de caries, proveerá de flexibilidad a los clínicos a la hora de determinar el estadio del proceso de caries o severidad de la lesión, útil para la detección temprana y la planificación del tratamiento, así como para el seguimiento de esta.

## **6.7. Tratamiento**

El tratamiento rutinario de la caries es sintomático: la sustancia cariada de una lesión que detecta el profesional o explica el paciente se elimina y la pérdida de sustancia se rellena con un material de obturación.

Para una fácil categorización de decisiones terapéuticas, se hace útil adoptar el modelo propuesto por Pitts y Longbottom, que clasifican las lesiones en 2 grupos, según sea la decisión a adoptar: Lesiones que necesitan tratamiento preventivo (NTP) y lesiones que necesitan tratamiento restaurador (NTR). Cada una de ellas presenta diferentes posibilidades terapéuticas. Todo paciente afectado de caries dental debe ser sometido a controles sucesivos, cuya periodicidad depende de su nivel de riesgo y de la actividad de las lesiones (81).

El tratamiento preventivo tiene como objetivo general reducir la incidencia, prevalencia y gravedad de la caries dental, entre los productos de acción preventiva se encuentran: Flúor, Xylitol. Los objetivos específicos son: identificar los riesgos, controlar los riesgos y disminuir la pérdida dentaria. Por otro lado, dentro de los tratamientos curativos invasivos se incluye: operatoria dental con láser, preparaciones cavitarias para restauraciones con amalgama y compuestos adhesivos.

## **6.8. Estrategias de prevención**



## RECuento E IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus mutans* DE SALIVA EN NIÑOS CON CARIES DENTAL: SEGUIMIENTO A 3 Y 6 MESES DESPUÉS DE UN PROCESO EDUCATIVO



La caries es una enfermedad que puede detenerse en etapas tempranas, además de ser prevenida y manejada de muchas formas. Los enfoques incluyen prevención primaria, definida como intervenciones provistas para evitar la iniciación de la caries, y prevención secundaria, definida como intervenciones para evitar el avance de lesiones tempranas a caries avanzadas. Por esta razón se han adoptado un número de estrategias en la prevención de la enfermedad, que incluyen:

1. Administración de fluoruro tópico y sistémico, el cuál actúa en la superficie de los dientes y en la flora bacteriana, haciendo una prevención primaria;
2. Buena higiene oral que incluya el uso de pasta dental con flúor, hilo dental y enjuague bucal específico. La eliminación mecánica de depósitos de placa asociada con las acciones farmacológicas de una pasta dental, disminuye la carga bacteriana y facilita la desintegración de las colonias;
3. Dieta balanceada, baja en azúcar;
4. Consumo de sucedáneos de la sacarosa como xilitol, sorbitol, licasina;
5. La aplicación de selladores que reducen nichos de colonización;
6. Actividades de promoción, prevención y educación en salud oral.

La eficacia de los métodos recomendados para la prevención de la caries ha sido claramente demostrada tanto en la clínica odontológica como en los programas comunitarios. En las poblaciones con alta prevalencia es necesario primero instaurar medidas preventivas masivas que garanticen la protección de toda la comunidad; luego, para ser más eficientes se requiere de la implementación de acciones preventivas específicas, para ello hay que emplear el enfoque de riesgo que identifique a las personas con más probabilidad de enfermar. Las actividades preventivas se clasifican en: Medidas preventivas comunitarias, medidas de cuidado personal y medidas profesionales (82).

En décadas recientes, algunos estudios se han centrado en la obtención de vacunas anti-caries dirigidas hacia *S. mutans*. Estas vacunas contienen anticuerpos contra receptores de la superficie bacteriana, Ag I/II, las cuales previenen la adhesión de los microorganismos al esmalte dentario. Otro tipo de vacuna ha sido sintetizada contra la enzima glucosil transferasa secretada por *S. mutans*. Esta enzima cataliza la síntesis de glucanos extracelulares a partir de sacarosa introducida por la dieta, formando una matriz responsable de la acumulación bacteriana (33).

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados para prevenirla, se desconoce si el recuento de *S. mutans* en saliva de personas con caries dental se disminuye después de intervenciones educativas en salud oral. Se ha visto que una dieta rica en sacarosa, una inadecuada higiene oral unida a la colonización temprana de *S. mutans* y sus altos recuentos en niños, además de otros factores, aumentan la incidencia de caries, ya que la evidencia demuestra que sí existe una asociación entre recuentos altos de *S. mutans* y el riesgo de desarrollar caries. El presente trabajo de investigación intentará determinar la presencia de *S. mutans* y su recuento en UFC/ per ml en saliva de niños con caries dental antes y después de un proceso educativo en salud oral, con el fin de establecer diferencias estadísticamente significativas en los valores obtenidos.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1. Diseño

Finalidad	Control de asignación de factores	Secuencia temporal	Direccional
Análítico	Experimental	Longitudinal	Prospectivo

Tabla 7-1 Diseño de investigación



## **7.2. Población y muestra**

Se hizo un ensayo comunitario de intervención en niños de ambos sexos en edades de 3 a 6 años, alumnos del Centro Educativo Fe y Alegría – José María Velaz, localidad de Suba, en la Ciudad de Bogotá. Con grupo control correspondiente a los niños sin caries seleccionados de acuerdo al criterio de clasificación ICDAS.

La intervención realizada por la Dra. Ana Lucía Sarralde y la Dra. Claudia Patricia Lamby y otras docentes del área comunitaria de la Facultad de Odontología, consistió con brevedad en un proceso educativo en salud oral dirigido a los Padres y/o acudientes de los escolares. La aplicación de una encuesta de conocimientos, actitudes y prácticas en salud oral, la cual se desarrolló desde el inicio de la aprobación de los padres. En la descripción de este proceso incluyen: Conferencia-taller a padres y niños sobre la importancia de una buena salud oral; taller educativo sobre cepillado y evidencia de placa bacteriana o biopelícula dental, importancia de una buena alimentación, orientación y recomendaciones; conversatorio y retroalimentación con padres y niños a lo largo del proyecto sobre la importancia de una buena higiene oral.

El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad Javeriana. Con la presentación del proyecto a las directivas de la institución educativa preescolar se obtuvo su aprobación y se procedió a diligenciar el consentimiento informado de los padres o adultos responsables para autorizar la participación de los niños en el estudio, una vez informados sobre los alcances del mismo.

Para la realización del presente estudio, se tomaron muestras de saliva en los niños de 3 a 6 años de edad, separando el grupo sano (sin caries dental, ICDAS 0) y el grupo con caries dental. En el grupo sano, se incluyeron 8 niños sin caries dental. En el grupo de caries dental, se incluyeron 11 niños con caries dental con índice ICDAS 3 y 12 niños con caries dental con índice ICDAS 6. Es importante resaltar que el aislamiento, identificación y recuento de *S. mutans* en niños incluidos en el grupo sano, sin caries dental ICDAS 0, se realizó simultáneamente en un estudio aparte; comprendiendo en el presente proyecto, la identificación, aislamiento y recuento de *S. mutans* en niños incluidos en el grupo de caries dental, ICDAS 3 y 6.

## **7.3. Población universo**

Muestras de saliva de niños de 3 a 6 años con caries dental obtenidos entre Febrero y Abril de 2015.

## **7.4. Población de estudio**

Muestras de saliva provenientes de niños con caries dental entre 3 a 6 años que pertenecen a una institución preescolar de Bogotá.

## **7.5. Tamaño de muestra**

Muestra de saliva obtenidas de 23 niños con caries dental. 11 niños con caries dental índice ICDAS 3 y 12 niños con caries dental índice ICDAS 6.

## **7.6. Procedimiento**

La investigación se llevó a cabo en El Centro de Investigaciones Odontológicas (CIO), adscrito a la Facultad de Odontología en la Pontificia Universidad Javeriana Sede Bogotá.



### **7.6.1. Sujetos del estudio**

La población de estudio fue del Centro Educativo Fe y Alegría – José María Velaz de la ciudad de Bogotá en el período comprendido entre Enero y Febrero del año 2015. Los pacientes fueron seleccionados por conveniencia para el estudio. Las muestras fueron tomadas por docentes del área comunitaria y del CIO, la Dra. Ana Lucía Sarralde y la Dra. Claudia Patricia Lamby, provenientes de niños en edades entre los 3 a 6 años. Antes de la inclusión de los niños en el estudio se cuenta con el consentimiento informado por parte de los padres, además de la información general de cada uno de ellos.

#### *Criterios de selección:*

- Criterios de inclusión: En el estudio se incluyeron niños y niñas de 36 a 72 meses residentes en la ciudad de Bogotá, inscritos en la nómina de alumnos de la Institución Educativa correspondiente, que presentaran toda la dentición temporal completa, sin compromiso sistémico, sin alteraciones del desarrollo dental, sin aparatología ortodóntica, y que hayan firmado la carta de consentimiento informado por parte de sus padres o adultos responsables para participar en el estudio.
- Criterios de exclusión: Niños que presentaran agenesia dental, fracturas de la corona, Avulsión de dientes temporales, con Síndromes asociados, presencia de enfermedades crónicas, con tratamientos que puedan contener sacarosa en su composición y en edades diferentes al rango de edad establecido para el estudio. Además, niños con cualquier otro proceso infeccioso oral diferente a caries dental, con algún proceso de discapacidad que impidiera la recolección de las muestras y, por último, niños que hayan recibido antibioterapia en los últimos 7 días previos a la toma de la muestra.

El examen en la cavidad oral permitió establecer la experiencia de las caries por un odontólogo quién determinó el índice ICDAS por sus siglas en inglés (International Caries Detection and Assessment System) conducido y desarrollado por el Centro de Detroit para la investigación sobre disparidades en salud oral (DCR – OHD) en el año 2005 (78,79). No se tomaron rayos X a ningún niño.

### **7.6.2. Recolección de la muestra y procedimientos biológicos**

Para las pruebas de actividad de caries se tomaron muestras de saliva no estimulada según lo informado por Fure (1998; 2003) (83,84) en los niños, incluidos en el grupo con caries dental, a los 0, 3 y 6 meses de iniciado el estudio. Obteniéndose mediante suave succión con una pipeta Pasteur; se recolectaron en horas de la mañana después del desayuno. La codificación de las muestras siguió el método descrito a continuación: Edad/ICDAS/momento en el tiempo (A=0; B=3; C=6) o (X=0; Y=3; Z=6). Como la recolección se llevó a cabo en dos períodos de tiempo distintos, el muestreo se conformó en dos grupos: Grupo 1 y Grupo 2. El grupo 1 lo integran 11 niños y el grupo 2 lo integran 12 niños.

Las muestras fueron inmediatamente transportadas al laboratorio de microbiología en un recipiente refrigerado para su posterior procesamiento. Luego fueron agitadas en vortex V-1 plus (Boeco, Germany) durante 30 segundos y se realizaron diluciones en base 10 ( $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ) en tampón fosfato (PBS) al 0.05 M.

### **7.6.3. Procesamiento de la muestra (Recuento, aislamiento e identificación de microorganismos)**



Alícuotas de 35 µl de cada una de las diluciones apropiadas se cultivaron en Agar Infusión Cerebro-Corazón (BHI), Agar Mitis Salivarius, MSA, y MSA suplementado con Sacarosa al 20% y bacitracina 0,2U/ml, MSB al 20%. El Agar MSB se usa para el aislamiento selectivo y recuento de *Streptococcus mutans*. Este medio es frecuentemente usado para el aislamiento y recuento de estreptococos totales y *S. mutans*. Aunque es considerado un medio selectivo para este microorganismo, la recuperación de *S. mutans* es mucho menor que en el Agar Mitis Salivarius (MSA). La identificación de *Streptococcus* totales se hizo sobre el MSA y en MSB suplementado con 20% de sacarosa se usó para la determinación de *Streptococcus* del grupo “*mutans*” como lo reporto Gold y cols. 1973 (85), véase Anexo No. 5.

Las cajas de Petri se incubaron anaeróticamente (H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub> 10:10:80) durante 2 días a 37°C en una cámara anaeróbica (Bactron, Shel Lab) (36). Después del crecimiento en Agar MSB suplementado con 20% de sacarosa, las colonias con morfología típica de *S. mutans* se contaron según lo descrito por Emilson (1981) y se expresaron como Unidades Formadoras de Colonias (UFC) *per ml* de saliva no estimulada (86). La pureza del cultivo se verificó mediante la coloración de Gram, prueba de Catalasa, hemólisis en Agar Sangre y pruebas bioquímicas, según protocolos estándar, véase Anexo No. 6 (61). El recuento de microorganismos aeróbicos totales se realizó para cada muestra en el medio de cultivo BHI, después de las 48 horas de incubación. Se tuvieron en cuenta todas las colonias con características morfológicas distintas en la placa de agar al momento del conteo.

Después del recuento bacteriano, se examinaron entre 5 y 20 colonias con características de *S. mutans* por medio de la tinción de Gram, prueba de Catalasa y se sometieron a las siguientes pruebas bioquímicas: fermentación de manitol y sorbitol. Los resultados se registraron después de 24 horas de aislamiento y las pruebas que reflejaron resultados débiles o no claros fueron rechequeados usando las mismas pruebas bioquímicas y, además de pruebas enzimáticas tales como la actividad de la catalasa. Al término de la identificación bioquímica de los aislados de *S. mutans* se tomó un inóculo del cultivo puro para almacenar el aislado bacteriano en viales con medio Todd-Hewitt para su posterior almacenamiento y transporte a un laboratorio especializado de biología molecular donde se realizará la identificación genotípica de las muestras.

Finalmente, se sembró la dilución 10<sup>-5</sup> de cada muestra procesada en Agar MacConkey con el fin de encontrar bacterias Gram negativas fermentadoras de lactosa, es decir especies de *Enterobacteriaceae*, productoras de ácidos. Se incubaron aeróticamente durante 2 días a 37°C y se les realizó tinción de Gram, prueba de la Catalasa para determinar sus características morfológicas, véase Anexo No. 6 – Crecimiento en Agar MacConkey.

Criterios de Selección para *S. mutans*:

- Criterios de inclusión:

Se incluyeron en los recuentos en Agar Mitis Salivarius suplementado con Sacarosa al 20% y Bacitracina 0.2 U/ml, MSB al 20%, a aquellas colonias que presentaran morfología típica de *S. mutans*. Es decir, colonias con apariencia elevadas, convexas, onduladas, de color azul oscuro, con márgenes irregulares, superficie granular, más o menos adherida y con una burbuja de color brillante rodeándolas cuando producen polisacáridos extracelulares. Además, de ser positivas en la prueba de catalasa y observarse cocos o cocobacilos Gram positivos en cadena.



- Criterios de exclusión:

Se excluyeron aquellas colonias con morfología diferente a la sugestiva de *S. mutans* en Agar MSB al 20%.

#### **7.6.4. Determinación del efecto antagónico**

La determinación del efecto antagónico se realizó con el ensayo de doble capa en Agar BHI (Infusión cerebro-corazón) descrito previamente por Apolônio y cols. 2007 (87), en el cual se sembraron las cepas que actúan como productoras de Bacteriocinas; en este caso se utilizaron cultivos tipo o cepas de referencia ATCC, las cuales fueron: *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *S. uberis* ATCC 700407, *S. mutans* ATCC 25175, *L. casei* ATCC 393, *S. salivarius* ATCC 13419, y que fueron cultivadas en Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI); por otra parte, las cepas que actuaron como indicadoras, corresponden a los *S. mutans* aislados a partir de las muestras de saliva no estimulada que fueron sembradas en Agar Mitis Salivarius suplementado con sacarosa al 20% y Bacitracina 0.2U/ml para el recuento de los mismos. Se seleccionaron 20 cepas al azar de *S. mutans* aisladas de las muestras de saliva provenientes de niños con caries dental para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana.

- *Preparación de las cepas productoras*

Las cepas productoras son aquellas que van a tener acción antagónica sobre las cepas indicadoras. De acuerdo a esto, 2 o 3 colonias de cada cepa de *S. mutans* que crecieron en el agar BHI se resuspendieron en caldo BHI y posteriormente se incubaron a 37°C en anaerobiosis (H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub> 10:10:80) durante 48 horas. A partir de esta suspensión, ajustada al 0.5% del patrón de McFarland, se hicieron siembras con micropipeta (2µl) en agar BHI (agar al 1.5% y extracto de levadura al 2%) y se incubaron a 37°C en anaerobiosis (H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub> 10:10:80) durante 48 horas. Después de este tiempo las cepas indicadoras se colocaron sobre las cepas productoras.

- *Preparación de las cepas indicadoras*

Las cepas indicadoras son aquellas que van a sufrir la acción de las cepas productoras; se eligieron de acuerdo, con la frecuencia de los biotipos, serotipos o ribotipos presentes. Con este fin, 2 o 3 colonias de cada cepa de *S. mutans* que crecieron en el agar BHI se resuspendieron en caldo BHI ajustadas al 0.5% de la escala de McFarland y, luego, se mantuvieron en incubación a 37°C en anaerobiosis (H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub> 10:10:80) durante 48 horas. Posteriormente se tomó 0.5 ml de esta suspensión, se mezcló con 5ml de agar BHI (agar al 0,75% y extracto de levadura al 2%) y se agregó inmediatamente sobre el agar BHI (agar al 1,5% y extracto de levadura al 2%) en el que han crecido las cepas productoras preparadas en el paso anterior. Estas cajas de Petri con agar BHI en doble capa, en las que están sembradas tanto las cepas productoras como las indicadoras, se llevaron a incubación a 37°C en anaerobiosis (H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub> 10:10:80) durante 48 horas. Al transcurrir de este período, la acción antagónica se reflejó con la presencia de un halo de inhibición generado por la cepa productora sobre la cepa indicadora. Para establecer el efecto antagónico se tuvieron en cuenta los halos de inhibición mayor de 4 mm.

#### **7.6.5. Susceptibilidad antimicrobiana**

El perfil de susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *S. mutans* seleccionadas para tal fin, se evaluaron contra los siguientes antimicrobianos: penicilina (10 UI), amoxicilina (10µg), amoxicilina + ácido clavulánico (30µg), tetraciclina (10µg), cefalozina (30µg), ciprofloxacina (5µg), eritromicina (15µg), azitromicina (15µg), imipenem (10µg), azitromicina (15µg) y vancomicina (30µg) mediante el



uso del método manual de dilución en agar (Kirby-Bauer). Los sensibilizadores antimicrobianos estándar fueron adquiridos en Sigma Chemical (St Louis, MO, USA). Se realizó suspensiones de cada una de las cepas en solución salina (0.98 p/v) ajustadas al 0,5% del patrón de McFarland, para luego sembrarlas sobre Agar Mueller-Hinton con hisopos estériles de forma masiva. Después de 48 horas de incubación a 35°C en una atmósfera aeróbica, se determinó el diámetro del halo de inhibición, en milímetros (mm), del efecto de cada uno de los antimicrobianos empleados. Se seleccionaron 20 cepas al azar de *S. mutans* aisladas de las muestras de saliva provenientes de niños con caries dental para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana.

### 7.6.6. Análisis estadístico

Se utilizó estadística descriptiva y la prueba Chi cuadrado para establecer diferencias en el recuento total de microorganismos aeróbicos, de *Streptococcus spp.*, y de *S. mutans* en los grupos con caries (ICDAS 3 y 6) antes y después (0,3 y, 6 meses) del proceso de educación para muestras independientes. Todos los test estadísticos se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics v. 22.0 y el nivel de significación estadístico,  $\alpha$ , se fijó en un valor de  $p < 0.05$ .

## 8. RESULTADOS

### *Características orales y demográficas de los pacientes:*

La recolección de los datos se llevó a cabo en dos períodos de tiempo distintos, es por eso que la codificación de las muestras se organizó en dos grupos: Grupo 1 y Grupo 2. De los 24 niños incluidos en el estudio, 1 niño fue excluido por motivos de traslado del estudiante a otro Centro Educativo.

