



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Especialidad en Odontopediatría

Desarrollo y evaluación de una técnica para la toma de muestra,
crecimiento y cuantificación de unidades formadoras de colonias cariogénicas
de superficies oclusales en niños de 6 a 9 años

Opción de titulación
Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Diploma de
Especialidad en Odontopediatría

Presenta:
Alicia Díaz Magdaleno

Dirigido por:
C.D.E.O. Mauricio López Jiménez

C.D.E.O. Mauricio López Jiménez
Presidente

D. En C. Rubén Abraham Domínguez Pérez
Secretario


C.D.E.O. Héctor Mancilla Herrera
Vocal

C.D.E.O. Laura Celeste Herrera Alaniz
Suplente


L.O.E.O. Cynthia Castro Martínez
Suplente




Dra. Ma. Guadalupe Zaldivar Lelo de Larrea
Director de la Facultad




Firma



Firma



Firma



Firma



Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
11 de Abril de 2019

RESUMEN

De las enfermedades infecciosas que afectan a los seres humanos, la caries dental es probablemente la más prevalente, descrita como un proceso dinámico de desmineralización y remineralización, producto del metabolismo bacteriano sobre la superficie dentaria, que con el tiempo puede producir una pérdida de minerales y resultará en la presencia de una cavidad. El principal microorganismo asociado a la producción de caries es *Streptococcus mutans* (*S. mutans*); identificarlo y cuantificarlo directamente de la placa dentobacteriana es fundamental, surgiendo la necesidad de aumentar la selectividad en los medios de cultivo y de optimizar los procesos microbiológicos para aislarlo y cuantificarlo. Esta investigación tiene por objetivo principal desarrollar y evaluar una técnica para la aislación, identificación y recuento de *S. mutans*, mediante el uso del agar tripticasa de soya, extracto de levadura con sacarosa al 20% y bacitracina (TYS20B). Se llevó a cabo un estudio experimental in vitro. Para la evaluación de la técnica se obtuvieron 112 impresiones de las superficies oclusales de 18 niños que fueron agrupados en dos, un grupo de 8 niños para desarrollar la técnica (grupo experimental), y otro grupo de 10 niños a quienes se tomó una muestra inicial y otra muestra inmediatamente después realizar una técnica de cepillado para evaluar la técnica (grupo evaluado). Las muestras fueron tomadas con cucharillas individualizadas con agar TYS20B, las cuales se incubaron en una jarra de anaerobiosis en el laboratorio de Investigación de Licenciatura y Posgrados de Odontología de la Universidad Autónoma de Querétaro. Se identificaron y cuantificaron las colonias bacterianas directamente de las muestras tomadas bajo microscopía directa, se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para comprobar la presencia de *S. mutans*. La técnica de impresión con agar TYS20B logró aislar y recuperar diversas morfologías de colonias de *S. mutans* a partir de placa dentobacteriana de la superficie oclusal de molares deciduos y permanentes. Con la técnica de impresión con agar TYS20B puede observarse la localización de las colonias bacterianas y el tipo de colonia de *S. mutans* directamente sobre una copia en negativo de la superficie oclusal. El agar TYS20B es fácil de elaborar, sin embargo es necesario respetar las cantidades de los componentes y no ejercer presión excesiva al tomar la muestra para que no se desgarre al agar.

Palabras clave: toma de muestra, impresión, agar TYS20B, aislamiento, cuantificación, *S. mutans*.

SUMMARY

Of the infectious diseases that affect humans, dental caries is probably the most prevalent, described as a dynamic process of demineralization and remineralization, product of bacterial metabolism on the tooth surface, which over time can cause a loss of minerals and will result in the presence of a cavity. The main microorganism associated with the production of caries is *Streptococcus mutans* (*S. mutans*); identifying and quantifying it directly from the dental plaque is fundamental, arising the need to increase the selectivity in culture media and to optimize microbiological processes to isolate and quantify it. The main objective of this research is to develop and evaluate a technique for isolating, identifying and counting *S. mutans*, using trypticase soy agar, yeast extract with 20% sucrose and bacitracin (TYS20B). An in vitro experimental study was carried out. For the evaluation of the technique, 112 impressions were obtained of the occlusal surfaces of 18 children who were grouped in two, a group of 8 children to develop the technique (experimental group), and another group of 10 children to whom an initial sample was taken, and another sample immediately after performing a brushing technique to evaluate the technique (group evaluated). The samples were taken with individual teaspoons with TYS20B agar, which were incubated in an anaerobic jar in the Research Laboratory of Graduate and Postgraduate Dentistry of the Autonomous University of Querétaro. The bacterial colonies were identified and quantified directly from the samples taken under direct microscopy, the polymerase chain reaction (PCR) was carried out to check for the presence of *S. mutans*. The technique of printing with agar TYS20B was able to isolate and recover various morphologies of colonies of *S. mutans* from dental plaque of the occlusal surface of deciduous and permanent molars. With the TYS20B agar printing technique, the location of the bacterial colonies and the type of *S. mutans* colony can be observed directly on a negative copy of the occlusal surface. The TYS20B agar is easy to process, however it is necessary to respect the quantities of the components and not exert excessive pressure when taking the sample so that it does not tear the agar.

Keywords: sample, printing, TYS20B agar, isolation, quantification, *S. mutans*.

A Gustavo, que ha demostrado su amor y apoyo incondicional hacia mis metas y proyectos sin escatimar en esfuerzo para lograr cada uno de ellos.

A mis papás y mi hermana, que no me permiten olvidar que los objetivos se alcanzan con decisión y perseverancia, y que la vida es cuestión de actitud, gracias a ustedes he llegado hasta este punto.

A mis sobrinos, Emmanuel y Eduardo, que son la alegría de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante el periodo de Enero 2017 a Diciembre 2018 con número de registro 822414 para la realización de este proyecto.

Agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro por darme la oportunidad de formar parte de su grupo estudiantil, al Posgrado de Odontopediatría por ser sede de este proyecto y mi casa de estudios de posgrado, a los coordinadores, a todos mis maestros por ser parte de mi formación tanto académica como personal, por su enseñanza y entrega; y a todas las personas que laboran en la clínica y en la institución por recorrer conmigo el camino durante dos años.

Al Dr. Mauricio López Jimenez por creer en mí desde un inicio, por su paciencia, enseñanza, y apoyo en momentos difíciles, por su valiosa amistad.

Al Dr. Héctor Mancilla Herrera por impulsarme con el ejemplo a salir de mi zona de confort, a ser una profesionista innovadora y experimental, por cada enseñanza personal y de la Odontopediatría.

Al Dr. Rubén Abraham Domínguez Pérez por su apoyo y paciencia durante la realización de la tesis, por guiarme desde el inicio, hasta el término de esta.

A la Dra. Claudia Verónica Cabeza Cabrera, por conducirme en la convivencia con los niños, y demostrarme el frágil tesoro que son y la responsabilidad que asumimos las personas que tratamos con ellos.

A mis compañeros: Edgar, Óscar, Ale, Dianita, Pau, Mile, Gaby, Kenya y Moni, por experimentar esta aventura a mi lado, por superar todas las diferencias entre nosotros al grado de fortalecer nuestra amistad, y por su apoyo, positivismo y hermandad.

Al comité de tesis, que aportó su tiempo, conocimiento y experiencia en la elaboración de esta tesis.

A mis pacientes, por enseñarme a ser tolerante, paciente, empática y comprensiva con los pequeños, y a entender los sentimientos y pensamientos más puros e inocentes de los seres humanos. Gracias por enseñarme la magia y el poder que pueden tener las palabras sobre una persona. Gracias a ustedes soy Odontopediatra.

Tabla de contenidos

| | |
|-------------------------------------|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | |
| 1.1 Revisión de la literatura..... | 9 |
| 1.2 Planteamiento del Problema..... | 25 |
| 2. OBJETIVOS | |
| 2.1 Objetivo general..... | 27 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 27 |
| 3. METODOLOGIA | |
| 3.1 Sujeto experimental..... | 29 |
| 3.2 Métodos..... | 29 |
| 3.3 Análisis estadístico..... | 41 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | |
| 4.1 Resultados | 44 |
| 4.2 Discusión..... | 50 |
| 4.3 Conclusión..... | 56 |
| 5. REFERENCIAS | 57 |
| 6. APENDICE | 64 |

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Métodos de recuento del número de bacterias. | 14 |
| Tabla 2. Conteo de UFC en escala logarítmica. | 18 |
| Tabla 3. Pruebas diagnósticas para el aislamiento, conteo y tipificación de <i>S. Mutans</i> | 20 |

RESULTADOS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Cantidad de UFC por paciente y cuadrante del grupo experimental. | 44 |
| Tabla 2. Cantidad de UFC por pieza dental del grupo experimental. . | 45 |
| Tabla 3. Características clínicas de los pacientes del grupo evaluado, higiene bucal y tiempo posterior a la exposición a 22600 ppm de Flúor. | 47 |
| Tabla 4. Cantidad de UFC por paciente y cuadrante del grupo evaluado. | 48 |
| Tabla 5. Cantidad de UFC por pieza dental del grupo evaluado. | 49 |

ANEXOS

| | |
|---|----|
| Anexo 1. Características clínicas de los pacientes del grupo experimental. | 65 |
| Anexo 2. Higiene bucal de los pacientes y tiempo posterior a la exposición a 22600 ppm de Flúor de grupo experimental. ... | 66 |
| Anexo 3. Diagnósticos de caries en sistema ICDAS del grupo experimental. | 67 |
| Anexo 4. Diagnósticos de caries en sistema ICDAS de los pacientes del grupo evaluado. | 68 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1 REVISIÓN DE LA LITERATURA

De las enfermedades infecciosas que afectan a los seres humanos, la caries dental es probablemente la más prevalente. Se describe la caries dental como un proceso dinámico de desmineralización y remineralización, producto del metabolismo bacteriano sobre la superficie dentaria, que con el tiempo puede producir una pérdida neta de minerales y posiblemente, aunque no siempre, resultará en la presencia de una cavidad. 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* (*S. mutans*) es el agente más importante asociado a ella. La caries y la periodontitis son causadas por un desequilibrio en las poblaciones bacterianas de biopelículas que se forman naturalmente y ayudan a mantener el estado normal de la cavidad oral (Escribano et al., 2005).

La complejidad de la enfermedad que conocemos como caries se debe a los múltiples factores que están asociados con la evolución de una población bacteriana que pasa de una biopelícula saludable a otra patológica. Una biopelícula sana puede estar formada por más de 700 especies bacterianas, de las cuales menos del 1% son bacterias potencialmente patogénicas; una biopelícula saludable actúa como defensa de primera línea para ayudar a proteger la boca de infecciones por bacterias patogénicas u otros patógenos. Cambios en el medio dentro de la biopelícula hacen que se favorezca la proliferación de especies patogénicas acidúricas y acidogénicas y tomen posesión de la misma (Milicich, 2008).

Ecológicamente, la caries dental es producto de un desequilibrio en el ecosistema oral que lleva al predominio de una flora antes considerada normal en la cavidad oral y ahora convertida en patógena (Acosta et al., 2006; De La Higuera et al., 1999). Como es conocido, la caries dental es un proceso patológico infeccioso, multifactorial, localizado, posteruptivo y transmisible que destruye los tejidos duros dentales (Gamboa, 2015). Los principales microorganismos asociados a la producción de caries son, en orden de frecuencia: a) *Streptococcus mutans* (principalmente el serotipo c) y en menor proporción *Streptococcus sobrinus* (*S.*

sobrinus) y *Streptococcus gordonii*; y b) especies de *Lactobacillus* y *Actinomyces* (Crossner et al., 1989; De La Higuera et al., 1999; Acosta et al., 2006).

La superficie dental es un hábitat natural indispensable para *S. mutans* y el tropismo por la biopelícula dental se refleja por su adaptación a sintetizar glucanos, fijar compuestos y a adaptar su aciduricidad (Cvitkovitch et al., 2003; Nadell et al., 2008; Nazar, 2009). *S. mutans* produce ácidos láctico, propiónico, acético y fórmico cuando metaboliza carbohidratos fermentables como la sacarosa, glucosa y fructosa. Estos ácidos circulan a través de la placa dental hacia el esmalte poroso, disociándose y liberando hidrogeniones, los cuales disuelven rápidamente el mineral del esmalte, generando calcio y fosfato, los cuales, a su vez, difunden fuera del esmalte. Este proceso se conoce como desmineralización (Hung et al., 2005; Rojas, 2008).

Flora microbiana oral

La microflora oral es un complejo ecosistema que contiene una amplia variedad de especies microbianas. La boca es colonizada por varios microorganismos antes de la erupción de los dientes, sin embargo, con la erupción de los dientes, la placa dental se desarrolla en las superficies dentales expuestas las cuales están cubiertas por una película amorfa, casi invisible compuesta principalmente por glicoproteínas salivales. De no tomarse medidas de higiene oral, las superficies de los dientes acumulan grandes masas microbianas, mientras que la descamación de células epiteliales no permite la acumulación en las superficies de la mucosa oral. El número de bacterias en placa dental puede alcanzar 10^8 por mg (peso húmedo). La cavidad oral es un ecosistema donde cohabitan principalmente comensales (aproximadamente 10^{10} bacterias, siendo el 60% cultivables) pertenecientes entre 500 y 700 especies, que colonizan las mucosas y dientes donde forman la placa bacteriana o biofilm, entre las cuales están los miembros del género *Streptococcus* (Hamada y Slade, 1980).

Observaciones clínicas en humanos y animales indican que la formación de placa es un requisito esencial tanto para la caries como para la enfermedad periodontal.

