



**Universidad de Granada
Facultad de Odontología**

TESIS DOCTORAL

**Estabilidad de genotipos de *Streptococcus mutans*
en escolares usando la técnica AP-PCR
y el cebador OPA-2**

José María Liébana Cabanillas

DIRECTORES

María del Pilar Baca García

Ana María Castillo Pérez

José Liébana Ureña

Granada 2008

Universidad de Granada

Facultad de Odontología

El trabajo de investigación que se expone en la siguiente Tesis, titulada “**Estabilidad de genotipos de *Streptococcus mutans* en escolares usando la técnica AP-PCR y el cebador OPA-O2**”, ha sido realizada bajo nuestra dirección por el Licenciado José María Liébana Cabanillas durante los años 2003 a 2007. Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por nosotros y la consideramos adecuada para ser presentada y permitir al doctorando aspirar al grado de Doctor ante el Tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, se expide el presente documento en Granada a 6 de Diciembre de 2007.

María del Pilar Baca García. Catedrática de Odontología Preventiva y Comunitaria. Departamento de Estomatología. Facultad de Odontología. Universidad de Granada

Ana María Castillo Pérez. Profesora Titular de Microbiología. Departamento de Microbiología. Facultades de Medicina y Odontología. Universidad de Granada.

José Liébana Ureña. Catedrático de Microbiología. Departamento de Microbiología. Facultades de Medicina y Odontología. Universidad de Granada.

Agradecimientos

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos:

A la **Profesora María del Pilar Baca García**, directora de esta Tesis Doctoral por su extraordinaria capacidad de trabajo, ella fue la primera en exigirse a sí misma todo lo necesario, sin escatimar sacrificios, para el desarrollo de esta investigación, mostrándome en todo momento, con rigor y seriedad, su continuo apoyo personal y científico.

A la **Profesora Ana María Castillo Pérez**, directora de esta Tesis Doctoral, por su entusiasmo, su constante ayuda, su magnífica orientación en los momentos de mayores dificultades y por su capacidad resolutive frente a los múltiples problemas que iban surgiendo durante la realización de la genotipia.

Al **Profesor José Liébana Ureña**, director, como las anteriores, de esta Tesis Doctoral, pero sobre todo **Padre** y amigo, por su ejemplo personal y profesional que tanto han contribuido a ser quien soy hoy.

A **Francisca Castillo Pérez**, por su gran capacidad profesional y por sus grandes conocimientos técnicos que le han permitido el control de tantas de cepas, gracias a su ordenado y meticuloso trabajo que resultó fundamental para llegar a la conclusión de esta Tesis Doctoral.

A la **Profesora Pilar Junco Lafuente** y a la **Doctora Adela Baca García**, por su contribución en las recogidas de datos y exploraciones bucodentales.

A los **Profesores Manuel Martínez Bueno** y **Antonio Martín Platero**, por su desinteresada ayuda material, que fue decisiva a la hora de tomar decisiones sobre el procedimiento a seguir en el método para establecer la homología de los genotipos.

A mi **hermana Julia**, por abrirme el camino de esta investigación, por su ayuda en el diseño y elaboración de algunas tablas y por su papel en las exploraciones bucodentales.

Al **Profesor Mariano Valderrama Bonnet**, por su participación en el tratamiento estadístico de los resultados y su disponibilidad en todo momento.

A **Don Rafael Olivares Castillo**, por sus inestimables consejos, ayuda y orientación bibliográfica.

A los **directores**, a los **maestros** de los colegios que participaron en este estudio y a los **padres** de los escolares, que autorizaron el mismo, por todas las facilidades mostradas y, sobre todo a estos **últimos**, al fin y al cabo, los verdaderos protagonistas de esta "historia".

A **mi mujer Lourdes** y **mi hija Paula** por el tiempo robado, por su amor y su apoyo.

A **todos los olvidados** en estas páginas que saben quienes son y la importancia que tienen para mí, ellos también merecen un agradecimiento muy especial.

A la memoria de mi abuelo Francisco.

No podemos impedir el viento, pero podemos crear molinos.

Proverbio holandés.

INDICE

1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.	13
2. INTRODUCCIÓN.	17
2.1. Ecosistemas orales.	19
2.2. Caries.	20
2.3. La placa y su relación con la caries.	25
2.4. Epidemiología de la caries.	29
2.5. Microbiota cariogénica.	32
2.5.1. Estreptococos del grupo mutans.	33
2.5.2. Factores de virulencia.	35
2.5.3. Lactobacilos y actinomices.	38
2.6. Estreptococos del grupo mutans y su relación con la producción y transmisión de caries.	40
2.7. Tipificación de los estreptococos del grupo mutans.	43
2.7.1. Fenotipia.	43
2.7.2. Genotipia.	44
3. MATERIAL Y MÉTODOS.	59
3.1. Población de referencia y selección de la muestra.	61
3.2. Exploración bucodental.	63
3.3. Variables incluidas en el estudio.	65
3.4. Recogida y procesado de las muestras.	68
3.5. Aislamiento e identificación de los estreptococos del grupo mutans.	71
3.6. Genotipia.	77
3.6.1. Extracción de ADN.	77
3.6.2. Amplificación de ADN. AP-PCR o RAPD o RAPDNA.	78
3.6.3. Preparación del gel de agarosa.	80
3.6.4. Detección de amplificados.	80
3.6.5. Lectura e interpretación de las bandas de electroforesis.	81
3.7. Reproducibilidad.	85
3.8. Tratamiento estadístico.	86
4. RESULTADOS.	87
4.1. Factores demográficos. Índices de caries. Recuentos de bacterias cariógenas. Aislamiento e identificación de los estreptococos del grupo mutans. Estudio basal y a los 18 meses.	89
4.2. Resultados de la AP-PCR.	98
4.3. Estudio de genotipos.	102
5. DISCUSIÓN.	113
5.1. Toma de muestras. ¿Saliva o placa?	116
5.2. Estudio microbiológico.	118

5.2.1. Selectividad del medio para aislamiento e identificación de los estreptococos del grupo mutans	118
5.2.2. Número de colonias seleccionadas.	119
5.3. Tipificación de <i>Streptococcus mutans</i> . Metodología de la AP-PCR.	120
5.3.1. Cebador OPA-02.	120
5.3.2. Condiciones de trabajo.	124
5.3.3. Lectura de bandas.	125
5.4. Persistencia de genotipos de <i>Streptococcus mutans</i> .	128
5.4.1. Intervalo de tiempo entre las tomas de muestra.	128
5.4.2. Estabilidad de genotipos.	129
5.5. Distribución de genotipos y evolución a los 18 meses.	132
5.5.1. Número de cepas por niño.	132
5.5.2. Distribución de genotipos. Adquisiciones y pérdidas.	132
5.5.3. Grupos de homología y transmisión horizontal.	133
5.6. Diversidad genotípica, ecología oral y enfermedad cariogena.	136
5.6.1. Relación entre diversidad genotípica y recuentos de bacterias cariogenas.	136
5.6.2. Relación entre diversidad genotípica con los índices de caries y sus incrementos a los 18 meses.	137
6. CONCLUSIONES.	139
7. BIBLIOGRAFÍA.	143

1. Justificación y objetivos

La caries es considerada como una enfermedad infecciosa, crónica, transmisible, muy prevalente en el ser humano, caracterizada por la destrucción de los tejidos duros dentales, por la acción de los ácidos producidos por los depósitos microbianos adheridos a los dientes. Se trata de la patología oral de mayor incidencia y la enfermedad que con mayor frecuencia afecta al ser humano. Además puede ser el origen de infecciones secundarias y a distancia que en determinados casos, pueden poner en riesgo la vida de los pacientes.

Los estreptococos del grupo mutans (EGM) son las bacterias más cariogénicas, destacando *Streptococcus mutans* (SM) sobre las demás especies.

El estudio microbiológico de estas bacterias ha permitido el desarrollo de técnicas de recuento a partir de saliva que constituyen una de las aplicaciones clínicas de mayor utilidad a la hora de valorar el riesgo de caries en grupos e individuos. Para llevar a cabo esta cuantificación el medio más empleado y difundido ha sido el agar Mitis Salivarius Bacitracina (MSB), aunque también es cierto que cada vez más está siendo cuestionada su capacidad selectiva.

Desde el punto de vista epidemiológico es esencial determinar los posibles mecanismos de transmisión mediante un método eficaz de tipificación a través de técnicas de biología molecular. En este sentido una de las aplicaciones de la genotipificación ha sido el estudio de estabilidad de las bacterias orales. La presencia estable de un determinado clon de SM, convierte a su hospedador en un sujeto potencialmente importante en la cadena de transmisión de esta bacteria.

Por otro lado, la población escolar seleccionada para nuestro estudio se encuentra en el rango de edades donde tiene lugar una segunda ventana de infectividad de SM influenciada por la aparición de los molares permanentes y el recambio de las piezas dentales.

De acuerdo con lo expuesto, se proponen para nuestro trabajo los siguientes **objetivos:**

- 1. Determinar el grado de estabilidad genotípica en 18 meses de *Streptococcus mutans* en escolares de nuestro entorno mediante la técnica AP-PCR y el cebador OPA-02.**
- 2. Analizar si el grado de diversidad genotípica se correlaciona con la enfermedad de caries, determinada mediante recuentos de *Streptococcus mutans* e incrementos de índices de caries.**
- 3. Mediante la creación de grupos de homología de ADN, analizar si se mantienen en el tiempo los genotipos compartidos entre escolares así como determinar si han tenido lugar adquisiciones de genotipos que eran portados por sus compañeros.**

2. Introducción

2.1. Ecosistemas orales

La cavidad oral puede ser considerada como un conjunto de ecosistemas en los que existen diferentes microorganismos que se relacionan entre sí, inmersos en un ambiente específico con elementos abióticos de los que están rodeados y con los que también se encuentran en estrecha relación. Se trata de un espacio que se encuentra abierto, en constante dinamismo y expuesto a numerosos factores que condicionan la composición y características microbianas presentes en cada uno de sus ecosistemas.

Principales ecosistemas presentes en la cavidad oral

- *Mucosa.*
- *Superficies dentales.*
- *Película adquirida.*
- *Placas dentales.*
- *Saliva.*
- *Surco gingival.*
- *Materiales artificiales.*

La microbiota normal es considerada hasta cierto punto beneficiosa al impedir la colonización de otros agentes patógenos. Sin embargo, aunque a través de un complejo sistema de señales moleculares entre ella y el hospedador, se constituye un estado de equilibrio armónico, éste puede alterarse (disbiosis) con la consecuente producción de patología oral¹.

¹ Liébana J, González M, Liébana MJ, Parra M. Composición y ecología de la microbiota oral. En Liébana J, ed. Microbiología Oral 2ª ed. Madrid: Mc Graw-Hill/Interamericana 2002, pp. 515-525.

2.2. Caries.

La caries es una enfermedad infecciosa transmisible, habitualmente crónica, que causa la desmineralización localizada de los tejidos duros dentales ocasionada como consecuencia de la producción de ácidos por los depósitos bacterianos adheridos a los dientes².

El esmalte está compuesto principalmente de hidroxiapatita: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, que es una compleja estructura prismática mineral que puede desorganizarse con una disminución de los niveles de pH por debajo de 5.5 como consecuencia del metabolismo bacteriano. Por otro lado, en condiciones normales la saliva se encuentra saturada de calcio y fosfatos que precipitan sobre la superficie dental para la recomposición de la matriz. De este modo tiene lugar una alternancia de periodos de destrucción, inactividad y reparación³.

Este equilibrio fisiológico de remineralización y desmineralización es un proceso multifactorial debido a la interacción a lo largo del **tiempo** de un **sustrato** con la **microbiota** presente en la cavidad oral del **hospedador**. Diversas circunstancias pueden interferir en alguno de estos elementos favoreciendo su desarrollo o confiriendo diversos grados de resistencia para impedir su aparición (Figura 1).

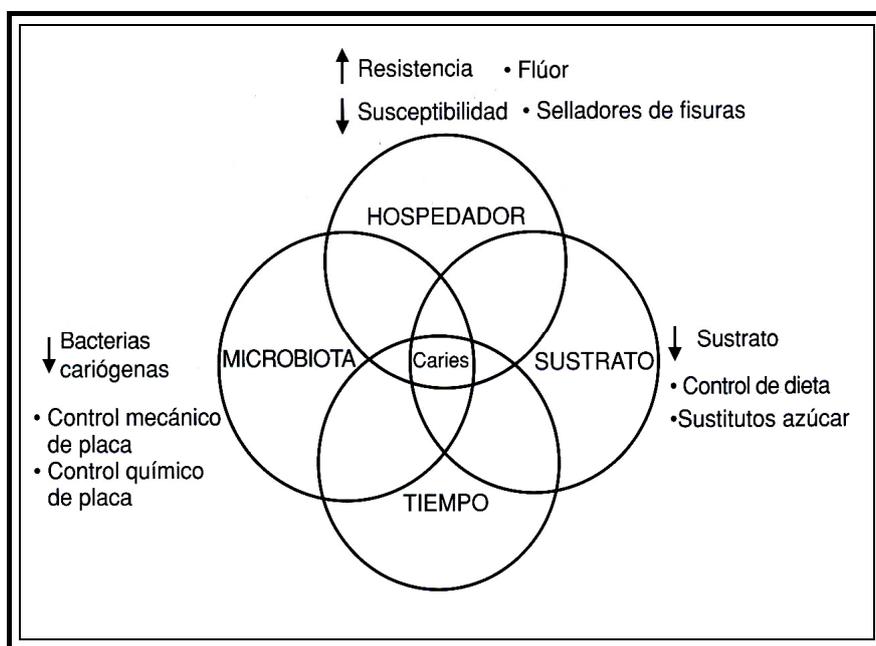


Figura 1. Factores que intervienen en la génesis de la caries y su prevención.

A) Factores del hospedador.

2 Baca P, Baca A, Maestre JR. Microbiología de la caries. En Liébana J, ed. Microbiología oral. 2ª ed. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana 2002, pp. 561-570.

3 Rioboo R. La dinámica de la desmineralización-remineralización de las estructuras dentales. En Rioboo R, ed. Odontología preventiva y comunitaria. Madrid: Avances 2002, pp. 119-141.

Se incluyen algunos de carácter general, en su mayoría relacionados con el medio ambiente en el que se desarrolla el individuo o enfermedades sistémicas de este, pero además podemos destacar por su relevancia los siguientes:

● **La edad del sujeto.** Aunque después de la erupción de los dientes, el medio ambiente de la cavidad oral del niño es similar al del adulto⁴, es preciso tenerla en cuenta ya que existen fases temporales más favorables para la formación de caries⁵. Así podemos distinguir tres periodos de mayor susceptibilidad:

- De los 4 a los 8 años porque tiene lugar la emergencia del primer molar permanente y la primera etapa transicional. Estos dientes recién erupcionados no han alcanzado su madurez posteruptiva y son más sensibles a la acción de los ácidos producidos por las bacterias.⁶
- De los 11 a los 14 en relación con la erupción del segundo molar permanente y con el segundo período de recambio.
- A partir de los 55 años en adelante por la caries radicular.

● **El diente.** Es en definitiva donde tiene lugar la lesión y por tanto habrá que tener en cuenta todas aquellas circunstancias relacionadas con él, especialmente las que impiden una correcta eliminación de placa. Así entre los aspectos más relevantes tenemos que considerar:

- Ubicación del diente en la cavidad oral; los sectores posteriores (molares y premolares) son más susceptibles que los anteriores.
- Maloclusiones, aparatología en boca, anatomía, histología e incluso las pequeñas irregularidades en la superficie dental, como las que se producen en las hipoplasias del esmalte que pueden contribuir a que se incremente la colonización por determinadas bacterias orales⁷.
- La composición química y mineral del esmalte así como sus características microestructurales que condicionan la velocidad de difusión de los ácidos bacterianos.

● **La saliva.** Es considerada uno de los factores de mayor importancia en la cavidad oral. Además de su implicación en el inicio de la digestión de los alimentos, en la degustación de los mismos o en la fonación, debemos destacar otros aspectos referidos a su relación con el desarrollo de la caries (Figura 2):

4 Könönen E, Asikainen S, Jousimies-Somer H. The early colonization of gram-negative anaerobic bacteria in edentulous infants. *Oral Microbiol Immunol* 1992;7:28-31.

5 Nadal-Valladura A. Caries dentaria. Etiología. En Nadal-Valladura A, ed. *Patología dentaria*. Barcelona: Rodas 1987, pp. 207-216.

6 Hamada S, Slade HD. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* 1980;44: 331-384.

7 Li Y, Navia J, Caufield P. Colonization by mutans streptococci in the mouths of 3-and 4-year-old Chinese children with or without enamel hypoplasia. *Arch Oral Biol* 1994; 39: 1057-1062.

- Mantiene lubricados los tejidos duros y blandos de la cavidad oral así como la integridad de la mucosa por su alto contenido en mucinas, prolina, agua y electrolitos.
- Capacidad para el mantenimiento del pH, llevado a cabo fundamentalmente por los sistemas tampón fosfato y bicarbonato.
- Lubricación, arrastre y dilución de los componentes de la dieta así como de microorganismos.
- Mantenimiento de la estructura dental, gracias a la sobresaturación de calcio y fosfatos que proporcionan una barrera a la desmineralización y un equilibrio de la balanza hacia la remineralización.
- Mantenimiento del equilibrio de los ecosistemas orales a través de determinadas proteínas que si bien pueden favorecer la agregación de bacterias o constituir fuente de nutrientes para algunas de ellas, ejercen un efecto antimicrobiano sobre las mismas al modificar su metabolismo y su capacidad de adhesión a la superficie del diente. Las más importantes son: proteínas ricas en prolina (PRPs), lisozima, lactoferrina, peroxidasa, mucinas, histidinas, Ig A secretora e Igs G y M⁸.

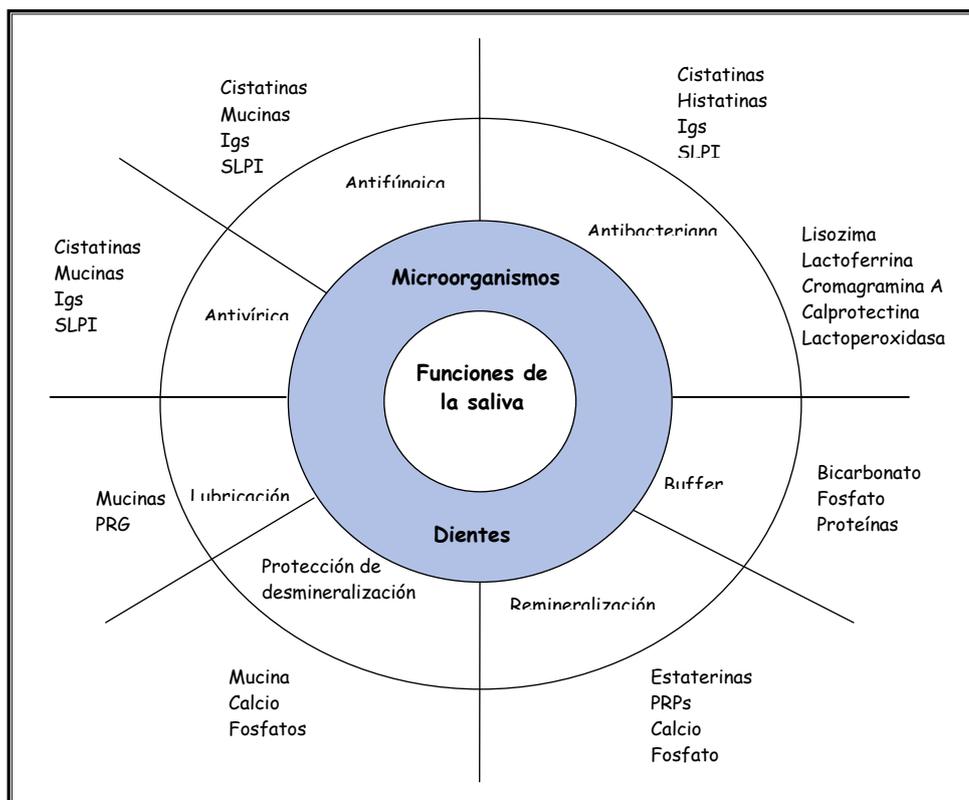


Figura 2. Rol de la saliva como antiinfeccioso y conservador de la integridad dental. Modificado de Amerongen⁹.

8 Liébana J, González MP, Liébana MJ, Parra L. Composición y ecología de la microbiota oral. En Liébana J, ed. Microbiología Oral 2ª ed. Madrid: Mc Graw-Hill/Interamericana 2002, pp 515-525.

9 Amerongen A, Nieuw A, Veerman E. Saliva: the defender of the oral cavity. Oral Dis 2002; 8: 12-22.

La alteración de alguno de estos factores puede traer consecuencias devastadoras a nivel oral en relación con la caries, tal es el caso por ejemplo de la xerostomía o disminución de la cantidad del flujo salival presente en el síndrome de Sjögren o provocada por la medicación con algunos fármacos.¹⁰

B) Sustrato.

Estaría representado por una dieta que contenga sustancias fermentables por los microorganismos capaces de transformarlas en ácidos orgánicos, especialmente láctico, con la consecuente bajada de pH. Los azúcares son las sustancias que con mayor facilidad son convertidas en ácidos y de entre todos ellos el que posee una mayor capacidad cariogénica es la sacarosa. Por otro lado, la cariogenicidad del sustrato puede influenciarse por la consistencia física de la dieta (su textura y adhesividad), el momento y el modo de la ingestión así como la frecuencia de su toma¹¹.

C) Microorganismos cariogénicos.

Destacan los estreptococos del grupo mutans (EGM), lactobacilos (LB) y en menor grado actinomicetes. Dada su importancia en el proceso cariogénico serán revisados de forma más extensa.

D) Tiempo.

Fue Ernest Newbrun¹² quien consideró por primera vez la inclusión de este cuarto factor, puesto que los tres primeros necesitan encontrarse interaccionando de forma simultánea y adecuada para la ruptura del equilibrio que conduce a la desmineralización dental.

E) Factores comunitarios.

La valoración del proceso se sirve de la epidemiología para conocer en que medida presenta caries dental la comunidad y para efectuar comparaciones con otras o con ella misma pasado un espacio de tiempo. Las causas consideradas en el ámbito poblacional incluyen el nivel socioeconómico y cultural, los estilos de vida, los comportamientos no saludables y las políticas sanitarias. Sobre estas causas se

10 Liébana J, Castillo A. Saliva y placa bacteriana. En Cuenca E, Baca P eds. Odontología preventiva y comunitaria. Principios, métodos y aplicaciones. 3ª edición. Barcelona. Masson 2005, pp. 45-48.

11 Jensen M. Diet and dental caries. Dent Clin North Am 1999; 43:615-633.

12 Newbrun E. Current concepts of caries etiology. En Newbrun E, ed. Cariology. Williams and Wilkins 1977, pp. 15-43.

aplican diferentes estrategias también poblacionales, cuya evaluación y eficacia se constatan mediante la reducción de los índices de caries.¹³

13 Baca P. Caries: fundamentos actuales de su prevención y control. En Cuenca E, Baca P, eds. Odontología preventiva y comunitaria. Principios, métodos y aplicaciones. 3ª ed. Barcelona. Masson 2005, pp. 19-40.

2.3. La placa y su relación con la caries.

Las placas dentales están formadas por un conjunto de microorganismos que, constituyendo una biopelícula, se encuentran firmemente adheridos entre sí y a una superficie dentaria, entremezclados, embebidos y rodeados de un material extracelularabiótico de un triple origen: bacteriano, saliva y dieta¹⁴. Su desarrollo incluye un complejo conjunto de procesos escalonados (Figura 3):

- Formación de la película adquirida sobre el esmalte; se trata de una capa acelular formada por la adsorción de glucoproteínas, componentes salivares, proteínas y compuestos secretados por microorganismos.
- Adhesión bacteriana a la película por enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals.
- Colonización primaria; se producen nuevas interacciones entre los receptores de la película y adhesinas de nuevas bacterias o de las que existían previamente.
- Colonizaciones secundaria y terciaria.
- Placa madura, donde la composición microbiana suele mantenerse estable.