Grupo	Edad (Promedio)	Género	ICDAS	Total Ceo (Promedio)
1	4,2±0,24 (47,8%)	Femenino: 5 (21,7%) Masculino: 6 (26,1%)	3: 6 (26,1%) 6: 5 (21,7%)	3,7±3,1
2	6,5±0,3 (52,2%)	Femenino: 5 (21,7) Masculino: 7 (30,4%)	3: 6 (26,1%) 6: 6 (26,1%)	5,3±3,9
<b>Total</b>	5,4±1,2 (100%)	Femenino: 10 (43,5) Masculino: 13 (56,5%)	3: 12 (52,2%) 6: 11 (47,8%)	4,2±1,1

**Tabla 8-1 Características orales y demográficas de los pacientes**

El resumen de la información morfo-métrica para los niños incluidos en el estudio se describe en la Tabla 8-1. El promedio de edad para el grupo 1 fue de 4 años y dos meses; para el grupo 2 fue de 6 años y cinco meses, con una diferencia entre los dos grupos de 2 años y tres meses. En total, la edad promedio fue de 5 años y cuatro meses. En ambos grupos predominó el género masculino con 26,1% y 30,4%, respectivamente; a nivel general, los datos fueron: 43,5% para el género Femenino y 56,5% para el género masculino. En cuanto al índice ICDAS, 12 niños (52,2%) se encontraban clasificados en ICDAS 3, mientras 11 (47,8%) en ICDAS 6. Además, para índice Ceo se obtuvo un promedio de 3,7 para el grupo 1 y 5,3 para el grupo 2, obteniendo un Total Ceo de 4,2.

### **Objetivo 1: Identificar *Streptococcus mutans* en muestras de saliva en niños con caries dental antes y después de un proceso educativo en salud oral.**

Para el cumplimiento de este objetivo, referente a la identificación y aislamiento de *S. mutans* se obtuvieron los siguientes resultados:

#### *Frecuencia de aislamiento e identificación de *S. mutans* a partir de placas de Agar MSB:*



## RECuento E IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus mutans* DE SALIVA EN NIÑOS CON CARIES DENTAL: SEGUIMIENTO A 3 Y 6 MESES DESPUÉS DE UN PROCESO EDUCATIVO



La Tabla 8-2 muestra el número de cepas de *S. mutans* identificadas a partir de 69 análisis microbiológicos realizados. Se observa que en un 69,6% de los análisis globales se aisló e identificó cepas de *S. mutans*. Este proceso se fundamentó principalmente en la selección de colonias con morfología típica y característica en Agar Mitis Salivarius suplementado con Sacarosa al 20% y Bacitracina 0.2U/ml, véase Anexo No.5. Además, la adición de sacarosa y bacitracina hacen que el medio se vuelva mucho más selectivo, favoreciendo el aislamiento de dicho microorganismo, como lo reportan estudios anteriores (85,88,89), a partir de muestras de saliva o placa dental; a estas concentraciones, los agentes selectivos permiten la recuperación de *S. mutans* con inhibición máxima del equilibrio de la flora normal de *Streptococcus spp.*, encontrados en este medio. También se ha reportado que los Enterococos y/o Levaduras se observan en ocasiones cuando son cultivadas muestras de placa de niños con lesiones dentales avanzadas. Sin embargo, otros estudios reportan que el medio TYCSB es el medio más selectivo y sensible para el cultivo de *S. mutans* tanto para laboratorio y estudios clínicos. Solo los cultivos con crecimiento sugestivo de *S. mutans* siguieron el procedimiento.

Posteriormente, las colonias sugestivas de *S. mutans* se sembraron por agotamiento en Agar MSB al 20%; se realizó tinción de Gram y prueba de catalasa, ver Anexo No.6 – Prueba de catalasa y tinción de Gram - .

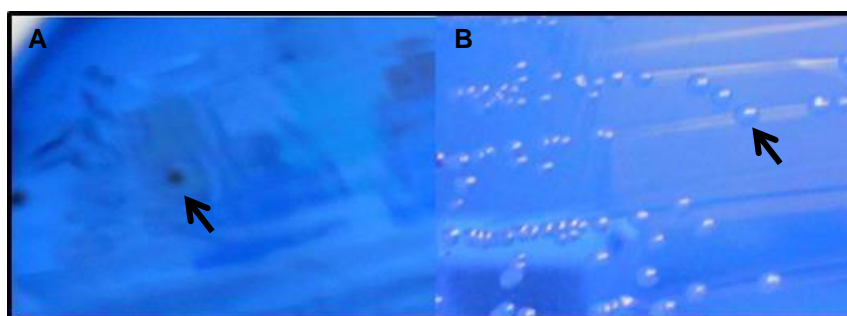
Aislamiento de <i>S. mutans</i>	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Si	48	69,6
No	21	30,4
Total	69	100

**Tabla 8-2 Frecuencia de aislamiento de *S. mutans***

De los 48 cultivos sugestivos para *S. mutans* se logró obtener un total de 20 aislamientos, obteniéndose cultivos puros, véase Anexo No.6 – Registro fotográfico de aislamientos - , con las características morfológicas mencionadas, además de ser catalasas negativas. De los restantes se encontraron cultivos acompañados de flora comensal de la cavidad bucal con características morfológicas de bacilos gram positivos y bacilos gram negativos que no se tuvieron en cuenta en el estudio por no hacer parte del mismo.

### *Características morfológicas de las colonias de S. mutans:*

Como se había señalado en la sección de resultados – procesamiento de la muestra – las 20 cepas aisladas de *S. mutans*, fueron almacenadas en viales con medio Todd-Hewitt para su conservación y posterior envío a un laboratorio de biología molecular en el cual se hará la identificación genotípica. Esta sección de los resultados no se incluyó por motivos de tiempo pero se realizará para posteriores investigaciones.



Fotografía 8-1 Tipos de colonias de *S. mutans*.

Es de gran importancia hacer mención, como se hace en el Anexo No. 5, que las colonias de *S. mutans* varían dependiendo del medio de cultivo utilizado. En la Fotografía 8-1, se observan dos tipos de morfología, aisladas con frecuencia a partir de las muestras de saliva. En la parte A, se observan colonias convexas, onduladas, de color azul oscuro, con márgenes irregulares, superficie granular y aspecto rugoso; en la parte B, se observan colonias convexas, de color azul claro, con márgenes regulares, superficie lisa y más grandes que las anteriores.

*Distribución de S. mutans en muestras de saliva:*

De las 69 muestras de saliva espontánea tomadas en los niños con caries dental al inicio (0 meses), a los 3 y 6 meses se determinó la presencia de *S. mutans* en el tiempo y su distribución a medida que avanzaba el proceso educativo en salud oral.

n	Inicio (0)	3 meses	6 meses
1	Si	Si	Si
2	Si	No	No
3	Si	No	No
4	Si	Si	No
5	Si	Si	Si
6	Si	Si	Si
7	Si	Si	No
8	Si	Si	Si
9	Si	Si	No
10	Si	Si	No
11	Si	Si	Si
12	Si	No	No
13	Si	Si	Si
14	Si	No	No
15	Si	Si	No
16	Si	No	No
17	Si	Si	Si
18	Si	No	No
19	Si	Si	Si
20	Si	Si	Si
21	No	No	No
22	Si	Si	Si
23	Si	No	No

Tabla 8-3 Distribución de *S. mutans* en el tiempo

En la Tabla 8-3 se representa la distribución de *S. mutans* en las muestras de saliva durante los 6 meses de intervención. De los 23 niños incluidos en el estudio, en 22 niños (96%) se determinó la presencia de este microorganismo. A los 3 meses, cerca de la mitad de los niños no se presenció *S.*

**RECUESTO E IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus mutans* DE SALIVA EN NIÑOS CON CARIES DENTAL: SEGUIMIENTO A 3 Y 6 MESES DESPUÉS DE UN PROCESO EDUCATIVO**

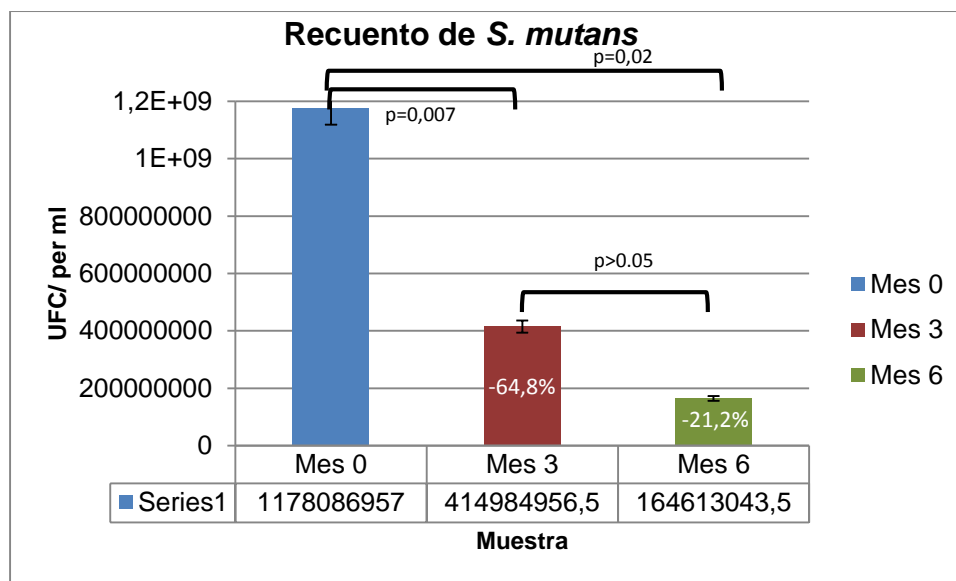


*mutans* (35%). Finalmente, a los 6 meses de iniciar el proceso educativo el 56% de los niños (13/23) no se observó *S. mutans*.

**Objetivo 2: Determinar el recuento de *Streptococcus mutans* en niños con caries dental antes y después de un proceso educativo en salud oral.**

Conteo de *S. mutans*:

Luego de la identificación de las cepas de *S. mutans* mediante los procedimientos descritos anteriormente, se procedió al conteo en placa en Agar Mitis Salivarius suplementado con Sacarosa al 20% y Bacitracina 0.2 U/ml de *S. mutans* en los 69 análisis. Los valores promedios del recuento total de *S. mutans* (UFC/ml) en muestras de saliva a partir de los niños incluidos en el estudio se describen a continuación.



**Ilustración 8-1 Valores promedio del recuento de *S. mutans***

Al determinar el recuento de *S. mutans* en todas las muestras analizadas, a los 0, 3 y 6 meses, se observó una reducción sustancial del 86% a los 6 meses de haber iniciado la intervención educativa en salud oral como se observa en la Ilustración 8-1. Del mes 0 al mes 3 el recuento de *S. mutans* disminuyó en un 64,8% en promedio y, del mes 0 al mes 6, una reducción del 86% adicional, siendo estadísticamente significativa ambas medidas,  $p=0,02$ , cuando se analizó de acuerdo a la prueba T-student. Sin embargo, del mes 3 al mes 6, no hubo diferencias estadísticamente significativas,  $p>0,05$ , a pesar de obtener una disminución del 60% entre este intervalo.

Valores promedios del recuento <i>S. mutans</i> en muestras de saliva de niños con caries dental							
Microorganismo		Recuento de SM*					
		0 Meses		3 Meses		6 Meses	
Recuento bajo	<10 <sup>5</sup>	0	1(4,35%)	3,38±4,06E+5	4(17,4%)	7,7E+3±2,8E+4	13(56,5%)
Recuento alto	>10 <sup>5</sup>	1,23±1,99E+9	22(95,6%)	5,02±8,50E+8	19(82,6%)	3,8±3,8E+8	10(43,5%)

**RECUESTO E IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus mutans* DE SALIVA EN NIÑOS CON CARIES DENTAL: SEGUIMIENTO A 3 Y 6 MESES DESPUÉS DE UN PROCESO EDUCATIVO**



\*SM, *Streptococcus mutans*. Los valores están expresados como medias ( $\pm$ DS). Se observaron diferencias en el recuento de *S. mutans* de 0 a 3 meses y de 0 a 6 meses ( $p < 0.05$ )

**Tabla 8-4 Valores promedios del recuento de *S. mutans***

En la literatura científica se estableció que recuentos superiores a  $10^5$  UFC/ml de *S. mutans* en saliva de pacientes con caries dental, indican un alto riesgo para el desarrollo de caries o su progresión. La Tabla 8-4 muestra la clasificación entre recuento bajo ( $<10^5$ ) y recuento alto ( $>10^5$ ) con respecto al valor relativo y absoluto de los valores promedios, obtenidos a partir del mes 0 hasta el mes 6. Se puede observar que al mes cero, de 23 niños incluidos en el estudio, 22 (95,5%) tenían un recuento alto,  $>10^5$  UFC/ml y sólo 1 (4,35%) estaba por debajo de este valor. Al tercer mes, 4 niños (17,4%) se encontraban por debajo de  $<10^5$  UFC/ml en el recuento de *S. mutans* con un valor promedio de  $3,38 \times 10^4 \pm 4,06 \times 10^5$ . Posteriormente, al mes seis se presentó un incremento aún mayor, continuando con la tendencia, obteniendo 13 niños (56,5%) con recuentos inferiores a  $<10^5$  UFC/ml y, con un valor promedio de  $7,7 \times 10^3 \pm 2,8 \times 10^4$ . Todos los valores fueron estadísticamente significativos al ser analizados,  $p < 0.05$ . Cabe destacar como hecho importante que un niño con caries dental y clasificada como ICDAS 6, no presentó *S. mutans* en las tres muestras de saliva recolectadas durante el estudio.

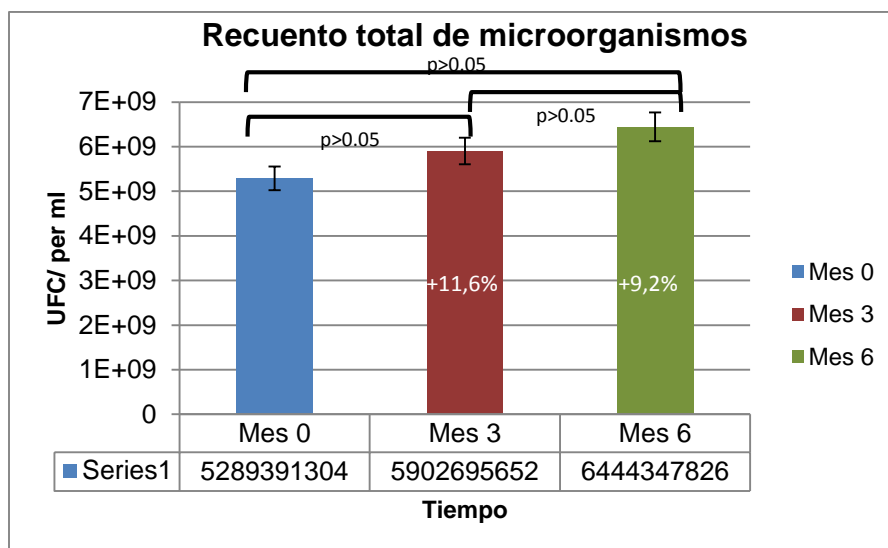
Rangos de riesgo de caries dental, según recuento de estreptococos del grupo <i>mutans</i>			
UFC/ml	Riesgo	n	%
10.000-50.000	Bajo	12	52,2
100.000-250.000	Medio	1	4,3
500.000-1.000.000	Alto	10	43,5
<b>Total</b>		23	100%
Los datos expresados son el promedio de la última muestra (6 Meses) en todos los pacientes.			

**Tabla 8-5 Rangos de riesgo de caries dental modificado a partir del método semi-cuantitativo Linoscreen**

Para determinar el riesgo de caries dental a partir del recuento de *S. mutans*, se modificó la escala de clasificación realizada por el método semi-cuantitativo Linoscreen (9,90), tal como se presenta en la Tabla 8-5. Los datos que se tuvieron en cuenta para esta clasificación del riesgo fueron los valores promedio del recuento de *S. mutans* a los 6 meses en los 23 niños. De acuerdo a esto, se clasificó en riesgo bajo al 52,2% de los niños con recuentos entre las 10.000 y 50.000 UFC/ml. Sin embargo, se evidencia la permanencia de 10 niños en el grupo de riesgo alto con valores entre  $5 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  UFC/ml, a pesar de obtenerse diferencias estadísticamente significativas,  $p < 0.05$ , del mes 0 al mes 6 en los promedios de los recuentos obtenidos.

**Objetivo 3: Determinar el recuento de microorganismos aeróbicos totales y estreptococos totales en niños con caries dental antes y después de un proceso de educación.**

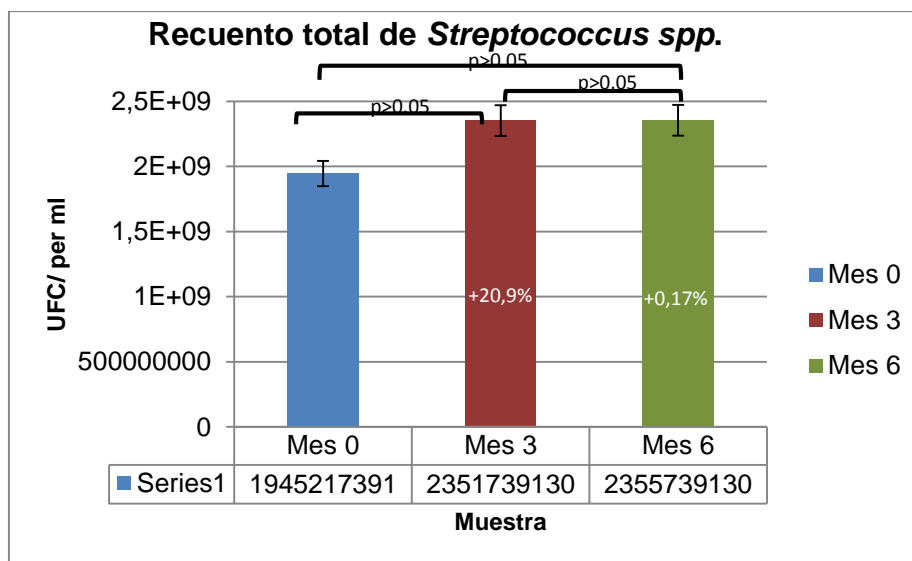
El recuento de microorganismos totales se llevó a cabo en Agar BHI + 5% de sangre de cordero, véase Anexo No. 6 - Conteo de colonias expresado en UFC/ per ml.



**Ilustración 8-2 Valores promedio del recuento total de microorganismos aeróbicos**

La Ilustración 8-2 presenta los valores promedio de todos los recuentos a los 0, 3 y 6 meses. Los recuentos estuvieron en el orden de  $4 \times 10^9$  a  $7 \times 10^9$  UFC/ml. En el gráfico se observa que se produjo un incremento considerable del recuento de microorganismos aeróbicos totales durante las tres medidas. Del mes 0 al mes 3 se observa una diferencia del 11,6%; aumentando en el segundo trimestre hasta un 9,2% y, obteniendo un total del 21,8%. A pesar de esto, todas las mediciones no fueron estadísticamente significativas,  $p > 0.05$ .

El recuento de *Estreptococos* totales se llevó a cabo en Agar Mitis Salivarius + 5% de sacarosa, véase Anexo No. 6 - Conteo de colonias expresado en UFC/ per ml.



**Ilustración 8-3 Valores promedio del recuento total de *Streptococcus spp.***

**RECUESTO E IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus mutans* DE SALIVA EN NIÑOS CON CARIES DENTAL: SEGUIMIENTO A 3 Y 6 MESES DESPUÉS DE UN PROCESO EDUCATIVO**



La Ilustración 8-3 corresponde a los valores promedios del recuento total de *Streptococcus spp.*, presentes en saliva a través de las tres mediciones en el tiempo. En el gráfico se observa un incremento del 20,9% de estreptococos orales en el transcurso de los primeros tres meses, seguido de un incremento del 21,1% para el sexto mes; esto indica que existió un incremento sustancial desde el momento inicial. Sin embargo, no se observó diferencias estadísticamente significativas entre las tres medidas (de 0 a 3, de 3 a 6 y de 0 a 6) cuando los datos fueron comparados,  $p > 0.05$ .