Se ha descrito un viraje en la población microbiana en la placa en desarrollo de preponderantes formas cocáceas en la placa temprana con un incremento de bacilos y formas filamentosas. Sin embargo los estreptococos conforman el mayor número del total de la población bacteriana en la placa dental. Muchos de los estreptococos pueden ser identificados como una de las siguientes especies: *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. mitior*, *S. salivarius*, y *S. milleri*. Parece que ciertas especies estreptocócicas orales tienen predilección por colonizar sitios particulares de la boca. *S. sanguis* y *S. mutans* preferiblemente colonizan las superficies de dientes y aparatos prostéticos. *S. salivarius* está presente en bajo número en placa y es un colonizador primario de la boca después del nacimiento, *S. mitior* no tiene un sitio preferido en cavidad oral, *S. sanguis* usualmente no se encuentra sino hasta la erupción de los dientes. Los estreptococos del grupo mutans han sido estudiados usando pruebas bioquímicas, serológicas y moleculares que incluyen hibridación ADN-ADN (ácido desoxirribonucleico) y secuenciación de genes ARN (ácido ribonucleico) ribosomales. Las especies bacterianas más importantes de la microbiota oral en el humano son *S. mutans* y *S. 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 (Linossier y Valenzuela, 2011).

Caracterización microbiológica del *S. mutans*

En general, en la comunidad científica hay consenso en señalar al *S. mutans* como el microorganismo más importante en la caries dental. Por lo tanto, las estrategias de aislamiento, identificación, tipificación, prevención y control están dirigidas hacia este. El *S. mutans* es un coco grampositivo que 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 (Sattely et al., 2008). En cultivos de agar sangre, las colonias de este microorganismo se diferencian fácilmente: altas,

convexas, pulvinadas (en forma de cojín) y mucoides, de 0,5 a 1 mm de diámetro, y opacas con un aspecto que recuerda al vidrio esmerilado (Sattely et al., 2008).

El *S. mutans* se encuentra de forma permanente en la cavidad oral después de la erupción dental, debido a que requiere la presencia de tejido duro no descamativo para colonizar (Sattely et al., 2008). La principal fuente para la adquisición y transmisión del *S. mutans* en los niños es la saliva de sus madres. La evidencia al respecto proviene de diferentes estudios que han mostrado un patrón idéntico de ADN cromosomal en las bacterias de los niños y sus madres. La colonización de esta bacteria ocurre a los 26 meses de edad, periodo que ha sido denominado ventana de infectividad (Lang et al., 1987; Beighton et al., 1989)

Por todo lo anterior, es importante recordar que el *S. mutans* es un microorganismo que forma parte de la flora oral microbiana, por lo que se puede encontrar tanto en pacientes sin caries como en pacientes con caries (Loesche, 1986; Gamboa, 2015). Actualmente, los estudios no solo se dirigen hacia la búsqueda del *S. mutans* en la saliva y la placa dental, sino también hacia la cuantificación de este microorganismo (Loesche, 1986; Gamboa, 2015). Diferentes estudios han mostrado una correlación entre los recuentos de este microorganismo en la cavidad oral con la prevalencia e incidencia de la caries (Loesche, 1986; Gamboa, 2015). No obstante, en otros estudios no se ha hallado correlación entre la cantidad de *S. mutans* y la incidencia de caries (Beighton et al., 1989).

Aislamiento, recuento e identificación del *S. mutans* a partir de muestras de placa dental y saliva

Actualmente, el hallazgo de un recuento alto de *S. mutans* es un factor de riesgo para tener en cuenta en la prevención y control de la caries dental. Esta bacteria es anaeróbica facultativa, es decir, que puede utilizar el oxígeno para su crecimiento; pero si este no está presente también puede sobrevivir. Sin embargo, su crecimiento óptimo ocurre en anaerobiosis ($H_2:CO_2:N_2$; 10:10:80, durante 48-72 horas a 37°C). De forma concomitante con la síntesis de dextrano a partir de la sacarosa, las colonias de este microorganismo emiten un exudado acuoso en la superficie del

medio de cultivo, a menudo lo suficientemente abundante como para que forme un charco en torno a la colonia (Sattely et al., 2008). En medios de cultivo con sacarosa este microorganismo está en capacidad de producir polisacáridos extracelulares y adquirir una apariencia opaca, rugosa y blanca, no adherente al medio de cultivo y ocasionalmente rodeada por polímeros de glucano de aspecto húmedo. Estos estreptococos no hidrolizan el almidón y fermentan la inulina, la rafinosa, el manitol y el sorbitol (Sattely et al., 2008). El *S. mutans* produce polisacáridos extracelulares a partir de la sacarosa por la acción de dos enzimas: la glucosiltransferasa (GTF) y la fructosiltransferasa (FTF). La GTF sintetiza glucano a partir de la glucosa, y la FTF, fructano a partir de la fructosa. El medio más común para el aislamiento de *S. mutans* es el agar mitis salivarius suplementado con bacitracina 0,2 U/ml y sacarosa al 20%, que permite la selección de otros estreptococos (Sattely et al., 2008).

Con el fin de iniciar el aislamiento de *S. mutans*, las muestras de placa dentobacteriana y saliva espontánea o estimulada se diluyen en forma seriada de 10 en 10 en tubos que contienen tampón fosfato salino 0,05 M. Después de mezclar las muestras con el tampón fosfato salino 0,05 M en vórtice durante 30 segundos, se toman 100 µl de cada dilución y se siembran en agar mitis salivarius bacitracina (MSB), con el fin de hacer el aislamiento selectivo y el recuento de *S. mutans*. El agar MSB (Difco Laboratories, Detroit, MI) contiene caseína pancreática digerida, peptona proteosa n.º 3, dextrosa, sacarosa al 20%, fosfato dipotásico, azul tripán, cristal azul, agar, telurito de Chapman y bacitracina 0,2 U/ml. Las cajas de Petri con agar MSB se incuban en anaerobiosis (H₂:CO₂:N₂ 10:10:80) durante 2 días a 37 °C. Después del crecimiento se hace el recuento de colonias con morfología característica de *S. mutans*, y se hace el cálculo respectivo con el factor de dilución de la caja donde crecen. El recuento final se expresa en unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro de saliva o gramo de placa dental (Gamboa et al., 2004).

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); utilizadas generalmente en la industria alimentaria (Loyola et al., 2007a). A continuación se encontrarán los principales métodos de recuento del número de bacterias en una muestra utilizados (Tabla 1).

Tabla 1. Métodos de recuento del número de bacterias.

| Método | Tipo de medición | Descripción |
|---|-------------------------|---|
| 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 μ). 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 | Indirecta | 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. Estimación en Unidades Formadoras de Colonias, UFC. Existen dos técnicas. |
| Recuento en placa por siembra en profundidad | Indirecta | 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

Indirecta

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.

Fuente: 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

Después del recuento bacteriano, se examinan de 5 a 20 colonias en promedio con características de *S. mutans* con la tinción de Gram y se someten a las siguientes pruebas bioquímicas: fermentación de rafinosa, manitol, melobiosa, trehalosa e inulina; hidrólisis de la esculina en presencia y ausencia de bilis; ureasa; hidrólisis de la arginina, y resistencia a la bacitracina. El *S. mutans* posee el siguiente perfil bioquímico: fermentación positiva de rafinosa, manitol, melobiosa, trehalosa e inulina; hidrólisis negativa de la esculina en la presencia de bilis e hidrólisis positiva de la esculina en ausencia de bilis; ureasa negativa; hidrólisis negativa de la arginina, y resistencia a 2 U de bacitracina (De La Higuera et al., 1999; Gamboa et al., 2004).

Medios de cultivo selectivos para *S. mutans*

En general hay muchas dificultades técnicas para obtener muestras representativas de diferentes sitios orales y para aislar, cultivar y contar los microorganismos. No existe un solo método de cultivo para examinar la variable y compleja placa dental que satisfaga todas las condiciones necesarias. En algunos casos se requieren procedimientos estrictamente anaeróbicos. Afortunadamente, muchas de las especies de estreptococos orales pueden aislarse de varios sitios usando medios selectivos como el Agar Mitis Salivarius (MS). Aunque el Agar MS fue originalmente desarrollado para aislar estreptococos fecales, su uso ha predominado sobre otros medios de cultivo para el aislamiento de estreptococos orales, incluyendo *S.*

mutans. En el agar MS, muchos estreptococos orales muestran una morfología característica de las colonias (blanquecinas, de bordes definidos, colonias firmes muy adherentes al medio de cultivo) lo cual permite su diferenciación inicial. Usualmente, la placa de agar se cultiva en una atmosfera del 95% de nitrógeno y 5% de dióxido de carbono a 37°C por 1 o 2 días seguida de una incubación en aire por 1 o 2 días. Además de la morfología característica de las colonias, los estreptococos orales pueden diferenciarse por su habilidad para fermentar ciertos azúcares (especialmente manitol y sorbitol) y por adherirse a superficies lisas en presencia de sacarosa. 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. Actualmente hay 5 medios de cultivo diferentes para el aislamiento de *S. mutans*. Estos son: Agar Mitis salivarius con bacitracina (MSB), Agar Mitis Salivarius con bacitracina y kanamicina (MSKB) Agar glucosa-sacarosa-telurito bacitracina (GSTB) Agar Tripticasa de soya extracto de levadura con sacarosa y bacitracina (TYS20B) y Agar triptona extracto de levadura cisteína con sacarosa y bacitracina (TYCSB). El agar MS es el medio más ampliamente usado para aislar *S. mutans* y otras especies orales de estreptococos. El agar MS ha sido modificado para ser más selectivo en el aislamiento de *S. mutans* adicionando tanto con sulfonamida (Agar MC), bacitracina (Agar MSB), polimixina o aun sacarosa (MS40S). Los métodos de recuento de colonias permiten determinar el grado de colonización producida por *S. mutans* según las edades, siendo de gran utilidad para identificar la población de alto riesgo de caries dentales y su aplicación permitiría desarrollar programas de prevención en salud oral en poblaciones específicas y vulnerables (Sabbaj et al., 1971; Linke, 1977; Jensen y Bratthall, 1989; Weinberger y Wright, 1990; Od et al., 2005; Hildebrandt y Bretz, 2006).

El medio TYS20B ha mostrado una mayor recuperación de *S. mutans* en comparación al medio BHI, que por su aporte de nutrientes es utilizado para el cultivo de una amplia variedad de microorganismos exigentes, tanto aerobios como anaerobios facultativos (Vandevenne, 2002). Este último se viene utilizando en el laboratorio de rutina para la reactivación y recuperación del *S. mutans* (Guatibonza,

1999; Medina et al., 2005). La óptima recuperación que mostró el medio TYS20B se podría deber al aporte de nutrientes obtenidos del caldo tripticasa soya y del extracto de levadura, componentes utilizados para el crecimiento y recuperación de microorganismos exigentes (Vandevenne, 2002), y del 20% de sucrosa. Es importante resaltar como ventaja la selectividad que tiene este medio comparado con BHI por la adición de bacitracina (Schaecken et al., 1986; Isaza et al., 1992) y la presencia de sacarosa que interfiere con el crecimiento de otros microorganismos, sin embargo, esta última característica hace necesario tomar precauciones en el manejo de su concentración debido a que altas concentraciones de sacarosa interfieren con la glicólisis del *S. mutans* (Iwami et al., 1995). El medio de cultivo MSA ocupó el tercer lugar en recuperación, esto podría justificarse a que en su composición presenta Azul de tripan y Cristal violeta, los cuales inhiben otros microorganismos contaminantes a las concentraciones utilizadas, aunque se ha reportado que dichos componentes pueden afectar el crecimiento del *S. mutans*, particularmente del serotipo a (Jensen y Bratthall, 1989a). El medio TH que es un medio de cultivo empleado para la recuperación de *Streptococcus B-hemolíticos* (Facklam, 1980) presentó un menor porcentaje de recuperación (Tabla 2). En el medio MS-MUT se obtuvo una mejor recuperación de *S. mutans* que en el medio MSB del cual se derivó y del que se diferencia por presentar la adición sulfisoxazol y el aumento en la concentración de bacitracina, en este medio aunque se presentó una mayor concentración de antimicrobianos no se afectó el crecimiento del microorganismo; el tercer elemento que se modificó en el MS-MUT fue la sucrosa disminuyendo su concentración con respecto al MSB, la cual se ha reportado en la literatura científica que interfiere con el crecimiento de algunos microorganismos, incluyendo el mismo *S. mutans* (Schaecken et al., 1986; Wade et al., 1986; Iwami et al., 1995). El medio de cultivo que presentó la menor recuperación del microorganismo fue el MSKB, medio modificado del MSB con adición de kanamicina y sorbitol al 7%, mostrando que a altas concentraciones de este reducen la recuperación de *S. mutans* (Kimmel y Tinanoff, 1991). Un aspecto que se debe tener en cuenta al utilizar este medio es el pH, porque según Rogers (1986), el sorbitol puede ser metabolizado a un pH de 7.0, pero no a pH de 5.5. Aunque la baja

recuperación del microorganismo coincide con los resultados obtenidos por Wan et al. (2002), se recomienda en futuras investigaciones relacionar este parámetro.

Tabla 2. Conteo de UFC en escala logarítmica.

| Medio de Cultivo | Conteo de UFC |
|-------------------------|----------------------|
| TYS20B | 8.72 |
| BHI | 8.39 |
| MSA | 8.01 |
| TH | 7.57 |
| MS-MUT | 6.89 |
| MSB | 6.47 |
| MSKB | 5.90 |

Fuente: Medina, R., Moreno, L. C., Velasco, M. C., & Gutiérrez, S. J. (2016). Estudio comparativo de medios de cultivo para crecimiento y recuperación del *Streptococcus mutans* ATCC 25175 "in vitro".