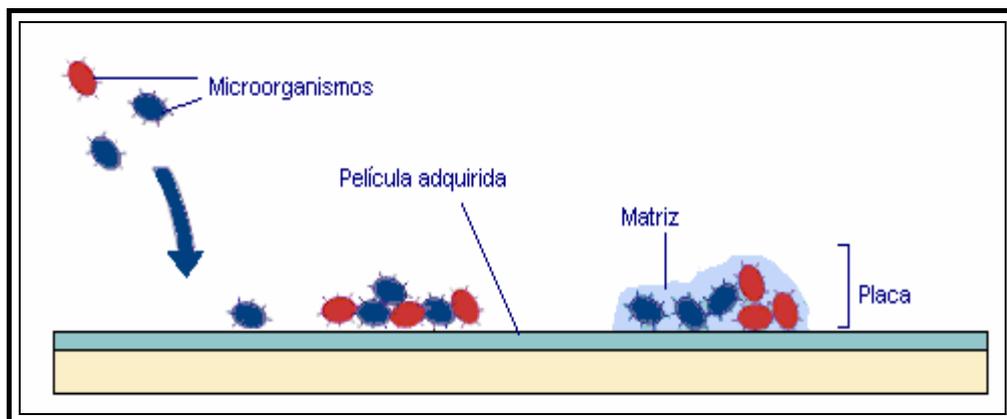


Figura 3. Formación de la biopelícula o placa.

De acuerdo con su localización, las placas dentales relacionadas con las caries son las supragingivales o coronales (que pueden situarse en superficies lisas, proximales, o en superficies oclusales de fosas y fisuras), las radicales y las relacionadas con materiales artificiales intraorales¹⁵ (Figura 4).

14 Liébana J, González M, Liébana MJ, Parra Alonso M. Composición y ecología de la microbiota oral. En Liébana Ureña J, ed. Microbiología Oral 2ª ed. Madrid: Mc Graw-Hill/Interamericana 2002, pp 515-525.

15 Liébana J, Castillo A. Saliva y placa bacteriana. En Cuenca Sala E, Baca García P, eds. Odontología preventiva y comunitaria. Principios, métodos y aplicaciones. 3ª edición. Barcelona. Masson 2005, pp.51-59.

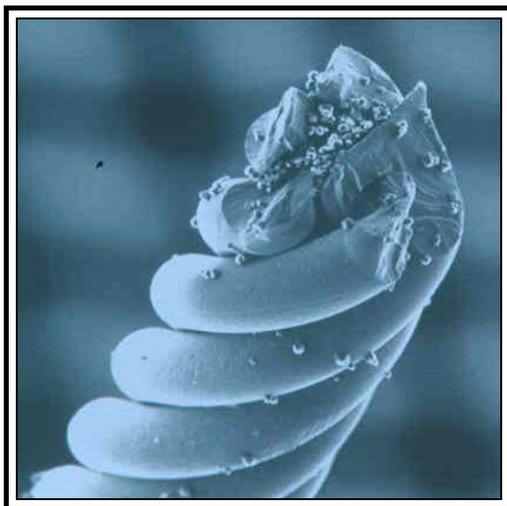


Figura 4. Restos de placa en un alambre de ortodoncia.
Imagen reproducida con permiso de su autor Dr Arturo Baca García.

En cuanto a la **relación placa-caries** se han propuesto diversas hipótesis: la de placa inespecífica, específica, ecológica y mixta. En el caso de la enfermedad que estamos tratando podría implicarse especialmente esta última que es un compendio de las anteriores y en la que se postula que:

- a) Son muchos los microorganismos orales capaces de generar ácidos.
- b) Que los factores de cariogenicidad estarían especialmente relacionados con los que ya señalamos en la figura 1.
- c) Que la producción de dichos ácidos provocaría una selección microbiana de las bacterias cariogénicas¹⁶.

Desde un punto de vista clínico la desmineralización de los tejidos duros dentarios puede afectar a esmalte, dentina y cemento con signos localizados que van desde la pérdida inicial y estructural de minerales hasta afectación pulpar y destrucción del diente, pudiendo establecerse una clasificación bajo tres diferentes criterios (Figura 5):

- a) En función de la localización de las placas cariogénicas, en caries de superficies lisas, de fosas y fisuras, proximales y radiculares.
- b) En crónicas o agudas, en relación a la evolución (por ejemplo, las formas rampantes implican un fuerte desafío cariógeno, normalmente asociado a un riesgo microbiológico elevado) (Figura 6).
- c) Recurrentes, en relación a una restauración preexistente.
- d) En activas e inactivas.
- e) De esmalte, dentina y con afectación pulpar, en base a la profundidad de la lesión.

16 Liébana J, Castillo A. Saliva y placa bacteriana. En Cuenca Sala E, Baca García P, eds. Odontología preventiva y comunitaria. Principios, métodos y aplicaciones. 3ª ed. Barcelona. Masson 2005, pp.59-61.

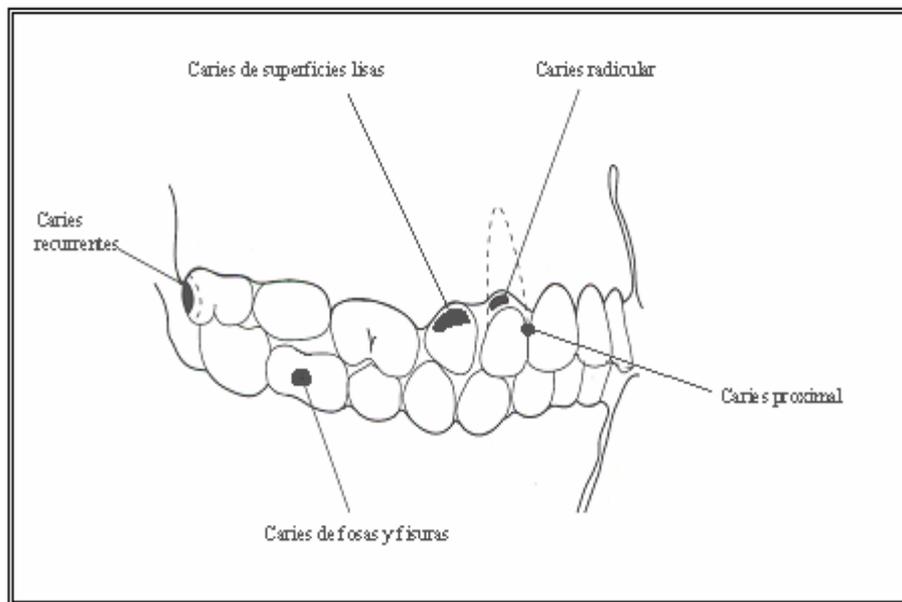


Figura 5. Diferentes tipos de caries.



Figura 6. Caries rampante. Reproducción con permiso de su autora Dra. Pilar Baca García¹⁷.

En resumen podemos decir que la cavidad oral constituye un sistema abierto que presenta un intercambio continuo con el medio circundante. La presencia de una microbiota cariogénica junto con una dieta rica en hidratos de carbono, da lugar a la producción de ácidos orgánicos que provocan la desmineralización por desorganización de la hidroxiapatita, componente fundamental del diente. Cuando estas fuerzas destructivas predominan sobre las reparadoras, la enfermedad avanza;

¹⁷ Baca P, Baca A, Maestre J. Microbiología de la caries. En Liébana J, ed. Microbiología oral, 2ª ed. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana 2002, pp. 561-570.

por el contrario la homeostasis salival permitiría que el fosfato y el calcio se reintegren en el esmalte favoreciendo la remineralización.

2.4. Epidemiología de la caries.

Bajo la **óptica epidemiológica** se considera una de las enfermedades infecciosas de mayor prevalencia, aunque existen variaciones en función de los hábitos culturales, zonas geográficas, o nivel socioeconómico. Los estudios en esta materia llevados a cabo sobre la caries han permitido determinar la necesidad y la eficacia tanto de diferentes tratamientos odontológicos como de las distintas medidas preventivas.

Tradicionalmente, el CAO es uno de los índices más utilizados para medir la historia de caries de un individuo o una población. Se obtiene a partir de la suma de dientes cariados (C), ausentes por caries (A) y obturados (O); referido a un individuo es sólo la suma de esos componentes, mientras que si se refiere a una población será la suma de todos ellos dividido entre el número de sujetos examinados. Originalmente empleado en la evaluación de la dentición permanente, tiene también su variante temporal en minúscula (co), en la que se eliminan los ausentes (a) debido a la imposibilidad para distinguir si se trata de ausencias por caries o debidas a la exfoliación natural. Este índice puede referirse al diente (CAOD-cod) o a la superficie (CAOS-cos), teniendo en cuenta en este caso que los dientes anteriores poseen 4 superficies y los posteriores 5.¹⁸

El CAO es una medida acumulativa ya que suma el número de restauraciones y extracciones con el número de dientes que tienen lesiones sin tratar, de manera que una vez que un diente es restaurado o extraído se convierte en un dato permanente en el historial dental del individuo representando indicadores históricos, mientras que el componente de dientes cariados (C) mide la enfermedad sin tratar en ese momento del estudio. Otro aspecto a tener en cuenta de estos índices es que cada diente sólo puede ser anotado una vez, es decir una misma pieza dental no puede ser suscrito como cariado y obturado al mismo tiempo. En estas circunstancias se anota con la situación peor, en este caso “cariado”.

En los últimos años se ha producido un notable descenso de los índices de caries en las sociedades occidentales gracias a medidas preventivas y a una mejor educación en salud buco dental¹⁹. En nuestro país este descenso, con una creciente tendencia a la estabilización, ha quedado demostrado desde la primera encuesta de Gimeno de Sande y cols. en 1969²⁰, pasando por la de Cuenca en 1986²¹, la de Sicilia

18 Cortés FJ. Medición de la salud y la enfermedad en odontología comunitaria. En En Cuenca E, Baca P, eds. *Odontología preventiva y comunitaria. Principios, métodos y aplicaciones*, 3a ed. Barcelona: Masson 2005, pp. 337-369.

19 Subirá C. La caries en el paciente de edad avanzada. En Bullón Fernández P. *Odontoestomatología geriátrica*. Madrid. IM&C 1996, pp.175-195.

20 Gimeno de Sande A, Sánchez B, Vieñes J, Gómez F, Mariño F. Estudio epidemiológico de la caries dental y patología bucal en España. *Rev Sanidad Hig Pub* 1971;45:361-433.

y cols. en 1987²², la de Nogueroles y cols. en 1994²³, de Llodra y cols. en 2000²⁴ y la última de Bravo y cols. en 2005²⁵ (Tabla 1).

Tabla 1. Índices de caries de escolares en las últimas encuestas nacionales.

Estudios	Edad	cod	CAOD	IR o ir (%)
OMS, 1986	6-7	3.5	-	2.8
	6-7	-	1.20	0
	12	-	4.20	2.04
Sicilia y cols, 1987	7	2.2	-	9.1
	7	-	1.50	15.4
	12	-	3.50	15.6
Nogueroles y cols, 1994	5-6	0.97	-	13.4
	5-6	-	0.04	2.5
	12	-	2.32	38
Llodra y cols, 2000	5-6	1.06	-	16.04
	5-6	-	0.07	28.57
	12	-	1.12	54.13
Bravo y cols, 2005	5-6	1.23	-	22.9
		-	0.4	30.4
	12	-	1.33	52.9

cod: suma de dientes temporales cariados y obturados. CAOD: suma de dientes permanentes cariados, ausentes por caries y obturados. IR/ir: índice de restauración (o/co x100, O/CO x 100). c-C: diente cariado. o-O: diente obturado.

En nuestro entorno más cercano, diversos autores también han dejado patente el importante descenso y estabilización de los índices de caries en escolares andaluces (Tabla 2).

21 Cuenca E. La encuesta de la OMS sobre la salud bucal en España. Una aproximación personal. Arch odontostomatol 1986;2: 15-22.

22 Sicilia A, Cobo J, Nogueroles B y cols. Prevalencia de caries en los niños y jóvenes escolares españoles de 7-12 y 15-19 años. Arch odontostomatol 1990;6: 323-330.

23 Nogueroles B, Llodra JC, Sicilia A, Follaza M. LA salud bucodental en España 1994. Antecedentes y perspectivas de futuro. Madrid: Avances Medico-Dentales, 1995.

24 Llodra JC, Bravo M, Cortes J. Encuesta de salud oral en España 2000. RCOE 2002;7:19-63.

25 Bravo M, Casals E, Cortés J. Encuesta de salud oral en España 2006.

Tabla 2. Índices de caries en la población escolar andaluza

Estudios	Edad	CAOD	IR (%)	Cod	Ir (%)
1985 ²⁶	7	0.66	3.58	3.45	-
	12	2.70	12.5	-	-
	14	4.01	10	-	-
1995 ^{27,28}	7	0.39	13	2.00	29
	12	2.69	25	-	-
	14	3.95	35	-	-
2001 ²⁹	7			1.37	-
	12	1.38	44	-	-
	14	2.23	46	-	-
2006 ³⁰	7	0.34	29.4	1.74*	13.8
	12	1.23	49.6	-	-
	14	1.85	47.02	-	-

Cod: suma de dientes temporales cariados y obturados. CAOD: suma de dientes permanentes cariados, ausentes por caries y obturados. IR/ir: índice de restauración (o/cox100, O/CO x 100). c-C: diente cariado. o-O: diente obturado. *Referido a caod: suma de dientes temporales cariados, ausentes por caries y obturados.

26 Salas-Wade MH. Dental caries experiencia in 7-12 and 14-years-old children in Andalucía, Spain. Community Dent Oral Epidemiol 1994;41: 135-41.

27 Llodra JC, González V, Baca P y cols. Estudio de salud dental en escolares andaluces .1995 (comunicación oral). Madrid: V Congreso de la Sociedad Española de Epidemiología y Salud Pública Oral; 1996.

28 González V, Llodra Jc. Evolución de la caries dental en escolares andaluces (1985-1995) (comunicación oral). Madrid: V Congreso de la Sociedad Española De Epidemiología y Salud Pública Oral; 1996.

29 López Jiménez E. Evolución económica de dos alternativas de programa de atención odontológica escolar. Tesis doctoral. Granada. Universidad de Granada, 1990.

30 Encuesta andaluza en escolares 2006. Consejería de Salud de la Junta de Andalucía. Informe técnico.

2.5. Microbiota cariogénica.

La complejidad y la coexistencia de diferentes ecosistemas en la cavidad oral hace posible, la convivencia de diferentes comunidades de microorganismos, cada una de ellas con sus propias características metabólicas y en delicado equilibrio con el resto y con el hospedador^{31,32}. La proporción y composición en cada uno de esos ecosistemas orales varía en función de múltiples factores como la edad, la dieta, la presencia de caries o enfermedad periodontal, el sometimiento a tratamientos antibióticos previos, estados de inmunosupresión y determinados factores genéticos y raciales^{33,34}.

Dentro del amplio espectro de la microbiota oral, las bacterias del género *Streptococcus* son las más importantes y prevalentes. Englobadas en dicho género se encuentran los estreptococos orales o viridans (Figura 7), que no constituyen un grupo taxonómico independiente como tal, sino que se caracterizan todos por habitar la cavidad oral, siendo de hecho los más abundantes en cualquiera de los ecosistemas orales a excepción del surco gingival.

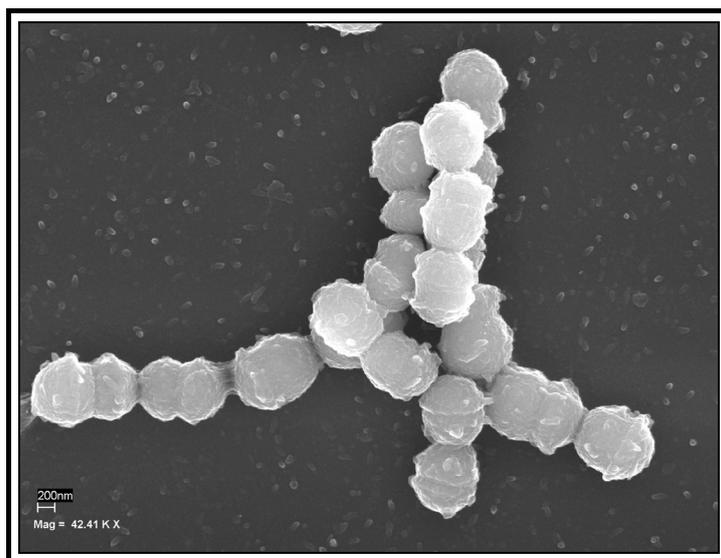


Figura 7. Microscopia electrónica de estrepococos orales.

Gracias a la revolución que han supuesto los avances en biología molecular para la taxonomía, se han producido y se siguen produciendo continuos cambios en la clasificación de las bacterias orales con el fin de agruparlas en función de su

31 Chow A. Infection of the oral cavity, neck and head. In Mandell GL, Benett JE, Dolin R, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5 ed. Philadelphia: Churchill Livingstone 2000, pp:278-326.

32 Brading M, Marsh P. The oral environment: the challenge for antimicrobials in oral care products. Int Dent J 2003; 53:353-363.

33 Marsh P. Oral ecology and its impact on oral microbial diversity. En Kuramitsu HK, Ellen RP, eds. Oral bacterial ecology. The molecular basis. Norfolk: Horizon Scientific Press 1999, pp.11-66.

34 Marcantoni M. Ecología de la cavidad bucal. En Negroni M, ed. Microbiología Estomatológica. Fundamentos y Guía Práctica. Buenos Aires: Panamericana 1999, pp: 23-44.

proximidad genética. Teniendo en cuenta este carácter provisional en la tabla 3 se muestra una división de los estreptococos orales que guardan relación con el hombre. Se han seguido los criterios de Facklam³⁵, por considerarlos los de mayor fiabilidad. Aunque sean de 2002, son universalmente aceptados sin que posteriormente se hayan producido hechos reseñables que alteren su vigencia.

Tabla 3. Clasificación de los estreptococos orales relacionados con el hombre.

Grupo	Especies
<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i> , <i>S. sobrinus</i> , <i>S. criceti</i> , <i>S. rattii</i>
<i>S. salivarius</i>	<i>S. salivarius</i> , <i>S. vestibularis</i> , <i>S. infantarius</i>
<i>S. anginosus</i>	<i>S. constellatus</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. anginosus</i>
<i>S. sanguinis</i>	<i>S. sanguinis</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>S. parasanguinis</i>
<i>S. oralis</i>	<i>S. mitis</i> , <i>S. cristatus</i> , <i>S. infantis</i> , <i>S. peroris</i>

2.5.1. Estreptococos del grupo mutans (EGM).

Estos microorganismos poseen características comunes de los estreptococos y son por tanto bacterias gram positivas, anaerobias facultativas, que se asocian formando parejas o cadenas de cocos y fermentan la glucosa con la producción de ácido láctico.³⁶ Estructuralmente no difieren del modelo general de todos los estreptococos, salvo en la ausencia de cápsula y en que las fimbrias, cuando existen, son poco prominentes. Por el contrario poseen capa mucosa en cuya composición siempre hay glucanos tanto solubles como insolubles, por lo que poseen glucosiltransferasas (GTFs) de bajo y alto peso molecular. Su pared celular posee una serie de polisacáridos de diferente composición, permitiendo en función de la misma distinguir los serotipos a, b, c, d, e, f, g y h. Estos se encuentran presentes de forma variable en las diversas especies y que participan en fenómenos de adhesión inter bacteriana.

Estas y otras características, como la capacidad de producir fructanos, de sintetizar polisacáridos intracelulares y el porcentaje de guanina (G) más citosina (C) en su ADN cromosómico, se recogen en la tabla 4 ordenados según su frecuencia en la cavidad y su cariogenicidad en el hombre.

35 Facklam R. What happened to streptococci overview of taxonomic and nomenclature changes. Clin Microbiol Rev 2002; 15:616-630.

36 Loesche W. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol. Rev 1986; 50:353-380.

Tabla 4. Algunas características diferenciales de los EGM³⁷.

	Fructanos	Polisacáridos intracelulares	Cariogenicidad humana	Serotipos	G+C
<i>S. mutans</i>	+	+	+	c, e, f	36-38
<i>S. sobrinus</i> [#]	-	-	+	d, g	43-46
<i>S. criceti</i>	-	+	D	a	42-44
<i>S. rattii</i>	+	+	D	b	41-43
<i>S. ferus</i>	-	-	-	c	43-45
<i>S. downei</i>	-	-	-	h	41-42
<i>S. macacae</i>	-	-	-	c	35-36

Todas las especies, además de producir glucanos solubles e insolubles, inician su desarrollo a pH 5 y carecen de neuroaminidasas. [#]: produce H₂O₂. +: carácter positivo. -: carácter negativo. D: propiedad débil. G+C: porcentaje de guanina más citosina en su ADN.

Su significación patógena más importante va ligada a la formación de placas y el desarrollo de caries aunque también se relacionan con otros cuadros como gingivitis, abscesos periapicales, pulpitis o celulitis. Por otro lado, a nivel sistémico se encuentran involucrados como agentes causantes de endocarditis cuando se produce una diseminación generalizada desde un foco infeccioso oral³⁸.

Diversos estudios han puesto de manifiesto la prevalencia de las diferentes especies de este grupo en distintos países (Tabla 5)³⁹.

37 Whaley RA, Beighton D. Current classification of the oral streptococci. Oral Microbiol Immunol 1998;13: 195-226.

38 González MA, Gutiérrez J, Maestre JR. Repercusiones generales de la patología infecciosa oral. En Liébana Urefia J, ed. Microbiología oral 2ª edición. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana 2002, pp. 619-629.

39 www.ehu.es/~oivmoral/microral.html. [Acceso Diciembre 2006]

Tabla 5. Prevalencia de los EGM.

Población	<i>S. mutans</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. criceti</i>	<i>S. ratti</i>
Niños (USA)	95	<1	0	<1
Niños (UK)	70	7	0	0
Niños (Canadá)	97	3	0	0
Niños (Japón)	>90	30	0	0
Niños (Tanzania)	0	17	0	20
Niños (China)	58	41	0	<1
Niños (Islandia)	>76	35	0	0
Adultos (USA)	>90	5-10	0-16	0
Adultos (Holanda)	80-100	5-40	0	0
Adultos (Europa)	56	52	3	8
Adultos (A. Saudí)	76	53	0	0
Adultos (Mozambique)	81	26	0	83
Ancianos (Suecia)	72	44	0	0
Ancianos (USA)	>85	7	2	3

2.5.2. Factores de virulencia.

Se trata de aquellas condiciones o características específicas de cada microorganismo que le confieren su capacidad patógena. La mayoría de ellos se relacionan con estrategias para producir ácidos (sobre todo láctico) y resistir las bajadas de pH consiguientes, aunque inicialmente es necesaria la adhesión como paso previo al desarrollo de la biopelícula. A continuación se enumeran los principales factores de virulencia de EGM y seguidamente se describen de forma resumida.

Principales factores de cariogenicidad de EGM.

- Acidogénesis.
- Poder acidúrico.
- Acidofilia.
- Corto efecto post-pH.
- Producción de H_2O_2 por parte de *S. sobrinus*.
- Producción de mutacinas por parte de *S. mutans*.
- Síntesis de polisacáridos extracelulares.
- Producción y movilización de polisacáridos intracelulares.
- Producción de dextranasas y fructanasas.

● *Acidogénesis*, o rápida capacidad de alcanzar el pH crítico de desmineralización de 4.5-5.5.

● *Acidofilia* o habilidad para sobrevivir a pH ácido.

● *Poder acidúrico* o carácter por el que siguen bajando el pH en condiciones de acidez, siendo particularmente intenso en el caso de *S. sobrinus* (SS). En buena medida es debido a los mismos factores que explican la acidofilia y la acidogénesis, que son los siguientes (Figura 8):

- Incremento de la actividad de la ATPasa en el sentido de expulsar protones.
- Eliminación de productos intermediarios de la glucólisis que resultan tóxicos ya que son fuente intracelular de ácidos. Para ello se abre la puerta del lactato por la que son expulsados al exterior. Así por ejemplo, un incremento de fructosa 1, 6 di P activa la lactato deshidrogenasa y el piruvato se convierte rápidamente en lactato. Por otra parte ante circunstancias similares, generalmente por un exceso de azúcar intracelular o de productos intermediarios catabólicos, se activa la piruvatocinasa y el fosfoenolpiruvato (FEP), dejando de participar en el sistema FEPFT, pasa a piruvato, con lo que de esta forma se inhibe una de las vías de ingreso de tal hidrato de carbono.
- Almacenamiento como reserva o como elementos estructurales. Así ante alta disponibilidad de azúcar y probablemente del riesgo de génesis de productos ácidos que tal situación determinaría, estas bacterias sintetizan glucógeno o polisacáridos extracelulares como ya se ha visto.
- Síntesis de proteínas de estrés. Una buena parte de ellas son chaperones, es decir, proteínas que en el caso concreto de una importante acidificación intracelular suprimen o corrigen el plegamiento incorrecto de proteínas no plegadas o parcialmente desnaturalizadas a consecuencia de la bajada del pH.

● *Efecto postpH corto*. Descensos rápidos de pH permiten su recuperación fisiológica rápida. Para ello impiden el ingreso de nuevas moléculas de sacarosa activando la piruvatocinasa o ponen en marcha la formación de aminas primarias mediante decarboxilasas (Figura 8).