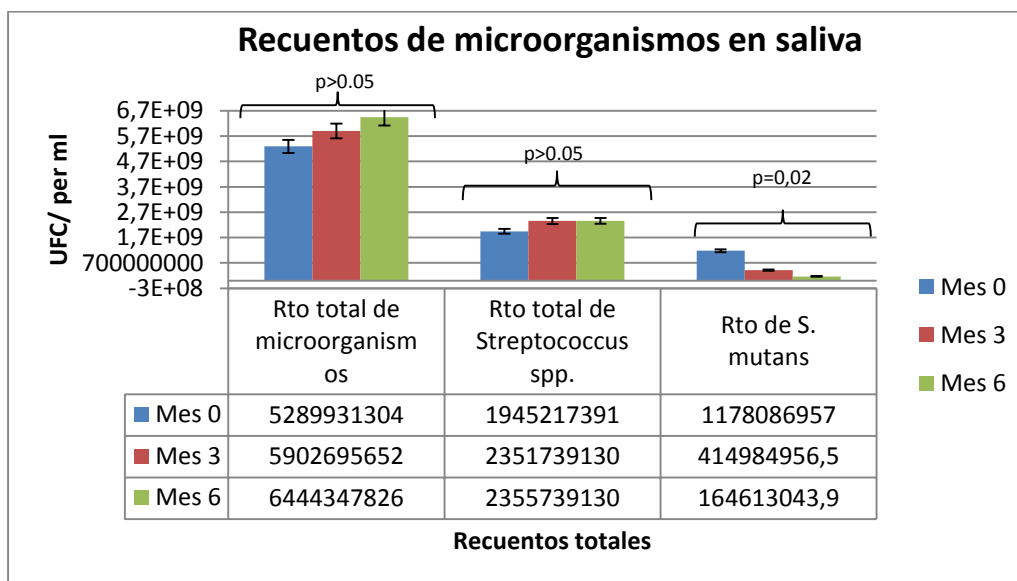
Valores promedios del recuento total de <i>Streptococcus spp.</i> , en muestras de saliva de niños con caries expresados como CFUx10 <sup>9</sup> /ml							
Microorganismo		Recuento total de <i>Streptococcus spp.</i>					
		0 Meses		3 Meses		6 Meses	
Recuento bajo	<10 <sup>5</sup>	/	0(0%)	/	0(0%)	/	0(0%)
Recuento alto	>10 <sup>5</sup>	1,94±2,75	23(100%)	2,35±2,28	23(100%)	2,36±2,13	23(100%)

Los datos están expresados como medias (±DS). No se observaron diferencias en el recuento total de *Streptococcus spp.*, a los 0,3 y 6 meses cuando los datos se compararon según la prueba T-student ( $p > 0.05$ ).

**Tabla 8-6 Valores promedios del recuento total de *Streptococcus spp.***

Por otro lado, al clasificar los valores promedios de los recuentos totales de *Streptococcus spp.*, de las muestras de saliva de los 23 niños incluidos en el estudio entre recuento bajo (<10<sup>5</sup>) y recuento alto (>10<sup>5</sup>), se observó que todos ellos presentaban un recuento superior a >10<sup>5</sup>UFC/ml durante los 6 meses como se presenta en la Tabla 8-6. Sin embargo, al analizar los valores obtenidos a los 0, 3 y 6 meses no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa,  $p < 0.05$ .

A continuación se presentan de manera esquemática los valores promedios de los recuentos de *S. mutans*, microorganismos aerobios totales y Estreptococos totales al inicio (0 meses), al mes 3 y al mes 6.



**Ilustración 8-4 Recuentos totales en los tres grupos analizados**



**RECuento E IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus mutans* DE SALIVA EN NIÑOS CON CARIES DENTAL: SEGUIMIENTO A 3 Y 6 MESES DESPUÉS DE UN PROCESO EDUCATIVO**



Los valores promedios para los recuentos totales de las tres mediciones (UFC/ml), es decir, para microorganismos aeróbicos totales, para *Streptococcus* totales y, para *S. mutans* a manera de síntesis se presenta en la Ilustración 8-4. Se puede observar diferencias en magnitud entre los tres análisis; donde el recuento de microorganismos aeróbicos totales se encuentra en el orden de  $5,2 \times 10^9$  a  $6,5 \times 10^9$ , mientras que el recuento total de especies *Streptococcus* está en el orden de  $1,9 \times 10^9$  a  $2,35 \times 10^9$  evidenciando la diferencia en magnitud entre estos recuentos. También para el recuento de *S. mutans* se observa una diferencia en los valores promedios inferiores a los dos anteriores, en el orden de  $1,17 \times 10^9$  a  $1,6 \times 10^8$ . Las mediciones en los recuentos de microorganismos aeróbicos totales y de *Streptococcus spp.*, a los 0,3 y 6 meses no fueron estadísticamente significativos,  $p > 0,05$ , como se mencionó anteriormente. Por otro lado, para *S. mutans*, se presentaron diferencias entre el mes 0 a 3 y el mes 0 a 6,  $p = 0,02$ , siendo el intervalo 3 a 0 no significativo.

**Objetivo 4: Determinar la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas *S. mutans* aisladas de muestras de saliva en niños con caries dental antes y después de un proceso educativo en salud oral, y determinar el efecto antagonico que producen sobre estas cepas, cepas productoras tipo ATCC.**

*Perfil de resistencia a los antimicrobianos:*

Para cumplir con este objetivo, una vez aisladas e identificadas las cepas de *S. mutans* se procedió a realizar el antibiograma para las 20 cepas de acuerdo al método de difusión en disco Kirby-Bauer, como se describe en la metodología. En la Tabla 8-7 se observa los perfiles de susceptibilidad de las 20 cepas con los 9 antimicrobianos utilizados.

Cepas evaluadas	P (10 UI)	AML (10µg)	KZ (30µg)	E (15µg)	IMI (10µg)	VA (30 µg)	AMC (30 µg)	TE (10 µg)	CIP (5µg)	AZM (15µg)
31C	0	13	17	0	0	19	26	21	22	12
32X	8	15	0	10	11	>30	10	10	19	7
32Y	14	>30	19	28	15	19	>30	>30	24	23
32Z	16	19	18	>30	17	21	>30	>30	>30	>30
33A	0	0	0	13	0	0	21	>30	17	19
33C	17	18	7	14	15	0	18	25	25	22
62B	>30	>30	>30	>30	28	>30	>30	>30	>30	>30
34A	13	19	24	0	0	>30	30	24	27	0
35C	18	>30	>30	>30	23	>30	>30	>30	>30	>30
36C	0	0	0	0	0	0	0	30	17	0
36Z	12	16	11	>30	17	22	>30	>30	>30	>30
37A	30	>30	30	>30	25	>30	>30	>30	>30	>30
61B	14	10	26	22	14	18	30	26	21	18
61X	10	16	0	26	11	18	24	20	16	16
61Y	10	12	14	16	13	12	14	14	15	18
62Z	16	18	10	14	8	0	14	15	13	16
63Y	0	13	0	22	0	0	19	>30	15	11
63Z	17	16	18	24	10	22	>30	>30	>30	26
66Z	7	8	0	8	0	0	17	17	16	15
67Y	0	18	10	>30	0	24	8	14	22	20
<b><i>S. mutans</i> ATCC25175</b>	>30	>30	30	>30	18	28	>40	>30	>30	27

El diámetro del halo de inhibición se expresó en milímetros. S, sensible; I, Intermedio; R, resistente; -, no hay dato. P, Penicilina G; AML, Amoxicilina; KZ, Cefazolin, E, Eritromicina; IMI,

**RECuento E IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus mutans* DE SALIVA EN NIÑOS CON CARIES DENTAL: SEGUIMIENTO A 3 Y 6 MESES DESPUÉS DE UN PROCESO EDUCATIVO**



Imipenem; VA, Vancomicina; AMC, Amoxicilina + A. clavulánico; TE, Tetraciclina; CIP, Ciprofloxacina; AZM, Azitromixina.

**Tabla 8-7 Determinación del perfil de susceptibilidad antimicrobiana para las cepas de *S. mutans* aisladas de muestras de saliva**

De acuerdo a estos datos, se establece que la mayoría de los aislamientos, cerca del 70%, fueron altamente sensibles a Vancomicina, Amoxicilina + Ácido clavulánico, Azitromicina y Ciprofloxacina. Por otro lado, el 60% de las cepas fueron resistentes a Imipenem y 20% se catalogaron como intermedias según los puntos de corte; para la cepa de referencia *S. mutans* ATCC 25175, utilizada como comparador, mostró un comportamiento Intermedio, 18 mm. El 55% de aislados de *S. mutans* se catalogaron como sensibles a amoxicilina. Con respecto a Penicilina G y Cefazolin, se obtuvo 50% en ambos casos de comportamiento resistente en las cepas evaluadas, respectivamente. Sin embargo, la prueba de difusión en agar no es confiable para evaluar la susceptibilidad a penicilina, según el CLSI. Para Tetraciclina y Eritromicina, se determinó sensibilidad en un 55% y 65%, respectivamente. Sólo una cepa, 33A, presentó resistencia a la mayoría de los antimicrobianos evaluados, 6 de 9 sensibilizadores. Finalmente, la cepa de referencia, *S. mutans* ATCC 25175, obtuvo un 95% de sensibilidad a la mayoría de los antimicrobianos evaluados, exceptuando al Imipenem como ya se había señalado, véase Anexo No. 6 – Prueba de susceptibilidad antimicrobiana. Los puntos de corte utilizados para la lectura de cada uno de los antimicrobianos se representan en la Tabla 13-1, como se observa a continuación:

Agente antimicrobiano	Contenido del disco	Diámetro de la zona (mm)		
		S	I	R
Penicilina	-*	-	-	-
Vancomicina	30µg	≥17	-	-
Eritromicina	15µg	≥21	16-20	≤15
Tetraciclina	30µg	≥23	19-22	≤18
Azitromicina	15 µg	≥18	14-17	≤13
Clindamicina	2µg	≥19	16-18	≤15

\*Datos no registrados por el CLSI

Los antimicrobianos Amoxicilina, Cefazolin, Imipenem, Amoxicilina + A. clavulánico y Ciprofloxacina, no fueron incluidos en la evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana para *Streptococcus* del grupo *viridans* con el método de difusión en disco por el CLSI. Para estos antimicrobianos se tomaron como puntos de corte los siguientes:

- Resistente: ≤13
- Intermedio: 14-18
- Susceptible: ≥19

*Determinación del efecto antagonista (Producción de Bacteriocinas) en las cepas S. mutans:*

Adicional a esto, con el fin de evaluar el efecto antagonista sobre las cepas de *S. mutans* aisladas a partir de muestras de saliva, se realizó el ensayo de doble capa en Agar BHI (infusión Cerebro Corazón) en el que se sembraron las 20 cepas de *S. mutans* como las cepas indicadoras y como cepas productoras se utilizaron cepas de referencia ATCC de *S. mutans*, *S. uberis*, *S. salivarius*, *L. casei* y *L. acidophilus*, véase Anexo No. 6.

Cepas evaluadas	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC13419	<i>Streptococcus uberis</i> ATCC 700407	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356
-----------------	--	---	---	-------------------------------------	--

**RECuento E IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus mutans* DE SALIVA EN NIÑOS CON CARIES DENTAL: SEGUIMIENTO A 3 Y 6 MESES DESPUÉS DE UN PROCESO EDUCATIVO**



Efecto antagónico en cepas indicadoras ( halos en mm)*	1	31C	6	0	9	9	0
	2	32X	0	7	8	0	6
	3	32Y	8	0	9	0	6
	4	32Z	18	0	15	8	0
	5	33A	10	0	0	0	0
	6	33C	7	12	9	0	0
	7	62B	12	10	8	0	0
	8	34A	10	18	0	0	10
	9	35C	0	0	12	0	0
	10	36C	0	0	0	0	0
	11	36Z	9	14	14	0	16
	12	37A	7	10	0	0	11
	13	61B	10	7	0	0	0
	14	61X	14	8	9	0	0
	15	61Y	8	7	0	0	5
	16	62Z	12	0	10	0	0
	17	63Y	11	0	12	0	9
	18	63Z	6	8	0	7	8
	19	66Z	14	0	7	8	8
	20	67Y	0	8	10	0	10
(-), No hay efecto antagónico; *, los valores obtenidos corresponden a milímetros							

**Tabla 8-8 Efecto antagónico sobre cepas *S. mutans* de niños con caries dental**

Como se describe en la Tabla 8-8, se presenta los halos de inhibición, en milímetros, producto del efecto antagónico que las cepas de referencia (cepas efectoras) generaron sobre las cepas indicadoras, en este caso las 20 cepas aisladas de *S. mutans*. Según estos resultados, se observa que ninguna de las cepas productoras tuvo una acción antagónica completa (100%) sobre las 20 cepas indicadoras. Las cepas que presentaron acción antagónica en la mayoría de las cepas de *S. mutans* evaluadas fueron: *S. mutans* ATCC 25175, *S. uberis* ATCC 700407, *L. acidophilus* ATCC 4356 con un 80%, 65% y 50%, respectivamente. El resto de las cepas, *S. salivarius* ATCC 13419 y *L. casei* ATCC 393, tuvieron diferentes tipos de acción antagónica que iban desde la inhibición de 4 a 9 cepas indicadoras. Además, en todas las cepas indicadoras se observó halos de inhibición ya sea por alguna de las cepas productoras. Véase Anexo No. 6 – Determinación del efecto antagónico.

En la Tabla 8-9 se presenta las cinco cepas productoras utilizadas para la determinación del efecto antagónico sobre las 20 cepas de *S. mutans* aisladas a partir de muestras de saliva de niños con caries dental.

Cepa productoras	Acción antagónica (≥6 mm)
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	16/20 (80%)
<i>S. salivarius</i> ATCC 13419	11/20 (55%)
<i>S. uberis</i> ATCC 700407	13/20 (65%)
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	4/20 (20%)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	10 /20 (50%)

**Tabla 8-9 Porcentaje de acción antagónica de cepas productoras**

**Objetivo 5: Determinar la presencia de Enterobacterias en muestras de saliva de niños con caries dental antes y después de un proceso educativo en salud oral.**

## RECuento E IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus mutans* DE SALIVA EN NIÑOS CON CARIES DENTAL: SEGUIMIENTO A 3 Y 6 MESES DESPUÉS DE UN PROCESO EDUCATIVO



Como objetivo final, se utilizó el medio de cultivo Agar MacConkey para la recuperación específica de Enterobacterias. Esto con el fin de determinar la posible presencia de estas bacterias Gram negativas en las muestras analizadas provenientes de niños con caries dental.

Observación		Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Fermentación Lactosa	Si	30	43,48
	No	12	17,39
No creció		27	39,13
Total		69	100%

**Tabla 8-10 Identificación de Especies de Enterobacterias en Agar MacConkey**

En la Tabla 8-10, se observa que del total de muestras analizadas, un 60,77% de los análisis presentaron crecimiento a las 48 horas de incubación; Sin embargo, en el 43,48% de los análisis se observó fermentación de la lactosa por el cambio de color del medio de cultivo empleado, de rojo a amarillo, sugiriendo como posibles Enterobacterias a estos microorganismos. Es decir, en 10 de los 23 niños con caries dental se observó crecimiento de bacterias fermentadoras de lactosa, la mayoría de ellos ICDAS tipo 6. Para confirmarlo, se realizó tinción de Gram observando Bacilos gram negativos y prueba de la catalasa demostrando su positividad. Este procedimiento microbiológico se realizó con el fin de establecer la presencia de dichos microorganismos, descritos en estudios anteriores como agentes etiológicos de la periodontitis en la sobreinfección, complicando el cuadro clínico de los pacientes (91).

En resumen, estos resultados muestran que existió una reducción significativa de los Estreptococos orales y, por ende, de *Streptococcus mutans* en muestras de saliva no estimulada proveniente de niños en edades de 3 a 5 años, ya que obtuvo una disminución promedio del 86% tal como se observa en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**; en la cual, se observó diferencias estadísticamente significativas,  $p < 0.05$ , del mes 0 al mes 3 y del mes 0 al mes 6, sin encontrar diferencias del mes 3 al mes 6. Por otro lado, el recuento de microorganismos aeróbicos totales no obtuvo diferencias estadísticamente significativas, lo que sugiere que existen otros microorganismos con recuentos altos, favorecidos por la disminución de *S. mutans*.

### 9. DISCUSION

La caries dental es una enfermedad multicausal estrechamente asociada con factores socio-culturales, económicos, ambientales y comportamentales. Por su parte, *Streptococcus mutans* ha sido considerado desde 1924 cuando fue aislado por Clarke, como el principal agente etiológico en el desarrollo de la caries dental (serotipo *c*, *e*, *f*, y *k*), teniendo un rol preponderante en los estadios iniciales del deterioro del esmalte (14). En los niños, *S. mutans* aparece tras la erupción de los primeros dientes, transmitido a partir de la madre, principalmente; estudios al respecto, han determinado que niños colonizados por este microorganismo durante la ventana de infectividad, localizada entre los 19 y 31 meses de edad, presentaban más lesiones cariosas en el tiempo o tenían más riesgo a desarrollar caries, mientras que en aquellos en que no se podía detectar *S. mutans*, tenían bajos índices de caries o se disminuía el riesgo de desarrollarla (70,92-94). Sin embargo, la evidencia es controversial en cuanto a la relación entre *S. mutans* y caries dental, algunos estudios han encontrado correlación (73) y otros no (95), estos resultados son influenciados en gran medida por el tipo de muestra, método de recolección o análisis, por la población estudiada entre otros factores. Además, de relacionar la co-infección entre *S. mutans* - *S. sobrinus* (serotipo *d* y *g*) como un factor importante en el incremento de las lesiones cariosas –incidencia- y un marcador de caries



activa, estando este último más estrechamente asociado con alta actividad cariosa más que *S. mutans* (96,97).

Aunque varias investigaciones realizadas anteriormente, han estudiado la relación entre caries dental y la presencia de *S. mutans* (98,99); en Colombia, estudios en la determinación de los niveles de *S. mutans* antes y después de una intervención en la población y la asociación entre el binomio caries - *S. mutans* son escasos (100).

En el presente estudio se evaluó el aislamiento, identificación y recuento de microorganismos aeróbicos totales, de *Streptococos* totales y de *S. mutans* en saliva proveniente de niños con caries dental, ya que en estudios anteriores se ha demostrado que recuentos altos de este microorganismo en niños menores de 6 años es un importante factor de riesgo en el desarrollo e incidencia de la caries dental temprana, considerándolo microorganismo cariogénico por excelencia (101). Referente al tipo de muestra seleccionada para el estudio, la saliva es considerada el principal vehículo de transmisión de *S. mutans* por contacto físico y una de las principales muestras estudiadas en la cavidad oral para el estudio de microorganismos cariogénicos. Como se hizo mención en el principio de la discusión, la madre es considerada la principal fuente de infección para sus hijos por medio del contacto directo de saliva (30).

Según la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, en esta investigación predominó el sexo masculino con un 56,5% y el promedio de edad fue de 5,4 años. El análisis clínico mostró que el 52,2% de los niños tenía un índice ICDAS 3 y 47,8% tenían un ICDAS 6. En cuanto al índice Ceo total, se obtuvo un promedio de 4,2 para los 23 niños. En Colombia, existen publicaciones en las cuales se ha reportado resultados similares e incluso inferiores de los reportados en este estudio, para evaluar la severidad de la caries, utilizando criterios de diagnósticos ICDAS y Ceo; la frecuencia de los datos encontrados fue, en su mayoría, para el índice ICDAS de tipo 2 y 3 y para el índice Ceo un promedio de 2,0 para ceo-s y 3,16 para ceo-d (40,42,49). Además, en cuanto a la dentición primaria en los niños de 5 años (edad índice), hubo un aumento aparente si se tiene en cuenta que en el Ensab III (41) se dio un valor de 3 en el año 1998; sin embargo, se puede pensar que ese incremento notable se explica por la prevalencia de caries para las edades tempranas que existe en esa región y que no se refleja en el Ensab debido a que los estudios nacionales comprenden un promedio general de la población. Teniendo en cuenta que dentro de los objetivos de esta investigación no fue determinar la prevalencia de la población en estudio, con estos datos no se puede señalar que exista un incremento real de los casos prevalentes de esta enfermedad, para eso se necesitaría abarcar un tamaño muestra más grande, requisito indispensable para determinar su prevalencia y otros indicadores. Por otro lado, según estudios realizados en la ciudad de Medellín (48,50), el género que predominó con caries dental fue el femenino con 52% en niños en edades de 5 a 13 años, y en la ciudad de Cali el 53,7% de ellos eran niños, sugiriendo que no hay relación entre el género y la presencia de caries dental (51).