En el estudio realizado por Medina (2005), el medio de cultivo que presentó un mayor crecimiento in vitro del *S. mutans* ATCC 25175 fue el TYS20B, mostrándose como el medio adecuado para la recuperación del microorganismo. Adicionalmente, presenta otras ventajas como son: fácil de elaborar y económico, este resultado coincide con el obtenido en otros estudios para recuperación de *S. mutans* (Schaeken et al., 1986; Wan et al., 2002). En el estudio de Hirasawa y Takada (2003), se muestra que la adición de sulfisoxazol no interfiere en el crecimiento del *S. mutans* y contribuye con la selectividad de este con respecto a microorganismos como el *S. sobrinus*, colonizador de sitios ya cariados, detectado en muestras clínicas en el medio MSB (Svanberg y Krasse, 1990), hallazgo que se correlaciona con el obtenido en otros estudios (Rogers, 1986; Wan et al., 2002); en el cual la adición de sulfisoxazol y la reducción de sucrosa permitieron una mayor recuperación de *S. mutans* en MS-MUT con respecto al MSB. Se propone para futuros trabajos con muestras clínicas adicionar 0.02% sulfisoxazol al medio

TYS20B. Los medios de cultivo que presentaron bajas proporciones de crecimiento del microorganismo no se pueden descartar en futuros trabajos, debido a que en muestras clínicas pueden ser más selectivos que los medios que mostraron mayor recuperación in vitro. Finalmente, es importante anotar que estudios realizados por diversas instituciones en Colombia que involucran aislamientos de *S. mutans* (Morales, 1982; Gonzáles, 1990; Peña, 1995; Delgado et al., 1999; Garzón et al., 2001; Martínez et al., 2001), en general, no utilizan medios de cultivo selectivos para este microorganismo, aumentando así el riesgo de contaminación por flora acompañante y por consiguiente generando posibles falsos positivos; haciéndose necesario crear un consenso para la recuperación de este importante patógeno causal en el estudio de la caries.

Morfología y características en cultivo de *S. mutans*

S. 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 pH 4.2 en, aproximadamente, 24 horas. Fermentador de glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina con la producción de ácido. Normalmente no desamina la arginina para producir amoníaco. Usualmente no producen ni 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. *S. mutans* se ha subclasificado en varios tipos con base en las propiedades inmunológicas, biológicas y genéticas: los serotipos de *S. mutans* son c, e, f y k. El hábitat natural de *S. mutans* es la boca humana. En cavidad oral, las colonias se adhieren muy cerca de la superficie del diente e igualmente se puede recuperar en lesiones cariosas. Puede aislarse frecuentemente de heces en humanos y ratas. Aunque *S. mutans* no se distribuye ampliamente en animales salvajes, se ha aislado en monos, murciélagos, ratas salvajes habitantes de campos de cultivo de caña de azúcar y de monos Rhesus. Igualmente, se ha aislado en ratas y hámsteres de experimentación (Hamada y Slade, 1980).

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 (Tabla 3) (Ojeda et al., 2013).

Tabla 3. Pruebas diagnósticas para el aislamiento, conteo y tipificación de *S. Mutans*.

| Técnica | Descripción |
|-----------------------------|---|
| Microscopía directa | Morfología tradicional que permite clasificarlos como estreptococos Gram positivos. La principal es que sólo es posible establecer morfotipos y no género ni especies bacterianas. |
| Inmunoensayos | 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. |
| Técnicas moleculares | 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. |

Fuente: Ojeda-Garcés JC, Oviedo-García E, Salas LA. Streptococcus mutans and dental caries. (English). CES Odontología 2013 01;26(1):44-56.

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 (Ojeda et al., 2013).

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 (Sattely et al., 2008); sin embargo, otros estudios no han encontrado correlación entre la cantidad de *S. mutans* y la incidencia de caries (Macpherson et al., 1992). 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 (Acosta et al., 2006).

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 (Ojeda et al., 2013). Se han descrito diversos métodos para cultivar y cuantificar a *S. mutans*, tanto en placa bacteriana como en saliva.

Linossier et al. (2003), 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 y Andréen (2012) 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).

Aunque actualmente existen muchos métodos diseñados para el recuento de microorganismos en cualquier espécimen, 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 (Ojeda et al., 2013). 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 (Loyola et al., 2007a, 2007b).

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 triptona extracto de levadura cisteína y bacitracina), GSTB (Agar glucosa-sacarosa-telurito bacitracina) (Medina et al., 2005).

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* (>10⁵ 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.* (10⁶ UFC/ml de saliva), se relaciona con elevada actividad de caries y con elevada ingestión de carbohidratos fermentables (Acosta et al., 2006; Coogan et al., 2008a). 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.

Métodos de aislamiento y recuento de *S. mutans* en muestras de placa bacteriana dental

Para monitorear *S. mutans* mediante muestra de placa bacteriana dental el método más utilizado con propósitos de investigación y seguimientos clínicos es el Método de Mondadientes, el cual consiste en recolectar placa bacteriana de piezas dentales o restauraciones utilizando un instrumento de madera afilado llamado "mondadientes". Las muestras obtenidas son transportadas al laboratorio en un medio de transporte, llamado RTF (Reduced Transport Fluid) (Herzberg y Meyer, 1998). Luego se realiza la técnica de diluciones. Las diluciones seleccionadas son sembradas en placas con medios selectivos para este microorganismo, TYCSB y MSB (Schaeken et al., 1986). Después de 48 horas de incubación a 37°C en jarra vela con 95% de N₂ y 5%CO₂. *S. mutans* fueron identificados de acuerdo a su típica morfología colonial, bajo lupa con aumento 10-20x (Emilson, 1983; Pienihäkkinen y Jokela, 1995).

Es un método simple, económico y viable de realizar en la consulta dental, pero el gran inconveniente es que produce una subestimación del microorganismo en las zonas retentivas, las cuales pueden no ser alcanzadas por el instrumento ya que debido a su forma y tamaño, la placa bacteriana de aquellas zonas no puede ser recolectada (Meiers y Schachtele, 1984; Pienihäkkinen y Jokela, 1995; Wennerholm et al., 1995). Otra de sus desventajas es la dificultad en la toma de muestra de placa dental pura (Wallman y Krasse, 1992) y al igual que el método de saliva requiere de un largo procesamiento en laboratorio y de conocimientos en microbiología para ser realizado.

Hoy en día han aparecido nuevas alternativas más exactas para la toma de muestra de placa bacteriana dental, como la publicada por Coogan et al. (2008b) basado en impresiones microbiológicas, utilizando como medio de cultivo agar MSB. El gran inconveniente de esta publicación es que aspectos de la metodología y de los

resultados no son explicados con la claridad necesaria para poder reproducirlo en su totalidad (Coogan et al., 2008b). Un estudio realizado por Zúñiga en el 2010, correlacionó la técnica descrita por Coogan con la técnica de monadientes; y la denominó técnica de cubeta, un método que permite la aislación y recuento de UFC de *S. mutans* de muestras obtenidas de placa dental sobre las superficies de piezas dentarias sanas y/o restauradas. Consiste en realizar una impresión directamente sobre las superficies oclusales, lo cual da una mayor exactitud del recuento de microorganismos cariogénicos, con el beneficio de no ser invasivo para el seguimiento de caries en lesiones que radiográficamente son de difícil diagnóstico y además puede utilizarse para monitorear restauraciones y lesiones de caries recurrente. Su principal ventaja, en comparación a técnicas como recuentos en saliva y la técnica de mondadientes utilizada como “gold standard”, radica en que sólo se necesita una toma directa de la muestra de placa dental sobre las superficies de restauraciones y/o dientes sanos de manera conservadora, además de requerir de un menor tiempo de procesamiento microbiológico, ya que elimina etapas como la dilución, siembra, y puede ser realizado por personal clínico sin conocimientos elevados en aspectos de laboratorio, aplicándose principalmente para objetivos de investigación y, además podría ser usado posteriormente para la clínica. Otra de sus ventajas es que al ser una impresión, permite la ubicación topográfica de las especies bacterianas, facilitando la aplicación de medidas preventivas ajustadas al riesgo individual de cada pieza dentaria. Consiste por lo demás en un método simple, de bajo costo y no invasivo para el paciente. Asimismo esta validado como método ya que posee una correlación positiva con el método del mondadientes y con el método de recuento de *S. mutans* en saliva (Zúñiga, 2010).

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los diversos métodos y técnicas que se ofrecen para el estudio y la determinación de las especies relacionadas con la caries dental, permiten seleccionarlas de acuerdo al objetivo del estudio que se desee realizar. Sin embargo existen tanto ventajas como limitaciones; y es necesario desarrollar y evaluar técnicas para aislar los microorganismos causantes de la caries, así como obtener la mejor información sobre éstos en beneficio de los pacientes y la comunidad. De ahí que sea necesario el conocimiento acerca del *S. mutans* y las técnicas usadas desde los albores de la microbiología hasta los procesos más recientes empleados en biología molecular para el aislamiento, clasificación y estudio de uno de los agentes asociados con el inicio y progreso de la caries dental.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y evaluar una técnica para la toma de muestra, crecimiento y cuantificación de unidades formadoras de colonias cariogénicas de superficies oclusales en niños de 6 a 9 años.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar la técnica desarrollada mediante la aplicación de la misma en un ensayo piloto comparativo de antes y después de una intervención.

Determinar si la técnica y el medio de cultivo utilizado permite una adecuada toma de muestra y crecimiento selectivo de *S. mutans* y *S. sobrinus* al identificarlos por medio de PCR en punto final.

3. METODOLOGÍA

3.1 SUJETO EXPERIMENTAL

Se llevó a cabo un estudio experimental *in vitro*. Para la evaluación de la técnica se obtuvieron 112 impresiones de las superficies oclusales de 18 niños que fueron agrupados en dos, un grupo de 8 niños para desarrollar la técnica (grupo experimental), y otro grupo de 10 niños a quienes se tomó una muestra inicial y otra muestra inmediatamente después realizar una técnica de cepillado para evaluar la técnica (grupo evaluado). Las muestras fueron tomadas con cucharillas individualizadas con agar TYS20B, las cuales se incubaron en una jarra de anaerobiosis en el laboratorio de Investigación de Licenciatura y Posgrados de Odontología de la Universidad Autónoma de Querétaro. Los criterios de inclusión para la fase de evaluación fueron pacientes de 6 a 9 años, con dentición mixta, con molares permanentes erupcionados con diagnóstico de ICDAS 0, 1 y 2. Se excluyeron los pacientes con primeros molares permanentes con diagnóstico de ICDAS 3, 4, 5 y 6, bajo antibioticoterapia, bajo tratamientos con fármacos que puedan alterar el flujo salival y/o contengan sacarosa, con infecciones orales y/o bajo tratamiento con colutorios antisépticos. Se eliminaron pacientes inmunosuprimidos, con enfermedades crónicas, o bien que no desearon participar en el estudio. Para la fase de laboratorio, se incluyeron colonias con morfología sugestiva de *S. mutans*, es decir: apariencia elevada, convexas, onduladas, con márgenes irregulares, superficie granular, con burbuja de color brillante; se excluyeron las colonias que no presentaron dicha morfología, y se eliminaron las muestras con ausencia de crecimiento de colonias bacterianas.

3.2 MÉTODOS

Selección de pacientes y firma de consentimiento informado

Se realizó la historia clínica y cariograma ICDAS correspondiente a la clínica de odontopediatría y se eligieron los pacientes de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión. Se invitó al padre o tutor a participar en la investigación, explicándole los objetivos, la justificación y los beneficios del estudio para su hijo y para la

población en general; si el padre o tutor y el paciente decidieron participar, se les proporcionó una carta de consentimiento informado y se les pidió que lo firmaran. Los datos fueron confidenciales y en todo momento se cumplió con los principios éticos propuestos en la declaración de Helsinki.

Los pacientes fueron divididos al azar en dos grupos, un grupo para desarrollar la técnica de 8 niños a los cuales se les tomó una muestra de cada cuadrante, y un grupo de 10 niños para evaluar la técnica, a los cuales se les tomó una muestra de cada cuadrante antes y después de realizar cepillado dental con técnica de Fones; a cada paciente se le proporcionó un cepillo dental (Colgate® Kids), y dentífrico (Colgate® Natural Extracts).

Preparación de cucharillas para impresión

Debido a la importancia de que el medio en el que se trabaje sea lo más estéril posible, para evitar cualquier contaminación cruzada, y el entorno lo más seguro posible para el operador; el uso de barreras de protección fueron necesarias en todo momento.

1. Se tomó impresión con alginato y cucharillas preformadas.
2. Se vaciaron las impresiones en yeso para ortodoncia.
3. Se recortaron excedentes de modelo de yeso.
4. Se agregaron 2 capas de cera rosa toda estación sobre las superficies oclusales de las cuatro hemiarquadas para simular el espacio que posteriormente ocupó el medio de cultivo (Fig. 1).

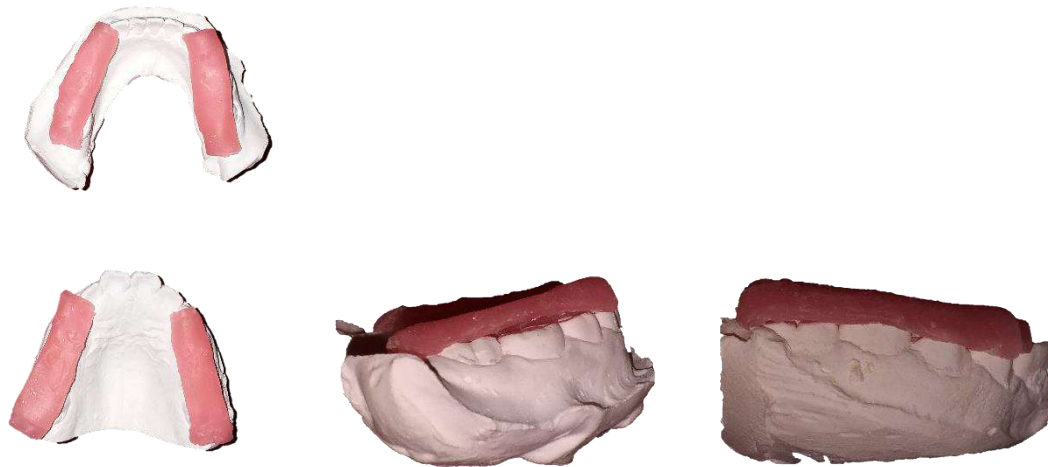


Fig. 1 Modelos de yeso con 2 capas de cera rosa.