● *Producción de agua oxigenada*, que ejercería un papel antagónico sobre microorganismos próximos; esta capacidad la posee sólo SS.

● *Producción de mutacinas* por *S. mutans* (SM); se trata de sustancias de naturaleza peptídica con actividad antimicrobiana que pueden conferir una ventaja ecológica para la colonización y el establecimiento en la placa dental.

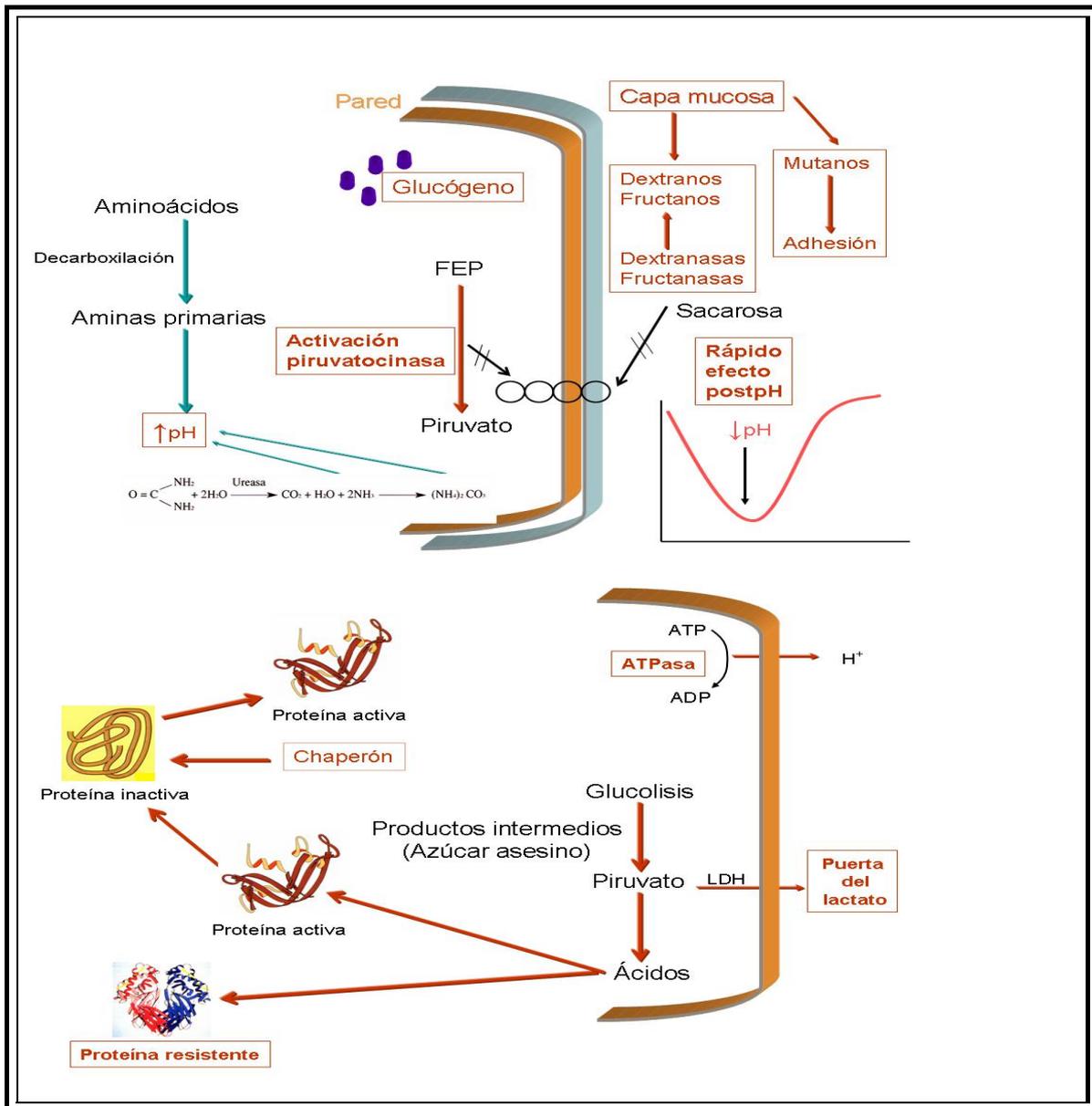


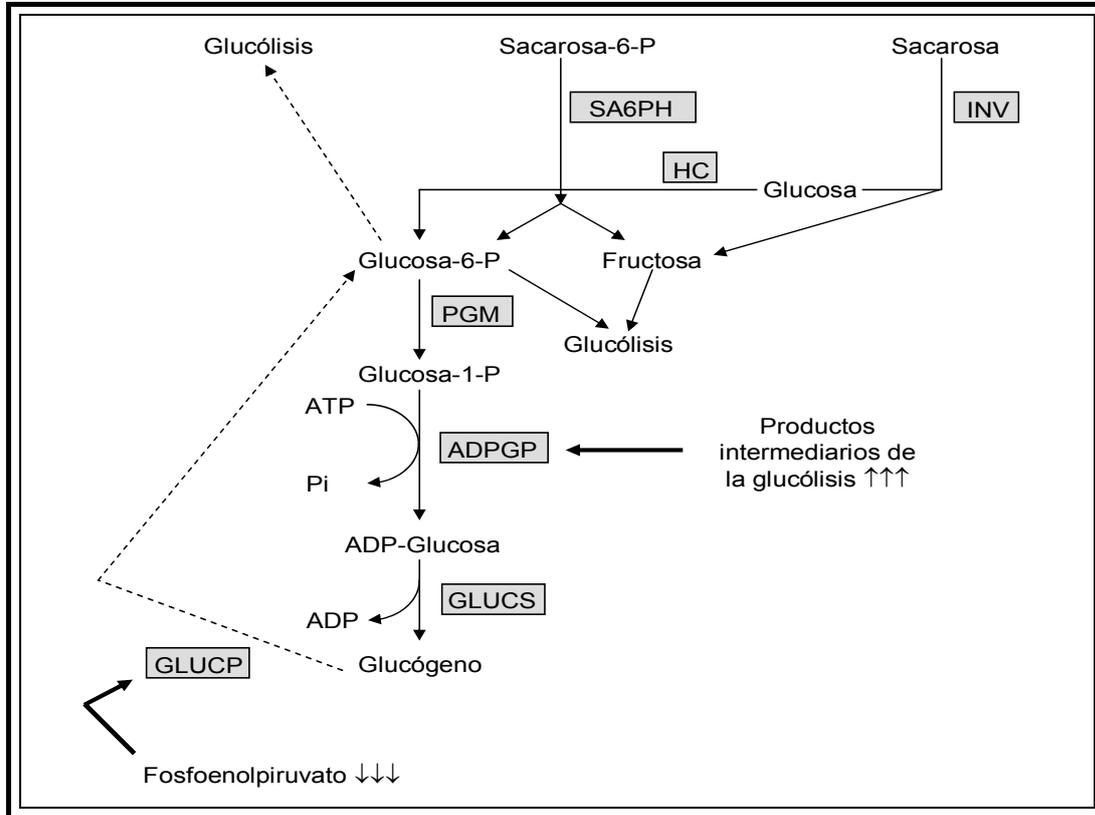
Figura 8. Estrategias bacterianas para producir ácidos y resistir el descenso de pH.

● **Síntesis de capa mucosa** cuando hay una alta disponibilidad de azúcar. Es realizada por las glucosiltransferasas I y II y fructosiltransferasa; esta última sólo producida por SM y *S. rattii* (SR). Pueden ser :

- Solubles: dextranos y fructanos, que pueden movilizarse por dextranasas y fructanasas hasta alcanzar el estado de glúcidos elementales asimilables.
- Insolubles o mutanos, que facilitan la adhesión, agregación y coagregación.

● **Síntesis de polisacáridos intracelulares.** Por lo general son homopolisacáridos y tienen un papel muy importante como reserva nutricional. El proceso se inicia a partir de la glucosa, que se transforma en glucosa-6-P, y luego en glucosa-1-P. Si en el medio se encuentra una concentración elevada de productos intermediarios de la

glucólisis, estos activan a una enzima, la ADP-glucopirofosforilasa, que forma ADP-glucosa y a partir de este compuesto se sintetiza glucógeno (Figura 9). Ante un déficit de sacarosa, estas bacterias pueden metabolizarlo y continuar la producción de ácidos.



SA6PH: sacarosa-6-P hidrolasa. INV: invertasa. HC: hexocinasa. PGM: fosfoglucomutanasa. ADPGP: ADP-glucopirofosforilasa. GLUCS: glucógeno sintetasa. GLUCPCP: glucógeno fosforilasa.

Figura 9. Síntesis y movilización de polisacáridos intracelulares.

(Los datos sobre los factores de virulencia han sido resumidos de Liébana J, Castillo A y Rodríguez-Avial C⁴⁰).

2.5.3. *Lactobacillus* spp y *Actinomyces* spp.

Los lactobacilos poseen mayor capacidad cariogénica que los actinomices por sus especiales propiedades: tienen poder acidogénico y acidúrico, inician su crecimiento a pH 5, son particularmente acidófilicos y ejercen una débil, pero constante, actividad proteolítica. Además algunas cepas sintetizan polisacáridos intra y extracelulares a partir de la sacarosa. Sin embargo se adhieren mal a las superficies duras por lo que suelen utilizar otros mecanismos para colonizar el diente mediante

40 Liébana J, Castillo A, Rodríguez-Avial C. Género *Streptococcus* y bacterias relacionadas. En Liébana J, ed. Microbiología oral 2ª ed. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana 2002.pp. 324-344.

unión física por atrapamiento, bien porque puedan quedar retenidos en determinadas zonas (pe. en fosas y fisuras o cavidades cariadas) o en la malla adherente que otras bacterias constituyen cuando forman las placas dentales⁴¹. Al igual que los EGM, los recuentos, determinados especialmente en medio Rogosa Micchell-Wiseman, sirven como test de actividad de caries.

Por otro lado, sólo algunas especies de actinomicetes se relacionan tangencialmente con el proceso cariogénico (*A. naeslundii* y *A. odontolyticus* como más representativos) y su poder patógeno en este sentido no es muy significativo. Así, algunas cepas producen capa mucosa (a expensas de fructanos con más carácter nutricional que adherente), elaboran ácidos como productos finales, tienen fimbrias, producen ureasa y neuroaminosidasa⁴² y tienen cierta actividad proteolítica, aunque sí son capaces de formar cristales intracelulares que sirven para generar cálculos.

41 Liébana J, Pontón J, Benito de Cárdenas L. Bacilos Grampositivos anaerobios facultativos de interés oral. En Liébana J, ed. Microbiología oral 2ª ed. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana 2002. pp. 345-355.

42. *Ibidem*, pp. 345-355.

2.6. Estreptococos del grupo mutans y su relación con la transmisión y producción de caries.

La implicación de los EGM (especialmente SM) en el proceso cariogénico está ampliamente demostrada⁴³, conociéndose incluso la relación de estos microorganismos en la saliva con el riesgo de padecer enfermedad⁴⁴ y estableciéndose una correlación entre los niveles de EGM y el número de superficies colonizadas⁴⁵. Otros estudios muestran los factores que influyen en la colonización y supervivencia de estas bacterias en la cavidad oral como ocurre por ejemplo con las interacciones microbianas, las fluctuaciones de pH y las concentraciones de carbohidratos⁴⁶.

Igualmente se conoce parte de la epidemiología, incluyendo el predominio de determinadas especies y su principal mecanismo de transmisión⁴⁷. Gracias al desarrollo de múltiples trabajos, basados en estudios fenotípicos y genotípicos, actualmente queda plenamente reconocida la transmisión vertical entre madres e hijos^{48,49,50,51} y en menor proporción entre padres e hijos^{52,53,54}. De hecho hoy en día es aceptada la existencia de una ventana de infectividad para la adquisición inicial de EGM de los niños a través de sus madres y situada por algunos investigadores entre los 19 y 31 meses de edad⁵⁵, tiempo que es aumentado por otros.⁵⁶ Son muchos los factores que influyen en la variabilidad de la transmisión materno-infantil incluyendo: el estado inmunológico del niño, el número de dientes erupcionados, la emergencia de molares, hipoplasias, consumo de sacarosa, factores inmunitarios de mucosa y saliva, susceptibilidad infantil, elevados niveles de EGM maternos, lactancia materna y otros

43 Van Houte J. Role of microorganism in caries etiology. J Dent Res 1994; 73:672-681.

44 Powell Lv. Caries prediction: a review of literature. Community Dent Oral Epidemiol 1998;26:361-371.

45 Lindquist B, Emilson C, Wennerholm K. Relationship between mutans streptococci in saliva and their colonization of the tooth surfaces. Oral Microbiol Immunol 1989; 4:71-76.

46 Bowden G. Survival of oral bacteria. Crit Rev Oral Biol Med 1998; 9: 54-85.

47 Bratthall D. The global epidemiology of mutans streptococci. En: Johnson, NW ed. Risk Markers for oral diseases: Dental Caries. Cambridge: Cambridge University Press 1991:287-312.

48 Rogers AH, The source of infection in the intrafamilial transfer of *Streptococcus mutans*. Caries Res 1981;15:26-31.

49 Berkowitz RJ, Jones P. Mouth-to-mouth transmission of the bacterium *Streptococcus mutans* between mother and child. Arch Oral Biol 1985;30:377-379.

50 Li Y, Caufield P. The fidelity of inicial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. J Den Res 1995; 74:681-684.

51 Soet J, Bokhout B, Buijs J, van Loveren C, de Graaff J, Prah Andersen B. Transmission of mutans streptococci between mothers and children with cleft lip and/or palate. Cleft Palate Craneofac J 1998; 35: 460-465.

52 Kozai K, Nakayama R, Tedjosasongko U, Kuwahara S, Suzuki J, Okada M, Nagasaka M. Intrafamilial distribution of mutans streptococci in Japanese families and possibility of father-to-child transmission. Microbiol Immunol 1999; 43: 99-106.

53 Emanuelsson I, Wang X. Demonstration of identical strain of mutans streptococci within Chinese families by genotyping. Eur J Oral Sci 1998; 106:788-794.

54 Hames-Kocabas E, Ucar F, Kocatas N, Uzel A, Alpöz A. Colonization and vertical transmission of *Streptococcus mutans* in Turkish Children. Microbiol Res. 2006. Article in press. Available on line in www.sciencedirect.com.

55 Caufield P, Cutter G, Desanayake A. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. J Dent Res 1993; 72: 37-45.

56 Klein M, Florio F, Pereira A, Hofling J, Goncalves R Longitudinal study of transmission, diversity, and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes in Brazilian nursery children. J Clin Microbiol. 2004;42:4620-4626.

intrínsecos a las cepas bacterianas transmitidas relacionados con sus factores de virulencia.⁵⁷

La transmisión de EGM se lleva a cabo de forma directa (pe. un beso) o indirecta (pe. cucharas, chupetes o tetinas del biberón). Aun así existen algunas otras fuentes pero no están bien documentadas. Lógicamente esta adquisición debe ser vehiculizada a través de la saliva, en la cual están representados microorganismos de los principales ecosistemas de la cavidad oral, siendo necesario además unos niveles mínimos para que pueda tener lugar la transmisión.

Además de la transmisión vertical, se ha demostrado la transmisión horizontal entre esposos⁵⁸ y se han descrito diversos casos entre niños de guarderías de Brasil⁵⁹, Japón⁶⁰ o China⁶¹, pero poco es sabido acerca de las interacciones en adultos en el desarrollo de su actividad profesional o en niños escolarizados. Con respecto a los niños en edad escolar ha sido descrita una segunda ventana de infectividad^{62,63} entre los 6-12 años coincidiendo con los períodos de recambio y la erupción de los molares permanentes, también producida a través de la saliva y desde diversas fuentes.

Independientemente del tipo de vía por la que ha tenido lugar la transmisión, una vez que el microorganismo entra en contacto con la cavidad oral del nuevo hospedador se pondrán en juego los factores de virulencia bacterianos frente a los de resistencia del individuo que determinarán la posibilidad de una colonización, de una permanencia o estabilidad en este medio y de la aparición o no de enfermedad oral. En este sentido, entre los factores que favorecen la colonización de una cepa se encuentra el elevado poder de adhesión de los EGM que aumenta su capacidad de supervivencia y persistencia en la cavidad oral. De hecho algunos clones alcanzan grados de colonización tan estables que llega a ser muy difícil su completa eliminación de la boca. Un ejemplo clásico fue el de un genotipo de SM que, presente en un sujeto antes de ser tratado con barniz de clorhexidina, recolonizó posteriormente su cavidad oral, aunque también se aislaron otros diferentes.⁶⁴ Así, si un clon de gran virulencia se establece sobre una superficie dentaria, en principio se puede considerar que va a

57 Napimoga MH, Höfling JF, Klein M, Kamiya R, Goncalves RB. Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. J Oral Science 2005; 47: 59-64.

58 Kohler B, Lundberg A, Birkhed D, Papapanou PN. Longitudinal study of intrafamilial mutans streptococci ribotypes. A Eur J Oral Sci. 2003;111:383-389.

59 Mattos-Graner R, Li Y, Caufield P, Duncan M, Smith D. Genotypic diversity of mutans streptococci in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. J Clin Microbiol 2001;39:2313-2316.

60 Tedjosasonko U, Kozai K. Initial acquisition and transmission of mutans streptococci in children at day nursery. ASDC J Dent Child 2002; 69: 284-288.

61 Yuan L, Jing Z, Ran S, Xue D. Genotypic diversity of *Streptococcus mutans* in 3-to-4-year-old Chinese nursery children suggests horizontal transmission. Arch Oral Biol 2007;81: 1904-1910.

62 Straetemans MM, Van Loveren C, de Soet JJ, de Graaff J, ten Cate JM. Colonization with mutans streptococci and lactobacilli and the caries experience of children after the age of five. J dent Res 1998; 77:1851-1855.

63 Lindquist B, Emilson C. Colonization of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes and caries development in children to mothers harboring both species. Caries Res. 2004;38:95-103.

64 Kozai K, Wang DS, Sandham HJ, Philips HI. Changes in strains of mutans streptococci by treatment with chlorhexidine varnish. J Dent Res 1991; 70:1252-1257.

permanecer un largo periodo de tiempo, haciendo que ese individuo deba considerarse de alto riesgo de caries y un posible reservorio de enfermedad.

2.7. Tipificación de los estreptococos del grupo mutans.

La tipificación es el único método que permite el seguimiento epidemiológico de los microorganismos, pudiendo realizarse por métodos fenotípicos y genotípicos. En este sentido se han publicado en las últimas décadas un amplio número de trabajos en relación a los EGM.

2.7.1. Fenotipia.

Entre las diversas metodologías utilizadas destacan:

➤ Bacteriocinotipia. Fue una de las primeras formas de tipificación con fines epidemiológicos^{65,66,67,68,69,70,71}. Desde entonces se han publicado numerosos trabajos que tienen su base en la producción o sensibilidad a estas sustancias proteicas de elevado peso molecular, empleando bien cepas estándar bacteriocenógenas o susceptibles. Sin embargo son técnicas complejas y que a menudo suelen dar como resultado una excesiva diversificación de bacteriocinotipos que no se corresponde con la realidad genética⁷², por ello la tendencia actual es su abandono.

➤ Serotipia. En 1969 Bratthall⁷³ publicó los resultados obtenidos empleando la inmunodifusión radial y al año siguiente describió cinco grupos serológicos⁷⁴. Estudios posteriores como los efectuados por los grupos de Perch⁷⁵ y Beighton⁷⁶, sirvieron para distinguir un total de ocho serotipos. Esta clasificación se basa en los carbohidratos antigénicos de la pared bacteriana. La primitiva diferenciación por serotipos dentro de los EGM, hoy es de muy escaso valor ya que cada uno de ellos ha sido incorporado a las distintas especies (véase tabla 4). Así por ejemplo, si bien las cepas de SM pueden pertenecer a los serotipos c, e y f, otras como las de *S. criceti* (SC), SR, *S. downei* (SD) y *S. macacae* (SMA) solo poseen uno y las de SS, aunque la mayoría se incluyen como d o g, a veces carecen de estos polisacáridos de pared.

65 Kelstrup J, Gibbons RJ. Bacteriocins from human and rodent streptococci. Arch. Oral Biol. 1969;14:251-258.

66 Hamada S, Ooshima T. Production and properties of some bacteriocins of *Streptococcus mutans*. Arch. Oral Biol 1975;20:641-648.

67 Ikeda T, Koulourides T, Kurita T, Housch T, Hirasawa M. Anti-dental caries effect in rats and man of a bacteriocin purified from the oral bacterium *Streptococcus mutans* C3603. Arch. Oral Biol 1985 ;30:381-384.

68 Hamada S, Ooshima T. Production and properties of some bacteriocins of *Streptococcus mutans*. Arch. Oral Biol. 1975; 20:641-648.

69 Rogers AH. Bacteriocinogeny and the properties of some bacteriocins of *Streptococcus mutans*. Arch. Oral Biol 1976; 21:99-104.

70 Rogers AH. Bacteriocin patterns of strain belonging to various serotypes of *Streptococcus mutans*. Arch. Oral Biol 1976; 21:243-249.

71 Baca P, Liébana J, Piédrola G. Epidemiological application of a new bacteriocin typing scheme for *Streptococcus mutans*. Community Dent Oral Epidemiol 1990; 18:194-196.

72 Longo PI, Mattos-Graner RO, Mayer MPA. Determination of mutacin activity and detection of mut A genes in *Streptococcus mutans* genotypes from caries-free and caries-active children. Oral Microbiol Immunol 2003;18:144-149.

73 Bratthall D. Immunodiffusion studies on the serological specificity of streptococci resembling *Streptococcus mutans*. Odontol Rev 1969; 20:231-243.

74 Bratthall D. Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling *Streptococcus mutans*. Odontol Rev 1970; 21:143-152.

75 Perch B, Kjems E, Ravn T. Biochemical and serological properties of *Streptococcus mutans* from various human and animal sources. APMIS 1974; 82:357-370.

76 Beighton D, Hardie JM, Whiley RA. A scheme for identification of viridans streptococci. J Med Microbiol 1999; 35:367-372.

➤ Biotipia. Un grupo de investigación de la Universidad de Granada ha publicado⁷⁷ un esquema de biotipia, utilizando para ello la detección de enzimas preformadas mediante el sistema API ZYM. De la tarjeta original se seleccionaron las enzimas aril amidasa, fosfatasa ácida y alfa-galactosidasa, que permiten la descripción de 8 biotipos. Desgraciadamente después de su aplicación a más de 2000 cepas, se obtiene un bajo nivel discriminatorio, pues casi todos los aislados se incluyen en un número muy restringido de biotipos.

➤ Otros métodos fenotípicos incluyen el análisis de ácidos grasos, análisis proteínico y la electroforesis enzimática multilocus (MEE, del inglés *multilocus enzyme electrophoresis*).

2.7.2. Genotipia.

Aunque el estudio de los caracteres fenotípicos es útil desde el punto de vista económico, poseen baja reproducibilidad así como escaso poder discriminatorio⁷⁸. Los métodos genéticos de tipificación no suelen plantear estos problemas⁷⁹. Los más frecuentemente empleados para los EGM son los siguientes:

➤ Análisis de plásmidos. Fue la primera de las técnicas basadas en ADN aplicada en estudios epidemiológicos⁸⁰, sin embargo, a causa del bajo porcentaje de cepas de EGM que portan estos elementos⁸¹, dicha técnica no se difundió.

➤ Análisis con endonucleasas de restricción (*REA, restriction endonucleases análisis*). Estas enzimas cortan en distintos puntos el ADN cromosómico bacteriano. Los fragmentos se separan por electroforesis en gel de agarosa que contiene bromuro de etidio para su revelado bajo luz ultravioleta. Debido a la especificidad del reconocimiento y corte de las enzimas, los patrones de bandas se pueden comparar. Ha sido utilizada con éxito tanto en la genotipificación de los EGM, bien de forma individual^{82,83,84,85,86} o asociada a la AP-PCR (véase después)^{87,88}, como para identificar

77 De la Higuera A, Gutiérrez J, Liébana J, García-Mendoza A, Castillo A. A new bio typing method for *S. mutans* with the API ZYM system. Clin Microbiol Infect 1999; 5:88-91.

78 Poyart C, Gilles Q, Coulon S, Berche P, Trieu-Cout P. Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. J Clin Microbiol 1997; 36: 41-47.

79 Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. J Clin Microbiol. 1999 ; 37:1661-1669.

80 Caufield P, Wannemuehler YM, Hansen JB. Familial clustering of the *Streptococcus mutans* cryptic plasmid strain in a dental clinic population. Infect Immun 1982; 38:785-787.