Como se señaló anteriormente, con respecto a la frecuencia e identificación de *S. mutans* se obtuvieron 48 aislamientos (69,6%) del total de análisis microbiológicos realizados. De los cuales, se pudo obtener 20 cultivos puros de *S. mutans* para las posteriores pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y antagonismo microbiano. A pesar de que en este estudio sólo se incluyeron niños con caries dental diagnosticada a través del índice ICDAS, los resultados arrojados en cuanto a la frecuencia de aislamiento son comparables con estudios realizados en ambos grupos, niños con caries y niños sin caries; según lo reportado por Loyola-Rodríguez J y cols. (73) donde a partir de 40 niños en edades de 3 a 6 años y clasificados con caries dental activa, obtuvieron una frecuencia de aislamiento de *S. mutans* del 75%, sin embargo, al comparar las frecuencias de aislamiento en ambos grupos, no encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ). Otro estudio realizado por Acevedo A y cols. (102) determinaron una frecuencia total de aislamiento en el grupo de niños en edades entre 2 a 19 años con caries dental del 62,5%, adicionalmente, en el subgrupo





de niños de 2 a 6 años con afectación de caries reflejó una frecuencia de aislamiento del 57%. Por otro parte, como se ha señalado en la sección de resultados, la identificación e aislamiento se hizo a partir del Agar Mitis Salivarius suplementado con Sacarosa al 20% y Bacitracina 0.2 U/ml, realizado también en estudios anteriores debido a la eficiencia en la recuperación y aislamiento de *S. mutans* ya demostrado (85). En el estudio realizado por Saravia A y cols. (103), compararon tres medios de cultivo, Agar Sacarosa-Bacitracina (SB-20), Agar SB-20 modificado y Agar Mitis Salivarius Bacitracina 0.2 U/ml y sacarosa al 15%(MSB), para la recuperación, recuento y diferenciación morfológica de *S. mutans* con respecto a *S. sobrinus* en muestras de saliva y biofilm dental; determinaron que los tres medios evaluados permiten el recuento de un gran número de colonias de *S. mutans*, sin embargo, el Agar SB-20 y SB-20 modificado obtuvieron una mayor eficacia en la identificación morfológica de *S. sobrinus*. Esto indica que investigaciones enfocadas en el aislamiento de *S. mutans* es preponderante el uso del Agar Mitis Salivarius suplementado con Sacarosa y bacitracina. Además, se ha demostrado que es la especie que con más frecuencia se aísla de la población microbiana en la cavidad oral con un 70-90%. Gracias a su capacidad de colonizar tanto superficies duras, como los dientes, y superficies mucosas en niños edéntulos se puede encontrar sobre todo a partir de placas supragingivales, radiculares y saliva, en cuyo caso su origen es secundario a la colonización en las placas.

En cuanto al recuento en placa de *S. mutans*, se demostró que hay una correlación positiva entre caries y el número de UFC, obteniendo datos semejantes con otros estudios en los que se midió las UFC/ml de *S. mutans* en saliva, luego de aplicarse una intervención preventiva en salud oral (104). Los datos demostraron que hubo una reducción del 86% en el valor promedio del recuento de *S. mutans* al sexto mes luego de empezar la intervención; además, los datos fueron estadísticamente significativos cuando se determinó para el intervalo mes 0 a mes 3 y mes 0 a 6,  $p < 0.05$ . Es importante señalar que el 43,5% de los niños en estudio presentó recuentos superiores a 500.000 UFC/ml después de 6 meses de implementarse la intervención educativa, lo que indica un alto riesgo para el desarrollo de caries de acuerdo con la valoración del riesgo de caries descrita en la bibliografía (9,36). Además, se evidenció un incremento sustancial para el recuento de microorganismos aeróbicos totales y *Streptococcus spp.*, totales de un 21,8% y 21,1% en el sexto mes respectivamente, seguramente por el aumento de otros microorganismos comensales pertenecientes a la microflora oral como consecuencia de la reducción de los niveles de *S. mutans*; ninguna de las mediciones fueron estadísticamente significativas,  $p > 0.05$ . Fue, sin embargo, interesante notar que un niño tuvo niveles indetectables de *S. mutans* en saliva antes y después de la intervención a pesar de su estadio de caries, el cual era ICDAS 6; probablemente, debido al hecho de que los números de este microorganismo (*S. mutans*) se encontraban por debajo de los límites de detección de las técnicas de cultivo actuales. Otra explicación podría ser la presencia de otros microorganismos (*Lactobacillus spp.*, y/o *Actinomyces spp.*) que causa la caries dental más avanzada, para el cual las estrategias de aislamiento de este estudio no estaban dirigidas. Un estudio realizado por Twetman y cols., en 1999 (105), examinaron el efecto del tratamiento quirúrgico y restaurador de la caries dental en los niveles de *S. mutans* y *Lactobacillus spp.*, en saliva proveniente de 108 niños con un promedio de edad de 4,4 años. Los resultados demostraron que los niveles de *S. mutans* y *Lactobacillus spp.*, post-tratamiento fueron reducidos significativamente ( $p < 0.001$ ) comparado a los niveles pre-tratamiento. Otro estudio clínico llevado a cabo en la Universidad de Chile (2013) (76) compararon los recuentos de *S. mutans* en muestras de biofilm antes y después de la aplicación de sellante en 38 pacientes. Después de los 30 días de aplicado el sellante, se tomó la segunda muestra de biofilm y se hizo el recuento, concluyendo que la aplicación de sellante con resina contribuye a reducir la cantidad de UFC/cm<sup>2</sup> de *S. mutans* sobre el área de los surcos de los dientes tratados. Sin embargo, es importante señalar que estos estudios realizaron intervenciones invasivas que implicaba tratamiento o restauración de la zona afectada por la caries dental. En cambio, en un estudio retrospectivo observacional determinaron el efecto del tratamiento rehabilitador integral de caries temprana de la infancia en los niveles de *S. mutans* en saliva de 89 niños. El tratamiento integral comprendía una parte preventiva y otra rehabilitadora; se determinó las concentraciones de





*S. mutans* antes y después de cada procedimiento con el fin de comparar los niveles de dicho microorganismo. Dichas comparaciones fueron estadísticamente significativas,  $p < 0.05$ , antes y después de cada uno de los procedimientos, sin embargo, al comparar ambos tratamientos no se observaron diferencias (106). En estos estudios y otros (107-110), en los que evaluaron el efecto del tratamiento preventivo en los niveles de *S. mutans* a partir de muestras de saliva en niños con edades entre 5 a 7 años, algunos encontraron diferencias significativas entre los niveles iniciales y los posteriores al tratamiento y otros no evidenciaron algún efecto del tratamiento preventivo en los niveles de *S. mutans*, aunque en la mayoría de ellos se encontró diferencia al igual que en el presente trabajo, como lo evidencia uno de ellos (110); en el que luego de un tratamiento restaurativo atraumático la reducción de *S. mutans* se observó en un 89,47% de los niños después de 1 semana, semejante al registrado por nosotros. El valor promedio del recuento de *S. mutans* al mes y a los seis meses pos-tratamiento reportados por ellos fueron de 1.4814 ( $10^6$ UFC/ml) y 1.4722 ( $10^6$ UFC/ml), respectivamente. Resultados comparables obtuvimos al obtener un 43,5% de los niños incluidos en el estudio con riesgo alto de presentar caries de acuerdo a los recuentos de *S. mutans*, los cuales eran  $>10^5$  (UFC/ml) después de 6 meses. A pesar de que la gran mayoría de los niños aún sigan en riesgo alto de desarrollar caries con relación a los recuentos de *S. mutans* obtenidos luego de 6 meses de llevarse a cabo el proceso educativo en salud oral, fue evidente la reducción significativa en un 86% del valor promedio de los recuentos del microorganismo en la saliva, pasando de 1,18 ( $10^9$ UFC/ml) a 1,6 ( $10^8$ UFC/ml). Los niños que aún persisten con riesgo de desarrollar caries, puede deberse a que el 47,8% de los niños presentaban un estado de la enfermedad muy avanzado, diagnosticado en ICDAS tipo 6, en el cual al menos la mitad de la superficie dental estaba afectada y posiblemente se extendía a la pulpa; en este caso, sería necesario reforzar la intervención educativo-preventiva con el tratamiento rehabilitador en niños con caries dental avanzada, con el objetivo de aumentar la eficacia de esta intervención integral en cuanto a la incidencia de caries y la presencia de niveles alto de *S. mutans*.

Existen otros estudios, realizados con el objetivo de hacer control microbiológico sobre *S. mutans*; los cuales consistían en proveer un probiótico como terapia de reemplazo en niños con un promedio de edad de 6 a 14 años, para luego medir los niveles de este microorganismo antes y después de realizar dicha intervención. Estas intervenciones consistían en probióticos orales suplementado con leche y contenían *Lactobacillus rhamnosus*, microorganismo ampliamente reconocido por sus efectos benéficos sobre la flora comensal de la cavidad oral (111); los niños en estudio fueron divididos en dos grupos: Grupo control que tomaba solo leche y Grupo experimental en el que se suministraba el probiótico. Después de tres semanas de ingesta, se hizo el conteo de *S. mutans* en saliva, determinando que hubo una reducción estadísticamente significativa de UFC/ml en el grupo del probiótico ( $p=0,03$ ) (112-114). A pesar de que hay una relación significativa entre los niveles de *S. mutans* y la intervención aplicada a los niños, es importante destacar que el nivel de *S. mutans* en saliva es una variable que explica el desarrollo de la caries como enfermedad, sin embargo, existen muchos otros factores como los hábitos alimenticios, la higiene oral, aspectos socio-económicos, aquellas relacionadas con la saliva (flujo salival, composición y capacidad de buffer) y otros microorganismos cariogénicos incluidos en la historia natural de la enfermedad, que hacen revalidar el concepto de que la caries es una enfermedad multifactorial. La utilización del recuento en placa como método semi-cuantitativo para la cuantificación de *S. mutans* y otros *Streptococcus* del grupo *mutans* en saliva, a través del uso del medio de cultivo MSB y su relación con la experiencia de caries dentales en niños en edad pre-escolar y escolar, es de extenso conocimiento en las ciencias odontológicas aplicadas (22,115).

Los estreptococos orales juegan un importante papel en la resistencia a la colonización por otras especies tales como los estafilococos. Sin embargo, esto ofrece un pool de material genético el cual puede ser susceptible a intercambio con otras bacterias, comensales orales y especies patógenas, lo que permite la aparición de cepas resistentes. Recientemente ha aumentado el interés por ellos, debido a la aparición y propagación de la resistencia bacteriana contra penicilina G, eritromicina A y



también la posibilidad de transferencia de material genético a *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*. La resistencia a los antibióticos dentro de estas especies de estreptococos orales puede actuar como un reservorio de resistencia para otra flora transitoria. Estudios *in vitro* e *in vivo* evaluando aislados clínicos a partir de pacientes con endocarditis, encontraron que la mayoría de los microorganismos fueron *Streptococcus* del grupo *viridans*, y cuatro especies principales representaron más de dos tercios de los aislados: *S. oralis*, *S. sanguis*, *S. gordonii* y *S. mutans*. Los aislados de *S. mutans* fueron susceptibles, en su mayoría, a penicilina G y eritromicina A (116). Como se pudo evidenciar en el perfil de resistencia a los antimicrobianos realizado en esta investigación, se observó que la mayoría de los aislamientos cerca del 70%, fueron altamente sensibles a Vancomicina, Amoxicilina + Ácido clavulánico, Ciprofloxacina y Azitromicina. Para Tetraciclina y Eritromicina se determinó sensibilidad en un 55% y 65%, respectivamente. Sin embargo, el 50% de las cepas fueron resistentes a Penicilina G y Cefazolin. El antimicrobiano con mayor resistencia presentada fue para Imipenem con un 60% y el 20% fueron intermedias. Datos similares se observaron en otro estudio, en el que se evaluó la susceptibilidad antimicrobiana de aislados de *S. mutans* (19). Según ellos, los 33 aislamientos de *S. mutans* fueron sensibles a Penicilina, Amoxicilina, Cefazolina, Eritromicina, Clindamicina, Imipenem y Vancomicina a través de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC). Es importante mencionar que los resultados obtenidos presentan cierta heterogeneidad frente a la susceptibilidad a algunos de ellos, los cuales son: Penicilina, Cefazolin e Imipenem. A pesar de esto, en diversas investigaciones también se ha mencionado la heterogeneidad frente a la susceptibilidad a antibióticos dentro de los cuales se destacan Penicilina G, Eritromicina y derivados (116,117). En el pasado, los estreptococos orales eran sensibles a penicilina, ampicilina y a la mayoría de los otros antibióticos. Sin embargo, en las dos últimas décadas los estudios de sensibilidad a los antibióticos han mostrado con claridad que está aumentando la resistencia a penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos y otras clases de antibióticos (60).

La importancia de determinar el perfil de susceptibilidad de cepas de *S. mutans* aislados de pacientes con caries dental avanzada a los antimicrobianos utilizados en infecciones odontogénicas, radica en conocer los niveles de resistencia presentes en estos pacientes y poder tomar una decisión terapéutica en base a estos hallazgos para que sea exitosa. Ya se ha determinado la importancia de este microorganismo en la endocarditis infecciosa, producto de los abscesos causados por la lesión cariosa.

Algunas poblaciones bacterianas pueden estar inhibidas por otras poblaciones por diversos mecanismos, ya sea por la aciduria generada por bacterias acidógenas o el agua oxigenada producto del metabolismo de algunas especies de *S. sanguis*. Otras bacterias, como los estreptococos, producen bacteriocinas, sustancias protéicas próximas a los antibióticos. Es bien sabido, que uno de los principales factores de virulencia que tiene en su repertorio *S. mutans* es la producción de bacteriocinas, también denominadas "mutacinas"; que son pequeños péptidos antimicrobianos capaces de inhibir el crecimiento de otros microorganismos, lo que le confiere ventaja en la colonización de otras superficies del aparato bucal (64). Las cepas de *S. mutans* productoras de mutacinas han sido agrupadas dentro de 24 grupos de similitud basados en su espectro de inhibición y en la inmunidad cruzada hacia otras cepas productoras de mutacinas (118). Estudios sobre antagonismo bacteriano en la cavidad oral se han desarrollado desde décadas pasadas, enfocándose en el control microbiológico sobre *S. mutans* (15) con el objetivo de desarrollar estrategias de prevención y control de la caries dental. Diferentes estudios mostraron que el efecto antagónico de estas mutacinas proporciona una gran capacidad para desplazar cepas nativas de las mismas especies; su actividad bactericida, en general, sólo cubre un espectro restringido a algunas bacterias diana próximas a la cepa productora. De este modo, las mutacinas, son activas contra los estreptococos del grupo *viridans* y contra el *A. viscosus* y las sanguicinas de *S. sanguis* son inhibitorias de *S. mutans* (32). De tal manera, la búsqueda de cepas de *S. mutans* con capacidad antagónica y su aplicación en control microbiológico se lleva a cabo desde hace varias décadas, con el fin de desplazar cepas nativas de *S. mutans* que poseen alta virulencia. El ensayo de doble capa



es usado para determinar la acción antagónica de estas sustancias producidas por cepas efectoras sobre las cepas indicadoras seleccionadas (119). En este estudio, el efecto antagónico se determinó en 20 cepas de *S. mutans* aisladas de muestras de saliva proveniente de niños en edades de 3 a 6 años. Con el fin de evaluar el efecto antagónico sobre estas 20 cepas de *S. mutans*, se utilizaron 5 cepas de referencia ATCC, las cuales fueron: *S. mutans* ATCC 25175; *S. salivarius* ATCC 13419; *S. uberis* ATCC 700407; *L. acidophilus* ATCC 4356 y; *L. casei* ATCC 393. Según nuestros datos, ninguna de las cepas productoras tuvieron una acción antagónica completa sobre las 20 cepas indicadoras; Las cepas productoras con mayor porcentaje de inhibición fueron: *S. mutans* ATCC 25175 con un 80%, seguido de *S. uberis* ATCC 700407 con un 65% y ; *L. acidophilus* ATCC 4356 con un 50%. Esta heterogeneidad en el efecto antagónico fue probablemente causada por diferentes condiciones en la prueba y el uso de diferentes cepas de referencia como cepas efectoras. Estudios llevados a cabo con cepas de *S. mutans* aisladas a partir de niños con y sin caries dental, han intentado determinar la producción de mutacinas y la asociación entre experiencia de caries y la actividad de las mismas, demostrando el gran potencial antagónico útiles en estrategias de control de la caries (64,120). Otros estudios han evaluado el antagonismo estreptocócico en biofilms orales, entre *S. sanguis* y *S. gordonii* que interfieren con el crecimiento de *S. mutans*. Un ejemplo de ello fue la investigación realizada por Kreth y cols. (121), en el que modelaron el antagonismo entre *S. sanguis*, *S. gordonii* y cepas de *S. mutans* cariogénicas en condiciones aeróbicas con el fin de que estos microorganismos utilizaran la disponibilidad de oxígeno y la producción diferencial de peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) contra *S. mutans*. Se ha comprobado, por medio de estudios clínicos y estudios experimentales en animales, que cuando está presente *S. mutans* en altos números en el biofilm oral, los colonizadores pioneros *S. sanguis* y *S. gordonii* pueden antagonizar con él. Siguiendo esta premisa, Kreth demostró que bajo condiciones aeróbicas ocurre inhibición de *S. mutans* dependiente de Pox, una proteína que produce  $H_2O_2$  producto del metabolismo aeróbico de *S. sanguis* y *S. gordonii*. Estos datos proporcionan nuevos conocimientos sobre los factores ecológicos que determinan la competencia entre estreptococos orales colonizadores pioneros y los mecanismos de supervivencia de *S. mutans* en el biofilm oral. Otros estudios reafirman la capacidad de *S. sanguis* y *S. gordonii* como antagonistas de *S. mutans* en la cavidad oral. Wang y cols. (122), demostraron que la interacción con *S. gordonii* inhibe fuertemente la producción de bacteriocinas de *S. mutans* en el biofilm oral, gracias al gen *sgc* responsable de la inhibición. Por otro lado, Kreth y cols. (123), usaron a *S. mutans* y *S. gordonii* como modelo para investigar los posibles mecanismos de competencia/coexistencia entre estas especies que ocupan el mismo nicho. Comprobando que las dos especies se involucran en una multitud de interacciones antagónicas temporal y espacialmente; la ocupación de un nicho por una especie se opone a la colonización por el otro, mientras que la colonización simultánea por las dos especies resulta la coexistencia. Sin embargo, ciertas especies de estreptococos orales no son los únicos con propiedades inhibitorias demostradas contra *S. mutans*; la colonización por patógenos periodontales, como *Porphyromonas gingivalis*, pueden resultar en una disminución proporcional en la población de tempranos colonizadores, tales como *S. mutans* y *S. sobrinus*, para la posterior dominación de los sitios de las enfermedades periodontales. Todavía no se entiende cómo estos colonizadores finales antagonizan los colonizadores primarios de la placa dental. Sin embargo, investigaciones recientes sugieren que la presencia de patógenos periodontales en placa dental podrían modular las propiedades de virulencia de *S. mutans* por la interferencia con su sistema de *quorum sensing* (122). Como se ha resaltado en los estudios citados y en otra documentación referida, se concluye que las bacteriocinas pueden ser importantes para un microorganismo en la habilidad para colonizar un nicho en particular. Les confiere ventajas en relación a otros colonizadores que hacen parte de la microflora normal de la cavidad bucal, como es el caso de *S. mutans*, el cual a pesar de pertenecer a este complejo microbiano también es el agente etiológico más importante en el desarrollo de la caries dental. Además, se ha visto que los niveles de *S. mutans* aumentan en relación a la edad y número de piezas dentarias, relacionando el número de piezas dentarias con los niveles del microorganismo, esto se debe a que requiere de una superficie dura no descamativa para colonizar; sin embargo, se ha visto que también coloniza superficies mucosas en menor cantidad (124). En la actualidad se sigue trabajando con las pruebas



de actividad antagonica para establecer las interacciones de coexistencia que se ejercen entre *S. mutans* y la microflora normal de la cavidad oral, esto con el objetivo de entender los mecanismos de sucesión e inhibición que halla a lugar *in vivo* los cuales generan un equilibrio biológico en el sistema. El proceso de salud-enfermedad que ocurre debido al desequilibrio de estas interacciones amerita la comprensión de nuevas estrategias que permitan el restablecimiento de la armonía.