5. Se mezclaron las porciones de silicón por condensación según indicaciones del fabricante y se colocó la porción en una cucharilla parcial.
6. Se colocó la cucharilla parcial con la porción de silicón por condensación sobre la cera rosa (cuidando que el material de impresión cubra completamente la cera y se adapte a la anatomía de la mucosa masticatoria del paciente en cada hemiarcada).
7. Se retiró el material de impresión una vez vulcanizado de la cucharilla parcial y se recortaron excedentes para que pudieran ser colocados los cuatro portaimpresiones obtenidos dentro de una caja de Petri (individual por paciente. Fig. 2). Para los pacientes del grupo que fue estudiado, se elaboraron dos juegos de portaimpresiones.



Fig. 2 Portaimpresiones recortados de un paciente.

8. Se esterilizaron los cuatro portaimpresiones de cada paciente dentro de una caja de Petri en autoclave a 121°C, 15 lbs de presión durante 15 minutos. Para los pacientes del grupo que fue evaluado se esterilizaron dos juegos de portaimpresiones, cada uno en su propia caja de Petri.

Preparación del medio de cultivo

1. Se pesaron 40g. del medio base (agar tripticasa soya Difco®) en una báscula.
2. Se pesaron 10g. de extracto de levadura (Difco®) en una báscula.
3. Se pesaron 150g. de sacarosa en una báscula.
4. Se colocó 1 litro de agua destilada en un matraz de Erlenmeyer y se depositó los 40g. de polvo de agar tripticada soya, los 10g. de extracto de levadura y los 150 g. de sucrosa.
5. Se mezcló y dejó reposar la solución por 15 minutos.
6. Se calentó aproximadamente durante 1 minuto hasta punto de ebullición (agitando intermitentemente para disolver completamente la preparación).

7. Se selló la entrada del matraz mediante un algodón y papel aluminio y se llevó a la autoclave; se sometió a: 121°C, 15 lbs de presión durante 15 minutos.
8. Se llevó el medio preparado a la campana de flujo laminar y se le añadió 200U/ml (es decir 0.2U/ml de agua destilada) de bacitracina; se agitó para disolver la preparación.
9. Se colocaron 2 ml. de medio de cultivo preparado (tripticasa soya extracto de levadura bacitracina sacarosa al 20%) en los portaimpresiones individuales previamente esterilizados, y se devolvió cada portaimpresión a su caja de Petri (Fig. 3).

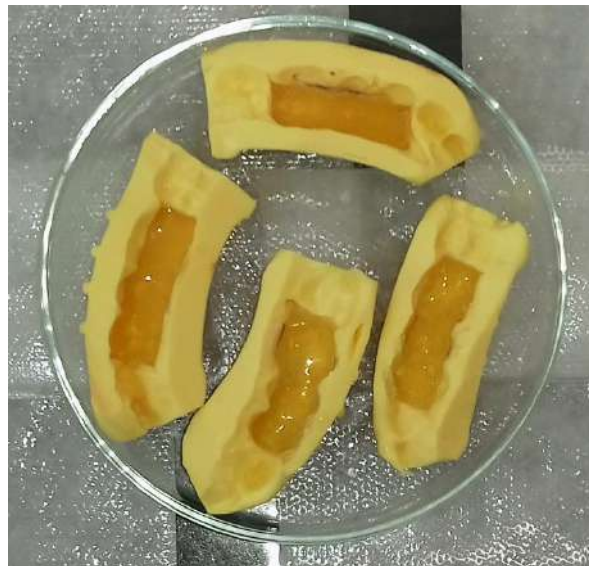


Fig. 3 Portaimpresiones de un paciente con medio de cultivo.

10. Se llevaron las cajas de Petri dentro de una bolsa plástica sellada a refrigeración a una temperatura de entre 2°C-8 °C. (con el fin de solidificar el medio dentro de los portaimpresiones y tenerlas listas para su utilización).

Medición de pH salival

Se obtuvo pH salival con tiras reactivas (Hydrion®) de cada paciente antes de conseguir las muestras con portaimpresión y agar TYS20B.

Toma de muestras

Previo a la utilización de los portaimpresiones con el medio preparado, estos se retiraron del refrigerador 30 minutos antes de utilizarse para que no estuvieran frías.

1. Se ubicó el portaimpresión con el medio preparado correspondiente a cada hemiarcada del paciente al que se le tomó la muestra. Se secó la superficie oclusal con aire para retirar saliva (Fig. 4).



Fig. 4 Adecuación de superficie oclusal para tomar muestra sin exceso de saliva.

2. Se colocó cada portaimpresión con medio preparado por separado sobre su correspondiente hemiarcada, presionándola suavemente sobre la superficie oclusal durante un minuto; se retiró y depositó nuevamente en la caja de Petri.
3. En el grupo evaluado, se llevó a cabo el cepillado dental, e inmediatamente después se tomaron las nuevas muestras, utilizando el segundo juego de portaimpresiones con agar TYS20B. Se colocó cada portaimpresión con medio preparado por separado sobre su correspondiente hemiarcada, presionándola suavemente sobre la superficie oclusal durante un minuto (Fig. 5); se retiró y depositó nuevamente en la caja de Petri .



Fig. 5 Toma de muestra.

4. Se incubaron las muestras bajo las siguientes condiciones: 35° C, 80% N₂, 10% CO₂, 10% H. (en una jarra de anaerobiosis) durante mínimo 24 horas, y máximo 48 horas (Fig. 6) en el laboratorio de Investigación de Posgrados de Odontología de la Universidad Autónoma de Querétaro.



Fig. 6 Incubación de muestras en jarra de anaerobiosis.

Identificación de UFC

Bajo una fuente luminosa y lupa estereoscópica, directamente sobre la impresión incubada se identificaron y cuantificaron las colonias en base a la morfología colonial típica de *S. mutans*, es decir:

- Colonias con apariencia elevada, convexas, onduladas, de márgenes irregulares, superficie granular, más o menos adheridas, con burbuja de color brillante rodeándolas.
1. Se determinó el número y tipo de UFC por pieza dental en cada impresión incubada (Figs. 7 a 11).



Fig. 7 Impresión con TYS20B. Anatomía de molar permanente con al menos dos morfologías diferentes de UFC.

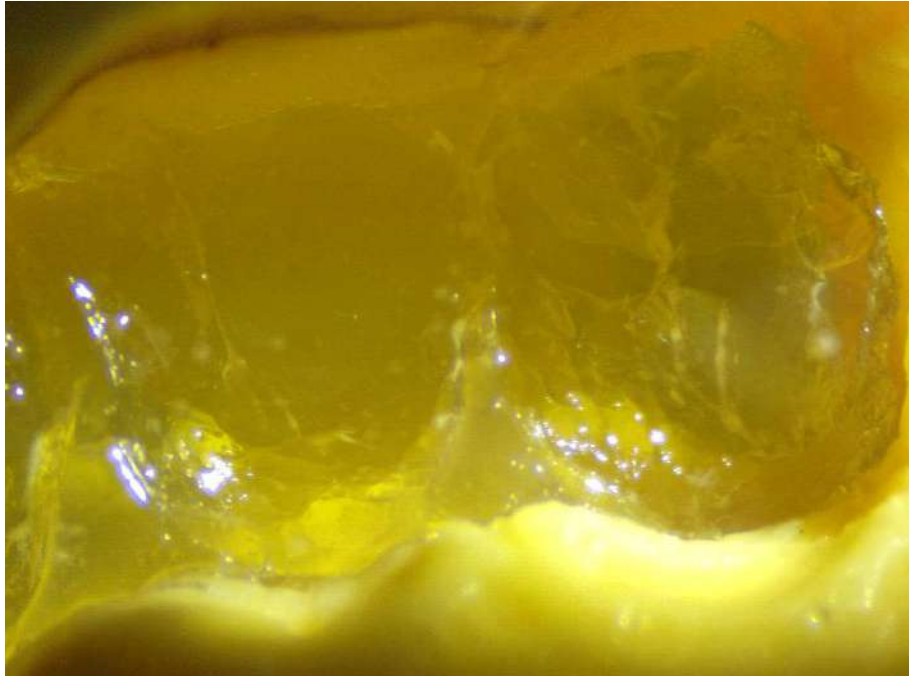


Fig. 8 Impresión con TYS20B. Anatomía de dos molares deciduos y localización de UFC principalmente en surcos.

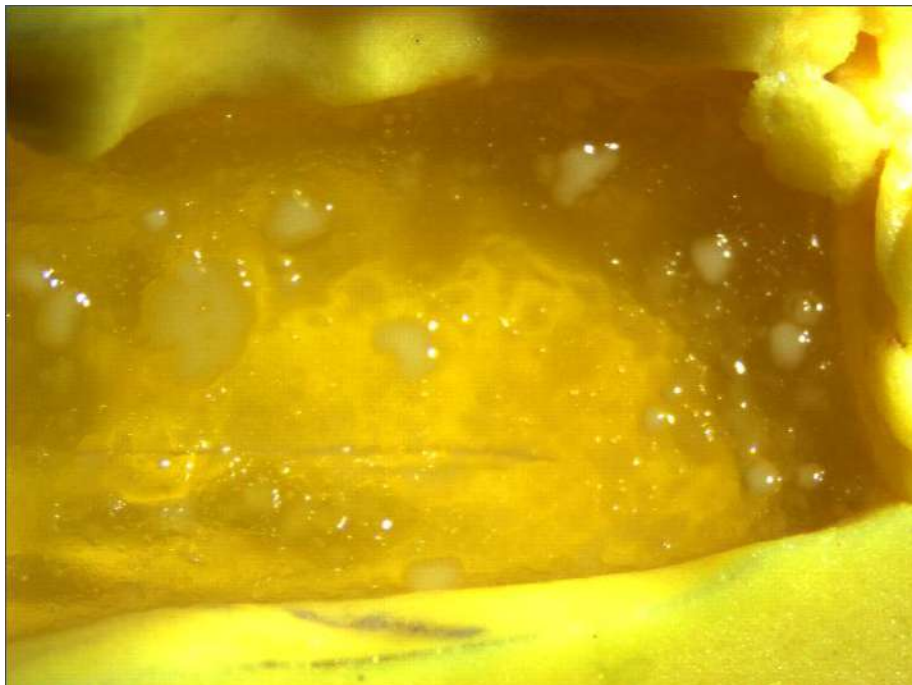


Fig. 9 Impresión con TYS20B. Dos diferentes morfologías de UFC coincidentes con las reportadas en la literatura.

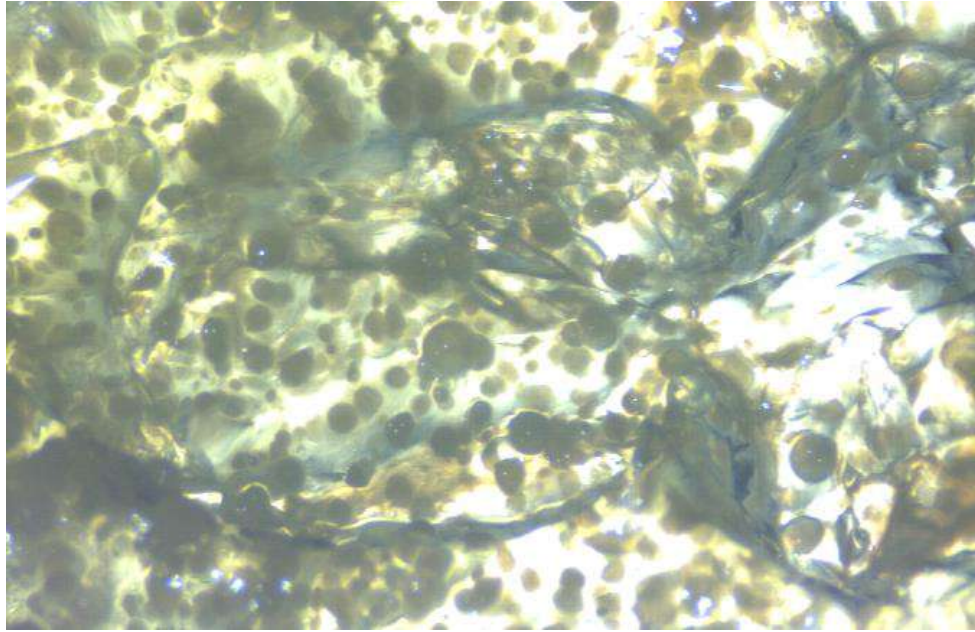


Fig. 10 Muestra tomada antes del cepillado. Se observa la anatomía de molares y la localización de las UFC sobre la superficie oclusal.