81 Hamada S, Slade HD. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev 1980; 44: 331-384.

82 Kozai K, Nakayama R, Tedjosongko U, Kuwahara S, Suzuki J, Okada M, Nagasaka N. Intrafamilial distribution of mutans streptococci in Japanese families and possibility of father-to-child transmission. Microbiol Immunol 1999; 43:99-106.

83 Emanuelsson I, Thornqvist E. Genotypes of mutans streptococci tend to persist in their host for several years. Caries Res 2000; 34:133-139.

84 Emanuelsson IR, Thornqvist E. Distribution of mutans streptococci in families: a longitudinal study. Acta Odontol Scand 2001; 59: 93-99.

85 Nie M, Fan M, Bian Z. Transmisión of mutans streptococci in adults within a Chinese population. Caries Res 2002; 36:161-166.

especies del grupo^{89,90}. Su mayor inconveniente radica en la gran cantidad de bandas que se obtienen y la correcta interpretación de las mismas. Esta dificultad se evita reduciendo el número de enzimas y usando las adecuadas a cada caso. Hoy sigue siendo una técnica de referencia.

➤ Análisis de fragmentos de restricción de longitud variable o polimórfica (*RFLP*, *restriction fragment length polymorphism*). Tras la separación del ADN cromosómico de la bacteria, el producto es cortado con enzimas de restricción. En un paso siguiente se realiza la separación en gel de agarosa, transfiriendo luego a membrana de nitrocelulosa.

➤ Ribotipia es una variación del RFLP, en la que las sondas derivan de los genes que codifican el ARN ribosómico de 16S y 23S; de esta manera el número de bandas es pequeño, simplificando la interpretación. Sin embargo se limita la capacidad de distinguir a dos cepas muy relacionadas. Ha sido utilizada por algunos autores para estudios de transmisión y estabilidad de la infección^{91,92}.

➤ Electroforesis en gel de campos pulsátiles (*PFGE*, *pulsed field gel electrophoresis*). Es una variación de la electroforesis en gel de agarosa en la que la polaridad del campo eléctrico que atraviesa el gel cambia periódicamente (pulso), de esta manera grandes fragmentos de ADN bacteriano pueden ser analizados por REA. Esta técnica es considerada como la más importante de los métodos de tipificación genética, con excelente poder discriminatorio y reproducibilidad; tiene el inconveniente de una larga duración, ya que la mayoría de los protocolos basados en ella requieren más de 4 días para obtener y analizar los pulsotipos, por lo que no se ha difundido en el estudio de EGM, con la excepción de pocos trabajos⁹³.

➤ Rep-PCR. Se trata de una PCR convencional en la que se usan cebadores que hibridan con secuencias de ADN repetidas o repetitivas (secuencias rep) que se encuentran distribuidas en el cromosoma bacteriano. Con esta técnica se amplían las regiones que se encuentran separadas por las secuencias rep, por lo que el

86 Tedjosasongko U, Kozai K. Initial acquisition and transmission of mutans streptococci in children at day nursey. *ASDC J Dent Child* 2002; 69: 234-235.

87 Emanuelsson I. Mutans streptococci in families and on tooth sites. Studies on the distribution, acquisition and persistence. *Swed Dent J Suppl* 2001; 148:1-66.

88 Emanuelsson I, Carlsson P, Hamberg K, Bratthal D. Tracing genotypes of mutans streptococci on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:24-29.

89 Li Y, Caulfield P, Emanuelsson IR, Thornqvist E. Differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* via genotypic and phenotypic profiles from three different populations. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16:16-23.

90 Sato T, Hu JP, Ohki K, Yamaura M, Washio J, Matsuyama J, Takahashi N. Identification of mutans streptococci by restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal 16S RNA genes. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:323-326.

91 Saarela M, Alaluusua S, Takei T, Asikainen S. Genetic diversity within isolates of mutans streptococci recognized by an rRNA probe. *J Clin Microbiol* 1993; 31:584-587.

92 Alaluusua S, Alaluusua SJ, Karjalainen J, Saarela M, Holttinen T, Kallio M, Hölttä P, Torkko H, Relander P, Asakainen S. The demonstration by ribotyping of the stability of oral *Streptococcus mutans* infection over 5 to 7 years in children. *Arch Oral Biol* 1994; 39: 467-471.

93 Rudney JD, Neuvar EK, Soberay AH. Restriction endonuclease-fragment polymorphisms of oral viridans streptococci, compared by conventional and field-inversion gel electrophoresis. *J Dent Res* 1992; 71:1182-1188.

polimorfismo resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y de la distancia entre copias contiguas causadas por inserciones o deleciones en su ADN. Tampoco esta técnica ha tenido mucha difusión en la genotipia de estreptococos orales.^{94,95}

➤ Reacción en cadena de la polimerasa con cebador de hibridación al azar (AP-PCR, *Arbitrarily primed polymerase chain reaction*). Es de los métodos de genotipificación aplicados en EGM, el menos laborioso y puede ejecutarse en muestras de muy pequeño volumen. La reacción en cadena de la polimerasa se realiza en condiciones especiales de temperatura y tiempo y los cebadores son oligonucleótidos de 9 a 10 bases (Figura 10). El resultado de la amplificación es una serie ordenada de fragmentos de ADN, de acuerdo con su peso molecular, que pueden ponerse de manifiesto a través de una electroforesis cuyo patrón de bandas resulta característico para cada cepa (Figura 11). Por esa razón se la conoce como *RAPD* o *RAPDNA* (*Random amplified polymorphic DNA*) o también como ADN polimórfico por amplificación al azar.

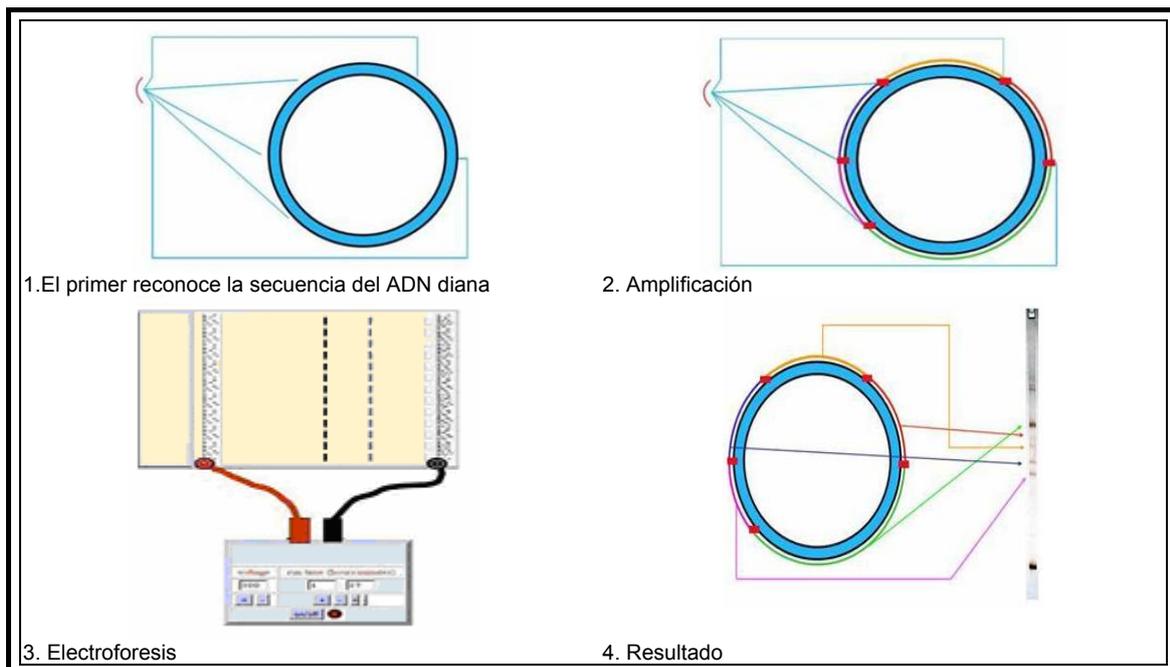


Figura 10. Fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa con cebador de hibridación al azar (AP-PCR o RAPDNA).

94 Paddick J, Brailsford S, Kidd E, Gilbert S, Clark D, Alam S, Killick Z, Beighton D. Effect of the environment on genotypic diversity of *Actinomyces naeslundii* and *Streptococcus oralis* in the oral biofilm. *Appl Environ Microbiol* 2003; 11:6475-6480.

95 Paddick J, Brailsford S, Kidd A, Beighton D. Phenotypic and genotypic selection of microbiota surviving under dental restorations. *Appl Environ Microbiol* 2005; 10: 2467-2472.

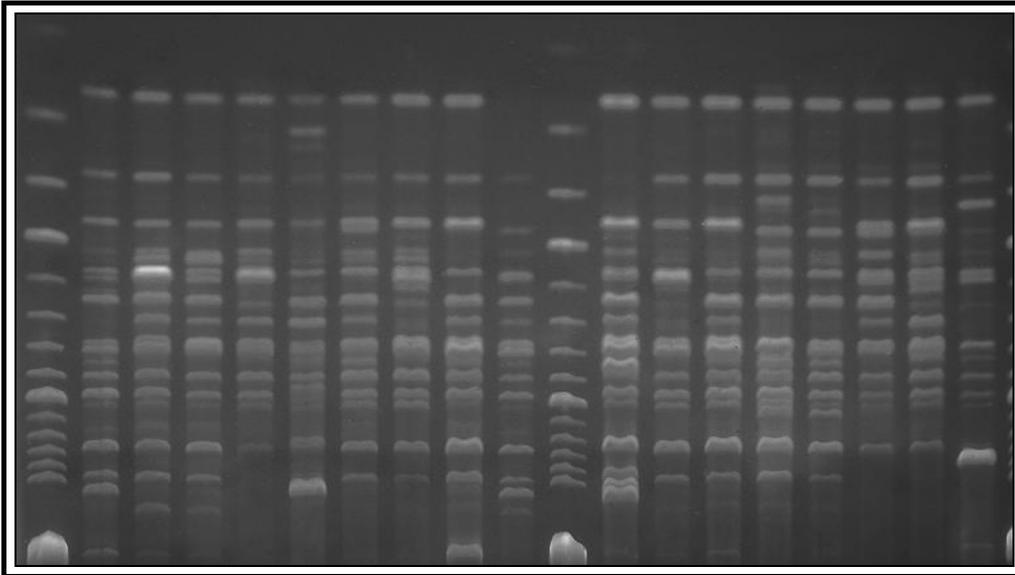


Figura 11. Bandas resultantes tras la amplificación con AP-PCR.

Como esta técnica no requiere del conocimiento previo del ADN que será analizado, pierde sensibilidad, así como reproducibilidad media entre laboratorios distintos, sin embargo, otros autores, opinan que tiene un poder de discriminación similar a RFLP, cuando emplean un cebador útil para estudiar EGM y comparan los resultados con aquella técnica patrón. Li y Caufield en 1998⁹⁶, analizaron un panel de 40 oligonucleótidos diferentes con el fin de encontrar cebadores de potencial uso en AP-PCR. Los resultados obtenidos por estos autores demostraron que, el llamado OPA-02 (5'-TGCCGAGCTG-3'), podía discernir entre dos cepas distintas relacionadas genéticamente. Los productos de amplificación (en inglés *amplicons*) eran un promedio de 8 a 12 bandas, con un tamaño que varió entre 50 a 2200 pares de bases. Al comparar los resultados obtenidos por esta metodología y por REA, en relación con el grado de similitud de los patrones de bandas obtenidos, fue para esta última de 0,69 y para la primera de 0,74, demostrando la validez de la técnica y de la capacidad del cebador para distinguir dos cepas muy relacionadas. Dos años antes, Saarela y cols.⁹⁷ realizaron una experiencia similar, para ello compararon AP-PCR con ribotipia y evaluaron 10 oligonucleótidos, como potenciales cebadores de hibridación al azar. Estudiaron OPA-01, OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-05, OPA-06, OPA-07, OPA-08, OPA-13 Y OPA-17, hallando mayor capacidad de discriminación con OPA-05 (5'-AGGGGTCTTG-3') y OPA-013 (5'-CAGCACCCAC-3'). Al analizar 127 cepas encontraron 40 ribotipos diferentes y 33 cuando se estudió con AP-PCR por lo que

96 Li Y, Caufield P. Arbitrarily primed polymerase chain reaction fingerprinting for the genotypic identification of mutans streptococci from humans. *Oral Microbiol Immunol* 1998; 13:17-22.

97 Saarela M, Hannula J, Mättö J, Asikainen S, Alaluusua S. Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Arch Oral Biol* 1996; 41: 821-826.

concluyeron que, a pesar de ser la ribotipia una técnica de mayor poder de discriminación, AP-PCR tiene buen poder de diferenciación entre clones y su simplicidad la hace aconsejable en estudios epidemiológicos y taxonómicos.

Aparte de los artículos, que acaban de ser comentados de Saarela y cols y Li y Caufield, a continuación, en la tabla 6, se hace un resumen esquemático de los trabajos más significativos publicados al respecto sobre la genotipificación de los EGM donde se ponen de manifiesto las diferencias metodológicas entre los distintos laboratorios. La mayoría de ellos se han seleccionado bien por su relación con los objetivos propuestos, o bien por la importancia de los EGM en la génesis de la caries dental. Se localizaron a través de una búsqueda Medline (1990-2007) con las siguientes estrategias de búsqueda: *mutans streptococci and dental caries*, *mutans streptococci and ADN*, *mutans streptococci and genotypes*, *mutans streptococci and AP-PCR*, *mutans streptococci and transmissions*, *mutans streptococci and saliva*, *mutans streptococci and plaques*, *mutans streptococci and colonization*, *mutans streptococci and diversity*; *mutans streptococci and virulence factors* y *mutans streptococci and stability*.

Tabla 6. Resumen esquemático de algunos trabajos sobre la genotipificación de EGM.

Referencia Año	Población y tiempo de seguimiento	Metodología y tipo de estudio	Resultados y conclusiones
Li Y, Caufield P.1995 ⁹⁸	34 parejas de madres-hijos. Madres con 24 años de alto riesgo de caries.	Estudio longitudinal. Muestras de saliva y placa. Niños desde los 0 a los 3 años. Toma de muestras cada 3 meses. Cultivo en MSB. Utilizan REA, cortan el ADN cromosómico con la enzima <i>Hae III</i> . Realizan análisis visual de bandas. Consideran identidad genética cuando en los geles, 9 de 10 bandas eran iguales.	En el 71% de los casos los genotipos de los niños son idénticos a los de las madres. La coincidencia es mayor para las niñas que para los varones: 88% vs 53%. Ello les hace concluir que la transmisión pudiera ser género específica.
Grönroos L, Saarela M, Mätö J y cols.1995 ⁹⁹	34 madres embarazadas con tomas antes del parto, a los seis meses y al año de edad de sus hijos.	Estudio longitudinal. Muestras de saliva. Cultivo en MSB. Estudio de sensibilidad a la clorhexidina sobre 379 colonias. Se hace serotipia y cuando en un mismo sujeto se obtienen iguales serotipos pero diferente CMI entonces se hacía ribotipia a esas colonias.	En 7 de las madres se encontraron diferencias de CMI para la clorhexidina y tenían distinto ribotipo pesar de tener el mismo serotipo.

98 Li Y Caufield P. The fidelity of inicial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. J Den Res 1995;74:681-684.

99 Grönroos L, Saarela M, Mätö J, Luoma A, Jousimies-Somer H, Pyälä L, Asikainen S, Alaluusua S. Chlorhexidine susceptibilities of mutans streptococcal serotypes and ribotypes. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39(4): 894-898.

Alaluusua S, Mättö J, Grönroos L y cols.1996 ¹⁰⁰	12 parejas de madres-hijos, Niños de 1.5 a 3 años. 6 de ellos presentaban caries del biberón (grupo NCB) y 6 estaban libres de caries (grupo NLC).	Estudio transversal. Muestras de placa de superficies sanas y cariadas. Cultivo en MSB. A las madres se les realizó recuentos de EGM en saliva. Usan ribotipia, el corte del ARN lo realizan con la enzima <i>Hind III</i> e hibridan con el plásmido pKK3535.	Siete niños (58,33%) poseían 1 ribotipo, cinco más de 1 (41,67%), de estos, cuatro padecían NCB (80%) y uno pertenecía al grupo NLC. Ocho madres (66,67%) tenían más de un ribotipo, las de los niños con NCB eran las que poseían un mayor número. Ribotipos similares encontraron en cuatro niños con caries y sus madres y en cuatro sanos y las suyas. Las parejas con NCB tenían mayores recuentos y mayor variabilidad que las NLC. Señalan que hay una relación directa entre recuentos y variabilidad genética.
Emanuelsson I, Wang X.1998 ¹⁰¹	18 familias chinas que incluyen padres, madres e hijos de 3 años.	Estudio transversal. Muestras de placa. Cultivo en MSB. Emplean REA cortando el ADN cromosómico con la enzima <i>Hae III</i> .	Aislaron EGM en once familias (61,1%). En cuatro, las madres e hijos compartían genotipos. En tres ocurría entre padres e hijos. En dos familias todos sus miembros tenían los mismos genotipos. En una solo los compartían los esposos y en otra ninguno. Concluyen que hay divergencias en la transmisión intrafamiliar entre caucásicos y chinos.
Grönroos L, Saarela M, Mättö J y cols. 1998 ¹⁰²	Estudian 20 parejas madre-hijo. En 5 parejas se repite el estudio fenotípico a los 5 y 7 años.	Estudio longitudinal. Toman muestras de placa de los niños y a las madres de saliva. Cultivan en MSB. A un total de 145 colonias de EGM se les realiza ribotipia, serotipia y se cataloga el grado de actividad de las mutacinas.	Los ribotipos idénticos tenían similar grado de actividad de mutacina. Se probó la transmisión en 9 de la 20 parejas madre-hijo.
Kozai K, Nakayama R, Tedjosasongko U y cols. 1999 ¹⁰³	20 familias japonesas con 36 de sus hijos.	Estudio transversal. Muestras de placa. Cultivo en MSB. Utilizan REA con las enzimas EcoRI, <i>Hind III</i> y <i>Hae III</i> para cortar el ADN.	Se aislaron un total de 144 genotipos diferentes; de 1 a 4 por individuo y hasta 7 por familia. El 51.4% de los genotipos en niños coincidían con los maternos y el 31.4% con los paternos. También se comprobó homología de cepas entre dos parejas de esposos.

100 Alaluusua S, Mättö J, Grönroos L, Innilä S, Torkko H, Asikainen S, Jousimies-Somer H, Saarela M. Oral colonization by more type of mutans streptococcus in children with nursing-bottle dental caries. Arch Oral Biol 1996;41:167-173.

101 Emanuelsson I, Wang X. Demonstration of identical strain of mutans streptococci within Chinese families by genotyping. Eur J Oral Sci 1998; 106:788-794.

102 Grönroos L, Saarela M, Mättö J, Tañer-Salo U, Vuorela A, Alaluusua S. Mutacin production by *Streptococcus mutans* may promote transmisión of bacteria from mother to child. Infect Immunol 1998; 66: 2595-2600.

103 Kozai K, Nakayama R, Tedjosasongko U, Kuwahara S, Suzuki J, Okada M, Nagasaka N.

Intrafamilial distribution of mutans streptococci in Japanese families and possibility of father-to-child transmission. Microbiol Immunol 1999; 43: 99-106.

<p>Li Y, Wang W, Caufield P. 2000¹⁰⁴</p>	<p>48 madres, 42 padres y 50 niños (27 niños varones y 23 niñas, de ellos había 2 gemelos).</p>	<p>Estudio transversal. En el cuestionario incluyen el tipo de lactancia, materna o artificial. Toma de muestras de placa de superficies proximales en dientes superiores e inferiores. Realizan cultivo en medio MSB. Utilizan REA, cortando el ADN cromosómico con la enzima <i>Hae III</i>, simultaneándola con AP-PCR según método de Li y Caufield de 1998 con el primer OPA-O2. Las imágenes las digitalizaron y fueron analizadas con un programa computarizado.</p>	<p>Existe un incremento de SM a medida que aumenta la edad de los niños posiblemente porque lo hace el número de dientes en boca aunque el estudio no apoya esta hipótesis. Piensan que la transmisión madre-hijo ocurre a los dos años Demuestran que la alimentación de pecho influye en la transmisión de SM de la madre a los niños y que la colonización temprana aumenta el riesgo de desarrollar caries.</p>
<p>Emanuelsson I, Thornqvist E. 2000¹⁰⁵</p>	<p>Participaron en el estudio 11 familias, madres, padres (salvo uno) y niños. Tras el estudio inicial, realizaron dos nuevos exámenes a los 2 y 5 años.</p>	<p>Estudio longitudinal. Tomas de muestras de saliva y de placas de superficies bucales y oclusales. Cultivo en MSB. Emplean REA, usando la enzima <i>Hae III</i> para cortar el ADN cromosómico.</p>	<p>Encuentran de 1 a 4 genotipos de SM por individuo. Los veintiuno adultos preservaban sus genotipos, aunque nueve perdieron 1 y cuatro adquirieron al menos otro. En los niños, nueve de once conservaban los genotipos, pero dos adquirieron 1, dos perdieron otro y uno de ellos ganó 2. Concluyen que la estabilidad de los genotipos adquiridos de los padres en niños de 3 a 8 años es alta. No excluyen sin embargo otras fuentes de transmisión.</p>
<p>Grönroos L, Alaluusua S. 2000¹⁰⁶</p>	<p>7 niños de 3 a 7 años, con caries activas.</p>	<p>Estudio transversal. Muestras en 7 niños de 50 sitios de placas en dientes cariados y sanos. En 5 de los sujetos también se tomaron muestras salivares. Cultivo en MSB. Utilizaron AP-PCR con el primer OPA-O5 .</p>	<p>De un total de 598 aislamientos estudiaron 114 correspondiendo a SS y SM. En 6 muestras de dos niños diferentes (42%) aislaron tanto SS como SM, pero en otras 6 muestras también de dos niños diferentes (42%) no se detectó SS. Encontraron 13 perfiles representativos para SM y 2 para SS. Dos niños presentaban 1 genotipo de SM, tres 2, uno 3 y otro 4. En dos de las muestras de saliva no se detectaron los genotipos hallados en las placas. El 80% sí estaban en saliva. Sugieren que determinados clones de SM tienen preferencia para colonizar tejidos específicos.</p>

104 Li Y. Wang W. Caufield, P. The fidelity of mutans streptococci, transmission and caries status correlate with breast-feeding experience among chinese families. *Caries Res* 2000;34:123-132.

105 Emanuelsson I., Thornqvist E. Genotypes of mutans streptococci tend to persist in their host for several years. *Caries Res* 2000;34:133-139.

106 Grönroos L, Alaluusua S. Site-specific oral colonization of mutans streptococci detected by arbitrarily primed PCR fingerprinting. *Caries Res* 2000;34:474-480.

<p>Truong TL, Menard C, Mouton C y cols. 2000¹⁰⁷</p>	<p>Analizan 45 cepas de referencia: 25 de ellas de SM, 15 de otros EGM y 5 de otras especies. Igualmente estudian 81 cepas de EGM procedentes de 41 pacientes adultos.</p>	<p>Estudio transversal. En los pacientes las tomas de muestras la hicieron de placas. Emplean para el aislamiento MSA y TYE + glucosa 0.5%. Usan AP-PCR con tres primers 970-11, OPA-03 y OPA-18. Realizan análisis visuales de los genotipos aislados en los pacientes tomando como base los de las cepas conocidas.</p>	<p>Concluyen que la AP-PCR es una técnica muy útil para identificar y subclasificar estreptococos orales.</p>
<p>Emanuelsson I, Thornqvist E. 2001¹⁰⁸</p>	<p>6 niñas y 7 varones de 3 años al inicio. Reexaminados a los dos o cinco años.</p>	<p>Estudio longitudinal. Toma muestras de saliva y placa. Cultivo en MSB. Realizan RAE con la enzima <i>Hae III</i>. Hicieron análisis visual para establecer la identidad genotípica.</p>	<p>Durante el periodo de estudio el primer molar había hecho erupción en nueve niños pero sólo tres de ellos mostraron SM en las muestras de placa. Hacen referencia a un segundo periodo de infectividad en estas edades después del primero que acontece a los 26 meses. Establecen tres modelos diferentes de transmisión: madre-hijos, padre-hijos y parientes-niños. Resaltan la importancia de la adquisición de SM desde el ambiente extrafamiliar.</p>

107 Truong T, Menard C, Mouton C, Trahan L. Identification of mutans and other oral streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis. J Med Microbiol. 2000 ;49:63-71.

108 Emanuelsson I, Thornqvist E. Distribution of mutans streptococci in families: a longitudinal study. Acta Odontol Scand 2001;59:93-98.