Por otro lado, los intentos de los investigadores por encontrar nuevas alternativas de control microbiológico hacia patógenos de la cavidad bucal, especialmente para *S. mutans*, han visto en los probióticos una herramienta importante para prevenir la caries dental, a pesar que tradicionalmente estos han sido usados para tratar enfermedades relacionadas con el tracto gastrointestinal. Sin embargo, en principio, cualquier parte del cuerpo que albergue microflora normal puede ser un blanco potencial para probióticos específicos y, la cavidad bucal tiene una microflora con una complejidad similar al resto de la microflora que existe en el cuerpo humano. Existen estudios en los cuales se han obtenido éxitos en el uso de probióticos orales que contienen *S. salivarius*, comensal predominante y colonizador pionero en la cavidad oral que persiste allí como un miembro predominante de la microbiota nativa durante la vida del huésped (125). En los individuos sanos (inmunológicamente competente), éste en raras ocasiones puede llegar a causar alguna infección. Muchas de las cepas son productoras de sustancias inhibidoras similares a bacteriocinas (BLIS), como la Salivaricina A y B, péptidos antimicrobianos que actúan contra los gérmenes gram-positivos, en especial contra *S. mutans*, jugando un papel importante en la estabilización de la microbiota oral y evitando el crecimiento excesivo de potenciales patógenos. La cepa K12, el prototipo usado para probióticos, originalmente introducido para controlar infecciones por *S. pyogenes*, ahora posee un repertorio expandido de aplicaciones que promueven la salud. Sin embargo, aún hoy se sigue evaluando los efectos del consumo de esta cepa. En una investigación conducida por Burton y cols. (126), examinaron las respuestas de salud de voluntarios humanos a la ingestión oral de altas dosis de *S. salivarius* K12 por 28 días; los resultados obtenidos no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con probiótico y el grupo con placebo,  $p > 0.05$ . Además de este microorganismo, se incluye a los Lactobacilos como las principales especies con actividad probiótica y terapéutica que se están utilizando y que mejor se conocen, dentro los cuales se encuentran: *L. acidophilus*, *L. casei*, y *L. rhamnosus* considerada la más importante bacteria probiótica en humanos (111). Estos pueden competir con los estreptococos orales por los sitios de adherencia de la cavidad bucal y producir sustancias antibacterianas contra *S. mutans*, no fermenta la sacarosa y puede hasta cierto punto, reemplazar los estreptococos cariogénicos. A pesar de estas consideraciones, los lactobacilos son considerados microorganismos cariogénicos, sin embargo, esta posibilidad necesita de investigaciones futuras (127). También se han hecho estudios de control microbiológico en cepas nativas de *S. mutans* con alta capacidad de producción de bacteriocinas, ya que a pesar de que se han catalogado como el principal agente etiológico de la caries dental, es también un microorganismo normal de la microflora oral. Se han descrito hasta el momento más de 8 mutacinas capaces de actuar frente a cepas virulentas de *S. mutans*, dentro de las cuales se encuentran: Mutacina I, II y IV, mutacina 1140 y, mutacina K8 con propiedades inhibitorias frente a otras bacteriocinas y son objeto de estudio para potenciales usos probióticos (128). El gran avance que se ha dado en los probióticos orales ha permitido la creación de probióticos que contienen cepas específicas de especies bacterianas que contribuyen al bienestar oral. Tal es el caso del producto ProBiora<sup>3</sup> que contiene *S. uberis* KJ2, *S. oralis* KJ3, y *S. rattus* JH145; todas ellas, flora comensal normal de la cavidad oral. Investigadores encontraron que la placa dental subgingival tomada a partir de sitios periodontales sanos contenían una proporción significativa de dos especies de *Streptococcus* del grupo *viridans*: *S. oralis* y *S. uberis*. La placa tomada a partir de sitios enfermos, sin embargo, casi siempre carecía de estas especies (129). La producción de peróxido de hidrogeno en estas especies y de bacteriocinas por *S. uberis* y *S. rattus* (Ubericina A y BHT-A, respectivamente) les permite tener la capacidad de inhibir agentes etiológicos de la caries y periodontitis. Hillman y cols. (130) investigaron los efectos adversos de una preparación estandarizada de ProBiora<sup>3</sup> después de la exposición oral sub-crónica en ratas a dosis diarias de hasta  $10^9$  UFC por cepa durante





90 días. Observaron que no hubo efectos adversos relacionados con el tratamiento en los parámetros fisiológicos durante el estudio. Además, Zarhadnik y cols. (131) realizaron una evaluación preliminar de la seguridad y eficacia de ProBiora<sup>3</sup> en humanos para afectar los niveles de *S. mutans* en saliva y otros patógenos periodontales cuando fue administrado dos veces al día durante 4 semanas. Se evidenció una disminución substancial en los niveles de *S. mutans* y no se observaron problemas de seguridad con la aplicación de este enjuague bucal, sugiriendo que este producto puede ser seguro para el uso diario así como una ayuda en el mantenimiento de la salud dental. Hoy en día, se continúa trabajando en la búsqueda de nuevos microorganismos nativos de la microflora oral capaces de ejercer un control microbiológico sobre las cepas patógenas que permita mantener el equilibrio del ecosistema oral, es el caso de *Streptococcus dentisani* propuesto como nueva especie, aislado a partir de superficies dentales de personas libres de caries (132) ; o el reemplazo con una cepa del mismo género y especie con bajo potencial acidogénico, también se constituye en una opción a considerar en la prevención de la caries (15,133).

A pesar de todos los avances que se han obtenido en el campo del control microbiológico de *S. mutans* en la cavidad oral, en este estudio no se encontraron investigaciones pasadas en la que evaluaran el efecto antagónico de cepas de referencia sobre cepas de *S. mutans* aisladas de muestras de saliva en niños con caries dental avanzada. De tal modo, no fue posible hacer una comparación precisa de los resultados encontrados acá y los registrados anteriormente con el fin de desvirtuar y/o confirmar los patrones de interacción que se dan entre microorganismos orales. De igual manera, este estudio intenta aportar contenidos novedosos y relevantes en la medida de su alcance.

Con relación a la siembra de la dilución  $10^{-5}$  en Agar McConkey en las muestras procesadas, se observó que el 60,77% de los análisis presentaron crecimiento a las 48 horas de incubación; además, en el 43,48% se confirmó que eran catalasa positivos y cocobacilos gram negativos, lo que sugiere la recuperación de posibles Enterobacterias. Estos datos no concuerdan con lo reportado en la literatura en cuanto a la presencia de estos microorganismos en la cavidad oral. La mayoría de los estudios demuestran que en pacientes con periodontitis en diferentes partes del mundo han mostrado altas prevalencia de sobreinfección por enterobacterias, las cuales podrían complicar el cuadro clínico de los pacientes y la respuesta a la terapia periodontal (91). Entre los microorganismos más representativos se encuentran *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Erwinia spp.*, entre otros. En una revisión realizada por Khemalelakul (134), intentó dilucidar el papel de las Enterobacterias en la etiología de la periodontitis crónica. Concluyó que estos microorganismos han sido reportados como transeúntes de la microflora bucal, y pueden encontrarse sobre la superficie mucosa, dientes y en el área subgingival de pacientes con enfermedad periodontal avanzada. Además, sustentó a través de la literatura que la alta prevalencia de dichos microorganismos se encuentra asociada con alimentos y aguas contaminadas y también debido a la mala higiene personal, junto con el uso incontrolado de agentes antimicrobianos. En Colombia las especies frecuentemente encontradas son *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*. Según esta información, se podría sugerir que la presencia de estos microorganismos en gran parte de los niños es una complicación del estado avanzado de la enfermedad, presentándose en mayor proporción en niños con ICDAS tipo 6.

Este estudio demuestra que es factible detectar bacterias cariogénicas directamente de muestras de saliva, y que además se pueden identificar cepas de *S. mutans* de forma específica a partir de muestras clínicas utilizando Agar Mitis Salivarius suplementado con sacarosa al 20% y bacitracina 0.2 U/ml. También ha confirmado los patrones observados en otros estudios para la distribución de *S. mutans* en niños con caries dental. Los resultados de los análisis microbiológicos de saliva y el seguimiento en niños menores de 6 años con caries dental podrían ser útiles para identificar el riesgo de caries a nivel individual o comunitario, así como también mejorar el diagnóstico y tratamiento.



## 10. CONCLUSIONES

Al finalizar esta investigación se puede concluir que:

- *S. mutans* fue aislado en altos números a partir de niños con caries dental en el orden de  $\geq 10^6$  UFC/ml. El 43,5% de los niños en estudio presentó recuentos superiores a 500.000 UFC/ml después de 6 meses de intervención, lo que indica un alto riesgo para el desarrollo de caries.
- No se encontró diferencias estadísticamente significativas a los 6 meses en el recuento total de microorganismos aeróbicos y *Streptococcus spp.*,  $p > 0.05$ . Sin embargo, para el recuento de *S. mutans* a los 3 y 6 meses sí hubo diferencias significativas,  $p = 0.02$ .
- En el 43,48% de las muestras cultivadas en Agar McConkey se observó crecimiento de *Enterobacteriaceae*, indicando el grado alto de progresión de caries dental en los niños sometidos al estudio, como lo demuestran también estudios anteriores.
- Los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana para las 20 cepas evaluadas demostraron que la mayoría, el 70% de ellas, fueron altamente sensibles a Vancomicina, Amoxicilina + Ácido clavulánico, Azitromicina y Ciprofloxacina. Cerca del 65% y 55% fueron sensibles a Tetraciclina, Amoxicilina y Eritromicina. Sin embargo, para Penicilina Cefazolin e Imipenem se obtuvieron los valores más altos de resistencia con un 50% en las dos primeras y 85% en este último. La cepa de referencia *S. mutans* ATCC 25175 tuvo un 95% de sensibilidad a los antimicrobianos evaluados, a excepción del Imipenem mostrando un resultado Intermedio. Esto, probablemente debido a que el método Kirby-Bauer no es tan sensible como el método de dilución en placa para determinar la susceptibilidad.
- La evaluación del efecto antagónico sobre las 20 cepas de *S. mutans* aisladas es variable. Ninguna de las cepas de referencia elegidas como efectoras no tuvieron acción antagónica completa (100%) sobre las cepas evaluadas. Las cepas de referencia que tuvieron mayor acción antagónica fueron *S. mutans*, *S. uberis* y *L. acidophilus* con un 80,65 y 50%, respectivamente.
- Se puede señalar que la metodología implementada en el laboratorio permitió la detección e identificación de *S. mutans* directamente a partir de muestras de saliva no estimulada, y que ésta es una herramienta con un gran potencial para la realización tanto de análisis clínicos como epidemiológicos.
- El proceso educativo en salud oral fue útil en la reducción significativa de los niveles de *S. mutans* en saliva luego de un seguimiento microbiológico a los 0,3 y 6 meses de iniciarse la intervención.
- Además, este estudio destaca la importancia del control microbiológico con el uso de intervenciones no invasivas que plantean el mejoramiento de prácticas de higiene y cuidado oral, hábitos alimenticios, etc., acompañado de estrategias para la promoción de una buena salud oral que permitan prevenir y reducir los niveles de *S. mutans* y de caries en forma significativa en niños menores de 6 años junto con sus padres.

## 11. RECOMENDACIONES





- Realizar este estudio para medir el recuento de otros microorganismos cariogénicos en saliva no estimulada (i.e, *Streptococcus sobrinus*, *S.salivarius*, *Lactobacillus spp.*, y especies de *Actinomyces*).
- Realizar este estudio tomando muestras de placa dental, paralelamente a la toma de muestras de saliva no estimulada y/o estimulada para establecer una posible relación entre los niveles de *S. mutans* y el diagnóstico de caries dental.
- Realizar este estudio comparando diferentes métodos de recuento bacteriano: Por turbidimetría, recuento en placa, recuento en filtros de membrana, recuento directo con contador electrónico, qPCR, Inmunoensayos, con el fin de determinar la eficiencia de cada uno de ellos.
- Hacer un seguimiento de los pacientes de este estudio a los 8 y 12 meses luego de la intervención educativa, obteniendo el conteo de *S. mutans* en cada uno de ellos para realizar un monitoreo microbiológico más largo, esto con el objetivo de determinar si el recuento promedio se mantuvo por debajo de los niveles de riesgo o si se observa una tendencia al re-establecimiento del recuento basal.
- Comparar el recuento de UFC/ per ml *S. mutans* en muestras de placa dental, saliva estimulada y no estimulada, mediante la técnica de recuento en placa.
- Nuevos estudios que abarquen un mayor tamaño muestral, etario y una mayor cantidad de aislados por paciente son necesarios para obtener resultados más concluyentes y comparables en cuanto a la incidencia de caries dental y el recuento alto de *S. mutans*.
- Identificar especies del género *Streptococcus* asociadas tanto a higiene oral (*S. rattus*, *S. oralis*, *S. uberis* y *S. dentisani*) como al desarrollo de la caries dental (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. salivarius* y, *Lactobacillus spp.*) e investigar sus interacciones de sucesión y competencia que podrían ser de suma importancia para el desarrollo de futuras formas de prevención y tratamiento.
- Mayores avances en relación a medios de cultivo, técnicas moleculares y sistemas de identificación bioquímicos comerciales, son necesarias para identificar aquellas especies pertenecientes a la cavidad oral y que aún no han sido descritas.
- Comparar el método de recuento en placa utilizando Agar Mitis Salivarius suplementado con Sacarosa al 20% y Bacitracina 0.2 U/ml y los sistemas comerciales semi-cuantitativos para el recuento de *S. mutans*, con el fin de conocer el rendimiento (% de recuperación) y el desempeño de cada una de estas técnicas.
- Por último, se recomienda reforzar la intervención educativo-preventiva con tratamiento rehabilitador en niños con caries dental avanzada, con el objetivo de aumentar la eficacia de esta intervención en cuanto a la incidencia de caries y la presencia de niveles alto de *S. mutans*.

## **12. BIBLIOGRAFÍA**

**RECuento E IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus mutans* DE SALIVA EN NIÑOS CON CARIES DENTAL: SEGUIMIENTO A 3 Y 6 MESES DESPUÉS DE UN PROCESO EDUCATIVO**



- (1) Pérez Quiñones JA, Duque de Estrada Riverón, Johany, Hidalgo Gato-Fuentes I. Asociación del *Streptococcus mutans* y lactobacilos con la caries dental en niños. *Revista Cubana de Estomatología* 2007;44(4):0-0.
- (2) Cabrera Escobar D, Herrera Nordet M, Gispert Abreu, Estela de los Ángeles, Duque Fuerte M. Riesgo de caries dental en niños atendidos en el hogar en el período 2006-2007. *Revista Cubana de Estomatología* 2009;46(2):0-0.
- (3) US Department of Health and Human Services. Oral health in America: A report of the Surgeon General, Rockville, MD: US Department of Health and Human Services, National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health; 2000. NIH Publication no.00-4713 2014.
- (4) Escobar G, Ortiz AC, Mejía LM. Caries dental en los menores de veinte años en Colombia: un problema de salud pública. *Rev.Fac.Nac.Salud Pública* 2003;21(2):107-118.
- (5) World Health Organization. Global oral health data bank. World Health Organization. Global oral health data bank [internet]. Geneva: World Health Organization; 2002. 2002.
- (6) Tascón JE, Cabrera G. Creencias sobre caries e higiene oral en adolescentes del Valle del Cauca. *Colomb Med* 2005;36(2):73-78.
- (7) Giacaman RA, Araneda E, Padilla C. Association between biofilm-forming isolates of *Streptococcus mutans* and caries experience in adults. *Arch Oral Biol* 2010 8;55(8):550-554.
- (8) Linossier A, Gajardo M, Olavarria J. Paleomicrobiological study in dental calculus: *Streptococcus mutans*. *Scanning Microsc* 1996;10(4):1005-13; discussion 1014.
- (9) Linossier A, Vargas A, Zillmann G, Arriagada M, Rojas R, Villegas R. *Streptococcus mutans*: Método semi-cuantitativo para establecer el rango de riesgo de infección bucal en niños preescolares chilenos. *Revista médica de Chile* 2003;131(4):412-418.
- (10) Bratthall D, Hänsel Petersson G. Cariogram—a multifactorial risk assessment model for a multifactorial disease. *Community Dent Oral Epidemiol* 2005;33(4):256-264.
- (11) Suárez Zúñiga E, Velosa Porras J. Comportamiento epidemiológico de la caries dental en Colombia/Epidemiology of Dental Caries in Colombia. *Universitas Odontologica* 2013;32(68):117-124.
- (12) Huamán YS, Campos RS. Ensayo comunitario de intervención: incidencia de caries en preescolares de un programa educativo preventivo en salud bucal. *Revista Estomatológica Herediana* 2014;22(1):3.
- (13) Smith R, Badner VM, Morse DE, Freeman K. Maternal risk indicators for childhood caries in an inner city population. *Community Dent Oral Epidemiol* 2002;30(3):176-181.
- (14) Graciano ME, Correa YA, Martínez CM, Burgos A, Ceballos JI, Sánchez LF. *Streptococcus mutans* y caries dental en América Latina. Revisión sistemática de la literatura. *Revista Nacional de Odontología. Revista Nacional de Odontología* 2014;8(14):32-45.



- (15) Gamboa F, Herazo Acuña B, Martínez MC. Control microbiológico sobre *Streptococcus mutans* y su acción acidogénica. *Universitas scientiarum* 2004;9:45-55.
- (16) Herazo AB. Clínica del sano en Odontología. : ECOE Ediciones; 2012, Bogotá.
- (17) Ojeda-Garcés JC, Oviedo-García E, Salas LA. *Streptococcus mutans* and dental caries. (English). *CES Odontología* 2013 01;26(1):44-56.
- (18) Duque de Estrada Riverón, Johany, Rodríguez Calzadilla A, Coutin Marie G, Riveron Herrera F. Factores de riesgo asociados con la enfermedad caries dental en niños. *Revista Cubana de Estomatología* 2003;40(2):0-0.
- (19) Gamboa F, Estupiñan M, Galindo A. Presence of *Streptococcus mutans* in saliva and its relationship with dental caries: Antimicrobial susceptibility of the isolates. *Universitas Scientiarum* 2004;9:23-27.
- (20) Aguilera, L. A., Sánchez, C. G., Neri, C. A., Aceves, M. C., & Padilla, B. M. P. *Streptococcus mutans* en saliva y su relación con caries dental en una población infantil de la comunidad de Tacoaleche Guadalupe, Zacatecas. *Rev ADM* 2009;65(6):48-56.
- (21) Sánchez-Pérez L, Acosta Gío E. *Estreptococos* cariogénicos predominantes, niveles de infección e incidencia de caries en un grupo de escolares. Estudio exploratorio. *Revista ADM* 2007;64(2):45-51.
- (22) Linossier AC, Valenzuela CY, Soler ER, Contreras EM. Colonization of the oral cavity by group *mutans streptococci* according to age assessed by a semi-quantitative method in saliva. *Rev Chilena Infectol* 2011 Jun;28(3):230-237.
- (23) König KG. Clinical manifestations and treatment of caries from 1953 to global changes in the 20th century. *Caries Res* 2004 May-Jun;38(3):168-172.
- (24) Marthaler T. Changes in dental caries 1953-2003. *Caries Res* 2004;38(3):173-181.
- (25) Ministerio de Salud y protección Social. Perfil y competencias profesionales del odontólogo en Colombia. 2013.
- (26) República de Colombia, Ministerio de Salud y la Protección Social. *IV Estudio Nacional de Salud Bucal (ENSAB IV)*. Resultados 2014.
- (27) Marsh, P., Martin, M., Lewis, M., Williams, D. *Oral Microbiology*. 5° Edición ed. Edinburgh London New York Oxford Philadelphia St Louis Sydney Toronto: CHURCHILL LIVINGSTONE, ELSEVIER; 2009.
- (28) Socransky SS, Haffajee A. Ecología microbiana periodontal. *Periodontology* 2000 (Ed Esp) 2006;12:135-187.
- (29) Negrori M. *Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica*. Buenos Aires - Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A.; 2009.