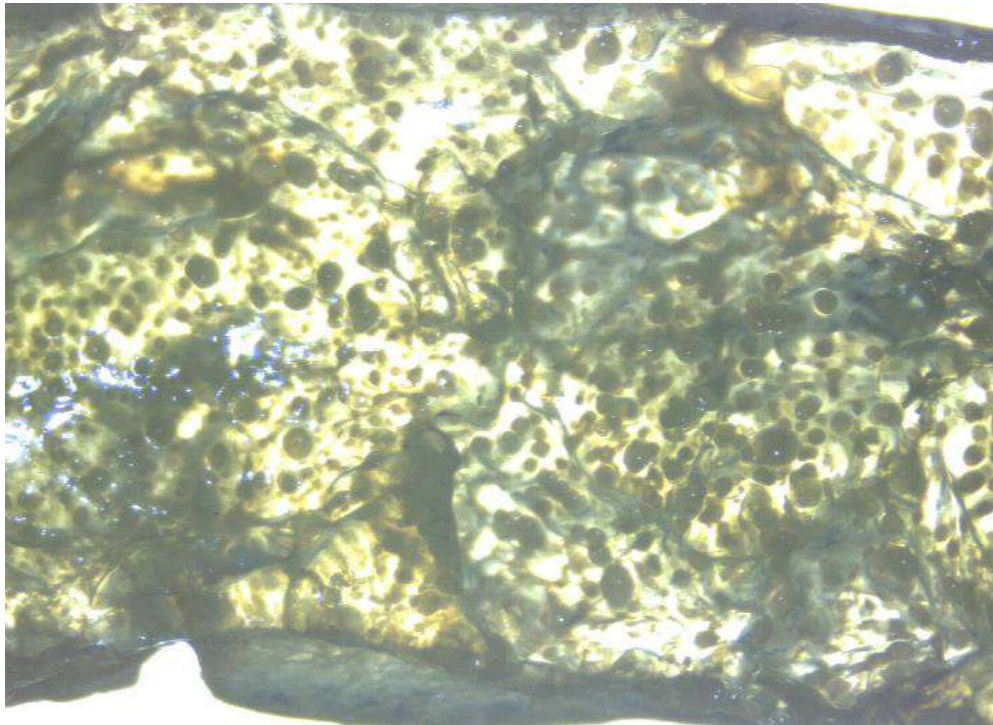


Fig. 11 Muestra tomada después del cepillado. Se observa una gran cantidad de UFC en comparación con la muestra tomada antes del cepillado.

Aislamiento de ADN

- Se realizó el aislamiento de ADN de las muestras con la siguiente técnica:
 2. Se retiraron de la impresión las UFC incubadas con cureta de Gracey.
 3. Se concentró cada muestra de UFC en un pellet centrifugado a 13,000 rpm durante 10 minutos, lavado 3 veces con PBS (Fig. 12).



Fig. 12 Centrífuga con pellets de muestras obtenidas.

4. Se lisó la pared bacteriana utilizando mutanolisina a 50°C durante una hora.
5. Se precipitaron las proteínas agregando acetato de amonio y centrifugando a 13,000 rpm durante 10 minutos (Fig. 13).
6. Se purificó el ADN empleando fenol-cloroformo-alcohol isoamilico.
7. Se lavó el ADN con etanol al 70%, se secó y rehidrató en agua destilada estéril.
8. Se cuantificó la concentración de ADN utilizando un espectrofotómetro (NanoDrop 2000).
9. Aquellas muestras en donde al menos se concentren 50 ng/ul se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.



Fig. 13 Precipitación de proteínas.

Reacción en Cadena de la Polimerasa

- Se realizó PCR utilizando primers específicos en reacciones de 20 ul.
 - Se realizó la reacción colocando:
 - 10 ul de nucleasa sin agua
 - 2.0 ul de solución Buffer con 1.5 mM MgCl₂
 - 2.0 ul de 2.5 mM dNTP's,
 - 2.0 ul de 10 picomoles de cada uno de los oligonucleótidos 16s.

La Tabla 6 muestra el oligonucleótido utilizado para la detección de *S.mutans*.

Tabla 6.Oligonucleótidos utilizados para la detección de *C. S.mutans* y sus características.

| Secuencia 5' - 3' | Temperatura de alineamiento | Referencia |
|---------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| 5'-GGCACCACAACATTGGGAAGCTG AGTT-3' | 70°C | (Hoshino et al., 2019) |
| 5'-GGAATGGCCGCTAAGTCAACAG GAT-3' | | |

- Se realizó PCR bajo las siguientes condiciones:
 1. Desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos
 2. Desnaturalización a 94°C por 50 segundos
 3. Alineamiento a 48°C por 30 segundos
 4. Extensión a 72°C por 90 segundos
 5. Extensión final a 72°C por 6 minutos
 6. Proceso de electroforesis
 7. El producto de este PCR se cargó en geles de agarosa al 2% y se sometió a electroforesis. Se tiñó el gel con bromuro de etidio y se observó en un foto documentador UV. Se identificó y documentó la presencia o ausencia de barras en el gel (Fig. 14); se comprobó la presencia de *S. mutans*.

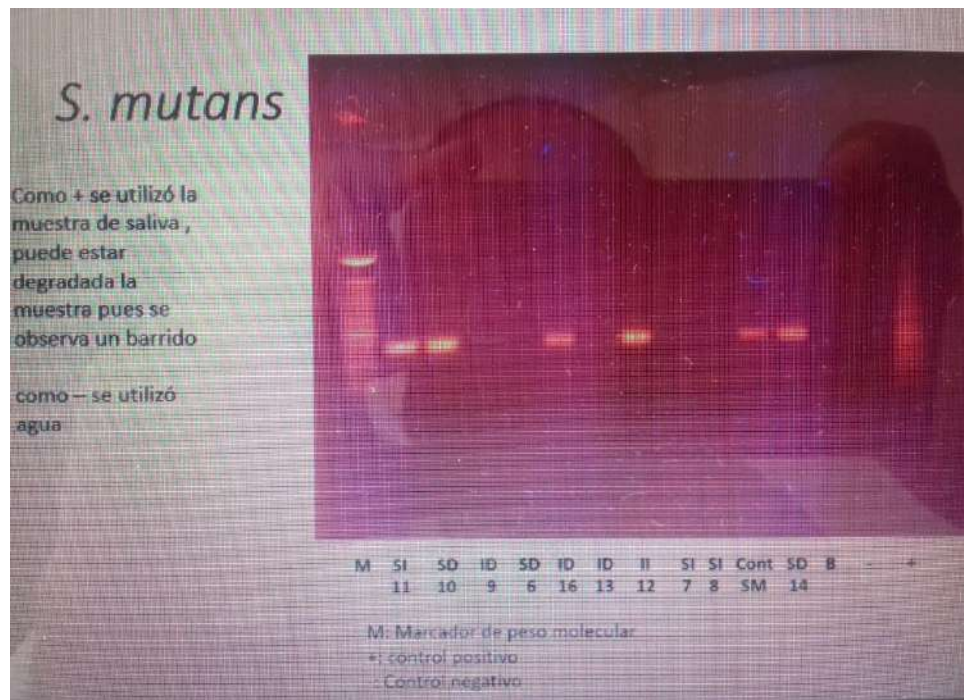


Fig. 14 Electroforesis para detectar presencia o ausencia de *S. mutans*.

3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se analizaron los datos cuantitativos en media, desviación estándar y rango, y los cualitativos en frecuencia y porcentaje. Para determinar la distribución de las variables se realizó el test de Smirnov-Kolmogorov. Para detectar diferencias

estadísticamente significativas entre los grupos se aplicó la prueba t de Student para muestras pareadas. La significancia estadística fue establecida en $p < 0.05$. Los resultados obtenidos se presentaron en tablas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS

Resultados obtenidos durante el desarrollo de la técnica

En la tabla 1 se muestra la cantidad de unidades formadoras de colonias bacterianas por paciente y cuadrante en los pacientes del grupo experimental (en el que se desarrolló la técnica), donde se observa una mayor cantidad de UFC en el cuadrante superior derecho respecto al cuadrante superior izquierdo, no siendo así para los cuadrantes inferiores, donde es mayor la cantidad de UFC del lado izquierdo que en el lado derecho.

Tabla 1. Cantidad de UFC por paciente y cuadrante del grupo experimental.

| Grupo | Grupo experimental (n=8) |
|--------------------|-------------------------------------|
| | $\bar{x} \pm D.E.$ (Rango) |
| UFC por paciente | 712.62 \pm 263.19 (341 - 1200) |
| UFC por cuadrante | |
| Superior derecho | 191.75 \pm 93.30 (95 - 300) |
| Superior izquierdo | 164.75 \pm 97.61 (70 - 300) |
| Inferior izquierdo | 187.75 \pm 71.87 (82 - 300) |
| Inferior derecho | 168.37 \pm 62.67 (93 - 300) |

UFC: unidades formadoras de colonias.

En la tabla 2 se muestra la cantidad de unidades formadoras de colonias bacterianas por pieza dental en los pacientes del grupo experimental. Se observa que la cantidad de UFC en dientes permanentes es mayor que en dientes deciduos, y en el primer molar permanente superior e inferior del lado izquierdo hay menor cantidad de UFC que en los del lado derecho.

Tabla 2. Cantidad de UFC por pieza dental del grupo experimental.

| Grupo | Grupo experimental (n=8) |
|------------------------------|-------------------------------------|
| | $\bar{X} \pm D.E.$ (Rango) |
| Primer molar deciduo | |
| Superior derecho | 64.50±31.13 (32 - 100) |
| Superior izquierdo | 52.50±33.72 (17 - 100) |
| Inferior izquierdo | 55.37±22.92 (34 - 100) |
| Inferior derecho | 56.00±30.62 (12 - 100) |
| Segundo molar deciduo | |
| Superior derecho | 56.00±38.07 (7 - 100) |
| Superior izquierdo | 50.37±33.72 (14 - 100) |
| Inferior izquierdo | 55.87±27.28 (22 - 100) |

| | |
|-------------------------|---------------------------|
| Inferior derecho | 68.25±30.43 (23 - 100) |
| Primer molar permanente | |
| Superior derecho | 71.25±31.67 (30 - 100) |
| Superior izquierdo | 61.87±34.49 (17 - 100) |
| Inferior izquierdo | 57.12±29.43 (25 - 100) |
| Inferior derecho | 63.50±28.04 (22 - 100) |

UFC: unidades formadoras de colonias, \bar{X} : media de población, D.E.: desviación estándar.

Resultados obtenidos durante la evaluación de I técnica

En la tabla 3 se muestran las características clínicas de los pacientes del grupo en el que se evaluó la técnica. Se observa que la mayoría de los pacientes (80%) exhibió tener una higiene dental regular, y el 60% presentó un tiempo mayor a medio año desde la última aplicación de flúor tópico en consulta.

Tabla 3. Características clínicas de los pacientes del grupo evaluado, higiene bucal y tiempo posterior a la exposición a 22600 ppm de Flúor.

| Grupo | Grupo evaluado (n=10) |
|---------------------------|----------------------------------|
| | $\bar{X} \pm D.E.$ (Rango) |
| Edad | 8.90±0.99 (7 - 10) |
| pH | 6.75±0.79 (6 – 8.50) |
| <i>Frecuencia (%)</i> | |
| Género | |
| Femenino | 5 (50) |
| Masculino | 5 (50) |
| Higiene | |
| Buena | 1 (10) |
| Regular | 8 (80) |
| Deficiente | 1 (10) |
| Última plicación de flúor | |
| Mayor a medio año | 6 (60) |
| Mayor a un año | 4 (40) |

\bar{X} : media de población, D.E.: desviación estándar.

En la tabla 4 se muestra la cantidad de UFC por paciente y cuadrante de los pacientes del grupo evaluado. Se observa que existe una mayor cantidad de UFC en las muestras tomadas después del cepillado, esto puede indicar que creció una mayor cantidad de UFC, probablemente por la desorganización de placa dentobacteriana que provoca el cepillado dental. Al realizar las pruebas estadísticas se observan diferencias significativas entre los resultados, con excepción del primer molar inferior izquierdo, donde no se observan diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 4. Cantidad de UFC por paciente y cuadrante del grupo evaluado.

| Grupo | Primer muestra (n=10) | Segunda muestra (n=10) | Valor de p |
|------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|------------|
| | $\bar{X} \pm D.E.$ (Rango) | | |
| UFC por paciente | 812.60±247.32 (439 - 1200) | 1117±122.12 (875 - 1200) | 0.0009* |
| UFC por cuadrante Superior derecho | 204.50±68.12 (83 - 300) | 292.50±23.71 (225 - 300) | 0.0033* |
| Superior izquierdo | 189.20±61.59 (81 - 300) | 268.70±76.11 (63 - 300) | 0.0020* |
| Inferior izquierdo | 231.80±71.850 (121 - 300) | 270.40±60.33 (114 - 300) | 0.0717 |
| Inferior derecho | 187.10±92.16 (22 - 300) | 285.40±32.95 (202 - 300) | 0.0094* |

UFC: unidades formadoras de colonias, \bar{X} : media de población, D.E.: desviación estándar. Prueba t de Student para muestras pareadas.

En la tabla 5 se muestra la cantidad de UFC por paciente y cuadrante de los pacientes del grupo evaluado. Se observa que existe una mayor cantidad de UFC en las muestras tomadas después del cepillado. Esto probablemente indica que creció una mayor cantidad de UFC, probablemente por la desorganización de placa dentobacteriana que provoca el cepillado dental. Al realizar las pruebas estadísticas se observan diferencias significativas entre los resultados, con excepción de los molares del cuadrante inferior izquierdo, donde no se observan diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 5. Cantidad de UFC por pieza dental del grupo evaluado.

| Grupo | Primer muestra (n=10) | Segunda muestra (n=10) | Valor de p |
|-----------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| | $\bar{X} \pm D.E.$ | | |
| | (Rango) | | |
| Primer molar deciduo | | | |
| Superior derecho | 67.80±26.62 (16 - 100) | 97.00±9.48 (70 - 100) | 0.0074* |
| Superior izquierdo | 62.60±21.10 (39 - 100) | 89.50±27.74 (11 - 100) | 0.0128* |
| Inferior izquierdo | 78.70±27.60 (44 - 100) | 88.90±20.67 (40 - 100) | 0.2008 |
| Inferior derecho | 62.10±32.28 (0 - 100) | 93.40±15.60 (52 - 100) | 0.0161* |
| Segundo molar deciduo | | | |
| Superior derecho | 68.50±19.09 (44 - 100) | 96.70±10.43 (67 - 100) | 0.0015* |
| Superior izquierdo | 59.00±26.82 | 88.00±27.90 | 0.0040* |

| | | | |
|-------------------------|-------------|-------------|---------|
| | (15 - 100) | (15 - 100) | |
| Inferior izquierdo | 76.70±26.35 | 90.50±20.80 | 0.0875 |
| | (36 - 100) | (36 - 100) | |
| Inferior derecho | 65.10±30.11 | 95±10.63 | 0.0152* |
| | (22 - 100) | (72 - 100) | |
| Primer molar permanente | | | |
| Superior derecho | 68.20±26.32 | 98.80±3.79 | 0.0058* |
| | (23 - 100) | (88 - 100) | |
| Superior izquierdo | 67.60±20.93 | 91.20±20.81 | 0.0006* |
| | (15 - 100) | (27 - 100) | |
| Inferior izquierdo | 76.40±26.71 | 91.00±19.51 | 0.0898 |
| | (40 - 100) | (38 - 100) | |
| Inferior derecho | 59.90±32.21 | 97.00±7.13 | 0.0056* |
| | (0 - 100) | (78 - 100) | |

UFC: unidades formadoras de colonias, \bar{X} : media de población, D.E.: desviación estándar. Prueba t de Student para muestras pareadas.