<p>Li Y, Caufield P, Redmo Emanuelsson I y cols. 2001¹⁰⁹</p>	<p>30 cepas:10 de colección y 20 de aislados clínicos</p>	<p>Estudio transversal. Analizan cinco técnicas: biotipia, serotipia, G+C, CDF y AP-PCR. Con la enzima <i>Hae III</i> hacen dos grupos: *Tipo 1: CDF-1 cuando en los patrones de bandas hay fragmentos mayores o iguales a 6.6 Kb. * Tipo 2: CDF-2 cuando solo hay bandas inferiores a 6.6 Kb. Los serotipos de las 10 cepas de referencia eran conocidos y empleados como estándar. De las 20 cepas procedentes de aislados clínicos, 10 eran del grupo CDF-1 y las otras 10 del grupo CDF-2. Todas ellas fueron serotipadas con antisuero de inmunofluorescencia. Las 30 cepas fueron estudiadas con pruebas bioquímicas por el sistema Minitek Differentiation Systems. Evalúan el contenido de G+C para incluir las cepas como SS o SM. Realizan AP-PCR según el trabajo de Li y Caufield de 1998. Digitalizan los patrones de bandas y efectúan una lectura visual y mediante un programa computarizado para determinar la similitud de los perfiles.</p>	<p>Señalan que hay relación entre CDF y serotipos mientras que no existe con los biotipos. Comparando AP- PCR con CDF, indican que hay una concordancia en el 100% con los dos métodos para precisar diferenciar SS y SM. Detectan que en CDF-1 siempre esta presente un fragmento de 782pb y en el CDF-2 uno de 1070 pb. Los dos fragmentos son únicos para cada especie Vistos sus resultados sugieren que la AP-PCR es una alternativa para la identificación de SS y SM.</p>
<p>Mattos-Graner R, Li Y, Caufield P y cols. 2001¹¹⁰</p>	<p>35 niños de entre 12 y 30 meses que convivían en una guardería de la ciudad de Piracicaba, Brasil.</p>	<p>Estudio transversal. Se basa en la detección de genotipos en los niños que no son detectados en sus madres. Con un depresor de lengua toman la muestra de saliva y luego presionan sobre medio MSB. Genotipan con AP-PCR según estudio de Li y Caufield de 1998, empleando el primer OPA-O2. Digitalizan las imágenes y analizan los patrones de bandas con un programa digitalizado. Utilizan el coeficiente de Dice. Los perfiles similares son también analizados por RFLP con la enzima <i>Hae III</i>.</p>	<p>Encuentran que el 70.8% de los niños poseían un genotipo de SM, el 25% 2 y el 4.2 3. Encuentran dos niños no relacionados genéticamente que eran portadores de cepas idénticas. No se demuestra asociación entre diversidad genotípica con niveles de SM ni con prevalencia de caries.</p>

109 Li Y, Caufield P, Redmo Emanuelsson I, Thornqvist E. Differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* via genotypic and phenotypic profiles from three different populations. Oral Microbiol Immunol 2001;16:16-23.

110 Mattos-Graner R, Li Y, Caufield P, Duncan M, Smith D. Genotypic diversity of mutans streptococci in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. J Clin Microbiol 2001;39:2313-2316.

<p>Jordan C, LeBlanc D. 2002¹¹¹</p>	<p>30 niños de 13 años que portaron bandas de ortodoncia.</p>	<p>Estudio transversal. Muestras de placa y saliva. Los recuentos de saliva los realizan por el método tradicional de células viables en MSB. Las placas las toman del molar permanente superior derecho y del esmalte junto a la banda de ortodoncia después del tratamiento. Realizan REA con digestión del ADN con la enzima <i>Sma I</i>. Escanean las bandas, pero no informan de cómo realizan la lectura de las mismas.</p>	<p>Solo en 17 pacientes pudieron aislar SM. Indican que el medio no es selectivo y que la morfología de las colonias no es eficaz para identificar SM.</p>
<p>Nie M, Fan M, Bian Z. 2002¹¹²</p>	<p>11 parejas chinas con al menos dos años de convivencia. En dos parejas se repite el estudio a los 3 meses.</p>	<p>Estudio longitudinal. Estudian muestras de placa y saliva sin estimular. Cultivo en MSB. Hacen serotipia y genotipan con REA y enzima <i>Hae III</i>, estudiando como mínimo 9 colonias por individuo. Toman fotografías del revelado de bandas pero no informan del método para su lectura.</p>	<p>Sólo 3 personas tenían 2 genotipos y el resto 1. Un mismo genotipo se corresponde con dos serotipos y a la inversa. En dos parejas hay homología, pero al repetir el estudio a los tres meses difieren los patrones de bandas entre ellas.</p>
<p>Emanuelsson I, Carlsson P, Hamberg K y cols. 2003¹¹³</p>	<p>13 sujetos de 20-40 años, reexaminados a los 4 y 7 meses.</p>	<p>Estudio longitudinal. Analizan niveles de EGM en saliva e higiene. El recuento lo realizan en Dentocout SM strip[®]. Posterior cultivo en MSB. Estudian la distribución de los genotipos en distintos sitios de las superficies dentales (primer y segundo premolar permanente) y la persistencia de los mismos tras el tiempo señalado. Utilizan PCR para la identificación de SM. Realizan AP-PCR y REA para genotipar. Escanearon las fotografías de los geles y realizan análisis visual.</p>	<p>Consideran que existe una elevada correlación entre AP-PCR y REA en las 148 cepas estudiadas. Encuentran hasta 7 genotipos distintos en algunos individuos. En un mismo sitio de las superficies dentales puede haber hasta 4 genotipos diferentes. Diferentes genotipos colonizan un mismo sitio de un diente y el mismo puede estar en otros diferentes. Encontraron los mismos genotipos en 25 sitios en doce sujetos al finalizar el estudio. Señalan el particular comportamiento de los genotipos a la hora de colonizar las superficies dentales.</p>
<p>Kohler B, Lundberg A, Birkhed D y cols. 2003¹¹⁴</p>	<p>16 familias (madres, hijos, 7 padres y 4 hermanos) Se evalúan a 16 años.</p>	<p>Estudio longitudinal. Estudian un total de 192 SM y 62 SS. Realizan recuentos de saliva en MSB. Emplean ribotipia evaluando los patrones visualmente.</p>	<p>Se aislaron 1-5 ribotipos por persona. 2-9 por cada familia. De las 16 parejas madre-hijo, 14 mostraron homología entre ellos en al menos 1 cepa. Otro tanto en 6 parejas de las 7 padres-hijos. En diez de los trece niños que se examinaron persistía al menos 1 ribotipo en el periodo de 16 años.</p>

111 Jordan C, LeBlanc D. Influences of orthodontic appliances on oral populations of mutans streptococci. Microbiol Immunol 2002; 17:65-7

112 Nie M, Fan M, Bian Z. Transmisión of mutans streptococci in adults within a Chinese population. Caries Res 2002; 36: 161-166.

113 Emanuelsson I, Carlsson P, Hamberg K, Bratthall D. Tracing genotypes of mutans streptococci on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Oral Microbiol Immunol 2003;18:24-9.

114 Kohler B, Lundberg A, Birkhed D, Papapanou PN. Longitudinal study of intrafamilial mutans streptococci ribotypes. A Eur J Oral Sci 2003;111:383-9.

<p>Toi C, Bönecker M, Cleaton-Jones P. 2003¹¹⁵</p>	<p>31 niños con caries. Se recogen muestras antes y después de recibir tratamiento restaurativo no traumático.</p>	<p>Estudio longitudinal. Toman muestras del centro de lesión de caries en el esmalte antes y después del tratamiento. Cultivo en TYCSB. Se centran en el estudio de SM y SS del total de especies recuperadas. Hacen genotipia con AP-PCR y OPA-05. Los patrones de bandas eran escaneados y analizados visualmente y con el programa SAS 8.1.</p>	<p>Se recuperan 46 colonias de las tomas directas en la lesión de la caries frente a las 25 aisladas después del tratamiento. No se constituyen grupos de homología, pero sí dice que no existen patrones específicos para las colonias encontradas antes de la restauración y las aisladas después.</p>
<p>Lindquist B, Emilson C. 2004¹¹⁶</p>	<p>15 parejas madres-hijos. Madres de 30 años y los niños que fueron seguidos los siete primeros años de vida.</p>	<p>Estudio longitudinal. Parten de madres colonizadas por SM y SS. Las muestras las recogen de saliva estimulada, placas dentales y lengua de los niños y sólo saliva de las madres. Utilizan MSB. Realizan digestión del ADN cromosómico y, para reducir el número de bandas detectadas, realizaron hibridación usando una sonda comercial. Los geles se visualizaron y fotografiaron en un transiluminador UV, sin informar como realizan el análisis de bandas.</p>	<p>Durante el periodo del estudio diez de quince niños adquirieron SM y solo 4 tenían SM y SS. En los niños se aislaron 26 genotipos de los que 9 eran idénticos a los de sus madres. Las madres tenían 24 genotipos al principio y a los siete años 20. Los niños tenían 15 genotipos al principio, pierden 9 y adquieren 11 (3 de sus madres). En el curso de los 7 años, tanto madres como niños presentan genotipos diferentes a los iniciales, lo que indica que los adquirieron de otras fuentes. SM y SS es detectado temporalmente antes en saliva de los niños que en lengua o placa.</p>
<p>Ersin NK, Kocabas EH, Alpoz AR, Uzel A. 2004¹¹⁷</p>	<p>8 niños de 2-3 años. 8 madres. 3 padres.</p>	<p>Estudio transversal. Toman muestras de placa y emplean el medio TYCSB. Estudian muestras de placa mediante AP-PCR con el primer OPA-05 y evalúan similitud de genotipos. Realizan análisis visual. Consideraron los genotipos similares cuando todas las bandas mayores fueron idénticas. El tamaño de los pares de bases fue medido con BioDoc Analyze (Biometra Ti5, Goettingen, Germany) y comparado en cada sujeto.</p>	<p>En las 8 parejas madres-hijos hubo transmisión. Los tres matrimonios tenían las mismas cepas, lo que sugiere una transmisión horizontal.</p>

115 Toi C, Bönecker M, Cleaton-Jones P. Mutans streptococci strains prevalence before and after cavity preparation during atraumatic restorative treatment. Oral Microbiol Immunol 2003; 18:160-164.

116 Lindquist B, Emilson C. Colonization of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes and caries development in children to mothers harboring both species. Caries Res. 2004;38:95-103.

117 Ersin N, Kocabas E, Alpoz A, Uzel A. Transmission of *Streptococcus mutans* in a group of Turkish families. Oral Microbiol Immunol 2004; 19: 408-410.

<p>Nascimento M, Höfling F, Goncalves B. 2004¹¹⁸</p>	<p>9 adultos de 50-75 años con caries de corona y/o raíz.</p>	<p>Estudio transversal. En este estudio se evalúan aislamientos de SM desde saliva, placas dentales, caries de corona y raíz con dos objetivos distintos: el perfil de colonización que presentaban las lesiones de caries coronales y de raíz y la correlación entre la distribución de los clones de SM y el tipo de caries. Se tomo muestra de saliva y, en las zonas donde no caries, con curetas. Cultivo en MSB. Genotipan con AP-PCR y primers OPA-02 y OPA-13. Las imágenes de los geles se fotografiaron y escanearon. Las bandas fueron individualmente analizadas por un programa computarizado, usaron el coeficiente de Dice.</p>	<p>Se aislaron 691 colonias. Seis sujetos presentan de 2 a 4 y tres individuos de 5 a 10. No hubo genotipos predominantes. No existieron diferencias entre los genotipos que colonizaban las caries coronales y las de raíz. Ningún genotipo concreto se asociaba al inicio y progresión de la enfermedad.</p>
<p>Liu J, Bian Z, Fan M y cols. 2004¹¹⁹</p>	<p>17 niños de 9 a 14 años estudiados a nivel basal, al mes, 3 y 6 meses de ortodoncia.</p>	<p>Estudio longitudinal. Muestras de placa y recuentos de SM en MSB. Utilizaron AP-PCR con el primer OPA-02. Análisis visual de las bandas con cinco observadores.</p>	<p>Se obtienen 713 colonias de 25 genotipos diferentes. Un niño tuvo 3 genotipos distintos, seis niños presentaron 2 y el resto un solo genotipo. Hay estabilidad desde el principio del tratamiento y en los sucesivos muestreos.</p>
<p>Klein M, Florio F, Pereira A y cols. 2004¹²⁰</p>	<p>16 madres de 28 años. 16 hijos de 6 meses. 20 meses de seguimiento.</p>	<p>Estudio longitudinal. En los niños se tomaron muestras cada dos meses de: saliva, dorso de la lengua, mucosa, cresta alveolar y placa dental cuando los dientes habían erupcionado. De las madres sólo saliva. Cultivo en MSB. Utilizaron AP-PCR con los primers OPA-02 y OPA-13. Análisis informático con coeficiente de Dice. Homología cuando la concordancia era $\geq 95\%$.</p>	<p>Se aislaron un total de 52 genotipos de los que sólo 16 eran de las madres. No se observo transmisión horizontal entre escolares.</p>

118 Nascimento M, Höfling J, Goncalves R. *Streptococcus mutans* genotypes isolated from root and coronal caries. Caries Res. 2004;38:454-63

119 Liu J, Bian Z, Fan M, He H, Nie M, Fan B, Peng B, Chen Z. Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed PCR in patients undergoing orthodontic treatment. Caries Res 2004;38:523-529.

120 Klein M, Florio F, Pereira A, Höfling J, Goncalves R Longitudinal study of transmission, diversity, and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes in Brazilian nursery children. J Clin Microbiol. 2004;42:4620-4626.

<p>Napimoga M, Kamiya R, Rosa R y cols. 2004¹²¹</p>	<p>16 adultos de entre 18-29 años, 8 de ellos con caries activa y otros 8 libres de ella.</p>	<p>Estudio transversal. Recogen muestras de saliva sin estimular, placa y dorso de la lengua. Cultivan en MSB. Estudian diversos factores de virulencia. También realizan electroforesis enzimática multilocus. Genotipan con AP-PCR y cebadores OPA-02 y OPA-13. Fotografían los geles y hacen análisis informático con coeficiente de Dice.</p>	<p>Hallan de 1-4 genotipos por individuo salvo un paciente en el que encuentran 13 genotipos. Demuestran fuerte asociación entre CAOD y diversidad de genotipos, los cuales presentan mayor intensidad de sus factores de virulencia. Señalan que la AP-PCR con dos primers OPA-02 y OPA-13 posee alto poder discriminatorio. Epidemiológicamente individuos no relacionados presentan genotipos distintos.</p>
<p>Li S, Liu T, Xiao X y cols. 2005¹²²</p>	<p>20 madres (26-30 años) con sus hijos (3-4 años).</p>	<p>Estudio transversal. Toman muestras de placa y recogen los índices de caries CAOD y cos. Cultivo en MSB. Realizan PCR para detectar el gen <i>MutA</i>. Para genotipar usan AP-PCR con OPA-02. Estudio de bandas visual.</p>	<p>Confirman transmisión de las madres a sus hijos. Las cepas portadoras del gen <i>MutA</i> tienen reducida su transmisión.</p>
<p>Li Y, Caufield P, Dasanayake AP y cols. 2005¹²³</p>	<p>156 madres en el tercer trimestre de gestación con tomas en el parto al recién nacido. A 50 parejas madres-hijos se les realizó seguimiento cada 3 meses durante 4 años.</p>	<p>Estudio longitudinal. Muestras de saliva y placa. Realizan recuentos de SM en MSB. Usan AP-PCR según la metodología de Li y Caufield de 1998. Recogen numerosas variables de madres e hijos: ingresos, tabaco, alcohol, tipo de parto, género, peso al nacer, lactancia, edad materna, antibióticos durante el embarazo.</p>	<p>En 37 parejas madres-hijos la transmisión fue del 88.9%. Seis niños que nacieron por cesárea, tuvieron 1 genotipo idéntico al de sus madres. El resto de los niños presentaban 1-3 genotipos con un 83.3% de homología con respecto a los de sus madres.</p>
<p>Meng L, Liu J, Peng B y cols. 2005¹²⁴</p>	<p>10 pacientes entre 20 y 67 años con diagnóstico de cáncer nasofaríngeo. Tomas de muestras basal, después de radioterapia, a los 3 y los 6 meses siguientes.</p>	<p>Estudio longitudinal. Muestras de saliva basal y estimulada. Cultivan en TYCSB. Recogen índices de caries y hacen recuentos salivares de estreptococos. Hacen genotipia por REA y <i>HaeIII</i>, leyendo los patrones con programa informático.</p>	<p>Los niveles de SM aumentan significativamente con el descenso del flujo salivar después de la radioterapia. En la mayoría de los sujetos, persisten sus genotipos y en otros 3 se pierde al menos uno.</p>

121 Napimoga M, Kamiya R, Rosa R, Rosa E, Höfling J, Mattos-Graner R, Goncalves R. Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries active individuals. J Med Microbiol 2004; 53:697-703.

122 Li S, Liu T, Xiao X, Yang J, Yang D, Zhuang H, Liu Z. Detection of mutA genes in transmitted strains and non transmitted strains of mutans streptococci. Caries Res. 2005;39:417-421.

123 Li Y, Caufield P, Dasanayake A, Wiener H, Vermund S. Mode of delivery and other maternal factors influence the acquisition of *Streptococcus mutans* in infants. J Dent Res. 2005;84:806-811.

124 Meng L, Liu J, Peng B, Fan M, Nie M, Chen Z, Gan Y, Bian Z. The persistence of *Streptococcus mutans* in nasopharyngeal carcinoma patients after radiotherapy. Caries Res. 2005; 39:484-89.

Barone S, Macedo C, Marin JM. 2005 ¹²⁵	5 madres y sus 5 hijos con síndrome de Down. Un grupo control de 7 parejas madre-hijo. La edad media de los niños fue de 10 años. Muestras de saliva en todos los sujetos y las repiten a los 6 meses.	Estudio logitudinal. Cultivan en MSB. Genotipan con AP-PCR y dos cebadores: OPA-02 y OPA-03. Análisis visual de las bandas.	Obtienen mejores resultados con OPA-02. Encuentran transmisión vertical en el grupo control. Todas las madres presentaron estabilidad de genotipos. Todos los niños con síndrome de Down variaron por completo sus genotipos a los 6 meses.
Cogulu D, Sabah E, Uzel A y cols. 2006 ¹²⁶	60 niños con síndrome de Down y 64 niños control entre 7-12 años.	Estudio transversal. Toma de muestras de saliva. Estudian niveles de caries. Cultivo en TYCSB. Usan AP-PCR con OPA-05.	Los niños con síndrome de Down presentan menores índices de caries y los genotipos eran diferentes al grupo control.
Hames-Kocabas E, Ucar F, Kocatas N y cols. 2006 ¹²⁷	49 madres, 20 padres y 56 de sus niños.	Estudio transversal. Toma de muestras de saliva. Cultivan en TYCSB. La finalidad es estudiar transmisión vertical de genotipos usando AP-PCR con cebador OPA-05. Análisis de bandas visual.	Se obtuvieron genotipos compartidos entre los tres miembros de 14 familias. Se obtuvo homología entre 36 parejas de madre-hijo y en 6 parejas padre-hijo con un porcentaje de genotipos homólogos del 24% y del 16.6% respectivamente.
Nomura R, Nakano K, Nemoto H y cols. 2006 ¹²⁸	Un sólo sujeto varón de 61 años con endocarditis infecciosa que se va a someter a una operación de sustitución de válvula cardiaca.	Estudio transversal. Toman muestras de placa y hacen examen bucodental dos días antes de la operación. Ya en quirófano recuperan la válvula para su estudio. Cultivo en MSB de donde aíslan 18 colonias de SM de placa y 7 de la válvula confirmadas con estudio por PCR. Hacen serotipia, western blot para el análisis de Gifs y realizan tests de capacidad de inducción de caries. Genotipan con 2 técnicas: AP-PCR con dos primers OPA-02 y OPA-13, y RAPD con 5 primers. Estudio visual de bandas.	Las 18 colonias de placa eran entre sí del mismo genotipo, al igual que las 7 de válvula. Al compararlas se comprueba que se trataban de dos cepas diferentes con distinto patrón de bandas y desigualdades en sus características fenotípicas. Concluyen que el genotipo de la válvula debería encontrarse también en la cavidad oral aunque en menor proporción.

125 Barone S, Macedo C, Marin JM. Arbitrarily primed polymerase chain reaction for fingerprinting the genotype identification of mutans streptococci in children with Down syndrome. *Spec Care Dentist* 2005; 25: 37-42.

126 Cogulu D, Sabah E, Uzel A, Ozkinay F. Genotyping of *Streptococcus mutans* by using arbitrarily primed polymerase chain reaction in children with Down Syndrome. *Arch Oral Biol.* 2006;51: 177-182.

127 Hames-Kocabas E, Ucar F, Kocatas N, Uzel A, Alpöz A. Colonization and vertical transmission of *Streptococcus mutans* in Turkish Children. *Microbiol Res.* 2006. Article in press. Available on line in www.sciencedirect.com.

128 Nomura R, Nakano K, Nemoto H, Fujita K, Inagaki S, Takahashi T, Taniguchi K, Takeda M, Yoshioka H, Amano A, Ooshima T. Isolation and characterization of *Streptococcus mutans* in heart valve and dental plaque specimens from a patient with infective endocarditis. *J Med Microbiol* 2006; 55:1135-1140.

<p>Yuan L, Jing Z, Ran S y cols. 2007¹²⁹</p>	<p>56 niños de 3-4 años de una guardería. Se forman dos grupos: 24 niños residían 5 días a la semana y otro grupo de 32 sólo en turnos de mañana.</p>	<p>Estudio transversal. Anotan índices de caries. Toman muestras de placa. Cultivan en TYCSB. Hacen genotipia con AP-PCR y cebador OPA-02 y con RFLP y enzima <i>Hae</i> III. Los patrones de bandas se analizan visualmente.</p>	<p>Se comprueba mayor prevalencia de SM en el grupo diurno. En el grupo interno se aislaron de 1 a 3 genotipos por niño y en el grupo diurno se hallaron entre 1 y 5 patrones. Se confirman casos de genotipos compartidos en 6 niños internos y en 2 niños de asistencia diurna.</p>
<p>Lembo F, Longo P, Ota-Tsuzuki C y cols. 2007¹³⁰</p>	<p>21 niños de entre 5-8 años separados en dos grupos: 11 de ellos con caries activa y 10 libres de caries.</p>	<p>Estudio transversal. Muestras de saliva estimulada, placas y dorso de la lengua. Utilizan MSB. Estudian 339 colonias a las que se les somete a un test de susceptibilidad a los cambios de acidez. Utilizan AP-PCR y cebador OPA-02 para la obtención de genotipos. Hacen lectura de bandas mediante programa informático.</p>	<p>Se aíslan entre 1 y 7 genotipos por niño. No encuentran diferencias entre el número de genotipos y los dos grupos. No existe relación entre número de genotipos y recuento en saliva de SM.</p>

EGM: estreptococos del grupo mutans; REA: *Restriction Endonucleases Analisis*; MSB: Agar Mitis Salivarius Bacitracina; AP-PCR: *Arbitrarily primed polymerase chain reaction*; SM: *Streptococcus mutans*; SS: *Streptococcus sobrinus*; MSA: Agar Mitis Salivarius; TYC: *Trypticase Yeast Cysteine*; CDF: equiparable a RAE; G+C: porcentajes de guanina y citosina; RFLP: *restriction fragment length polymorphism*; TYCSB: *Trypticase Yeast Cysteine Sucrose Bacitracin*; CMI: concentración mínima inhibitoria; CAOD: índice de caries, como la suma de dientes permanentes cariados, ausentes por caries y obturados, para una población será la suma de los CAOD de todos los individuos dividida por el número de ellos; cos: índice de caries, como la suma de la superficie cariada y obturada de dientes primarios, para una población será la suma de los cos de todos los individuos dividida por el número de los explorados; Gtfs: glucosil transferasas.

129 Yuan L, Jing Z, Ran S, Xue D. Genotypic diversity of *Streptococcus mutans* in 3-to-4-year-old Chinese nursery children suggests horizontal transmission. Arch Oral Biol. 2007;81: 1904-1910.

130 Lembo F, Longo P, Ota-Tsuzuki C, Rodrigues C, Mayer M. Genotypic and phenotypic analysis of *Streptococcus mutans* from different oral cavity sites of caries-free and caries-active children. Oral Microbiol Immunol. 2007; 22: 313-319.