- (30) Körber FPC, Cornejo LS, Giménez MG. EARLY ACQUISITION OF STREPTOCOCCUS MUTANS FOR CHILDREN.
- (31) Arauco-Paola A, Julia A, Carlos Javier A, Melissa CS, Paul CM, Maribel CR, et al. Caries de Infancia temprana: diagnóstico e identificación de factores de riesgo. (Spanish). *Odontología Pediátrica* 2014 jul;13(2):119-137.
- (32) Mouton C, Robert J. *Bacteriología bucodental*. Edición original ed.: Masson, S.A.; 1995.
- (33) Cura F, Palmieri A, Girardi A, Martinelli M, Scapoli L, Carinci F. Lab-Test((R)) 4: Dental caries and bacteriological analysis. *Dent Res J (Isfahan)* 2012 Dec;9(Suppl 2):S139-41.
- (34) Yip K, Smales R. Oral diagnosis and treatment planning: part 2. Dental caries and assessment of risk. *Br Dent J* 2012;213(2):59-66.
- (35) Liébana J. *Microbiología Oral*. 2a ed. Madrid, España: McGraw-Hill-Interamericana; 2002.
- (36) Gómez AA, Agudelo CM, Sánchez SB, Clavijo MC, Ávila AC, Correa CD, et al. *Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología*. : Pontificia Universidad Javeriana; 2006.
- (37) de Estrada Riverón, Johany Duque, Quiñonez JAP, Fuentes IH. *Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar*. 2006.
- (38) Struzycka I. The oral microbiome in dental caries. *Pol J Microbiol* 2014;63(2):127-135.
- (39) Arango MC, Baena GP. *Caries de la infancia temprana y factores de riesgo*. 2011.
- (40) Chavarría N, Durán L, Pinzón J, Torres D. PREVALENCIA DE CARIES DE LA PRIMERA INFANCIA Y EXPLORACIÓN DE FACTORES DE RIESGO. *Revista Colombiana de Investigación en Odontología* 2013;4(10):56-64.
- (41) *III Estudio Nacional de Salud Bucal (ENSAB III)*. ; 1998.
- (42) Ramírez Puerta BS, Escobar Paucar G, Franco Cortés ÁM, Martínez Pabón MC, Gómez Urrea L. Caries de la infancia temprana en niños de uno a cinco años. Medellín, Colombia, 2008. *Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquia* 2011;22(2):164-172.
- (43) Yévenes I, Bustos BC, Ramos AA, Espinoza RM, Jara MN, Smith LP. Prevalence of dental caries in preschool children in Peñaflo, Santiago, Chile. *Revista Odonto Ciência (Journal of Dental Science)* 2009;24(2):116-119.
- (44) Rivera Martínez CA. Pre-school child oral health in a rural Chilean community. *Int.j.odontostomatol.(Print)* 2011:83-86.
- (45) World Health Organization. *The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century—the approach of the WHO Global Oral Health Programme* [internet]. Geneva: World Health Organization; 2015 2003.

**RECuento E IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus mutans* DE SALIVA EN NIÑOS CON CARIES DENTAL: SEGUIMIENTO A 3 Y 6 MESES DESPUÉS DE UN PROCESO EDUCATIVO**



- (46) Galán Morera R, Luecke D, Myers N. Estudio nacional de salud demanda de servicios odontológicos: Estudio Nacional de Salud. Colombia 1977- 1980. Bogotá: República de Colombia, Ministerio de Salud; 1980. 1980.
- (47) Escobar-Paucar G, Puerta GSR, Cortés ÁMF, Posada ÁMT, Aguirre JFC. Experiencia de caries dental en niños de 1-5 años de bajos ingresos. Medellín. Colombia. CES Odontología 2010;22(1):22-28.
- (48) Franco Cortés A, Guzmán Zuluaga I, Gómez Restrepo A, Ardila Medina CM. Reemergencia de la caries dental en adolescentes. Avances en Odontostomatología 2010;26(5):263-270.
- (49) Díaz-Cárdenas S, González-Martínez F. Prevalencia de caries dental y factores familiares en niños escolares de Cartagena de Indias, Colombia. Rev Salud Pública 2010;12(5):843-851.
- (50) Franco A, Ochoa E, Ramírez B, Segura A, Tamayo A, García C. Situación de salud bucal de los escolares de Medellín. VI Monitoreo. Año 2006. Rev Salud Pública de Medellín 2007;2(1):57-69.
- (51) García LM, Giraldo S, Mossos R, Muñoz M, Perea C, Prado C. Prevalencia de caries y enfermedad periodontal en escolares del sector público de Cali, 2005. Colomb Med 2008;39(suppl 1):47-50.
- (52) Secretaria Distrital de Salud de Bogotá. Línea de base para el seguimiento y evaluación de la meta de salud oral propuesta en el plan de desarrollo 2004-2007. La Secretaría 2007.
- (53) Franco AM, Santamaría A, Kurzer E, Castro L, Giraldo M. El menor de seis años: Situación de caries y conocimientos y prácticas de cuidado bucal de sus madres. CES odontología 2004;17(1):19-29.
- (54) Triana FE, Rivera SV, Soto L, Bedoya A. Estudio de morbilidad oral en niños escolares de una población de indígenas amazónicos. Colombia médica 2005;36(4 Supl 3):26-30.
- (55) López O, Duque L, Agudelo L, Cardona D. Morbilidad oral y factores de riesgo en preescolares y escolares de Manizales. Revista Digital de Salud (Universidad Autónoma de Manizales) 2005;1:1-13.
- (56) Gispert Abreu E, Rivero López A, Cantillo Estrada E. Relación entre el grado de infección por *Streptococcus mutans* y la posterior actividad cariogénica. Revista Cubana de Estomatología 2000;37(3):157-161.
- (57) Seki M, Karakama F, Terajima T, Ichikawa Y, Ozaki T, Yoshida S, et al. Evaluation of *mutans streptococci* in plaque and saliva: correlation with caries development in preschool children. J Dent 2003 May;31(4):283-290.
- (58) Rodríguez Llanes R, Traviesas Herrera EM, Lavandera Carballido E, Duque Hernández M. Factores de riesgo asociados con la caries dental en niños de círculos infantiles. Revista Cubana de Estomatología 2009;46(2):0-0.



- (59) Cuéllar González, María de los Angeles, Hernández Gallardo I, Mondragón Mojica M, Martínez Herrera E, Rodríguez López A. Prevalencia de caries y factores asociados en niños de estancias infantiles. *Gac.méd.Méx* 2000;136(4):391-397.
- (60) Koneman EW, Allen S. Koneman. *Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas.* : Ed. Médica Panamericana; 2008.
- (61) Medina R, Moreno LC, Velasco MC, Gutiérrez SJ. Estudio comparativo de medios de cultivo para crecimiento y recuperación del *Streptococcus mutans* ATCC 25175 in vitro. *NOVA publ.cient* 2005;3(3):25-30.
- (62) Decker EM, Klein C, Schwindt D, von Ohle C. Metabolic activity of *Streptococcus mutans* biofilms and gene expression during exposure to xylitol and sucrose. *Int J Oral Sci* 2014 Jul 25.
- (63) Merritt J, Qi F. The mutacins of *Streptococcus mutans*: regulation and ecology. *Mol Oral Microbiol* 2012 Apr;27(2):57-69.
- (64) Gamboa F, Chaves M, Estupiñán M, Galindo A. Detección de mutacinas en biotipos de cepas *S. mutans* aisladas de niños preescolares con y sin caries dental. *Universitas Odontológica* 2006;25(57):7-13.
- (65) Köhler B, Andrén I, Jonsson B. The effect of caries-preventive measures in mothers on dental caries and the oral presence of the bacteria *Streptococcus mutans* and lactobacilli in their children. *Arch Oral Biol* 1984;29(11):879-883.
- (66) Köhler B, Andreen I. Influence of caries-preventive measures in mothers on cariogenic bacteria and caries experience in their children. *Arch Oral Biol* 1994;39(10):907-911.
- (67) Tournelle Kimura PM. Prevalencia y diversidad de bacterias pertenecientes al género *Streptococcus* en saliva de niños pre-escolares chilenos entre 2 y 5 años de edad con y sin caries 2013.
- (68) Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986 Dec;50(4):353-380.
- (69) Beighton D, Manji F, Baelum V, Fejerskov O, Johnson NW, Wilton JM. Associations between salivary levels of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, lactobacilli, and caries experience in Kenyan adolescents. *J Dent Res* 1989 Aug;68(8):1242-1246.
- (70) Kohler B, Andreen I. Mutans streptococci and caries prevalence in children after early maternal caries prevention: a follow-up at eleven and fifteen years of age. *Caries Res* 2010;44(5):453-458.
- (71) Universidad de Granada. Prácticas online de Microbiología para Farmacéuticos. Recuento de bacterias. 2014; Available at: <http://www.pomif.com/pages/practicas/bacteriologia/recuento-de-bacterias-viables/recuento-text>. Accessed Febrero, 26, 2015.
- (72) Salazar LA, Vásquez C, Almuna A, Oporto G, Santana R, Herrera CL, et al. Detección molecular de estreptococos cariogénicos en saliva. *International Journal of Morphology* 2008;26(4):951-958.





(73) Loyola-Rodriguez JP, Martinez-Martinez RE, Flores-Ferreya BI, Patino-Marin N, Alpuche-Solis AG, Reyes-Macias JF. Distribution of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in saliva of Mexican preschool caries-free and caries-active children by microbial and molecular (PCR) assays. *J Clin Pediatr Dent* 2008 Winter;32(2):121-126.

(74) MARTÍNEZ ER, SUÁREZ MC, FEITO RS, GONZÁLEZ JF. Técnicas de diagnóstico de la caries dental. Descripción, indicaciones y valoración de su rendimiento. *Bol Pediatr* 2006;46:23-31.

(75) D. Barrera. Actividad antimicrobiana de plantas sobre microorganismos cariogénicos. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia; 2009.

(76) Natalia Paz Acuña Zepeda. Estudio clínico comparativo de recuento de *Streptococcus mutans* antes y después de la aplicación de sellante. Universidad de Chile; 2013.

(77) Deery C. Caries detection and diagnosis, sealants and management of the possibly carious fissure. *Br Dent J* 2013;214(11):551-557.

(78) Ismail AI, Sohn W, Tellez M, Amaya A, Sen A, Hasson H, et al. The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol* 2007 Jun;35(3):170-178.

(79) Galvis L, García N, Pazos B, Arango MC, Jaramillo A. Comparación de la detección de caries en dentición temporal con el índice ICDAS Modificado y el índice ceo en niños de 1 a 5 años en Cali. 2011.

(80) Herrera MdS, Medina-Solis CE, Maupomé G. Prevalencia de caries dental en escolares de 6-12 años de edad de León, Nicaragua. *Gaceta Sanitaria* 2005;19(4):302-306.

(81) Duque de Estrada Riverón, Johany, Hidalgo-Gato Fuentes I, Pérez Quiñónez JA. Técnicas actuales utilizadas en el tratamiento de la caries dental. *Revista Cubana de Estomatología* 2006;43(2):0-0.

(82) Lozano Llaury, Lucía Beatriz. Efectividad de un yogurt comercial con y sin cepas probióticas sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* en saliva de niños de 3 a 5 años con caries, en la I.E. 81015 Carlos E. Uceda Meza, Trujillo, 2013. Universidad Nacional de Trujillo; 2014.

(83) Fure S. Five-year incidence of caries, salivary and microbial conditions in 60-, 70- and 80-year-old Swedish individuals. *Caries Res* 1998;32(3):166-174.

(84) Fure S. Ten-year incidence of tooth loss and dental caries in elderly Swedish individuals. *Caries Res* 2003 Nov-Dec;37(6):462-469.

(85) Gold OG, Jordan HV, van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 1973 11;18(11):1357-1364.

(86) Emilson CG. Prevalence of *Streptococcus mutans* with different colonial morphologies in human plaque and saliva. *Scand J Dent Res* 1983 Feb;91(1):26-32.



- (87) Apolonio AC, Carvalho MA, Ribas RN, Sousa-Gaia LG, Santos KV, Lana MA, et al. Production of antagonistic substance by *Eikenella corrodens* isolated from the oral cavity of human beings with and without periodontal disease. *J Appl Microbiol* 2007 Jul;103(1):245-251.
- (88) Gutierrez de Annan S, Ruiz de Valladares RE, Benito de Cardenas IL. Mitis salivarius-bacitracin 10% saccharose agar for oral streptococci and *Streptococcus mutans* counts. *Acta Odontol Latinoam* 1997;10(1):47-53.
- (89) Wan AK, Seow WK, Walsh LJ, Bird PS. Comparison of five selective media for the growth and enumeration of *Streptococcus mutans*. *Aust Dent J* 2002 Mar;47(1):21-26.
- (90) Herrera CL, Pantoja P, de La Maza T, Sanhueza A, Salazar LA. Diagnóstico microbiológico y molecular de bacterias cariogénicas en mujeres embarazadas de la Región de La Araucanía, Chile. *Revista chilena de infectología* 2007;24(4):270-275.
- (91) Medina A. Efecto de las enterobacterias en pacientes con periodontitis crónica. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral* 2010;22(1):27-35.
- (92) Kishi M, Abe A, Kishi K, Ohara-Nemoto Y, Kimura S, Yonemitsu M. Relationship of quantitative salivary levels of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in mothers to caries status and colonization of *mutans* streptococci in plaque in their 2.5-year-old children. *Community Dent Oral Epidemiol* 2009 Jun;37(3):241-249.
- (93) Martínez Pabón MC, Rodríguez Cíodaro A. Estudio de las cepas de estreptococos del grupo *Mutans* Presentes en binomios madre-hijo. *Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquia* 2010;21(2):177-185.
- (94) Alves AC, Nogueira RD, Stipp RN, Pampolini F, Moraes AB, Goncalves RB, et al. Prospective study of potential sources of *Streptococcus mutans* transmission in nursery school children. *J Med Microbiol* 2009 Apr;58(Pt 4):476-481.
- (95) Viana Barraza NJ. Correlacion entre diagnóstico clínico de caries dental y el recuento de *streptococcus mutans* y *lactobacillus spp* en saliva. Un estudio piloto. 2014.
- (96) Yasunaga A, Yoshida A, Morikawa K, Maki K, Nakamura S, Soh I, et al. Monitoring the prevalence of viable and dead cariogenic bacteria in oral specimens and in vitro biofilms by qPCR combined with propidium monoazide. *BMC Microbiol* 2013 Jul 13;13:157-2180-13-157.
- (97) Zhang Q, van Palenstein Helder WH. Caries experience variables as indicators in caries risk assessment in 6–7-year-old Chinese children. *J Dent* 2006 10;34(9):676-681.
- (98) Okada M, Kawamura M, Oda Y, Yasuda R, Kojima T, Kurihara H. Caries prevalence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in Japanese schoolchildren. *Int J Paediatr Dent* 2012 09;22(5):342-348.
- (99) Okada M, Soda Y, Hayashi F, Doi T, Suzuki J, Miura K, et al. Longitudinal study of dental caries incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in pre-school children. *J Med Microbiol* 2005 Jul;54(Pt 7):661-665.



(100) Arévalo-Ruano M, Canacuan-Melo F, Echeverry-Chica J, Salazar-González C, Martínez-Delgado C, Martínez-Pabón M, et al. Molecular identification and genotyping of *Streptococcus mutans* from saliva samples of children in Medellín, Colombia. *CES Odontología* 2015;27(2):47-60.

(101) Garcés JCO, García EO, Salas LA. *Streptococcus mutans* y caries dental. (*Streptococcus mutans* and dental caries). *CES Odontología* 2013;26(1):44-56.

(102) Acevedo AM, Ray MV, Socorro M, Rojas-Sanchez F. Frequency and distribution of *Mutans Streptococci* in dental plaque from caries-free and caries-affected Venezuelan children. *Acta Odontol Latinoam* 2009;22(1):15-20.

(103) Saravia ME, Nelson-Filho P, Silva RAB, De Rossi A, Faria G, Silva LAB, et al. Recovery of *mutans streptococci* on MSB, SB-20 and SB-20M agar media. *Arch Oral Biol* 2013 3;58(3):311-316.

(104) Ariel Andrés Salinas Guerra. EFECTO DEL NIVEL DE *Streptococcus mutans* SALIVAL, ÍNDICE DE HIGIENE ORAL E ÍNDICE DE COMPORTAMIENTO EN HIGIENE ORAL SOBRE EL ÍNDICE ceod EN NIÑOS Y NIÑAS DE 6 AÑOS BENEFICIARIOS DEL PROGRAMA DE SALUD ORAL INTEGRAL EN LA REGIÓN METROPOLITANA Universidad de Chile; 2013.

(105) Twetman S, Fritzon B, Jensen B, Hallberg U, Stahl B. Pre- and post-treatment levels of salivary *mutans streptococci* and *lactobacilli* in pre-school children. *Int J Paediatr Dent* 1999 Jun;9(2):93-98.

(106) Nicole Ciampi Díaz. "Efecto del tratamiento rehabilitador integral de caries temprana de la infancia en los niveles de *Streptococcus mutans* salivales de niños atendidos en la Clínica de Odontopediatría de la Escuela de Graduados de la Universidad de Chile" Universidad de Chile; 2013.

(107) Benito de Cárdenas, Ida Laura, de Annán G, Susana E, Testa de Nadal, María Mercedes. Efecto del tratamiento preventivo sobre la microflora salival: recuento de estreptococos. *Rev Asoc Odontol Argent* 1994;82(2):126-131.

(108) Litsas G. Effect of full mouth rehabilitation on the amount of *Streptococcus mutans* in children with Early Childhood Caries. *Eur J Paediatr Dent* 2010 Mar;11(1):35-38.

(109) Peretz B, Sarit F, Eidelman E, Steinberg D. *Mutans streptococcus* counts following treatment for early childhood caries. *J Dent Child (Chic)* 2003 May-Aug;70(2):111-114.

(110) Roshan NM, Shigli AL, Deshpande SD. Microbiological evaluation of salivary *Streptococcus mutans* from children of age 5-7 years, pre- and post-traumatic restorative treatment. *Contemp Clin Dent* 2010 Apr;1(2):94-97.

(111) de Estrada Riverón, Johany Duque, Fuentes IH, Martell YD. Microorganismos probióticos en la prevención de caries dentales. *Medisur* 2010;8(5):371-376.

(112) Yadav M, Poornima P, Roshan NM, Prachi N, Veena M, Neena IE. Evaluation of probiotic milk on salivary *mutans streptococci* count: an in vivo microbiological study. *J Clin Pediatr Dent* 2014 Fall;39(1):23-26.