4.2 DISCUSIÓN

Las especies bacterianas más importantes de la microbiota oral en el humano son *S. mutans* y *S. sobrinus*, que 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 (Linossier y Valenzuela, 2011). En general, en la comunidad científica hay consenso en señalar al *S. mutans* como el microorganismo más importante en la caries dental. Por lo tanto, las estrategias de aislamiento, identificación, tipificación, prevención y control están dirigidas hacia éste (Sattely et al., 2008). En estudios anteriores se había confirmado la utilidad de diversos medios de cultivo para el aislamiento de estreptococos orales, pero debido a las dificultades

en el proceso de identificación de microorganismos es necesario contar con un medio de cultivo con un alto porcentaje de selectividad hacia *S. mutans* y mantener inhibido el crecimiento de estreptococos orales acompañantes (Zúñiga, 2010).

S. mutans es un productor rápido de ácido láctico con capacidad de cambiar un medio de pH 7 a pH 4.2 en, aproximadamente, 24 horas (Hamada y Slade, 1980). En el presente estudio el pH salival de los pacientes varió desde un pH 6 a pH 8, es decir que en ambos grupos el pH promedio se encontró dentro de los valores normales (6.5 a 7), en el grupo en el que se desarrolló la técnica (grupo experimental) fue de 6.87 (Anexo 1), y en el grupo en el que se evaluó la técnica fue de 6.75 (Tabla 3).

ICDAS es un sistema internacional de detección y diagnóstico de caries, para la práctica clínica, la investigación y el desarrollo de programas de salud pública. Tiene el objetivo de ser un método visual para la detección de la caries, en fase tan temprana como fuera posible, y que además detectara la gravedad y el nivel de actividad de la misma. En este estudio se observó que en el grupo experimental (Anexo 3), la mayoría de primeros molares permanentes se encontraron clínicamente sanos (entre el 62.5% y el 75%), o bien con caries en estado inicial sin presencia de cavidad (del 0% al 37.5%); y en el grupo evaluado con dos muestras la mayoría de los primeros molares permanentes se observaban clínicamente sanos, es decir código ICDAS 0 (entre el 50% y 80%), o bien con caries en estado inicial sin presencia de cavidad, es decir, códigos ICDAS 1 y 2 (del 0% al 50%). Así mismo se observa que el primer molar permanente del cuadrante superior izquierdo presentó una mayor incidencia (80%) de diagnósticos ICDAS 0 (es decir clínicamente sano), seguido del primer molar permanente inferior derecho (70%), luego el primer molar permanente inferior izquierdo (60%), y por último el primer molar permanente superior derecho (50%), como se presenta en el Anexo 4. En estudios posteriores podrían compararse estos datos con la eficacia del cepillado por cuadrantes tomando en cuenta si el paciente es diestro o zurdo.

Correlacionando los diagnósticos de ICDAS y la cantidad de colonias bacterianas, en los pacientes que tuvieron código ICDAS 0 se observa que el número de UFC

aumentaba, duplicándose o hasta triplicándose en la segunda impresión con agar (posterior al cepillado); y en los pacientes que mostraban códigos ICDAS 1 y 2, la cantidad de UFC también aumentaba pero en menor proporción (Tablas 4 y 5 y anexo 4). Por lo que se puede decir que no necesariamente existe una relación entre el diagnóstico ICDAS y el recuento de *S. mutans* de placa dental depositada sobre la cara oclusal de los primeros molares permanentes.

El medio más común para el aislamiento de *S. mutans* es el agar MS suplementado con bacitracina 0,2 U/ml y sacarosa al 20%, que permite la selección de otros estreptococos (Sattely et al., 2008). Cabe mencionar que el agar MS fue originalmente desarrollado para aislar estreptococos fecales, y aunque su uso ha predominado sobre otros medios de cultivo para el aislamiento de estreptococos orales, permite el crecimiento de diversos estreptococos con una morfología característica de las colonias de *S. mutans* (blanquecinas, de bordes definidos, colonias firmes muy adherentes al medio de cultivo). Además, en el estudio de Hirasawa y Takada (2003), se detectó crecimiento en agar MSB de *S. sobrinus*, colonizador de sitios ya cariados (Svanberg y Krasse, 1990), lo que es indeseable si se quiere aislar únicamente *S. mutans* directamente de la placa dentobacteriana. Debido a lo anterior descartamos el uso de agar MSB para llevar a cabo la investigación. En el estudio realizado por Medina (2005), el medio de cultivo que presentó un mayor crecimiento in vitro del *S. mutans* ATCC 25175 fue el TYS20B, mostrándose como el medio adecuado para la recuperación del microorganismo. Adicionalmente, presenta otras ventajas como son: fácil de elaborar y económico, este resultado coincide con el obtenido en otros estudios para recuperación de *S. mutans* (Schaecken et al., 1986; Wan et al., 2002). Para llevar a cabo el aislamiento y el desarrollo de la técnica para toma de muestra, crecimiento y cuantificación de *S. mutans* se utilizó el agar TYS20B, y mediante PCR y electroforesis se comprobó que las UFC que se lograron aislar en este estudio fueron de *S. mutans*, y ninguna de *S. sobrinus*, por lo que se puede confiar en el medio TYS20B como selectivo para *S. mutans*.

A partir del cultivo y aislamiento bacteriano, de muestras de placa bacteriana dental mediante la técnica de impresión en agar TYS20B, se obtuvieron colonias aisladas con características macroscópicas y de adherencia correspondientes a *S. mutans* (Figs. 7 a 9). La literatura refiere que las colonias de este microorganismo se diferencian fácilmente: altas, convexas, pulvinadas (en forma de cojín), con márgenes irregulares, más o menos adherentes, de 0,5 a 1 mm de diámetro, y opacas con superficie granular que recuerda al vidrio esmerilado (Sattely et al., 2008). En medios de cultivo con sacarosa este microorganismo adquiere una apariencia opaca, rugosa y blanca, no adherente al medio de cultivo y ocasionalmente rodeada por polímeros de glucano de aspecto húmedo. Usualmente, la placa de agar se cultiva en una atmósfera del 95% de nitrógeno y 5% de dióxido de carbono a 37°C por 1 o 2 días. La morfología característica de las colonias, los estreptococos orales pueden diferenciarse por su habilidad para fermentar ciertos azúcares (especialmente manitol y sorbitol) y por adherirse a superficies lisas en presencia de sacarosa (Sabbaj et al., 1971; Linke, 1977; Jensen y Bratthall, 1989; Weinberger y Wright, 1990; Od et al., 2005; Hildebrandt y Bretz, 2006). En ésta investigación, en colonias de ciertos pacientes se observó la aparición de una morfología colonial de esta especie bacteriana, mientras en otros se pudo observar mayor diversidad, ya que 3 morfologías coloniales diferentes fueron detectadas (Fig. 9). Al observar las muestras tras 24 horas de haber sido tomadas, las colonias bacterianas en todas las muestras mostraban la morfología típica descrita, sin embargo, en algunas muestras que fueron observadas pasadas 24 horas de haber sido obtenidas se observó colonias más grandes y opacas, incluso algunas de estas colonias presentaban un halo y estaban más adheridas al medio. En todas las muestras tomadas posterior al cepillado, se observó un mayor número de colonias en comparación a la primera muestra, y dispersadas en toda la cara oclusal, y no solamente en surcos y vertientes internas como en las muestras tomadas antes del cepillado (Figs. 10 y 11); cabe mencionar que las muestras se tomaron inmediatamente después del cepillado con técnica de Fones, el mismo tipo de cepillo (Colgate® Kids), y el mismo dentífrico (Colgate® Natural Extracts). Al tomar las UFC para colocarlas en tubos eppendorf con solución PBS algunas

colonias mostraron excesiva adherencia al medio a través de una película mucoide transparente (sobre todo las colonias de las muestras tomadas después del cepillado), siendo difícil tomarlas, no obstante otras colonias no se encontraban adheridas al medio, coincidiendo con la falta de consenso entre los autores y previas investigaciones en cuanto a morfología de las UFC de *S. mutans*, pero podría deducirse que mientras más tiempo se mantenga en incubación en un medio con sacarosa, las colonias se adhieren más al medio y crecen en tamaño, al mismo tiempo que paulatinamente cambian de transparentes a blancas.

Actualmente, los estudios no solo se dirigen hacia la búsqueda del *S. mutans* en la saliva y la placa dental, sino también hacia la cuantificación de este microorganismo (Loesche, 1986; Gamboa, 2015). Diferentes estudios han mostrado una correlación entre los recuentos de este microorganismo en la cavidad oral con la prevalencia e incidencia de la caries (Loesche, 1986; Sattely et al., 2008; Gamboa, 2015). No obstante, en otros estudios no se ha hallado correlación entre la cantidad de *S. mutans* y la incidencia de caries (Beighton et al., 1989; Macpherson et al., 1992). La técnica que se desarrolló y evaluó en este trabajo consiste en realizar una impresión directamente sobre las superficies oclusales, lo cual da una mayor exactitud del recuento de microorganismos cariogénicos, con el beneficio de no ser invasivo para el seguimiento de caries en lesiones que radiográficamente son de difícil diagnóstico y además puede utilizarse para monitorear restauraciones y lesiones de caries recurrente. Su principal ventaja, en comparación a técnicas como recuentos en saliva y la técnica de mondadientes utilizada como “gold standard”, radica en que sólo se necesita una toma directa de la muestra de placa dental sobre las superficies de restauraciones y/o dientes sanos de manera conservadora, además de requerir de un menor tiempo de procesamiento microbiológico, ya que elimina etapas como la dilución, siembra, y puede ser realizado por personal clínico sin conocimientos elevados en aspectos de laboratorio, aplicándose principalmente para objetivos de investigación y, además podría ser usado posteriormente para la clínica. Otra de sus ventajas es que al ser una impresión, permite la ubicación topográfica de las especies bacterianas, facilitando la aplicación de medidas preventivas ajustadas al riesgo individual de cada pieza dentaria. Consiste por lo demás en un método

simple, de bajo costo y no invasivo para el paciente, que además ha sido validado como método por Zúñiga (2010), ya que posee una correlación positiva con el método del mondadientes y con el método de recuento de *S. mutans* en saliva. El medio TYS20B mostró una mayor recuperación de *S. mutans* en comparación al medio BHI y MSB, ya que por su aporte de nutrientes es utilizado para el cultivo de una amplia variedad de microorganismos exigentes, tanto aerobios como anaerobios facultativos (Guatibonza, 1999; Vandevenne, 2002 ; Medina et al., 2005). Es importante resaltar como ventaja la selectividad que tiene este medio comparado con BHI por la adición de bacitracina (Schaecken et al., 1986; Isaza et al., 1992) y la presencia del 20% de sacarosa que interfiere con el crecimiento de otros microorganismos, sin embargo, esta última característica hace necesario tomar precauciones en el manejo de su concentración debido a que altas concentraciones de sacarosa interfieren con la glicólisis del *S. mutans* (Iwami et al., 1995).

La técnica de impresión en agar TYS20B fue capaz de aislar *S. mutans* en las muestras obtenidas de los pacientes. Esto concuerda con investigaciones realizadas anteriormente con otros medios de cultivo, en los cuales mediante la misma técnica se logró aislar y permitió el recuento del microorganismo en estudio (Zúñiga, 2010).

Una dificultad que posee el método de impresión con agar, es ejercer la presión exacta sobre las restauraciones dentarias, que permita una correcta impresión de la cara oclusal sin desgarrar el medio de cultivo e inocular bacterias dentro del medio de cultivo, por lo que se sugiere respetar y tal vez aumentar la concentración de agar mejorando la resistencia al desgarro de este material y calibrar la presión ideal que se debe ejercer. Pero su desventaja principal, al igual que otros métodos que miden *S. mutans* en placa dentobacteriana, radica en que es una técnica que no permite conocer el riesgo bucal cariogénico del paciente, porque para determinarlo debería medir la cantidad de *S. mutans* en la boca completa, en donde el recuento en saliva y el Sistema Internacional de Clasificación y Manejo de Caries (ICCMS) pueden certeramente determinar el riesgo de caries individual, y de esta manera

llevar a cabo el diagnóstico, y tareas de prevención y restauración para preservar la estructura dental.

Finalmente es importante recordar que la caries es una enfermedad multifactorial, en donde una serie de determinantes intervienen en el desarrollo de ésta, por lo que el recuento de *S. mutans* sólo es uno de los tantos y diversos factores que favorecen el desarrollo de la enfermedad y por sí solo no es capaz de predecir futuras lesiones. Los hallazgos del presente estudio permitirán abarcar el riesgo cariogénico desde una perspectiva más local, permitiendo tomar medidas preventivas ajustadas al diente en particular, en especial realizar un buen acabado y pulido del material de restauración, como asimismo establecer un régimen regular de citas al odontólogo para evaluar la efectividad de dichas medidas en el tiempo. Esto sin dejar de lado otras medidas locales como la realización de terapias remineralizantes cotidianas (flúor), terapias antibacterianas (clorhexidina) cuando las condiciones del medio bucal lo indiquen, de modo de atender las necesidades particulares del paciente en cada etapa de su vida.