3. Material y método

3.1. Población de referencia y selección de la muestra.

Nuestro trabajo consta de dos partes separadas en el tiempo realizadas en escolares de primer ciclo de Educación Primaria (primer curso) del Distrito Norte de Granada Capital, donde se seleccionaron aleatoriamente dos colegios: Juan XXIII (identificado con el dígito 1) y Padre Manjón (señalado con el número 2). La primera de las fases sirvió como base de un estudio previo llevado a cabo en el seno de nuestro grupo de investigación¹³¹, efectuándose la recogida de las muestras durante los meses de octubre y noviembre del año 2002 (estudio a nivel basal). Transcurridos 18 meses, entre abril y mayo de 2004 se procedió a una nueva toma de saliva en los mismos escolares siempre y cuando se cumplieran las condiciones requeridas para el estudio.

El total de niños matriculados con edad de 6-7 años en primero de Primaria en los dos centros escogidos durante el curso académico 2002-2003 era de 97. De ellos, 85 cumplían los requisitos de inclusión, aunque al final sólo participaron 75, de entre los cuales hubo algunas pérdidas reduciéndose la cifra hasta 67. El porcentaje de niños “perdidos”, por diversas causas, fue a los 18 meses de 10.66% (n=8). (Tabla 8).

Tabla 8. Población estudiada.

Colegio.	Población diana.	Escolares al inicio.	Escolares a 18 meses
Juan XXIII	48	42	38
Padre Manjón	49	33	29
Total	97	75	67

Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- Autorización para poder realizar el trabajo. Se obtuvo de la Dirección del Centro y de los padres de los alumnos, según el modelo reflejado en la figura 11.
- No haber estado sometido a ningún tratamiento preventivo que pudiera interferir en los resultados.
- No recibir tratamiento antibiótico en las cuatro semanas previas a la toma de muestra.
- Permanencia en el mismo centro y en la misma clase durante el desarrollo del estudio para asegurar el mismo entorno entre los alumnos.

¹³¹ Liébana J. Genotipos de *Streptococcus mutans* de saliva y placa en escolares usando la técnica AP-PCR y el cebador OPA-02. Tesis doctoral. Universidad de Granada 2007.

A todos los escolares se les realizó, tras una charla orientativa, una exploración bucodental y se les recogió saliva estimulada. Además en la primera fase del estudio fueron tomadas muestras de placas de superficies lisas y oclusales en 18 de los niños.

PROGRAMA ESCOLAR DE SALUD BUCO-DENTAL
UNIDAD DE ODONTOLOGIA PREVENTIVA Y COMUNITARIA
HOJA INFORMATIVA A LOS PADRES

Estimados padres:

En colaboración con la Facultad de Odontología y la autorización de la Dirección del Colegio se va a realizar una exploración bucodental a los alumnos de primero de primaria consistente en:

Revisión del estado de los dientes mediante exploración visual y sin radiografías.
Recogida de muestra de saliva.

Dicha exploración se realizará en el propio colegio por un odontólogo y se repetirá a los 18 meses. De ésta información se enviará un informe del estado de los dientes de su hijo, junto con unas recomendaciones oportunas para que su hijo conserve un buen estado bucal. Les recordamos que no supondrá ningún riesgo para la salud de los niños y ningún coste para el escolar.

A continuación solicitamos mediante su firma la autorización para que a su hijo se le puedan realizar las exploraciones y les rogamos rellenen los datos que se solicitan:

Padre, madre o tutor del niño/a:

.....

Profesión del padre:

Autorizo a mi hijo/a :,
para las exploraciones bucodentales.

Fecha de nacimiento del niño/a:

Granada, de.....del.....

Firma del padre o tutor

Rogamos devuelva la autorización una vez firmada al colegio.

Figura 11. Hoja de autorización de los padres o tutor.

ENCUESTA DE SALUD BUCODENTAL																																																																																																															
Nombre escolar						Edad			Fecha de nacimiento																																																																																																						
Colegio						Curso y clase																																																																																																									
Fecha						Numero de identificación																																																																																																									
Explorador																																																																																																															
Profesión del padre						Profesión de la madre																																																																																																									
<table style="margin: auto; border-collapse: collapse;"> <tr> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td>55</td><td>54</td><td>53</td><td>52</td><td>51</td><td>61</td><td>62</td><td>63</td><td>64</td><td>65</td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td>17</td><td>16</td><td>15</td><td>14</td><td>13</td><td>12</td><td>11</td><td>21</td><td>22</td><td>23</td><td>24</td><td>25</td><td>26</td><td>27</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> </tr> <tr> <td>47</td><td>46</td><td>45</td><td>44</td><td>43</td><td>42</td><td>41</td><td>31</td><td>32</td><td>33</td><td>34</td><td>35</td><td>36</td><td>37</td> </tr> <tr> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td>85</td><td>84</td><td>83</td><td>82</td><td>81</td><td>71</td><td>72</td><td>73</td><td>74</td><td>75</td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> </table>																												55	54	53	52	51	61	62	63	64	65					17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27															47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37															85	84	83	82	81	71	72	73	74	75				
55	54	53	52	51	61	62	63	64	65																																																																																																						
17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27																																																																																																		
47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37																																																																																																		
85	84	83	82	81	71	72	73	74	75																																																																																																						
OBSERVACIONES																																																																																																															

Figura 13. Ficha de recogida de datos.

3.3. Variables incluidas en el estudio.

Variables tomadas durante la exploración bucodental.

- **Número de identificación:** A cada escolar se le asignó un número de referencia de uno o dos dígitos; el primero correspondía al colegio en el que estaba estudiando y un segundo que hacía referencia al niño. Por ejemplo 1-17 indica el colegio número 1, Juan XXIII y el 17 a la posición que ocupa el escolar en la lista.

- **Nombre:** Nombre y los apellidos del niño.

- **Edad y fecha de nacimiento:** Se rellenó a partir de la hoja de autorización de los padres. La fecha de nacimiento en formato DD/MM/AA (día/mes/año).

- **Sexo:** 1 para los varones y 2 para las mujeres.

- **Colegio 1:** Juan XXIII y **2:** Padre Manjón.

- **Profesión del padre y de la madre o del tutor.** Se rellenó a partir de los datos aportados en la hoja de autorización. Para cuantificar el nivel socioeconómico se tomaron como indicador las actividades de los padres o tutores según una adaptación de la escala británica de ocupaciones. La codificación fue la siguiente:

I. Directivos. Administradores. Altos funcionarios. Profesiones liberales y técnicos superiores.

II. Otros directivos. Técnicos medios. Artistas y deportistas.

III. Cuadros y mandos intermedios. Administrativos y funcionarios, en general, personal de los servicios de protección y seguridad.

IV. a) Trabajadores manuales cualificados de la industria, comercio y servicio. *Idem* del sector primario.

b) Trabajadores manuales semicualificados, de la industria, comercio y servicio. *Idem* del sector primario.

V. Trabajadores no cualificados.

VI. Otros casos. Mal especificado. No consta.

- **Odontogramas:**

Fecha de la recogida de los datos en formato DD/MM/AA. Se rodeó con un círculo el número correspondiente a cada uno de los dientes presentes en la boca. Para indicar el estado de los dientes, tanto temporales como permanentes, se utilizaron los criterios de caries de la OMS con la siguiente codificación:

Código 0: Diente sano temporal.

Código 1: Diente temporal cariado:

1-oclusal.

2- mesial.

3- distal.

4- vestibular.

5- lingual o palatino.

Código 2: Diente temporal obturado y cariado.

Código 3: Diente temporal obturado.

Código 4: Resto radicular o gran destrucción.

Código 5: Diente temporal sellado.

Código 6: Diente permanente:

60-sano.

61- cariado.

62-obturado y cariado.

63- obturado.

65- sellado.

66- semierupcionado.

67- ausente.

68 – teñido.

Código 7: Diente temporal ausente.

Código 8: Diente temporal teñido.

Variables desarrolladas a lo largo del estudio.

• **Índices de caries:** A partir de las variables recogidas se calcularon los siguientes índices:

- **CAOD.** Es la suma de dientes permanentes cariados, ausentes por caries y obturados. Para una población será la suma de los CAOD de todos los individuos dividida por el número de ellos.
- **CAOS.** Es la suma de las superficies cariadas, ausentes por caries y obturadas de los dientes permanentes. Para una población será la suma de los CAOS de todos los individuos dividida por el número de los mismos.
- **IR o índice de restauración.** Describe la relación existente entre el número de dientes con caries activa y las que están restauradas. Puede aplicarse tanto para dentición temporal (ir) como permanente (IR). Se obtiene del cociente entre el número de dientes obturados divididos por la suma total de dientes con historia de caries: cariados, ausentes por caries y restaurados.
- **cod.** Es la suma de dientes primarios cariados y obturados. Para una población será la suma de los cod de todos los individuos dividida por el número de ellos.

- **cos**. Es la suma de las superficies cariadas y obturadas de dientes primarios. Para una población será la suma de los cos de todos los individuos dividida por el número de los explorados.
 - **ΔCAOD**. Incremento de dientes permanentes cariados, ausentes por caries y obturados, o variación en el índice CAOD a los 18 meses.
 - **ΔCAOS**. Incremento de superficies permanentes cariadas, ausentes por caries y obturados, o índice CAOS en la segunda exploración bucodental.
 - **Δcod**. Variaciones en los dientes primarios cariados y obturados a los 18 meses con respecto al nivel basal.
 - **Δcos**. Variaciones en las superficies cariadas y obturadas a los 18 meses con respecto al nivel basal.
 - **ΔCOcoD**. Incremento de dientes cariados y obturados, tanto en dentición temporal como permanente.
 - **ΔCOcoS**. Incremento de superficies cariadas y obturadas, tanto temporales como permanentes.
- **Recuento en CRT[®] Bacteria** para EGM y para *Lactobacillus* spp.
 - **Número de colonias aisladas por escolar.**
 - **Identificación bacteriológica: número de colonias de SM, SS, SR y otras.**
 - **Genotipia mediante AP-PCR y cebador OPA-02: número de genotipos.**
 - **Ganancia y pérdida de genotipos: estabilidad.**
 - **Grupos de homología de ADN: genotipos compartidos.**

3.4. Recogida y procesado de las muestras.

A) Saliva.

➤ *Toma de la muestra:* se realizó siempre a la misma hora entre las 9:30 y las 10:30, antes de la hora del recreo. A cada escolar se le hacía masticar una pastilla de parafina esteril. Después de tragar la saliva durante dos minutos se fue recogiendo la producida en los cinco minutos siguientes en un frasco estéril de boca ancha.

➤ *Transporte:* los frascos eran introducidos en un recipiente con hielo para llevarlos rápidamente al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología.

➤ *Impregnación en CRT Bacteria® para recuento de EGM y LB.* Una vez abiertos los viales y tras depositar en su interior una pastilla para crear una atmósfera de CO₂, se retiraba la cubierta de plástico que recubre los medios por ambos lados, cada uno de ellos específico para el contaje de los microorganismos indicados. A continuación ambas superficies eran impregnadas de saliva utilizando una pipeta estéril. Por último, una vez cerrado el vial, se procedía a la incubación durante 48h a 36 ± 1^o C (Figura 14). Los resultados se leyeron y compararon con los parámetros establecidos por la casa comercial (Ivoclar Vivadent Clinical, Schaan, Liechtenstein) (Figuras 14 a 16). Sin embargo por considerarlo más satisfactorio para nuestro propósito a la hora de informatizar los datos hemos considerado una escala de valores de cinco dígitos: 0 (ausencia de crecimiento), 1 (≤ 10⁴), 2 (>10⁴<10⁵), 3 (≥10⁵<10⁶) y 4 (≥10⁶).

➤ *Agitación.* Tras lo anterior, se introducía un imán estéril en los frascos y se colocaban sobre un agitador (Selecta, agimatic- n), durante 5 minutos, con la finalidad de romper el moco para fluidificar la saliva.

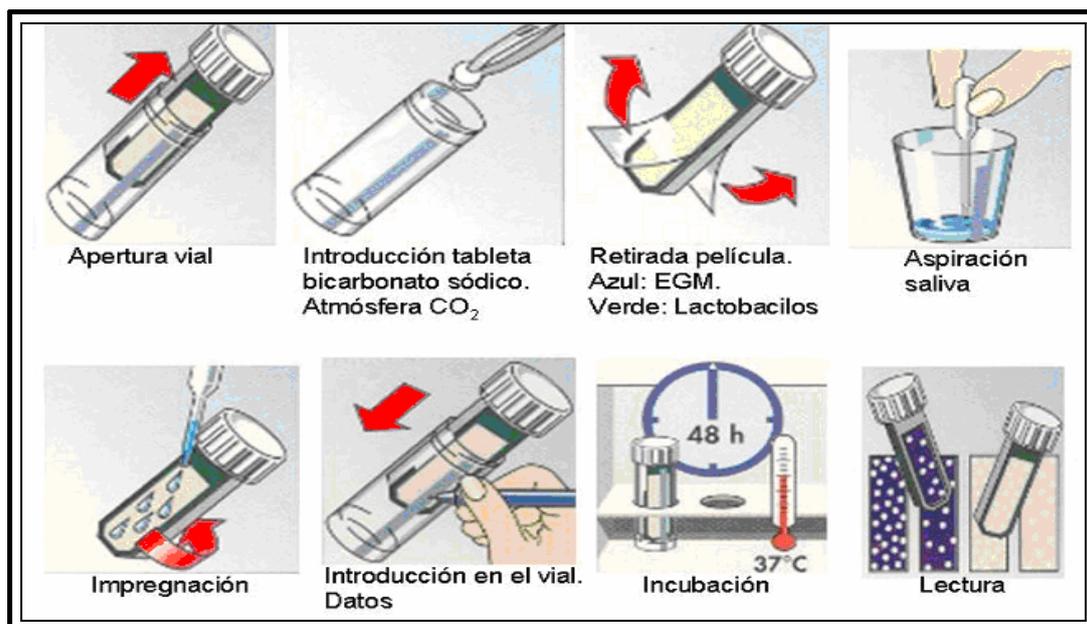


Figura 14. Procesamiento de la saliva en CRT® Bacteria.

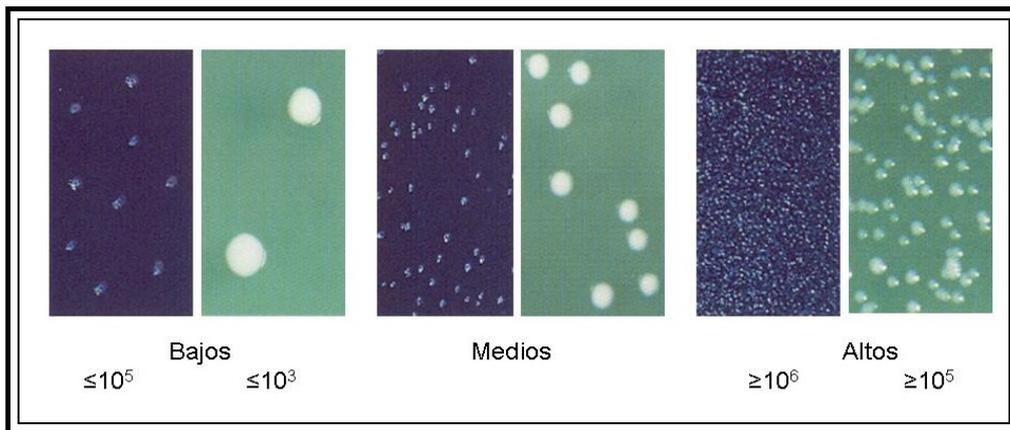


Figura 15. Parámetros establecidos para las comparaciones de los recuentos.

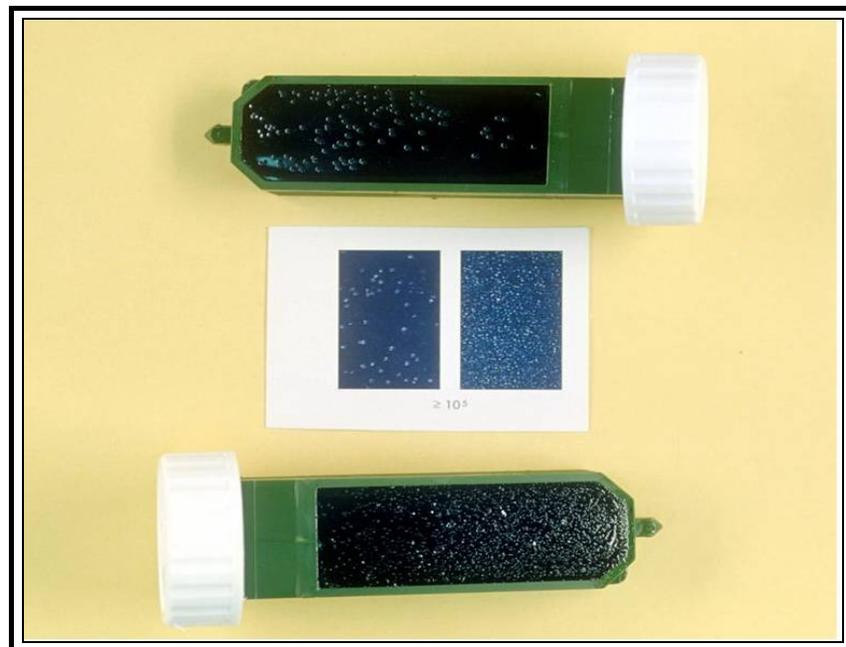


Figura 16. Recuentos en CRT® Bacteria para EGM indicando alto riesgo y su comparación con la escala proporcionada por la casa comercial.

B) Placa.

En el estudio basal fueron seleccionados 18 escolares para tomas de placa, efectuándose durante la exploración y previamente a la recogida de saliva.

➤ *Toma de la muestra:* las zonas eran secadas con torundas de algodón y luego, mediante cuñas de madera estériles, se recogía la placa bacteriana de superficies lisas de molares e incisivos permanentes y de de superficies oclusales de los primeros. Por último, se introducían en tubos eppendorf con 1 ml tampón fosfato 0.05M y pH 7.3.

<i>Composición del tampón fosfato</i>	
Solución A:	
Fosfato sódico monobásico ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}\cdot\text{H}_2\text{O}$) ...	3.5 g
Agua destilada	500 ml
Solución B:	
Fosfato sódico dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	6.7 g
Agua destilada	500 ml
Preparación final	
23 ml de solución A y 77 ml de solución B	

- *Transporte:* también fueron trasladadas en hielo hasta el laboratorio.
- *Agitación vibratoria* durante 30 segundos de los eppendorf (Labolan modelo 51076, Navarra. España) para que las bacterias se desprendieran bien de las cuñas.

3.5. Aislamiento e identificación de los estreptococos del grupo mutans.

Medios de cultivo utilizados.

- *MSB (Agar Mitis Salivarius Bacitracina)*. Este medio¹³³ se obtiene a partir del MSA adicionado de bacitracina (Sigma) y 15% de sacarosa (Difco, USA), permitiendo una mayor selectividad para EGM.

Preparación del agar MSB:

Disolver 90g del medio deshidratado MSA en 1000ml de agua destilada.

Adicionar 150g de sacarosa

Calentar y autoclavar.

Enfriar hasta 45°C.

Adicionar ampolla de 1 ml de telurito potásico al 1%

Incorporar 1ml de bacitracina a concentración de 200 U/ml.

Composición del MSA:

<i>Triptona.....</i>	<i>10 g</i>
<i>Proteasa-peptona nº3</i>	<i>5 g</i>
<i>Glucosa</i>	<i>1 g</i>
<i>Sacarosa</i>	<i>50 g</i>
<i>Fosfato dipotasico</i>	<i>4 g</i>
<i>Azul tripán</i>	<i>00.75 g</i>
<i>Cristal violeta</i>	<i>0.0008 g</i>
<i>Agar</i>	<i>15 g</i>

-*Fermentación del manitol.* Medio incorporado de este polialcohol que es metabolizado por los EGM y no por los de otros grupos.

¹³³ Gold O, Jordan H, Van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol 1973; 18: 1357-1364.

<u>Composición del caldo manitol</u>	
Bacto-peptona	5 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
Hemina	10 ml/l
Cisteina	0.4 g/l
Agar	1 g/l
Manitol	10 g/l
Rojo de clorofenol	0.04 g/l
pH	7.2±0.2

- TSA. (Tryptic Soy Agar Difco. Becton Dickinson, Francia). Medio de cultivo sólido utilizado de forma habitual para crecimiento bacteriano.

<u>Formulación del TSA:</u>	
Peptona tríptica.....	17g
Petona de soja	3g
Glucosa	2.5g
Cloruro sódico	5g
Fosfato dipotásico	2g
Agua destilada	1000ml
Agar	15g
pH	7.4±2

- TSB. Igual composición que el TSA pero sin agar.

- Estudio de la producción de agua oxigenada.

<u>Medio para detectar la producción de agua oxigenada:</u>	
Peptona tríptica.....	17g
Petona de soja	3g
Glucosa	2.5g
Cloruro sódico	5g
Fosfato dipotásico	2g
Agua bidestilada	1000ml
Agar	15g
pH	7.4±2
Tras autoclavar y en condiciones de sobrefusión a 45°C añadir:	
Benzidina (Sigma)(5mg/ml)	10ml
Peroxidasa (Sigma) (1mg/ml)	10ml

- Detección de arginina dehidrolasa (ADH).

Prueba ADH por la técnica de Moller (bio-Mérieux,Francia):

<i>Biothione</i>	<i>5g</i>
<i>Extracto de carne de buey</i>	<i>5g</i>
<i>Purpura de bromocresol</i>	<i>0.01g</i>
<i>Rojo cresol</i>	<i>0.005g</i>
<i>Glucosa</i>	<i>0.5g</i>
<i>Piridoxal</i>	<i>0.005g</i>
<i>Disolver 10.5 g en 1000ml de agua destilada y ajustar el pH a 6.</i>	
<i>Adicionar L-arginina al 1%</i>	
<i>Dejar un testigo sin aminoácidos</i>	
<i>Autoclavar</i>	

Procedimiento.

En el caso de las muestras de saliva, se realizaron diluciones seriadas en tampón fosfato en base 10 desde 10^{-1} a 10^{-6} . De cada tubo se tomaron 100 μ l que se distribuían uniformemente sobre la superficie de placas de Petri que contenían MSB. Todas las placas se incubaron 48 horas a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ en atmósfera anaerobia (GENbox anaer, bioMérieux SA. Marcy l'Etoile. Francia). Las muestras de placa se procesaban siguiendo igual sistemática pero en este caso sólo se hicieron diluciones hasta 10^{-3} .

Desde la dilución óptima del medio MSB se seleccionaban las colonias compatibles con EGM basándose en criterios morfológicos, es decir, aquellas que eran de mediano tamaño, de tonalidad azul oscura casi negra, prominentes o no, rugosas o lisas, a veces adheridas al agar y en ocasiones con una gota de capa mucosa brillante en la parte superior o al lado (Figura 17).

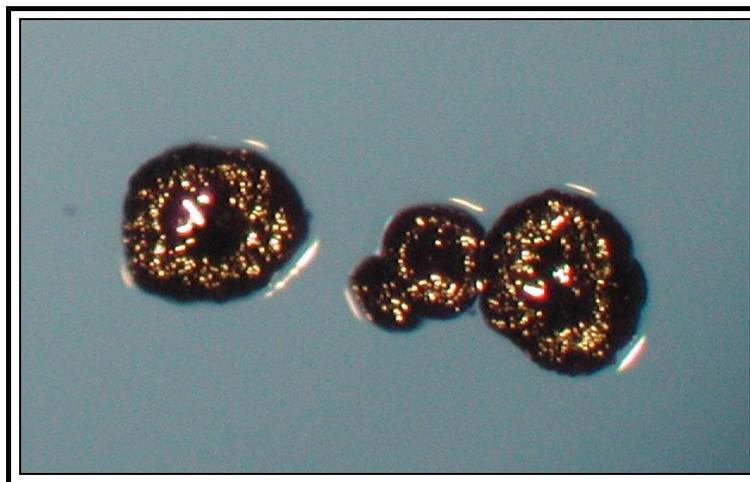


Figura 17. Colonias compatibles con EGM.

Las colonias así seleccionadas se inocularon en caldo manitol para diferenciar a los EGM. Los resultados que se obtenían podían ser de tres tipos: manitol negativo, si los microorganismos no metabolizaban el polialcohol, manitol positivo, en caso que sí lo hiciesen y NC, no crecimiento, debido a que probablemente el medio no cubría las necesidades nutricionales de algunas cepas de estreptococos.

En las muestras en las que no fue posible identificar ninguna ufc morfológicamente compatible con EGM, se realizaron nuevas tomas de saliva hasta un máximo de cinco y un mínimo de tres. Si después de esto se mantenía la ausencia de colonias con morfología de EGM, los niños eran considerados como no portadores de estos microorganismos.