- (113) Jindal G, Pandey RK, Agarwal J, Singh M. A comparative evaluation of probiotics on salivary mutans streptococci counts in Indian children. *Eur Arch Paediatr Dent* 2011 Aug;12(4):211-215.
- (114) Juneja A, Kakade A. Evaluating the effect of probiotic containing milk on salivary mutans streptococci levels. *J Clin Pediatr Dent* 2012 Fall;37(1):9-14.
- (115) Olak J, Mandar R, Karjalainen S, Soderling E, Saag M. Dental health and oral mutans streptococci in 2-4-year-old Estonian children. *Int J Paediatr Dent* 2007 Mar;17(2):92-97.
- (116) Bryskier A. Viridans group streptococci: a reservoir of resistant bacteria in oral cavities. *Clin Microbiol Infect* 2002 Feb;8(2):65-69.
- (117) Pasquantonio G, Condo S, Cerroni L, Bikiqu L, Nicoletti M, Prenna M, et al. Antibacterial activity of various antibiotics against oral streptococci isolated in the oral cavity. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2012 Jul-Sep;25(3):805-809.
- (118) Bekal-Si Ali S, Hurtubise Y, Lavoie MC, LaPointe G. Diversity of *Streptococcus mutans* bacteriocins as confirmed by DNA analysis using specific molecular probes. *Gene* 2002 1/23;283(1-2):125-131.
- (119) Gamboa F, Chaves M, Lamby C, Fajardo A, Arevalo A. Antagonistic action of indigenous *Streptococcus mutans* strains. *Acta Odontol Latinoam* 2009;22(2):129-138.
- (120) Alaluusua S, Takei T, Ooshima T, Hamada S. Mutacin activity of strains isolated from children with varying levels of mutants streptococci and caries. *Arch Oral Biol* 1991;36(4):251-255.
- (121) Kreth J, Zhang Y, Herzberg MC. Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 2008 Jul;190(13):4632-4640.
- (122) Wang BY, Kuramitsu HK. Interactions between oral bacteria: inhibition of *Streptococcus mutans* bacteriocin production by *Streptococcus gordonii*. *Appl Environ Microbiol* 2005 Jan;71(1):354-362.
- (123) Kreth J, Merritt J, Shi W, Qi F. Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *J Bacteriol* 2005 Nov;187(21):7193-7203.
- (124) Garibay Rodríguez P. Nivel de *Streptococcus* del grupo mutans en infantes de 0-24 meses que asistieron a la Unidad del Bebé del Area de de Odontopediatría del IESN en los meses de mayo-junio del 2005. 2005.
- (125) Wescombe PA, Hale JD, Heng NC, Tagg JR. Developing oral probiotics from *Streptococcus salivarius*. *Future Microbiol* 2012 Dec;7(12):1355-1371.
- (126) Burton JP, Cowley S, Simon RR, McKinney J, Wescombe PA, Tagg JR. Evaluation of safety and human tolerance of the oral probiotic *Streptococcus salivarius* K12: A randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Food and Chemical Toxicology* 2011 9;49(9):2356-2364.



- (127) Chung J, Ha E, Park H, Kim S. Isolation and characterization of *Lactobacillus* species inhibiting the formation of *Streptococcus mutans* biofilm. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19(3):214-216.
- (128) Wescombe PA, Heng NC, Burton JP, Chilcott CN, Tagg JR. Streptococcal bacteriocins and the case for *Streptococcus salivarius* as model oral probiotics. *Future Microbiol* 2009 Sep;4(7):819-835.
- (129) Hillman J, Socransky S. Bacterial interference in the oral ecology of *Actinobacillus actinomycescomitans* and its relationship to human periodontitis. *Arch Oral Biol* 1982;27(1):75-77.
- (130) Hillman JD, McDonell E, Hillman CH, Zahradnik RT, Soni MG. Safety assessment of ProBiora3, a probiotic mouthwash: subchronic toxicity study in rats. *Int J Toxicol* 2009 Sep-Oct;28(5):357-367.
- (131) Zahradnik RT, Magnusson I, Walker C, McDonell E, Hillman CH, Hillman JD. Preliminary assessment of safety and effectiveness in humans of ProBiora3, a probiotic mouthwash. *J Appl Microbiol* 2009 Aug;107(2):682-690.
- (132) Camelo-Castillo A, Benitez-Paez A, Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Mira A. *Streptococcus dentisani* sp. nov., a novel member of the mitis group. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014 Jan;64(Pt 1):60-65.
- (133) Hillman JD, McDonell E, Cramm T, Hillman CH, Zahradnik RT. A spontaneous lactate dehydrogenase deficient mutant of *Streptococcus rattus* for use as a probiotic in the prevention of dental caries. *J Appl Microbiol* 2009 Nov;107(5):1551-1558.
- (134) Khemaleelakul S, Baumgartner JC, Pruksakorn S. Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2002 12;94(6):746-755.
- (135) Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S24 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. Enero, 2014.(Vol 34 No 1.).



## 13. ANEXOS





ANEXO N°1

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



Pontificia Universidad Javeriana  
Facultad de Odontología

CONSENTIMIENTO INFORMADO MENORES DE EDAD

TÍTULO DEL PROYECTO: “ Descripción del microcosmos bacteriano ligado a placa dental en niños con y sin caries dental: seguimiento a 3 y 6 meses después de un proceso de educación”.

INVESTIGADORES: Fredy Omar Gamboa, Adriana Dabeiba García, Ana Lucía Sarralde, Claudia Patricia Lamby Tovar, Fabio Aristizabal y Martín Abba.

FECHA:

Su representado menor de edad está siendo invitado a participar en el proyecto de investigación titulado: “ Descripción del microcosmos bacteriano ligado a placa dental en niños con y sin caries dental: seguimiento a 3 y 6 meses después de un proceso de educación”. Si usted decide autorizar la participación de su representado menor de edad en este estudio, debe firmar este consentimiento informado. Su firma quiere decir que se la ha explicado y ha entendido en qué consiste la participación del menor en el estudio y sus posibles riesgos, incomodidades o molestias.

Este estudio es una investigación de tipo experimental que se realizará en la Pontificia Universidad Javeriana (Facultad de Odontología), con la aprobación del Centro de Investigaciones Odontológicas y el Comité de Ética e Investigación de la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana.

El objetivo de este estudio es buscar los microorganismos implicados en caries dental que se encuentran en la placa dental y evaluar si las estrategias de educación dadas conducen a una placa mucho más sana.

El estudio en el que su representado menor de edad está siendo invitado a participar consiste en permitir tomar tres muestras de placa dental de algunas superficies de los dientes, mediante una cucharilla, una al momento de ser incluido en el estudio y las dos restantes (al 3er. y 6o. mes) después de iniciar un proceso de educación para tener una mejor salud oral.

Es importante seguir las instrucciones de los investigadores para la toma de las muestras, que serán dadas previamente a la recolección de las mismas.

La toma de las muestras no implican ningún riesgo para su salud de acuerdo a la resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia.

**RECuento E IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus mutans* DE SALIVA EN NIÑOS CON CARIES DENTAL: SEGUIMIENTO A 3 Y 6 MESES DESPUÉS DE UN PROCESO EDUCATIVO**



Las muestras tomadas (al inicio, 3er. y 6º. mes) serán utilizadas para realizar el análisis microbiológico. El excedente de la muestras serán almacenadas en el Centro de Investigaciones Odontológicas de forma adecuada.

Usted puede decidir no autorizar la participación de su representado menor de edad en la investigación si no lo desea o retirarlo del proyecto en cualquier momento y esta decisión no perjudicará la relación de su representado con el odontólogo (investigador del estudio), quien continuará con el tratamiento pertinente. No habrá ningún costo adicional por la participación del menor en el estudio. Muy posiblemente el menor obtenga un beneficio adicional, sin costo alguno, en el seguimiento y refuerzo educativo al conocerse el tipo de bacterias presentes en su placa dental.

Los datos de este estudio serán publicados. La información publicada no incluirá el nombre del menor o cualquier otra forma de identificación. De requerirse no serán utilizados sin su expresa autorización. La historia clínica del menor podrá ser consultada por el investigador para el estudio.

Usted puede hablar con los investigadores en cualquier momento y hacer cualquier pregunta que tenga en relación con el estudio dirigiéndose a los investigadores o a la secretaria técnica del Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana: Dra. Maddy Ruiz Vásquez, teléfono 3004004387. [maddy.ruiz@javeriana.edu.co](mailto:maddy.ruiz@javeriana.edu.co)

Los investigadores:

Fredy Gamboa: Telf. 3208320, ext 2899 E-mail: [gamboa@javeriana.edu.co](mailto:gamboa@javeriana.edu.co)

Adriana García: Telf. 3208320. E-mail: [adrigaro@hotmail.com](mailto:adrigaro@hotmail.com)

Ana Lucía Sarralde: Telf. 3208320, E-mail: [sarralde@javeriana.edu.co](mailto:sarralde@javeriana.edu.co)

Claudia Patricia Lamby Tovar: Telf. 3208320, E-mail: [clamby@javeriana.edu.co](mailto:clamby@javeriana.edu.co)

Fabio Aristizabal: (Universidad Nacional de Colombia), [ancizarf@gmail.com](mailto:ancizarf@gmail.com)

Martin Abba: (UBA, Argentina), [mabba@uba.ar](mailto:mabba@uba.ar)

Yo, (nombre del participante) \_\_\_\_\_, menor de edad declaro que se me ha explicado en qué consistirá la participación en el estudio y acepto participar en él.

Firma del participante o huella, si no sabe escribir: \_\_\_\_\_

Yo \_\_\_\_\_ (representante legal), identificado con C.C. ( )  
pasaporte ( ) o cédula de extranjería ( ) número: \_\_\_\_\_, declaro que:

**RECuento E IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus mutans* DE SALIVA EN NIÑOS CON CARIES DENTAL: SEGUIMIENTO A 3 Y 6 MESES DESPUÉS DE UN PROCESO EDUCATIVO**



Me han dado una copia de este consentimiento informado, me ha sido dada la oportunidad de hacer todas las preguntas sobre la investigación y estas han sido respondidas. He entendido perfectamente cuáles son los procedimientos que le van a ser practicados a mi representado menor de edad durante la investigación y estoy de acuerdo con que mi representado se someta a ellos. Estoy de acuerdo con que mi representado participe en el estudio. También autorizo que los resultados obtenidos del presente estudio sean publicados y que el material aislado de las muestras de mi representado pueda almacenarse para ser usado en otras investigaciones.

Datos del participante menor de edad

Nombre: \_\_\_\_\_ Fecha de nacimiento: \_\_\_\_\_

Datos del representante legal:

Nombre \_\_\_\_\_ C.C No. \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

Datos de los investigadores:

Nombre \_\_\_\_\_ C.C No. \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_ C.C No. \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_ C.C No. \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_ C.C No. \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

**RECuento E IDENTIFICACIóN DE *Streptococcus mutans* DE SALIVA EN NIÑOS CON CARIES DENTAL: SEGUIMIENTO A 3 Y 6 MESES DESPUÉS DE UN PROCESO EDUCATIVO**



Nombre \_\_\_\_\_ C.C No. \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_ C.C No. \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

**Datos de los testigos**

Nombre \_\_\_\_\_ C.C No. \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

Parentesco con el participante: \_\_\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_ C.C No. \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

Parentesco con el participante: \_\_\_\_\_



**ANEXO N°2**

**FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS (Recuento de *S. mutans*)**

Se hizo recuento de colonias de *S. mutans* expresado en UFC/ per ml en cada una de las diluciones sembradas ( $10^{-5}$ ;  $10^{-6}$ ;  $10^{-7}$ ) en MSB al 20% con sacarosa para las muestras respectivas.

Recuento de <i>S. mutans</i> en MSB suplementado al 20% de Sacarosa								
Muestra	Toma	Colonias	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	Catalasa	Gram	Rto UFC/ml
	1°							
	2°							
	3°							
	1°							
	2°							
	3°							
	1°							
	2°							
	3°							

**Figura 13-1 Formato para el recuento de *S. mutans***

En total se procesaron 69 muestras de saliva provenientes de niños entre los 2 y 6 años de edad con caries dental. Otros formatos se utilizaron para el recuento de Estreptococos totales y para microorganismos aeróbicos totales.

Rto de Streptococcus spp. en MSA								
Muestra	Toma	Colonias	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	Catalasa	Gram	Rto UFC/ml
	1°							
	2°							
	3°							
	1°							
	2°							
	3°							
	1°							
	2°							
	3°							

Rto total de microorganismos aeróbicos en BHI suplementado al 5% con sangre de carnero								
Muestra	Toma	Colonias	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$			Rto UFC/ml
	1°							
	2°							
	3°							
	1°							
	2°							
	3°							
	1°							
	2°							
	3°							

**ANEXO N°3**

**INSUMOS PARA LA PREPARACIÓN DE AGAR Mitis Salivarius Bacitracina al 20% con Sacarosa**

El Agar Mitis Salivarius, MSA (Difco Laboratories; Detroit, MI) contiene:

Componentes	Contenido
Digerido pancreático de caseína	6.0 g
Peptona de proteosa No. 3	9.0
Peptona de proteosa	5.0
Dextrosa	1.0
Sacarosa	50
Fosfato dipotásico	4.0
Azul tripan	0.075
Cristal azul	0.0008
Telurito de Chapman	1
Agar	15,0
Fórmula aproximada por litro	



**Fotografía 13-1 Agar Mitis Salivarius**

Además de la utilización de azúcar blanca refinada y Bacitracina, frasco de 250,000 Unidades (SIGMA).



**RECuento E IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus mutans* DE SALIVA EN NIÑOS CON CARIES DENTAL: SEGUIMIENTO A 3 Y 6 MESES DESPUÉS DE UN PROCESO EDUCATIVO**



**ANEXO N°4**

**FICHA DE LA RECOLECCIÓN DE DATOS**

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

PROYECTO: "DESCRIPCION DEL MICROCOSMOS BACTERIANO DE LA PLACA DENTAL EN NIÑOS CON Y SIN CARIES DENTAL, SEGUIMIENTO 0, 3, Y 6 MESES DESPUES DE UN PROCESO DE EDUCACION"

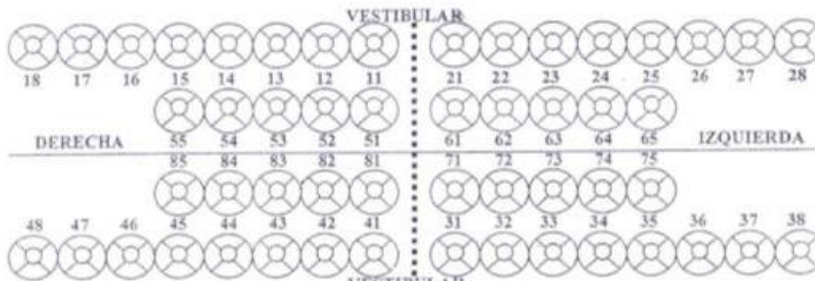
FORMATO DE REGISTRO CLINICO DEL ODONTOGRAMA.

Centro Educativo: Fé y Alegría – Suba - Jose María Velaz

Nombre: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_

Curso: \_\_\_\_\_



CONVENCIONES	Color	CONVENCIONES	Color
Carado		Diente faltante	
Obturado con amalgama		Diente en erupción	
Obturado con resina		Sellante presente	
Diente extraído		Corona completa	
Diente con exodoncia indicada			

Índice coe 

c	o	e
---	---	---

 Total 

--

 Sanos 

--

Índice COP 

C	O	P
---	---	---

 Total 

--

 Sanos 

--

Fecha 

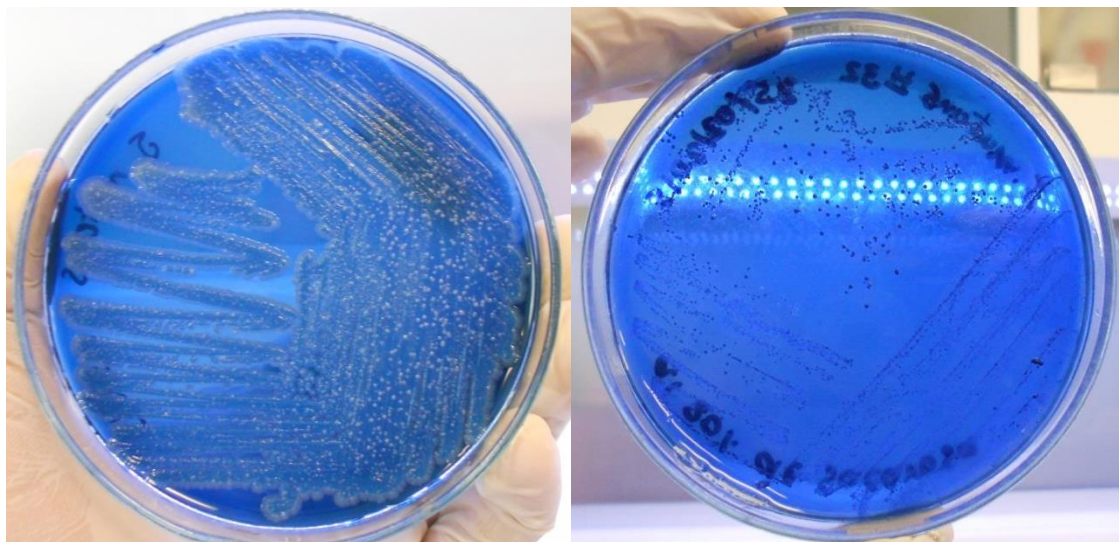
D	M	A
---	---	---

OBSERVACIONES \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**ANEXO N°5**

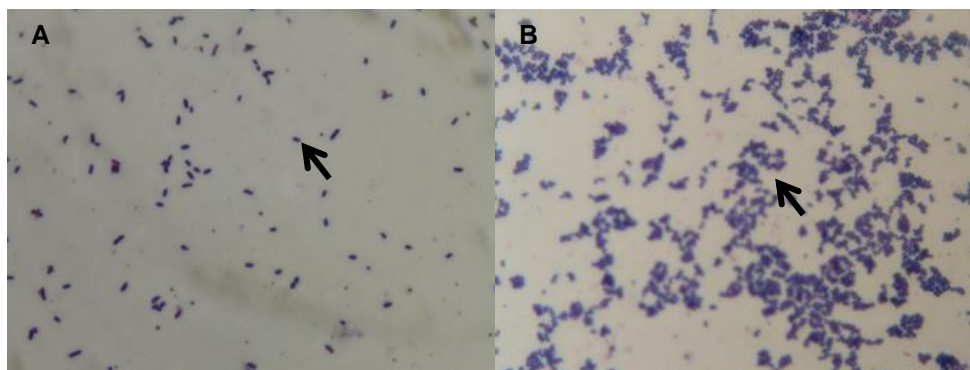
**COLONIAS DE *S. mutans* EN MEDIO MSB SUPLEMENTADO AL 20% CON SACAROSA**

Las colonias en el Agar MSA y MSB aparecen elevadas, convexas, onduladas, de color azul oscuro, con márgenes irregulares, superficie granular, más o menos adherida y con una burbuja de color brillante rodeándolas cuando producen polisacáridos extracelulares. Sin embargo, tanto en estos medios como en el TYCSB, el aspecto puede variar mucho no sólo entre las especies, sino también entre las cepas de la misma especie, lo que a menudo dificulta su reconocimiento.



**Fotografía 13-2 Cepas de *S. mutans* en medio MSB al 20% con sacarosa**

Con la tinción de Gram se observan Cocos a cocobacilos gram positivos de 10 µm de largo. Su morfología varía dependiendo del medio de cultivo en el que se encuentran como se observa en la Fotografía 13-3. A, Cocobacilos gram positivos; B, Cocos gram positivos en cadena.