4.3 CONCLUSIÓN

La técnica de impresión con agar TYS20B logró aislar y recuperar *S. mutans* a partir de placa dentobacteriana de la superficie oclusal de molares deciduos y permanentes. Con la técnica de impresión con agar TYS20B puede observarse la localización de las colonias bacterianas y el tipo de colonia de *S. mutans* directamente sobre una copia en negativo de la superficie oclusal. El agar TYS20B es fácil de elaborar, sin embargo es necesario respetar las cantidades de los componentes y no ejercer presión excesiva al tomar la muestra para que no se desgarre al agar. No se observó una relación entre el diagnóstico ICDAS y el recuento de UFC de *S. mutans* de placa dentaobacteriana depositada sobre la cara oclusal de los primeros molares permanentes.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Acosta, G. A., Agudelo, C. M., Sánchez, S. B., Clavijo, M. C., Ávila, A. C., Correa, C. D., e Isabel, S. (2006). Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología. Pontificia Universidad Javeriana.
- Coogan, M. M., MacKeown, J. M., Galpin, J. S., y Fatti, L. P. (2008a). Microbiological impressions of teeth, saliva and dietary fibre can predict caries activity. *Journal of Dentistry*. 36(11): 892–899.
- Coogan, M. M., MacKeown, J. M., Galpin, J. S., y Fatti, L. P. (2008b). Microbiological impressions of teeth, saliva and dietary fibre can predict caries activity. *Journal of Dentistry*. 36(11): 892–899.
- Crossner, C. G., Claesson, R., y Johansson, T. (1989). Presence of mutans streptococci and various types of lactobacilli in interdental spaces related to development of proximal carious lesions. *European Journal of Oral Sciences*. 97(4): 307–315.
- Cvitkovitch, D. G., Li, Y.H., y Ellen, R. P. (2003). Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. *Journal of Clinical Investigation*. 112(11): 1626–1632.
- De La Higuera, A., Gutiérrez, J., Liébana U. J., Garcia, M. A., y Castillo, A. (1999). A new biotyping method for Streptococcus mutans with the API ZYM system. *Clinical Microbiology and Infection*. 5(2): 88–91.
- Delgado, T. J. E., Castañeda, L. S. P., Amaya, A., Nereid, S., y Cabal, M. C. (1999). Comparación del Crecimiento in Vitro de Streptococcus mutans y Lactobacillus acidophilus con Edulcorantes. *Univ. Odontol*. 18(37): 33-8.
- Dewhirst, F. E., Chen, T., Izard, J., Paster, B. J., Tanner, A. C. R., Yu, W. H., y Wade, W. G. (2010). The human oral microbiome. *Journal of Bacteriology*. 192(19): 5002–5017.
- Emilson, C. G. (1983). Prevalence of Streptococcus mutans with different colonial morphologies in human plaque and saliva. *European Journal of Oral Sciences*. 91(1): 26–32.
- Escribano, M., Matesanz, P., y Bascones, A. (2005). Pasado, presente y futuro de la microbiología de la periodontitis. *Avances En Periodoncia e Implantología Oral*. 17(2): 79–87.
- Facklam, R. R. (1980). Manual de procedimientos para el aislamiento e identificación de Streptococcus. Organización Panamericana de la Salud.
- Gamboa, F., Estupiñan, M., y Galindo, A. (2004). Presence of Streptococcus Mutans in saliva and its relationship with dental caries: antimicrobial susceptibility of the isolates. *Universitas Scientiarum*. 9: 23–27.

- Gamboa, J. F. O. (2015). Identificación y caracterización microbiológica, fenotípica y genotípica del *Streptococcus mutans*: experiencias de investigación / Microbiological, Phenotypic, and Genotypic Characterization of *Streptococcus mutans*: Research Experiences. *Universitas Odontologica*. 33(71): 76.
- Garzón, F., Flomin, B., Jiménez, J., y Medina, R. (2002). Efecto de la formación de sales de los componentes activos del líquido de la cáscara de la nuez del marañón (*Anacardium occidentale*) en la actividad antimicrobiana sobre el *Streptococcus mutans*. Trabajo de Pregrado Facultad de Odontología Universidad Nacional de Colombia Bogotá DC.
- González, L. P. (1996). Efecto del aspartame sobre el crecimiento del *Streptococcus mutans* a nivel experimental. *Rev. del Centro de Estudios en Salud (CES) Medellín*.
- Guatibonza, S. (1999). Extracción del líquido de la cáscara de la nuez del marañón y determinación de la actividad antibacteriana en *Streptococcus mutans*. Trabajo de Pregrado Química-Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Colombia Bogotá DC.
- Hamada, S., y Slade, H. D. (1980). Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiological Reviews*. 44(2): 331–384.
- Herzberg, M. C., y Meyer, M. W. (1998). Dental Plaque, Platelets, and Cardiovascular Diseases. *Annals of Periodontology*. 3(1): 151–160.
- Hildebrandt, G. H., y Bretz, W. A. (2006a). Comparison of culture media and chairside assays for enumerating mutans streptococci. *Journal of Applied Microbiology*. 100(6): 1339–1347.
- Hildebrandt, G. H., y Bretz, W. A. (2006b). Comparison of culture media and chairside assays for enumerating mutans streptococci. *Journal of Applied Microbiology*. 100(6): 1339–1347.
- Hirasawa, M., y Takada, K. (2003). A new selective medium for *Streptococcus mutans* and the distribution of *S. mutans* and *S. sobrinus* and their serotypes in dental plaque. *Caries Research*. 37(3): 212–217.
- Hoshino, T., Kawaguchi, M., Shimizu, N., Disease, N (2004). PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using *gtf* genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 48: 195-199.
- Hung, W. C., Tsai, J. C., Hsueh, P. R., Chia, J. S., y Teng, L. J. (2005). Species identification of mutans streptococci by *groESL* gene sequence. *Journal of Medical Microbiology*. 54(9): 857–862.

- Inaba, H., y Amano, A. (2010). Roles of oral bacteria in cardiovascular diseases--from molecular mechanisms to clinical cases: Implication of periodontal diseases in development of systemic diseases. *J Pharmacol Sci.* 113(2): 103–109.
- Isaza, M. C. A., Mejia, G. I., Marulanda, T., y Gonzalez, J. F. (1992). *Fundamentos de farmacología en terapéutica*. 2ª edición. Editorial Guillermo Lagos R. Librería Medica Celsus.
- Iwami, Y., Schachtele, C. F., y Yamada, T. (1995). Effect of Sucrose Monolaurate on Acid Production, Levels of Glycolytic Intermediates, and Enzyme Activities of *Streptococcus mutans* NCTC 10449. *Journal of Dental Research.* 74(9): 1613–1617.
- Jensen, B., y Bratthall, D. (1989a). A New Method for the Estimation of Mutans Streptococci in Human Saliva. *Journal of Dental Research.* 68(3): 468–471.
- Jensen, B., y Bratthall, D. (1989b). A New Method for the Estimation of Mutans Streptococci in Human Saliva. *Journal of Dental Research.* 68(3): 468–471.
- Kimmel, L., y Tinanoff, N. (1991). A modified mitissalivarius medium for a caries diagnostic test. *Wiley Online Library.* (16): 275–279.
- Köhler, B., y Andren, I. (2012). Mutans streptococci and caries prevalence in children after early maternal caries prevention: A follow-up at 19 years of age. *Caries Research.* 46(5): 474–480.
- Lang, N. P., Hotz, P. R., Gusberti, F. A., y Joss, A. (1987). Longitudinal clinical and microbiological study on the relationship between infection with *Streptococcus mutans* and the development of caries in humans. *Oral Microbiology and Immunology.* 2(1): 39–47.
- Linossier, A. C., y Valenzuela, C. Y. (2011). Colonización de la cavidad oral por *Streptococcus* grupo mutans, según edad, evaluado en saliva por un método semi-cuantitativo. *Rev Chil Infect.* 28(3): 230–237.
- Linossier C, A., Vargas D, A., Zillmann G, G., Arriagada R, M., Rojas A, R., y Villegas R, R. (2003). Streptococci mutans: Método semi-cuantitativo para establecer el rango de riesgo de infección bucal en niños preescolares chilenos. *Revista Medica de Chile.* 131(4): 412–418.
- Loyola, R. J. P., Martinez, M. R. E., Flores, F. B. I., Patiño, M. N., Alpuche, S. A. G., y Reyes, M. J. F. (2007a). Distribution of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in Saliva of Mexican Preschool Caries-free and Caries-active Children by Microbial and Molecular (PCR) Assays. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry.* 32(2): 121–126.
- Loyola, R. J. P., Martinez, M. R. E., Flores, F. B. I., Patiño, M. N., Alpuche, S. A. G.,

- y Reyes, M. J. F. (2007b). Distribution of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in Saliva of Mexican Preschool Caries-free and Caries-active Children by Microbial and Molecular (PCR) Assays. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. 32(2): 121–126.
- Macpherson, L. M. D., MacFarlane, T. W., Geddes, D. A. M., y Stephen, K. W. (1992). Assessment of the cariogenic potential of *Streptococcus mutans* strains and its relationship to in vivo caries experience. *Oral Microbiology and Immunology*. 7(3): 142–147.
- Martínez, P. M. C., Aya, B., Maritza, C., Vásquez Vélez, D. C., y Delgado, T. J. E. (2001). Capacidad del *Streptococcus mutans* para fermentar xilitol y sacarina sódica in vitro. *Univ. Odontol*. 21(45): 58-62.
- Meiers, J.C., y Schachtele, C. F. (1984). Fissure removal and needle scraping for evaluation of the bacteria in occlusal fissures of human teeth. *Journal of dental research*. 63(8): 1051-1055.
- Milicich, G. (2008). Caries: Una perspectiva de la enfermedad oral que nos esforzamos por manejar. *J Minim Interv Dent*. 1(1): 25–34.
- Morales, E. (1982). Acción del *Streptococcus mutans* sobre el dextran exógenos. Doctoral dissertation, Tesis, Facultad de Odontología Universidad Nacional de Colombia Bogotá DC.
- Nadell, C. D., Xavier, J. B., Levin, S. A., y Foster, K. R. (2008). The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. *PLoS Biology*. 6(1): 0171–0179.
- Nakano, K., Inaba, H., Nomura, R., Nemoto, H., Takeda, M., Yoshioka, H., y Ooshima, T. (2006). Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(9): 3313–3317.
- Nakano, K., Nomura, R., Nakagawa, I., y Hamada, S. (2004). Demonstration of *Streptococcus mutans* with a Cell Wall Polysaccharide Specific to a New Serotype , k , in the Human Oral Cavity Demonstration of *Streptococcus mutans* with a Cell Wall Polysaccharide Specific to a New Serotype , k , in the Human Oral Cavity. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(1): 198–202.
- Nazar, J. (2009). Biofilms bacterianos. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello*. 67: 61–72.
- Od, R. M. A., Carlos, L., Od, M. C., Constanza, M., Od, V. R., y C, S. J. G. (2005). Estudio comparativo de medios de cultivo para crecimiento y recuperación del *Streptococcus mutans* ATCC 25175 “ in vitro .” *Nova*. 3(3): 25–30.
- Ojeda, G. J. C., y Oviedo, G. E. (2013). *Streptococcus mutans* and dental caries. *Revista CES Odontología*. 26(1): 44–56.

- Peña. M., C. (1995). Adherencia de *Streptococcus oralis* comparando diferentes rugosidades superficiales de la porcelana. *Revista CES Odontología*. 16(1): 26.
- Pienihäkkinen, K., y Jokela, J. (1995). A simple method for monitoring mutans streptococci in young children. *European Journal of Oral Sciences*. 103(1): 61–62.
- Rogers, A. H. (1986). The Effects of Sorbate on Oral Streptococci Grown in Continuous Culture. *Journal of Dental Research*. 65(6): 895–898.
- Rojas, S. F. (2008). Algunas consideraciones sobre caries dental, fluoruros, su metabolismo y mecanismos de acción. *Acta Odontol Venez*. 46(4): 509–516.
- Salazar L.A., Vásquez C., Almuna A., Oporto G., Santana R., y Herrera C.L. (2008). Detección molecular de estreptococos cariogénicos en saliva. *International Journal of Morphology*. 26(4): 951-958.
- Salman, H. A., Kumar, R. S., Babu, N. C., e Imran, K. (2017). First detection and characterization of *Streptococcus dentapri* from caries active subject. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*. 11(7): DM01.
- Sattely, E. S., Fischbach, M. A., y Walsh, C. T. (2008). Total biosynthesis: In vitro reconstitution of polyketide and nonribosomal peptide pathways. *Natural Product Reports*.
- Schaeken, M. J. M., Van Der Hoeven, J. S., y Franken, H. C. M. (1986). Comparative Recovery of *Streptococcus mutans* on Five Isolation Media, Including a New Simple Selective Medium. *Journal of Dental Research*. 65(6): 906–908.
- Svanberg, M., y Krasse, B. (1990). Comparative Recovery of Mutans Streptococci on 2 Selective Media. *Caries.Research*. 24: 36–38.
- Vandevenne, C. (2002). Métodos de análisis microbiológicos de alimentos.
- Wade, W. G., Aldred, M. J., y Walker, D. M. (1986). An improved medium for isolation of *Streptococcus mutans*. *Journal of Medical Microbiology*. 22(4): 319–323.
- Wallman, C., y Krasse, B. (1992). Mutans streptococci in margins of fillings and crowns. *Journal of Dentistry*. 20(3): 163–166.
- Wan, A. K. L., Seow, W. K., Walsh, L. J., y Bird, P. S. (2002). Comparison of five selective media for the growth and enumeration of *Streptococcus mutans*. *Australian Dental Journal*. 47(1): 21–26.
- Weinberger, S. J., y Wright, G. Z. (1990). A comparison of *S. mutans* clinical assessment methods. *Pediatric Dentistry*. 12(6): 375–379.

Wennerholm, K., Lindquist, B., y Emilson, C. G. (1995). The toothpick method in relation to other plaque sampling techniques for evaluating mutans streptococci. *European Journal of Oral Sciences*. 103(1): 36–41.