Las colonias manitol positivas se sembraron desde el mismo medio en 3 placas con TSA, incubándose 48 horas a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ en atmósfera anaerobia, para ser usadas con distintos fines:

- Desde una de las placas las colonias eran arrastradas para su liofilización en leche desnatada (Skim milk Difco. Becton Dickinson, Francia) con el fin de incorporar los liofilizados a nuestra colección de EGM.
- A partir de la segunda se inocularon en caldos con TSB y tras 24 horas a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ en anaerobiosis, se les añadía glicerol al 50% y se congelaban a -20°C . En el caso de que en la identificación final se llegase a SM utilizaríamos estas muestras para realizar los estudios de biología molecular.
- De la tercera placa se efectuó estudio bioquímico convencional que, aparte del manitol (cuyos resultados volvían a evaluarse), incluía: producción o no de agua oxigenada y arginina dehidrolasa-deshidrogenasa (ADH) por la técnica de Möller y sensibilidad o resistencia a 2 U/ml bacitracina en el caldo con el polialcohol. La interpretación de los resultados se realizó siguiendo el diagrama mostrado en la figura 18.

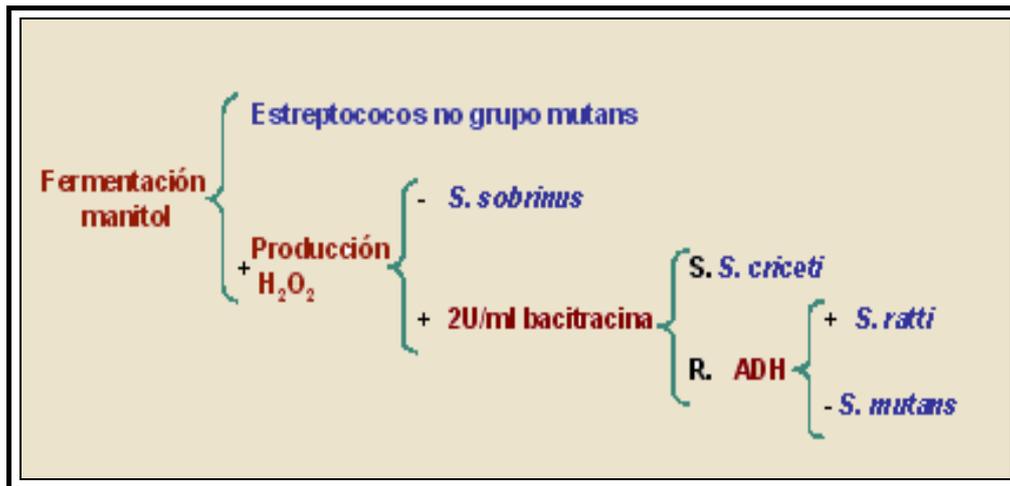


Figura 18. Diagrama para identificar las colonias aisladas en agar MSB.

Interpretación de las pruebas bioquímicas de identificación.

- *Producción de agua oxigenada*: tras la inoculación en el medio correspondiente, este era incubado 48h a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ para su posterior lectura. La prueba era positiva cuando la masa microbiana aparecía de color marrón y negativa si era incolora (Figura 19).

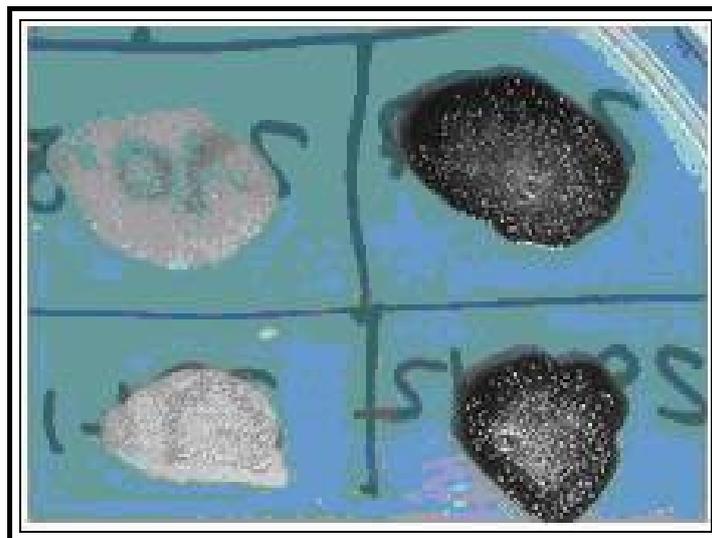


Figura 19. Producción del agua oxigenada negativa y positiva.

- *Sensibilidad a la bacitracina*: se adicionaron 2 U/ml de dicho antibiótico al caldo manitol con la formulación previamente señalada. Tras incubar 48h a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ se procedió a la lectura. Si la cepa era sensible no se producía crecimiento ni cambio de color del medio, cosa que si ocurría si era resistente.

- *Prueba de la ADH*: se inocularon dos tubos, el testigo, y el que contenía arginina. Se recubrían con una película de parafina estéril incubándose a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$. La lectura se efectuó a las 48h. Tras incubación a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$, la positividad es indicada por una

coloración violeta o rojo violeta (producción de putrescina y NH_3) y la negatividad por un color amarillo o ligeramente violáceo. El tubo utilizado como testigo era observado igual que en el caso de una prueba negativa.

3.6. Genotipia.

3.6.1.Extracción de ADN.

La extracción se realizó siguiendo las pautas establecidas por Promega (Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Promega Corporation, Madison, USA), que son descritas a continuación.

Una alícuota de las cepas conservadas en glicerol, se inoculó en caldo Wilkins Chalgren (Wilkins Chalgren Broth, Panreac Quimica SA. Barcelona, España) incubándose durante una noche. Un mililitro (ml) de este cultivo se transfirió a eppendorf y se centrifugó a 14.000 rpm durante 2 minutos. El sedimento se lavó dos veces con 1 ml de agua destilada estéril.

A cada eppendorf se adicionaron 480 µl de EDTA 50mM y 60 µl de lisozima (10mg/ml) (Roche 837 059, Biomol, Sevilla, España), dejándose incubar 30 minutos a 37° C tras los cuales eran sometidos a centrifugación 2 minutos a 14.000 rpm. Al sedimento se le incorporaron 600 µl de Nuclei Lysis Solution, incubándose 5 minutos a 80°C. Pasado ese tiempo se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se les añadieron 3 µl de RNasa Solution. Tras mezclar suavemente se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Seguidamente se adicionaron 200 µl de Protein Precipitation Solution, y una vez agitados en vortex 20 segundos, se incubaron en hielo 5 minutos para después centrifugar a 14.000 rpm 3 minutos.

El sobrenadante se transfirió a eppendorf con 600 µl de isopropanol (Panreac Quimica SA. Barcelona, España) a temperatura ambiente, mezclándolo por inversión hasta observar una masa filiforme. A continuación se centrifugaron 2 minutos a 14.000 rpm, y se hicieron dos lavados con etanol al 70% (Panreac Quimica SA. Barcelona, España). La rehidratación del sedimento se realizó con 100 µl de DNA Rehydration Solution, dejando incubar a 65°C una hora o bien toda la noche a 4°C (Figura 20).

En último lugar para cuantificar y comprobar la pureza del ADN, se realizaron medidas en espectrofotómetro (UV-VIS4418 Zuzi series 4200. Beijin China). Para ello se prepararon diluciones 1:100 del ADN en agua bidestilada estéril y se midieron las absorbancias a 260 y 280 nm; la primera de ellas nos informaba de la cuantificación del ADN y de la relación de D.O. entre las dos se determinaba si había un exceso de contaminación proteica.

Una vez hecho esto, los extraídos eran conservados a -20°C para su posterior empleo en la amplificación.

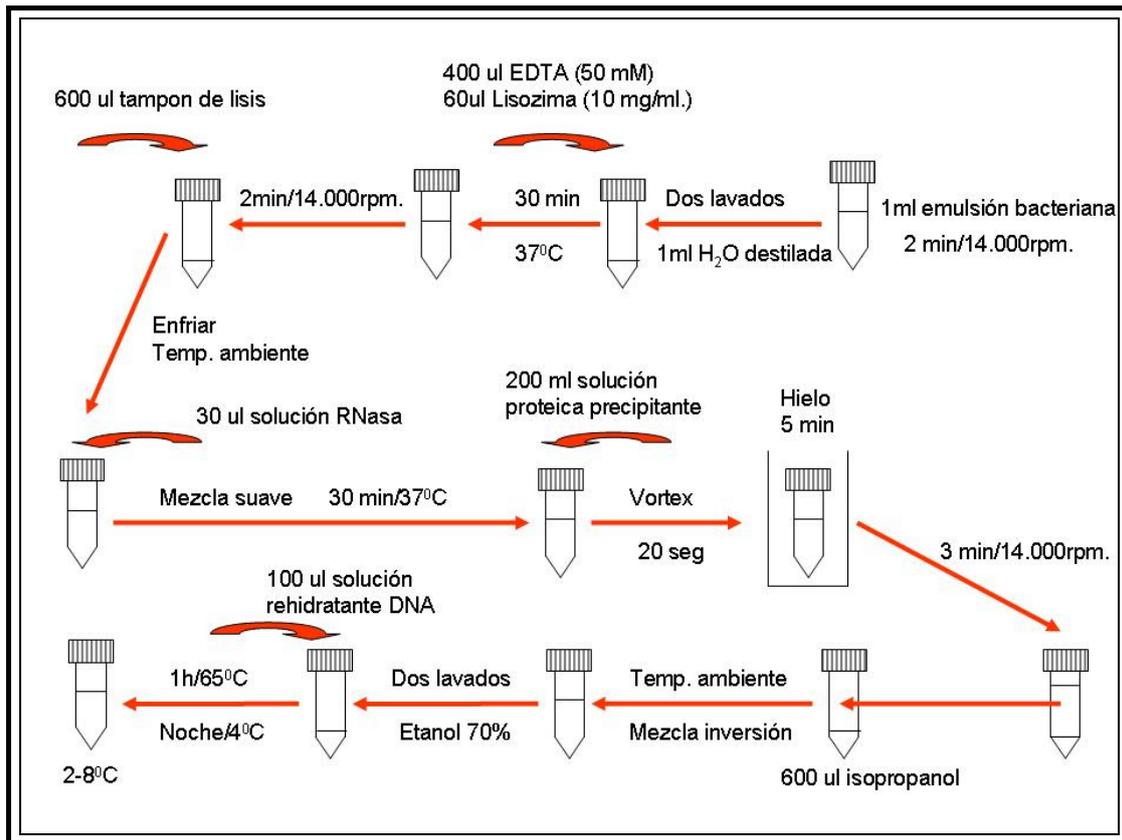


Figura 20. Proceso de extracción del ADN bacteriano.

3.6.2. Amplificación de ADN. AP-PCR o RAPD o RAPDNA.

La amplificación de ADN se desarrolló siguiendo los criterios establecidos por Li Y y cols 2001¹³⁴ (Tabla 9).

Tabla 9. Formula de la AP-PCR con el cebador OPA-02.

	Concentraciones
<i>Tampón 10X</i>	5 µl
<i>Cloruro de magnesio</i>	3.5 mM
<i>Primer</i>	50 pmol
<i>Desoxinucleótidos</i>	200 µM
<i>Taq-polimerasa</i>	1,25 U
<i>Extraído</i>	Volumen para 20 ng
<i>Volumen final (H2O destilada csp.)</i>	50 µl

134 Li Y, Caufield P, Redmo Emanuelsson I, Thornqvist E. Differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* via genotypic and phenotypic profiles from three different populations. Oral Microbiol Immunol 2001;16:16-23.

Para un volumen total de 50 μ l, la mezcla contenía para cada reacción, los siguientes componentes: 200 μ M de cada uno de los desoxinucleótidos dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Promega C1141; Promega Corporation, Madison, USA); 3.5 mM de Cl_2Mg ; 1.25 unidades de Taq-polimerasa (Promega M1661; Promega Corporation, Madison, USA); 5 μ l de buffer 10x (20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM KCl, 0.1 mM de EDTA, 1mM DDT, 50% de glicerol, 0.5% de Twen®20 y 0.5% de Nonidet®-P40); 50 pmol de primer OPA-02 (5'-TGCCGAGCTG-3'; Tib Molbiol, Berlín, Alemania) y volumen de extraído para una concentración final de ADN de 20 ng.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler® personal Eppendorf AG (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) (Figura 21).



Figura 21. Termociclador Mastercycler® personal Eppendorf AG.

El programa de amplificación usado fue el siguiente: 94°C durante 2 minutos, seguidos por 45 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94°C, 30 segundos de hibridación a 36°C y extensión durante 1 minuto a 72°C ; para finalizar dicha extensión se aplicaban 7 minutos a 72°C.

Temperatura	Proceso	Tiempo	Nº de ciclos
94°C		2 min	
94°C	Desnaturalización	30 segs	45
36°C	Hibridación	30 segs	
72°C	Extensión	1 min	
72°C		7 min	

3.6.3. Preparación del gel de agarosa.

Se introducían en un matraz aforado TBE 1x adicionado de agarosa para una concentración final del 1,5%. La mezcla era calentada en un microondas hasta su completa disolución, momento en que era llevado a una campana de flujo laminar vertical donde se añadía el bromuro de etidio (0.5 µg/ml) necesario para el revelado. Trás la homogenización, era vertido suavemente a la placa molde que previamente había sido preparada sellando sus laterales con cinta adhesiva y colocando su peine correspondiente. Se dejaba enfriar para la solidificación del gel asegurándonos que no hubiesen quedado burbujas de aire que pudieran interferir y falsear la migración de los componentes.

3.6.4. Detección de amplificadas.

Cuando el gel quedaba listo eran despegadas las cintas adhesivas de su molde y se retiraba el peine quedando así definidos los pocillos para la dispensación de la muestra. En cada carga se incluía un pocillo con un marcador de peso molecular (Roche Diagnostics GMDH; Roche Apliance Science, Manhein, Germany) para la posterior comparación con los patrones de bandas resultantes. El gel se introducía en la cubeta de electroforesis y se cubría por completo de TBE 1x para luego cargar 10λ del producto de la amplificación de la AP-PCR. En todos los casos se mantuvieron las mismas condiciones de tiempo y voltaje para obtener la mayor uniformidad posible 4:30 horas y 100 voltios (Figuras 22 a 25):

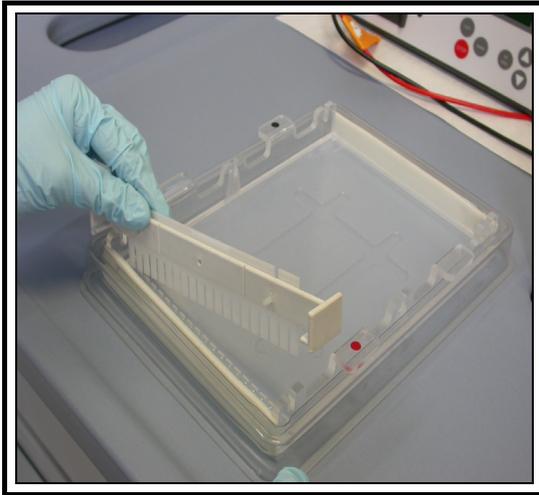


Figura 22. Retirada del peine.

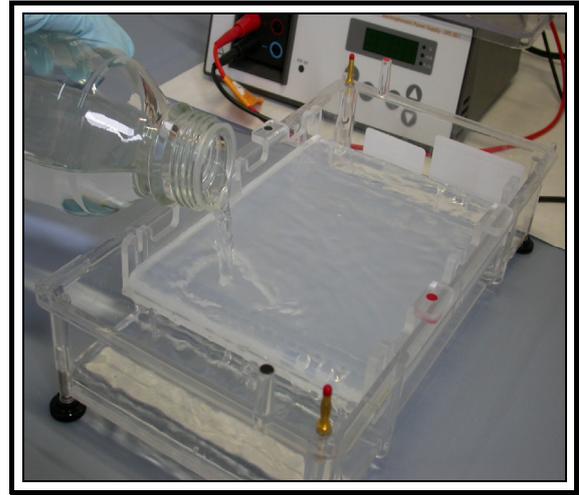


Figura 23. Llenado con TBE.

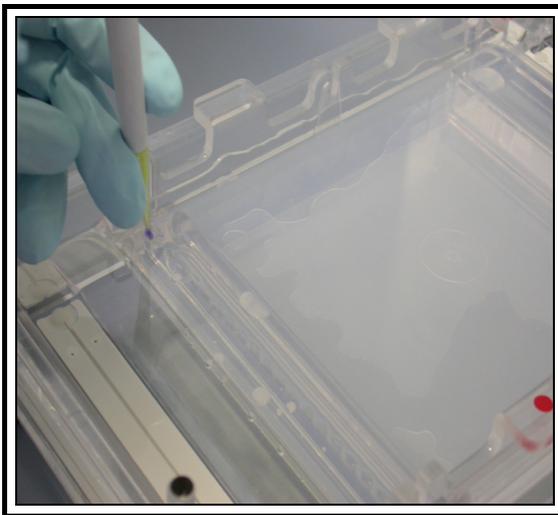


Figura 24. Se cargan las muestras.

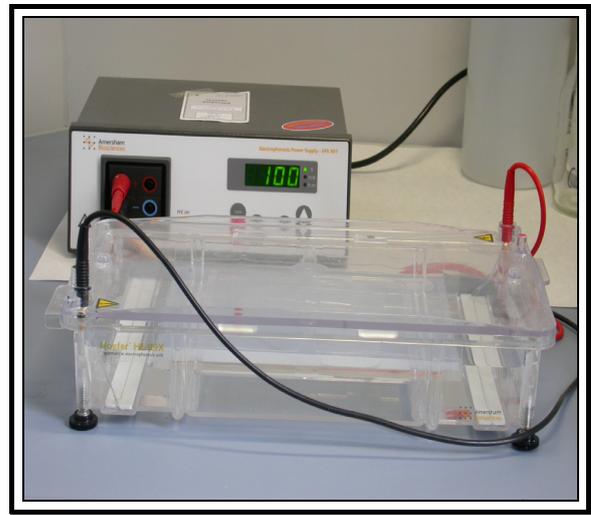


Figura 25. Puesta en marcha.

3.6.5. Lectura, interpretación de las bandas de electroforesis.

La observación de las bandas se realizó en un transiluminador ultravioleta (Figura 26) (Vilber Lourmat, Marne la Vallée Cedex, Francia). Las imágenes se fotografiaron con maquina digital (Nikon Coolpix 4500, Tokio, Japan) y se almacenaron con formato Tagged Image File Format (TIFF).

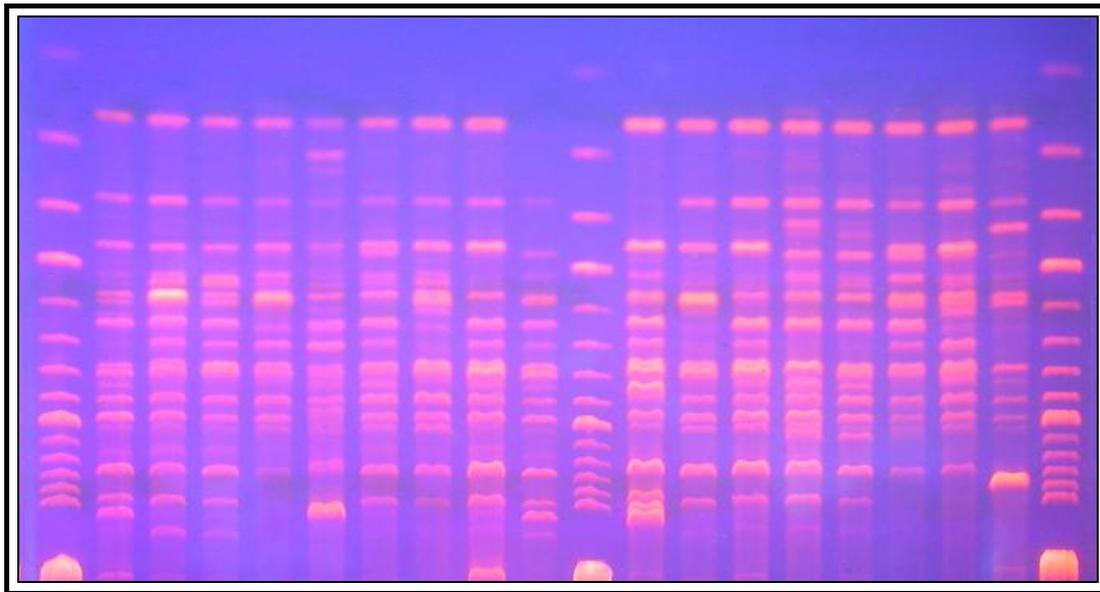


Figura 26. Revelado de las bandas en transiluminador ultravioleta.

En primer lugar se procedió a comparar visualmente las bandas de un mismo niño y que corrían en un único gel. Ello nos permitió descartar un alto número de cepas idénticas. Para depurar más la técnica se volvieron a repetir geles haciendo que aquellas cepas que visualmente proporcionaban unas bandas más similares corrieran juntas en un gel. La lectura visual de las bandas se realizó por tres observadores previamente entrenados.

Posteriormente se utilizó el programa Fingerprinting II Informatix™ Software (BioRad, Laboratorios, Inc. California, Usa) para analizar y comparar las bandas provenientes de todos los escolares y aquellas que eran dudosas aisladas en un mismo niño.

Se utilizó el coeficiente de Pearson de tal forma que el programa compara picos de curvas en función de la mayor o menor intensidad de las bandas y situación en el gel, lo que permitió obtener los dendogramas correspondientes a cada colegio.

Las cepas se consideraron pertenecientes al mismo genotipo cuando existía una homología igual o superior al 80%. Se tomó este valor en función de:

- a) Índice medio de similitud obtenido por Li y Caufield¹³⁵ para OPA-O2.
- b) Nuestra propia evaluación de la fiabilidad de la metodología utilizada. Para ello se hicieron correr extraídos de la misma cepa en tres geles distintos con las condiciones estandarizadas.

135 Li Y, Caufield P. Arbitrarily primed polymerase chain reaction fingerprinting for the genotypic identification of mutans streptococci from humans. *Oral Microbiol Immunol* 1998; 13:17-22.

c) Nuestros propios resultados una vez analizados con el programa Fingerprinting II Informatix™ Software, ya que si el punto de corte hubiese sido superior, la diversidad genotípica habría sido demasiado alta.

Una vez seleccionados los genotipos de cada niño estos se denominaron con letras mayúsculas en orden alfabético y comenzando por la letra A que no tenía que coincidir necesariamente con el perfil de otro escolar con la misma denominación. Posteriormente se comparaban con los de los demás individuos para establecer grupos de homología mediante números romanos, a fin de establecer los genotipos que eran compartidos por los sujetos estudiados y así determinar en los que se podía haber producido una posible transmisión horizontal.

En las figuras 27 y 28 se observan algunos geles, señalándose un ejemplo de dos bandas con homología superior al 80% según el programa Fingerprinting II Informatix™ Software y genotipos pertenecientes a distintos grupos de homología.

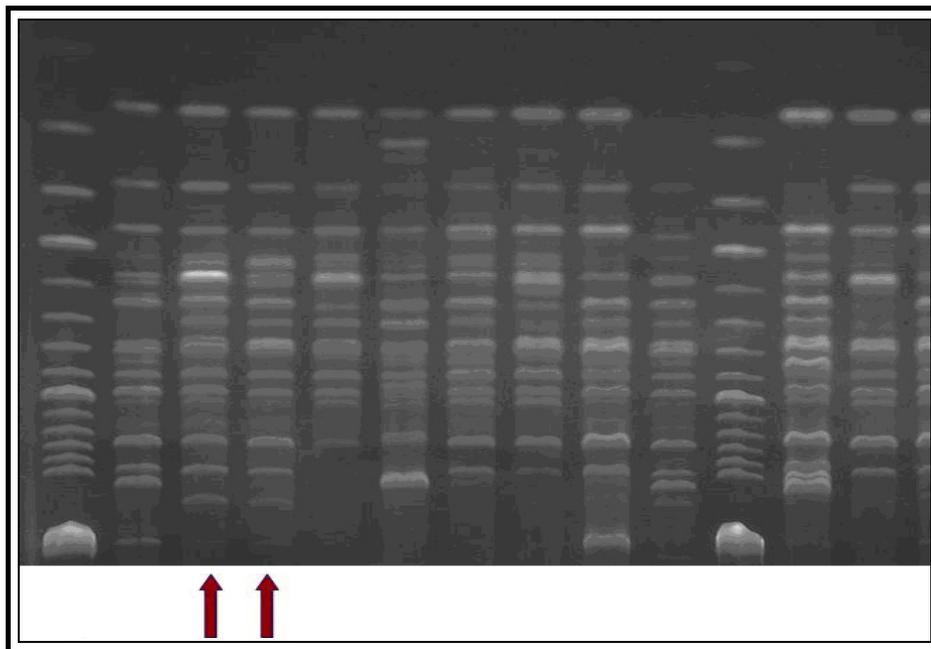


Figura 27. Bandas con homología superior al 80%.