**Fotografía 13-3 Cocobacilos Gram positivos de *S. mutans* en MSB al 20%**

## ANEXO N°6

### PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS

**Preparación de medios de cultivo:** Se preparó siguiendo las especificaciones de la casa comercial. A excepción del Agar Mitis Salivarius, MSA, suplementado con Bacitracina al 0.2 U/ml y Sacarosa al 20%; en este caso, se preparó 1 Litro de agua destilada por cada 90 gr de MSA, 150 gr de azúcar blanca refinada y, 1 ml de la solución stock estéril de Bacitracina (200 Unidades/ ml). Para su preparación se llevó a cabo el siguiente procedimiento: Se adicionó los 90 gr de MSA en 1000 ml para reconstituirlo, adicionando 150 gr de azúcar blanca. El medio fue calentado en una estufa para disolver los componentes y luego se puso en la autoclave a 121°C por 15 minutos para ser esterilizado. Después se dejó a temperatura ambiente hasta obtener una temperatura de 45°C y luego se adicionó 1 ml de la solución stock de Bacitracina. Se agito bien durante 5 minutos y se sirvió en cajas de Petri plásticas de 90 mm\*120 mm. Los otros medios de cultivo fueron: Agar MacConkey, Agar Brain Heart Infusion, Agar Mueller-Hinton y, Todd-Hewitt.



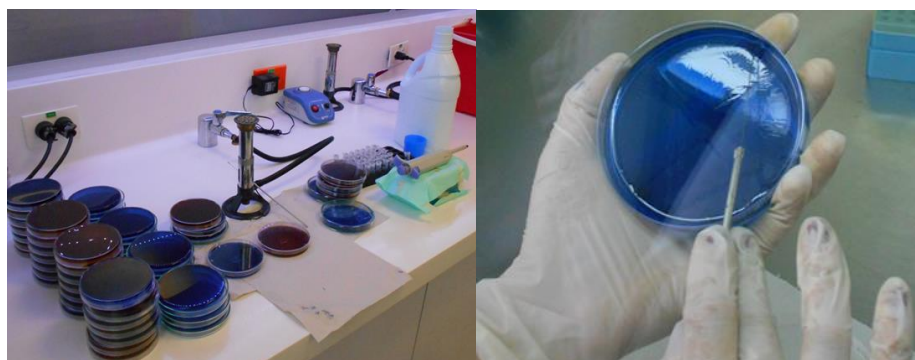
**Fotografía 13-4 Preparación de medios de cultivo**



**Fotografía 13-5 Vertimiento de agar en placas de petri**

Luego de que los medios estuvieran preparados y debidamente refrigerados, la siembra en placa se hizo por la técnica de siembra “masiva” con un aza redonda estéril. Se hizo cinco repeticiones para cada placa de agar con el fin de que la muestra se esparciera de manera homogénea.





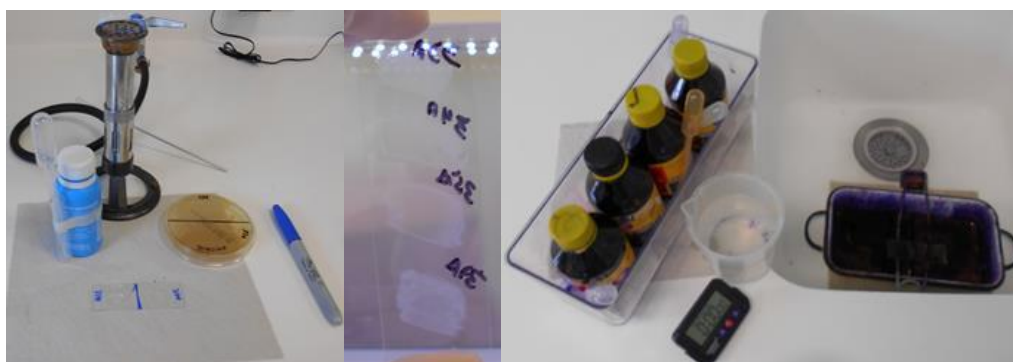
Fotografía 13-6 Siembra de muestras

Las cajas de Petri se almacenaron en una cámara anaeróbica (Bactron, Shel Lab) a 37°C durante 24 horas.



Fotografía 13-7 Cámara anaeróbica

Después del crecimiento bacteriano en las cajas de Agar, las colonias con morfología típica de *S. mutans* en MSB al 20% fueron examinadas para la actividad de la catalasa y tinción de Gram, además de las pruebas bioquímicas realizadas con el sistema comercial Api 20 Strep (BioMerieux, Marcy-l'étoile, France).



Fotografía 13-8 Prueba de la Catalasa y tinción de Gram

Las colonias con morfología típica de *S. mutans*, fueron catalasa negativa, y cocos Gram positivos. *Streptococcus mutans* poseen el siguiente perfil bioquímico:

## RECuento E IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus mutans* DE SALIVA EN NIÑOS CON CARIES DENTAL: SEGUIMIENTO A 3 Y 6 MESES DESPUÉS DE UN PROCESO EDUCATIVO



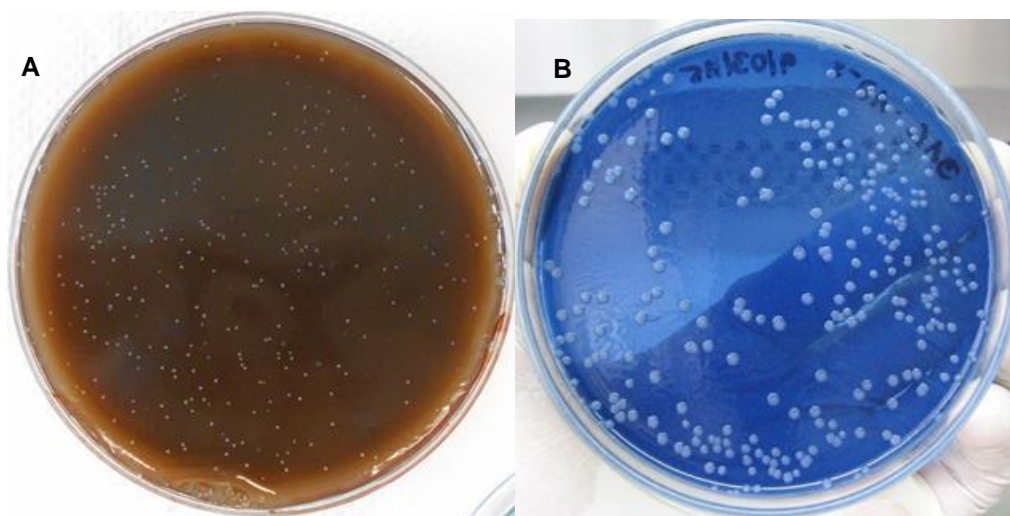
Prueba	Resultado
Rafinosa	Positivo*
Manitol	Positivo*
Melobiosa	Positivo*
Trehalosa	Positivo*
Inulina	Positivo*
Esculina sin bilis	Hidrólisis positiva
Esculina con bilis	Hidrólisis negativa
Ureasa	Negativa
Arginina	Hidrólisis negativa
Bacitracina (2 U)	Resistente
*Fermentación de carbohidratos	

Fuente: (64)

Es aconsejable realizar re-chequeo de las cepas de *S. mutans* con las siguientes pruebas bioquímicas: manitol y sorbitol. Esta bacteria es fermentadora de los dos carbohidratos.

### Conteo de colonias expresado en UFC/ per ml:

El conteo se realizó en Agar BHI al 5% de sangre de cordero, Agar Mitis Salivarius y, Agar Mitis Salivarius suplementado con Sacarosa al 20% y Bacitracina 0.2U/ml. Esto con el fin de determinar las UFC/ per ml de Microorganismos aeróbicos totales, *Streptococcus spp.*, totales, y *S. mutans*. Se seleccionaron las placas de agar que contenían menos de 300 colonias en cada una de las diluciones empleadas ( $10^{-5}$ ;  $10^{-6}$ ;  $10^{-7}$ ).

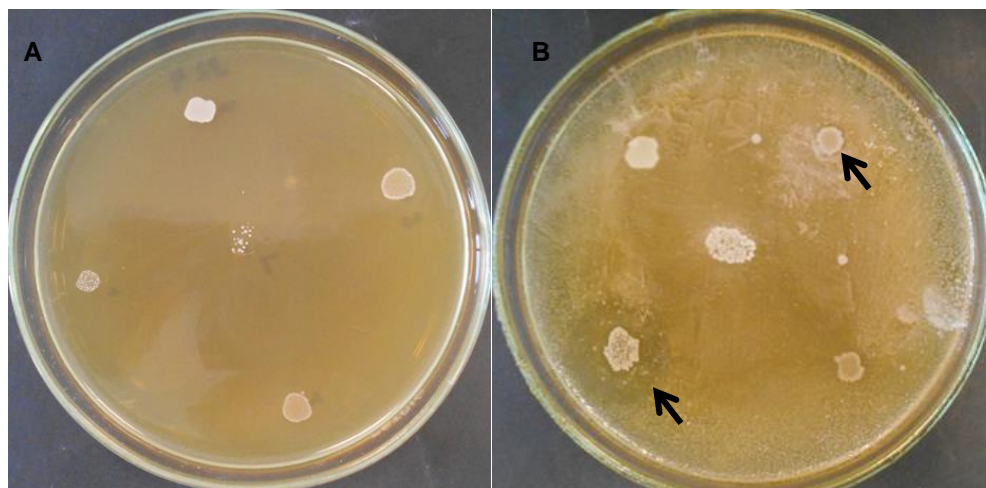


Fotografía 13-9 Conteo de UFC/ per ml en placas de agar

En la Fotografía 13-9, se observa en la parte A: colonias blancas, cremosas, puntiformes,  $\gamma$ -hemolíticas, dispersas uniformemente sobre la palca de Agar BHI; la parte B: colonias azules, convexas, onduladas, de aspecto rugoso.

### Determinación del efecto antagónico:

El efecto antagonístico se determinó por medio del ensayo de doble capa en Agar BHI. Para tal fin, se midió el diámetro del halo de inhibición generado por la cepa productora con respecto a la cepa indicadora. Como cepa indicadora se utilizó las 20 cepas de *S. mutans* aisladas a partir de las muestras de saliva; como cepas productoras se utilizaron cepas de referencia ATCC, las cuales fueron: *S. mutans* ATCC 25175; *S. salivarius* ATCC 13419; *S. uberis* ATCC 700407; *L. casei* ATCC 393; *L. acidophilus* ATCC 4356, véase en la metodología. Se consideró como efecto antagonístico aquella cepa productora que obtuviera un halo mayor o igual a 4 mm.



**Fotografía 13-10 Determinación del efecto antagonístico**

Las cepas productoras, también denominadas cepas efectoras, se sembraron con micropipeta en gota con un volumen cada una de 2µl, como se observa en Fotografía 13-10, parte A. Este proceso se realiza antes de verter la segunda capa de agar sobre la placa, con el inóculo correspondiente a cada una de las 20 cepas de *S. mutans* escogidas como indicadoras. En la parte B, se observa ya la segunda capa de agar con la cepa indicadora dispersa homogéneamente, lo que permite ver los halos de inhibición producto de la acción antagonística de las cepas productoras.

#### **Prueba de susceptibilidad antimicrobiana:**

Para esta prueba, se utilizó la guía de estándares de desempeño para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana M100-S24 – Enero de 2014, realizadas por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (135), con el objetivo de establecer los parámetros de medición del diámetro de la zona de inhibición (Sensible, Intermedio, Resistente) con respecto a los antimicrobianos utilizados en las 20 cepas seleccionadas para el estudio. Hay que tener presente que estos parámetros se establecieron a nivel general para los *Streptococcus spp.* del grupo *viridans*. A continuación se muestran los antimicrobianos usados para la estandarización de la prueba con sus respectivos halos de inhibición.

Agente antimicrobiano	Contenido del disco	Diámetro de la zona (mm)		
		S	I	R
Penicilina	-*	-	-	-
Vancomicina	30µg	≥17	-	-
Eritromicina	15µg	≥21	16-20	≤15
Tetraciclina	30µg	≥23	19-22	≤18
Azitromicina	15 µg	≥18	14-17	≤13
Clindamicina	2µg	≥19	16-18	≤15

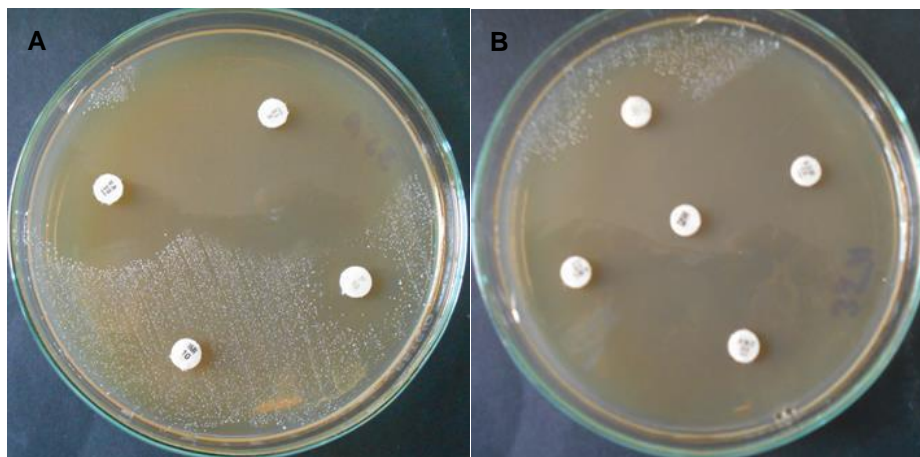


\*Datos no registrados

Tabla 13-1 Interpretación de la zona de inhibición según el CLSI

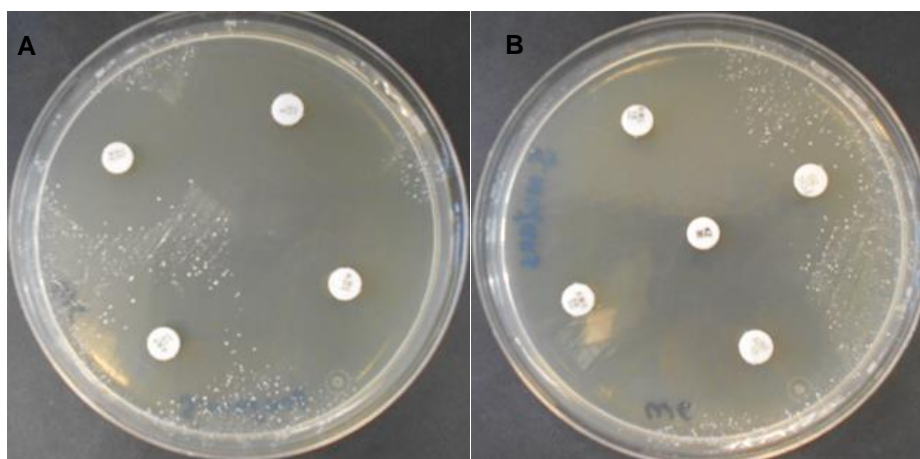
Fuente: (135)

Los antimicrobianos restantes (Amoxicilina, Cefazolin, Imipenem, Amoxicilina + A. clavulánico, Cefazolin y Ciprofloxacina) no fueron incluidos en la determinación del efecto antimicrobiano por el CLSI.



Fotografía 13-11 Antibiograma realizado en cepas de *S. mutans*

Como se observa en la Fotografía 13-11, se presentan los halos de inhibición generados por los sensibilizadores a una cepa de *S. mutans* aislada a partir de las muestras de saliva. En la mayoría presenta halos >30 mm de diámetro, excepto en Imipenem y Penicilina, fenómeno ocurrido en casi todas las 20 cepas evaluadas, véase ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..



Fotografía 13-12 Antibiograma realizado en *S. mutans* ATCC 25175

Con el fin de comparar los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana de las 20 cepas de *S. mutans* evaluadas, se realizó antibiograma a la cepa de referencia *S. mutans* ATCC 25175, como se ilustra en la Fotografía 13-12. De acuerdo a esto, se presentó una sensibilidad a casi todos los

**RECuento E IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus mutans* DE SALIVA EN NIÑOS CON CARIES DENTAL: SEGUIMIENTO A 3 Y 6 MESES DESPUÉS DE UN PROCESO EDUCATIVO**



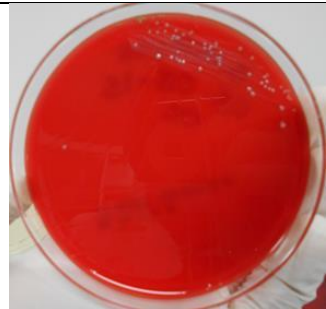



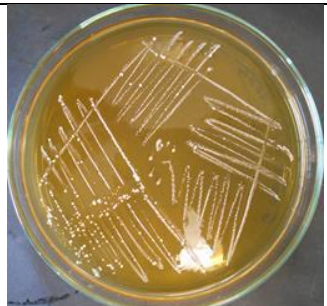



antimicrobianos evaluados, a excepción del Imipenem con un resultado de 18 mm, lo que lo cataloga como intermedio según los puntos de corte, véase en resultados – sección: Perfil de resistencia a los antimicrobianos.

Por otro lado, el CLSI no evaluó la mayoría de los antimicrobianos incluidos en el estudio para la prueba de difusión en disco. La estandarización de la prueba se determinó para los *Streptococcus* del grupo *viridans* que incluye seis grupos: *sanguis*, *mitis*, *mutans*, *salivarius*, *anginosus*, *bovis*.

**Registro fotográfico de aislamientos:**

En la Tabla 13-2 se observan los registros fotográficos de los aislamientos tanto clínicos como de las siembras de las cepas de referencia en los tres medios de cultivo utilizados: Agar Mitis Salivarius, Agar BHI y, Agar Trypticasa de Soya con sangre de cordero al 5%.

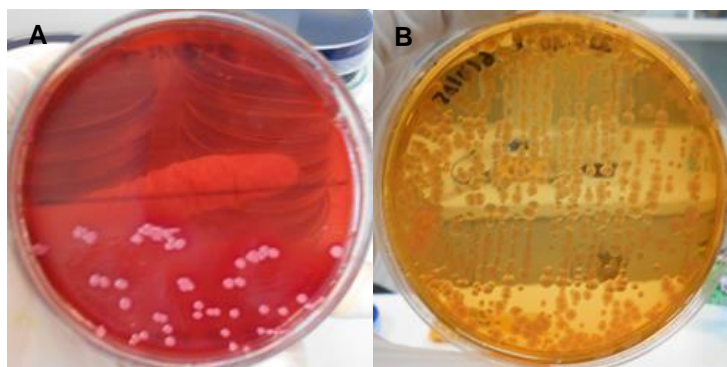
<b>Aislamientos clínicos</b>		
		
<i>S. mutans</i> aislado de muestras de saliva en Agar Mitis Salivarius suplementado con sacarosa al 20% y bacitracina 0.2U/ml	<i>S. mutans</i> sembrado en Agar BHI para la prueba de Antagonismo bacteriano	<i>S. mutans</i> sembrado en Agar Trypticasa de Soya (TSA), suplementado con 5% de sangre de cordero
<b>Cepas de referencia</b>		
		
<i>S. uberis</i> sembrado en Agar BHI	<i>Lactobacillus acidophilus</i> sembrado en Agar BHI	<i>S. salivarius</i> sembrado en Agar BHI
		

<i>S. mutans</i> sembrado en Agar BHI	<i>Lactobacillus casei</i> sembrado en Agar BHI
---------------------------------------	---

Tabla 13-2 Registro fotográfico de aislamientos

**Crecimiento en Agar MacConkey:**

En la sección de materiales - *Procesamiento de la muestra* -, se describe al final la siembra de la dilución  $10^{-5}$  de cada una de las muestras en Agar MacConkey, con objeto de recuperar posibles bacterias gram negativas fermentadoras de lactosa.



Fotografía 13-13 Agar MacConkey con bacterias Lac+ (A) y Lac- (B)

Como se ilustra en la Fotografía 13-13, a partir del cultivo de todas las muestras se evidenció colonias fermentadoras de lactosa, parte A, y colonias que no fermentan la lactosa, parte B.

ANEXO 2

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE LOS AUTORES  
(Licencia de uso)

Bogotá, D.C., Jueves, 11 de Junio de 2015

Señores  
Biblioteca Alfonso Borrero Cabal S.J.  
Pontificia Universidad Javeriana