Zúñiga, S. P. (2010). Evaluación de la Técnica de Cubeta como un método para el aislamiento y recuento de *S treptococcus mutans* a partir de muestras de placa dental en restauraciones de Resina Compuesta y Amalgama. Universidad de Chile.

1. APÉNDICE

Anexos

Anexo 1

Se muestran las características clínicas de los pacientes del grupo en el que se desarrolló la técnica, donde se observa una relativa mayoría de pacientes con alto consumo de carbohidratos (50%).

Anexo 1. Características clínicas de los pacientes del grupo experimental.

| Grupo | Grupo experimental (n=8) |
|--------------------------|-------------------------------------|
| | $\bar{X} \pm D.E.$ (Rango) |
| Edad | 8.50±1.06 (7 - 10) |
| pH | 6.87±0.79 (6 – 8) |
| | <i>Frecuencia (%)</i> |
| Género | |
| Femenino | 4 (50) |
| Masculino | 4 (50) |
| Consumo de carbohidratos | |
| Alto | 4 (50) |
| Regular | 3 (37.50) |
| Bajo | 1 (12.50) |

\bar{X} : media de población, D.E.: desviación estándar.

Anexo 2

Se muestra la higiene bucal de los pacientes del grupo experimental y el tiempo posterior a su última aplicación de flúor en consulta en los pacientes del grupo experimental, donde se observa que la mayoría de los pacientes realizaban una higiene dental regular (75%), y su última aplicación de flúor tópico había sido hace más de seis meses (62.5%).

Anexo 2. Higiene bucal de los pacientes y tiempo posterior a la exposición a 22600 ppm de Flúor de grupo experimental.

| Grupo | Grupo experimental (n=8) |
|-----------------------|-------------------------------------|
| <i>Frecuencia (%)</i> | |
| Higiene | |
| Buena | 2 (25) |
| Regular | 6 (75) |
| Deficiente | 0 (0) |
| Aplicación de flúor | |
| Mayor a medio año | 5 (62.50) |
| Mayor a un año | 3 (37.50) |

Anexo 3

Se muestran los diagnósticos de caries en el sistema ICDAS de los primeros molares permanentes de cada cuadrante en los pacientes del grupo experimental, donde se observa que la mayoría de primeros molares permanentes se encontraron clínicamente sanos (entre el 62.5% y el 75%), o bien con caries en estado inicial sin presencia de cavidad (del 0% al 37.5%).

Anexo 3. Diagnósticos de caries en sistema ICDAS del grupo experimental.

| Grupo | Grupo experimental (n=8) |
|--|-------------------------------------|
| <i>Frecuencia (%)</i> | |
| Primer molar permanente superior derecho | |
| ICDAS 0 | 6 (75) |
| ICDAS 1 | 1 (12.50) |
| ICDAS 2 | 1 (12.50) |
| Primer molar permanente superior izquierdo | |
| ICDAS 0 | 6 (75) |
| ICDAS 1 | 2 (25) |
| ICDAS 2 | 0 (0) |
| Primer molar permanente inferior izquierdo | |
| ICDAS 0 | 6 (75) |
| ICDAS 1 | 2 (25) |
| ICDAS 2 | 0 (0) |
| Primer molar permanente inferior derecho | |
| ICDAS 0 | 5 (62.50) |
| ICDAS 1 | 3 (37.50) |
| ICDAS 2 | 0 (0) |

ICDAS: sistema internacional de detección y diagnóstico de caries (international caries detection and assessment system).

Anexo 4

Se muestran los diagnósticos de caries en sistema ICDAS de los pacientes del grupo estudiado (grupo al que se le tomó una muestra antes del cepillado y otra inmediatamente después del mismo). Se observa que la mayoría de los primeros molares permanentes se observaban clínicamente sanos (entre el 50% y 80%), o bien con caries en estado inicial sin presencia de cavidad (del 0% al 50%). Así mismo se observa que el primer molar permanente del cuadrante superior izquierdo presentó una mayor incidencia (80%) de diagnósticos ICDAS 0 (es decir clínicamente sano), seguido del primer molar permanente inferior derecho (70%), luego el primer molar permanente inferior izquierdo (60%), y por último el primer molar permanente superior derecho (50%).

Anexo 4. Diagnósticos de caries en sistema ICDAS pacientes del grupo evaluado.

| Grupo | Primer muestra (n=10) |
|--|----------------------------------|
| <i>Frecuencia (%)</i> | |
| Primer molar permanente superior derecho | |
| ICDAS 0 | 5 (50) |
| ICDAS 1 | 0 (0) |
| ICDAS 2 | 5 (50) |
| Primer molar permanente superior izquierdo | |
| ICDAS 0 | 8 (80) |
| ICDAS 1 | 0 (0) |
| ICDAS 2 | 2 (20) |
| Primer molar permanente inferior izquierdo | |
| ICDAS 0 | 6 (60) |
| ICDAS 1 | 3 (30) |
| ICDAS 2 | 1 (10) |

| | |
|--|--------|
| Primer molar permanente inferior derecho | 1 (10) |
| ICDAS 0 | |
| ICDAS 1 | 7 (70) |
| ICDAS 2 | 2 (20) |
| | 1 (10) |

ICDAS: sistema internacional de detección y diagnóstico de caries (international caries detection and assessment system).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
 FACULTAD DE MEDICINA
 POSGRADO DE ODONTOPEDIATRÍA



DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UNA TÉCNICA PARA LA TOMA DE MUESTRA, CRECIMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS CARIOGÉNICAS DE SUPERFICIES OCLUSALES EN NIÑOS DE 6 A 9 AÑOS

Residente: Alicia Díaz Magdaleno

ANEXO 5: HOJA DE REGISTRO INDIVIDUAL DE DATOS

Paciente: _____

Edad: _____ Género: _____ Ph Bucal: _____

Inmunización: Si ____ No ____ Última fecha: _____

Malposición dental: Si ____ No ____ Especificar: _____

Cepillado de dientes al día: _____ Cepillado de dientes nocturno: Si ____ No ____

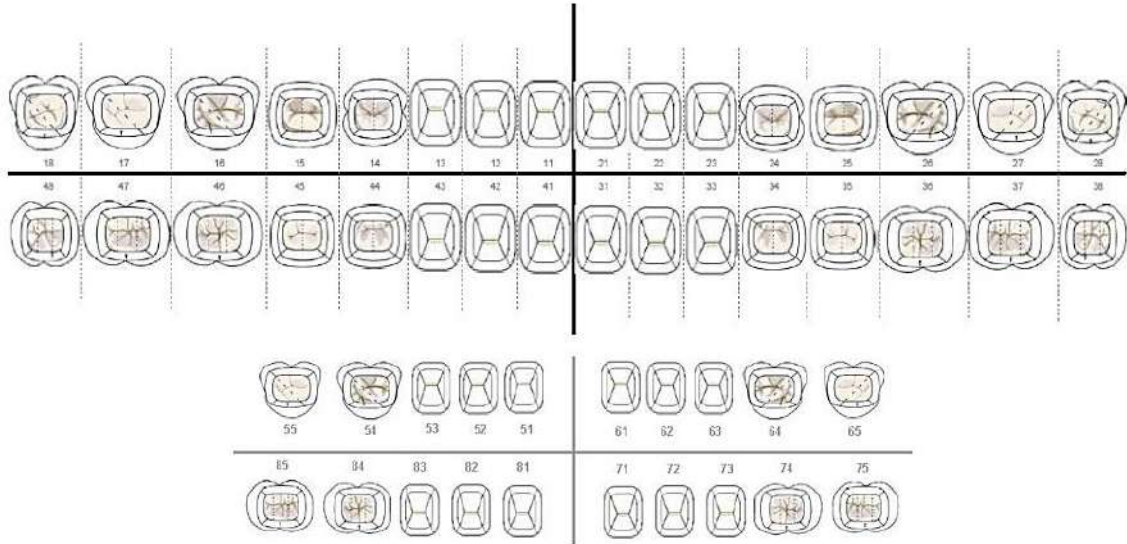
Uso de hilo dental: Si ____ No ____ Frecuencia: _____

Uso de enjuague bucal: Si ____ No ____ Frecuencia: _____

Número de veces a la semana que consume:

| | | | |
|----------------|--|------------|--|
| Pan o galletas | | Dulces | |
| Jugos | | Chocolates | |
| Fruta | | Gomitas | |
| Refrescos | | Yogurt | |
| Yakult | | Otros | |

Odontograma ICDAS Fecha: _____



Fecha de toma de muestras: _____

Procesamiento de muestras: _____

| Muestra | ICDAS | ICDAS | UFC/cm ² | S. mutans |
|--------------------|----------|-------------|---------------------|-----------|
| | Deciduos | Permanentes | | PCR |
| Superior derecha | | | | |
| Superior izquierda | | | | |
| Inferior derecha | | | | |
| Inferior izquierda | | | | |



Odontología
UAQ



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Medicina



Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Los resultados de esta investigación favorecerán al desarrollo de futuras investigaciones que requieran el aislamiento, cuantificación, clasificación y estudio de *Streptococcus* asociados con el inicio y progreso de la caries dental a partir de la placa dentobacteriana localizada sobre la superficie dental, evitando así la recolección de la misma con instrumentos para luego llevar a cabo laboriosos procesos microbiológicos. El desarrollo de ésta técnica permitirá aislar, cuantificar y ubicar topográficamente las Unidades Formadoras de Colonias directamente de piezas dentales sanas y/o restauradas además de ser un método simple y aplicable en cualquier tipo de clínica.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

Desarrollar y evaluar una técnica para la toma de muestra, crecimiento y cuantificación de unidades formadoras de colonias cariogénicas de superficies oclusales en niños de 6 a 9 años.

BENEFICIOS DEL ESTUDIO

Los resultados de esta investigación pueden simplificar y favorecer el estudio de los microorganismos relacionados con el inicio y progreso de la caries dental, y su relación con otros microorganismos presentes en la flora oral. Este estudio puede abrir nuevas líneas de investigación sobre el crecimiento topográfico de microorganismos causantes de caries dental sobre materiales utilizados para la restauración de órganos dentales, para que mejoren sus propiedades antimicrobianas y no solo mecánicas.



Odontología
UAQ



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Medicina



PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

Si reúne las condiciones para participar en este protocolo y de aceptar participar se le realizarán las siguientes pruebas y procedimientos:

1. Se realizará un cuestionario sobre hábitos de alimentación e higiene y se realizara un diagnóstico de caries en cada diente.
2. Se tomará una impresión o molde sobre el cual se elaborará la cucharilla para la impresión con medio de cultivo.
3. Una vez elaborada la cucharilla a la medida de cada niño y ésta haya sido preparada y esterilizada con el medio de cultivo, se tomará la muestra de bacterias sobre las superficies de sus dientes.
4. Las muestras se procesarán en el laboratorio de investigación para determinar el tipo y cantidad de bacterias presentes en las superficies de los dientes del paciente.

RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

Durante el procedimiento para obtener las impresiones con medio de cultivo el paciente no tendrá ninguna molestia, y tampoco representa ningún riesgo para su salud.

ACLARACIONES

- 1.- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- 2.- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación
- 3.- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar o no las razones de su decisión la cual será respetada en su integridad
- 4.- No tendrá que hacer gasto alguno derivado de este estudio, el financiamiento del mismo es por cuenta del investigador principal.
- 5.- No recibirá pago por su participación
- 6.- En el caso de que el participante presente algún efecto adverso secundario no previsto que implique un gasto económico, éste será cubierto por el investigador principal, siempre que estos efectos sean consecuencia comprobada de su participación en el estudio.
- 7.- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo al investigador responsable.
- 8.- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de



Odontología
UAQ



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Medicina



cada paciente, será mantenida en escrita confidencialidad por el grupo de investigadores, pero los resultados derivados de éste (no sus datos personales) podrían ser publicados en una tesis o artículo de investigación.

9.- Usted también tiene opción de recibir mayor información por parte de las comisiones de investigación y de bioética de la Facultad de Medicina de la UAQ en caso de que tenga dudas sobre sus derechos como participante del estudio a través de:

Dr. Rubén A. Domínguez Pérez

Integrante del área Odontológica del comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la UAQ. Correo: dominguez.ra@uaq.mx

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la carta de consentimiento informado que forma parte de este documento.

NUMERO DE FOLIO: _____

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento

Firma del participante

Firma del padre o tutor

Fecha: _____

Testigo 1. _____

Testigo 2. _____

Esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante):

He explicado al Sr(a). _____

La naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación y la de su hijo (a). He contestado



Odontología
UAQ



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Medicina



a las

preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y repuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Nombre y firma del investigador.

Alicia Díaz Magdaleno, alumna del posgrado de Odontopediatría en la facultad de medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Correo electrónico: alicia.diazm82@hotmail.com

Fecha: _____

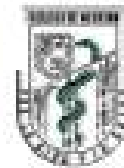


Odontología
UAQ



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Medicina



Carta de revocación del consentimiento

Título del protocolo:

DESARROLLAR Y EVALUAR UNA TÉCNICA PARA LA TOMA DE MUESTRA, CRECIMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS CARIOGÉNICAS DE SUPERFICIES OCLUSALES EN NIÑOS DE 6 A 9 AÑOS.

Investigador principal:

Sede donde se realizará el estudio: Clínica de Odontopediatría de la Facultad de medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Nombre del participante:

Por este conducto deseo informar mi decisión de retirarme de este proyecto de investigación por las siguientes razones (opcional):

Si el paciente así lo desea, podrá solicitar que le sea entregada toda la información que se haya recabado sobre él, con motivo de su participación en el presente estudio.

Nombre y firma del paciente: _____

Nombre y firma del padre o tutor: _____

Nombre y firma de un testigo: _____

Fecha: _____

c.c.p El paciente.

(Se deberá elaborar por duplicado quedando una copia en poder del paciente).