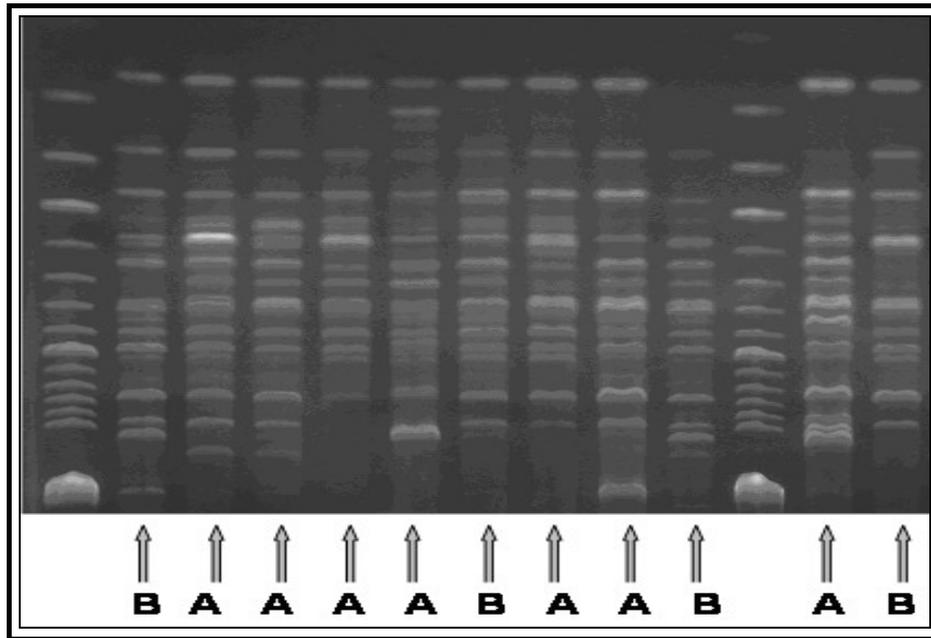


Figura 28. Gel con diferentes genotipos.

De forma similar se procedió con las muestras aisladas de los escolares examinados a los 18 meses en las que una vez determinados visualmente el número de genotipos diferentes en cada uno de ellos, se hacían correr en un mismo gel los genotipos aislados en cada niño a nivel basal y a los 18 meses con el objeto de determinar la estabilidad, la ganancia y/o la pérdida de los mismos. Para evaluar la presencia de genotipos compartidos, se procedió de la forma previamente descrita para el estudio realizado al inicio (Figura 29). Los genotipos identificados a los 18 meses se denominaron de forma análoga al estudio basal pero con letras minúsculas.

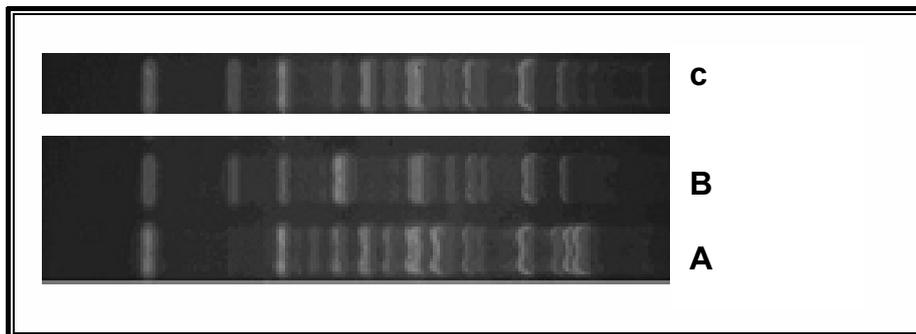


Figura 29. Ejemplo de un nuevo genotipo adquirido en uno de los escolares que no se corresponde ni con sus patrones basales ni con los de ningún compañero.

3.7. Reproducibilidad.

En las diversas etapas se efectuaron controles, algunos de los cuales ya se han señalado. El 20% de las siembras de saliva se realizaron por duplicado; tres personas distintas llevaron a cabo el recuento de colonias, cotejando sus resultados.

En todas las extracciones de ADN se empleó un control negativo y cada cinco ciclos se repetía el procedimiento en una cepa de cada uno de ellos con el fin de comprobar la falta de contaminación con ADN extraño.

El cebador y las condiciones de la PCR fueron estudiadas en una prueba piloto previa; se emplearon cepas patrones para la reacción en distintos días, hallando siempre el mismo patrón de bandas.

Cada ocho ensayos de AP-PCR se repitieron las amplificaciones con una cepa de cada ciclo y se separó el producto en gel de agarosa, confirmando la homología entre los ADN que pertenecían a la misma cepa.

El estudio de las bandas por medio del programa Fingerprinting II Informatix™ Software (BioRad, Laboratorios, Inc. California, Usa) se realizó por duplicado, en dos tiempos distintos, obteniendo los mismos resultados.

3.8. Tratamiento estadístico.

Los datos se procesaron mediante el programa SPSS versión 13.0. En el análisis descriptivo de los datos se calculó la media muestral y la correspondiente desviación típica o estándar de las variables objeto de estudio. Para comparar las variables: recuentos de EGM y LB e índice de caries cod y cos basales, Δ CAOD, Δ CAOS, Δ COcoD, Δ COcoS a los 18 meses, entre niños con 0, 1 y 2 genotipos, se utilizó el test de Kruskal-Wallis. La comparación de estas mismas variables entre niños con 1 y 2 genotipos, así como entre los que comparten genotipos y no lo hacen, se llevó a cabo mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

4. RESULTADOS

4.1. Factores demográficos. Índices de caries. Recuentos de bacterias cariógenas. Aislamiento e identificación de los estreptococos del grupo mutans. Estudio basal y a los 18 meses.

En las tablas 11 y 12 quedan recogidos de cada uno de los escolares incluidos en el estudio, los datos demográficos y los recuentos de bacterias cariógenas (referidos a EGM Y LB en CRT Bacteria[®]) tanto basales como a los 18 meses. Estos datos se exponen de forma resumida en la tabla 13, indicando los valores medios (\bar{x}) y desviaciones estándar (DE), para cada uno de los colegios y en la globalidad. La edad media de los niños al inicio del estudio fue de 6.80 (± 0.35), el 55.2% eran varones y el 44.8% niñas. En el Colegio Juan XXIII el nivel social predominante fue el IV (47.4%) y en el Padre Manjón el III (41.4%). En el primer centro, al inicio del estudio, los recuentos basales y a los 18 meses de CRT Bacteria[®] EGM fueron de 3.32 (± 1.12) y 3.08 (± 1.2) respectivamente, mientras que los de CRT Bacteria[®] LB fueron de 3.45 (± 0.95) al inicio y de 3.34 (± 0.99) a los 18 meses. Por otro lado, en el segundo de los colegios a nivel basal, los recuentos CRT Bacteria[®] EGM y CRT bacteria LB fueron respectivamente de 1.90 (± 1.5) y 2.28 (± 1.6) y los 18 meses de 2.45 (± 1.5) para EGM y de 2.52 (± 1.35) para LB.

En las tablas 14 y 15 se describen los índices de caries de cada escolar para cada centro, tanto a nivel basal como sus incrementos a los 18 meses. En la tabla 16 se resumen estos datos para cada centro y en la totalidad de la población indicando los valores medios (\bar{x}) y desviaciones estándar (DE). En el Colegio Juan XXIII, el cod fue de 1.89 (± 3.5) y el cos de 3.47 (± 7.24); a los 18 meses, el Δ CAOD fue 0.97 (± 1.46), el Δ CAOS 1.24 (± 2.01), el Δ COcoD 1.97 (± 2.37) y el Δ COcoS de 3.32 (± 3.94). En el Padre Manjón, se obtuvo un cod y un cos de 1.79 (± 1.98) y 2.86 (± 3.64) respectivamente; pasados 18 meses, el Δ CAOD fue de 1.03 (± 1.40), el Δ CAOS de 1.38 (± 2.00), el Δ COcoD de 2.10 (± 2.11) y el Δ COcoS de 3.86 (± 3.8).

En las tablas 17 y 18 se recogen para ambos colegios en la totalidad temporal del estudio, los datos microbiológicos referidos, niño a niño, a las colonias estudiadas (en saliva para los dos momentos de recogida de muestra e incluyendo además tomas de placas en algunos escolares a nivel basal), las que no metabolizaban el manitol, las que no se desarrollaron en el medio con este polialcohol, los casos en los que no fue posible detectar colonias de EGM y las especies halladas. Estos datos se analizan en las tablas 19 y 20. En total se estudiaron 1321 colonias compatibles con morfotipos de EGM, 786 al inicio (11.73 de media por niño), independientemente del origen de la muestra (saliva o placas), y 545 a los 18 meses (8.0 de media por niño); 234 no degradaron el manitol; no se desarrollaron en el medio con el mismo 76. Se

Resultados

identificaron 1011 cepas de EGM; 959 pertenecían a *S. mutans* (94.48%), 45 (4.43%) pertenecían a la especie *S. sobrinus*, 8 colonias fueron identificadas como *S. criceti* (0.78%) y sólo 3 como *S. rattus* (0.3%).

En la tabla 21 se refleja que del total de 67 escolares, 14 no tuvieron *S. mutans* ni a nivel basal ni a los 18 meses; en 2 escolares en los que se aisló este microorganismo al inicio no fue posible hacerlo posteriormente y otro niño que no tenía *S. mutans* lo adquirió a los 18 meses.

Tabla 11. Escolares del Colegio Juan XXIII seguidos 18 meses (n=38). Factores demográficos y recuentos de bacterias cariogénas basales (B) y a los 18 meses (18).

Escolar	Sexo	Edad	Nivel social	Recuento CRT® Bacteria SM		Recuento CRT® Bacteria LB	
				B	18	B	18
EAM(1)	F	6.70	VI	4	4	4	3
AAR(2)	M	7.10	IVb	1	4	1	4
AA(3)	M	6.61	II	4	4	4	4
PCC(4)	F	6.50	III	1	1	4	4
JCF(5)	M	6.60	IVa	4	4	4	4
ACC(8)	M	6.67	IVa	1	2	3	4
DCG(9)	M	6.92	IVa	4	4	4	4
FDM(10)	M	7.23	IVb	4	4	4	4
AEM(11)	M	7.05	IVb	1	1	2	2
RDM(12)	M	7.31	IVb	4	3	4	4
MJE(13)	F	6.83	IVb	4	4	4	3
CEH(14)	F	6.67	IVb	3	4	1	4
CFB(15)	M	6.78	VI	1	1	4	2
AFG(16)	M	7.03	VI	4	3	4	4
CFC(17)	F	6.19	VI	4	4	3	4
AGO(18)	F	7.13	IVb	4	0	4	0
SGG(19)	F	6.93	IVa	4	4	4	4
YGJ(20)	F	7.32	IVa	4	4	3	4
PGM(21)	M	6.45	I	4	3	4	4
FC(22)	M	6.55	VI	4	4	4	4
AHM (23)	M	6.26	II	3	3	3	1
LJB(24)	F	6.59	VI	4	3	3	3
MJ(25)	F	7.33	IVa	4	3	4	4
CMA(26)	M	6.41	VI	4	4	3	4
CMC(27)	F	6.82	III	3	3	1	3
MMR(28)	F	6.66	IVb	4	4	4	1
CMH (29)	M	7.34	IVb	4	4	4	4
JMM(30)	M	6.57	V	4	1	4	3
TMG(31)	M	6.76	VI	4	4	4	4
ENM(34)	M	6.60	III	3	2	4	4
YNM(35)	M	7.12	VI	4	4	4	3
MPG(36)	F	7.27	III	4	4	4	4
VRV(37)	M	6.91	III	1	1	2	3
CSS(38)	F	6.95	IVa	4	4	2	3
JVL(39)	M	6.67	II	3	2	4	3
DVN(40)	F	6.35	VI	4	4	4	4
IYL(42)	M	6.51	IVb	3	3	4	3
NMC(43)	F	6.41	IVa	2	2	4	3

EGM: estreptococos del grupo mutans; LB: lactobacilos.

Resultados

Tabla 12. Escolares del Colegio Padre Manjón seguidos 18 meses (n=29). Factores demográficos y recuentos de bacterias cariogénas basales (B) y a los 18 meses (18).

Escolar	Sexo	Edad	Nivel social	Recuento CRT® Bacteria SM		Recuento CRT® Bacteria LB	
				B	18	B	18
AJS(51)	F	7.10	V	3	4	2	4
ASL(52)	M	7.32	II	1	3	1	2
IBV(53)	F	7.03	II	2	3	1	2
PLM(55)	M	6.67	III	2	2	2	4
CF(56)	F	6.59	III	4	4	4	3
DR(57)	M	6.66	II	0	3	0	3
PMC(59)	M	6.35	VI	3	3	0	2
JF(60)	M	7.16	I	4	3	3	3
JSH(61)	M	6.50	IVb	0	0	0	3
AML(62)	F	6.19	VI	2	3	3	1
LFD(64)	F	6.54	III	4	4	3	4
JMH(65)	M	6.41	IVb	2	1	4	3
ETC(66)	F	6.45	V	0	1	4	3
MR(67)	M	6.26	VI	3	3	3	2
VMG(70)	M	6.16	V	2	1	3	1
FBJ(71)	M	7.80	III	0	0	3	3
RZC(72)	F	6.70	VI	4	4	3	2
FBR(73)	M	6.78	VI	4	2	4	2
JLB(74)	M	7.10	V	1	4	4	4
VPP(75)	F	6.95	IVa	1	3	4	4
NMC(76)	F	6.41	VI	4	4	2	4
ZLF(79)	F	6.83	IVb	1	4	4	4
ERS(80)	M	6.78	IVb	4	4	4	3
LRR(82)	F	6.41	III	1	1	1	4
AGG(83)	F	7.33	IVb	1	1	0	3
AOG(84)	M	7.82	IVb	1	4	0	4
JMF(85)	M	6.75	I	0	1	0	1
SBG(87)	F	6.78	V	0	4	0	3
RR(88)	F	7.15	V	1	4	4	4

EGM: estreptococos del grupo mutans; LB: lactobacilos.

Tabla 13. Escolares estudiados. Factores demográficos. Recuentos de bacterias cariogénas basales (B) y a los 18 meses (18). Media y desviación estándar [\bar{x} (DE)].

	Edad	Sexo		Nivel social	%	Recuento SM		Recuento LB		
		V (%)	(F%)			B	18	B	18	
Juan XXIII n =38	\bar{x} DE	6.81 (0.23)	22(57.9)	16(42.1)	I-II	10.5	3.32 (1.12)	3.08 (1.2)	3.45 (0.95)	3.34 (0.99)
					III	13.2				
					IV	47.4				
					V-VI	28.9				
Padre Manjón n =29	\bar{x} DE	6.79 (0.42)	16(51.7)	14(48.3)	I-II	13.8	1.90 (1.5)	2.45 (1.5)	2.28 (1.6)	2.52 (1.35)
					III	41.4				
					IV	20.7				
					V-VI	37.9				
Total n =67	\bar{x} DE	6.80 (0.35)	38(55.8)	30(44.2)	I-II	11.9	2.7 (1.46)	2.81 (1.36)	2.94 (1.4)	2.99 (1.22)
					III	19.4				
					IV	35.8				
					V-VI	32.8				

EGM: estreptococos del grupo mutans; LB: lactobacilos.

Tabla 14. Escolares del Colegio Juan XXIII seguidos 18 meses (n=38). Índices de caries basales e incrementos a los 18 meses.

E	BASAL					18 MESES				
	CAOD	CAOS	cod	cos	ir(%)	ΔCAOD	ΔCAOS	Δcod	Δcos	ir(%)
1	0	0	10	20	60	4	6	-2	-2	100
2	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	4	5	1	1	100
5	0	0	2	2	0	0	0	2	4	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	4	4	0	1	1	2	8	17
10	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	1	1	100	0	0	1	2	0
13	0	0	18	36	0	0	0	-10	-11	0
14	0	0	1	1	0	2	2	1	1	0
15	0	0	7	12	29	0	0	-2	-2	40
16	0	0	1	2	0	3	3	2	3	0
17	0	0	3	4	0	0	0	1	4	50
18	0	0	1	1	0	4	7	1	2	0
19	0	0	1	1	0	0	0	1	5	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	5	11	0	2	4	1	11	67
22	0	0	4	4	0	3	3	-1	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	2	2	0	0	0	0	1	100
25	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
26	0	0	1	2	0	4	4	4	4	0
27	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0
28	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
29	0	0	1	1	0	2	2	2	5	0
30	0	0	1	2	0	0	0	2	2	67
31	0	0	4	15	0	4	6	2	5	17
34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0	1	1	8	8	100
39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	0	0	6	12	0	1	1	-3	-4	33
42	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

E: escolar; CAOD: número de dientes cariados, ausentes por caries y obturados; CAOS: número de superficies cariadas, ausentes por caries y obturadas; ir: porcentaje de dientes temporales obturados del total de cariados + obturados; cod: número de dientes temporales cariados y obturados; cos: número de superficies temporales cariadas y obturadas; Δ: incremento.

Resultados

Tabla 15. Escolares del Colegio Padre Manjón seguidos 18 meses (n=29). Índices de caries basales e incrementos a los 18 meses.

E	BASAL					18 MESES				
	CAOD	CAOS	cod	cos	ir(%)	Δ CAOD	ΔCAOS	Δ cod	Δcos	ir(%)
51	0	0	3	5	0	1	1	4	6	75
52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
53	0	0	2	2	100	4	6	3	5	0
55	0	0	0	0	0	2	2	1	2	100
56	0	0	1	1	0	3	3	4	7	75
57	0	0	1	1	0	1	2	1	2	0
59	0	0	0	0	0	0	0	3	4	0
60	0	0	3	6	33,33	0	0	7	16	0
61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
64	0	0	1	2	100	0	0	6	12	0
65	1	2	4	4	100	2	0	7	11	42,86
66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
67	0	0	4	8	0	2	4	3	6	66,67
70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
71	0	0	4	4	0	0	0	2	4	0
72	0	0	4	4	100	0	0	4	7	25
73	0	0	4	8	0	0	0	5	10	60
74	0	0	4	6	0	4	4	5	14	0
75	0	0	0	0	0	4	5	2	4	0
76	0	0	3	4	0	2	2	5	7	0
79	0	0	3	6	0	1	1	2	3	0
80	0	0	7	15	0	3	4	8	15	0
82	2	2	0	0	0	4	6	3	5	0
83	0	0	0	0	0	0	0	0	0	.
84	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	.
87	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
88	0	0	4	7	25	0	0	5	12	20

E: escolar; CAOD: número de dientes permanentes cariados, ausentes por caries y obturados; CAOS: número de superficies permanentes cariadas, ausentes por caries y obturadas; ir: porcentaje de dientes temporales obturados del total de cariados + obturados; cod: número de dientes temporales cariados y obturados; cos: número de superficies temporales cariadas y obturadas; Δ: incremento.

Tabla 16. Escolares seguidos 18 meses. Índices de caries basales e incrementos. Media y desviación estándar [\bar{x} (DE)].

		BASAL		18 MESES			
		cod	cos	ΔCAOD	ΔCAOS	ΔCOcoD	ΔCOcoS
Juan XXIII n =38	\bar{x} (DE)	1.89 (3.5)	3.47 (7.24)	0.97 (1.46)	1.24 (2.01)	1.97 (2.37)	3.32 (3.94)
Padre Manjón n =29	\bar{x} (DE)	1.79 (1.98)	2.86 (3.64)	1.03 (1.40)	1.38 (2.00)	2.10 (2.11)	3.86 (3.8)
Total n =67	\bar{x} (DE)	1.85 (2.96)	3.21 (5.59)	1 (1.42)	1.30 (2)	2.03 (2.25)	3.55 (3.87)

cod: número de dientes temporales cariados y obturados; cos: número de superficies temporales cariadas y obturadas; Δ: incremento; ΔCOcoD: incremento de dientes cariados y obturados; ΔCOcoS: incremento de superficies cariadas y obturadas.

Tabla 17. Estreptococos investigados a nivel basal y tras 18 meses en los escolares del Colegio Juan XXIII (n=38).

E	BASAL							TRAS 18 MESES						
	Col	SM	SS	SC	SR	M(-)	NC	Col	SM	SS	SC	SR	M(-)	NC
1-1	S 7	7	0	0	0	0	0	10	9	0	0	0	1	0
1-2	S 9	0	0	0	0	8	1	0	0	0	0	0	0	0
1-3	S 6	3	0	1	0	2	0	12	12	0	0	0	0	0
1-4	S 1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1-5	S 6	4	0	0	0	2	0	12	12	0	0	0	0	0
1-8	S 6	0	0	0	0	6	0	5	5	0	0	0	0	0
1-9	S 6	4	0	0	0	2	0	12	12	0	0	0	0	0
1-10	S 20	8	8	0	0	4	0	12	9	0	0	0	0	3
1-11	S 10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
1-12	S 11	3	0	0	0	8	0	2	0	0	0	0	0	2
1-13	S 6	3	0	2	0	1	0	11	11	0	0	0	0	0
1-14	S 19	13	1	0	0	4	1	12	12	0	0	0	0	0
1-15	S 6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0
1-16	S 6	5	0	1	0	0	0	11	11	0	0	0	0	0
1-17	S 21	14	2	0	0	4	1	19	9	0	0	0	10	0
1-18	S 12	5	2	0	0	5	0	10	9	0	0	0	1	0
1-19	S 6	4	0	1	0	1	0	12	10	0	0	0	0	2
1-20	S 6	5	0	0	0	1	0	12	11	0	0	0	0	1
1-21	S 6	6	0	0	0	0	0	8	2	6	0	0	0	0
1-22	S 6	6	0	0	0	0	0	12	12	0	0	0	0	0
1-23	S 3	3	0	0	0	0	0	9	9	0	0	0	0	0
	F 6	6	0	0	0	0	0							
	L 6	4	0	0	0	2	0							
1-24	S 6	6	0	0	0	0	0	10	10	0	0	0	0	0
	F 1	0	0	0	0	0	1							
	L 6	6	0	0	0	0	0							
1-25	S 3	2	0	0	0	1	0	7	7	0	0	0	0	0
	F 6	6	0	0	0	0	0							
	L 6	4	0	0	0	2	0							
1-26	S 2	1	0	1	0	0	0	10	10	0	0	0	0	0
	F 0	0	0	0	0	0	0							
	L 6	5	0	0	0	1	0							
1-27	S 3	3	0	0	0	0	0	9	9	0	0	0	0	0
	F 0	0	0	0	0	0	0							
	L 2	1	0	0	0	1	0							
1-28	S 6	5	0	1	0	0	0	10	10	0	0	0	0	0
	F 0	0	0	0	0	0	0							
	L 6	6	0	0	0	0	0							
1-29	S 6	6	0	0	0	0	0	9	9	0	0	0	0	0
1-30	S 6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0
1-31	S 6	6	0	0	0	0	0	11	11	0	0	0	0	0
	F 6	4	0	0	0	2	0							
	L 6	6	0	0	0	0	0							
1-34	S 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-35	S 14	9	2	0	1	1	1	11	11	0	0	0	0	0
1-36	S 6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0
1-37	S 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-38	S 6	6	0	0	0	0	0	12	12	0	0	0	0	0
1-39	S 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-40	S 21	11	1	0	0	3	6	11	11	0	0	0	0	0
1-42	S 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-43	S 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

E: escolar; col: número de colonias estudiadas; SM: *Streptococcus mutans*; SS: *Streptococcus sobrinus*; SC: *Streptococcus criceti*; SR: *Streptococcus ratti*; M(-): bacteria que no metaboliza el manitol; NC bacteria que no se desarrolla en el medio con este polialcohol; S: saliva; F: placa de fisuras; L: placa de superficies lisas.

Resultados

Tabla 18. Estreptococos investigados a nivel basal y tras 18 meses en los escolares del Colegio Padre Manjón (n=29).

E	Basal							18 meses						
	Col	SM	SS	SC	SR	M(-)	NC	Col	SM	SS	SC	SR	M(-)	NC
2-51	S	5	5	0	0	0	0	10	10	0	0	0	0	0
	F	0	0	0	0	0	0							
	L	6	6	0	0	0	0							
2-52	S	8	0	0	0	0	3	7	7	0	0	0	0	0
	F	0	0	0	0	0	0							
	L	6	3	0	1	0	2							
2-53	S	6	3	0	0	0	3	10	10	0	0	0	0	0
	F	3	2	0	0	0	0							
	L	11	6	0	0	0	4							
2-55	S	10	9	0	0	0	1	8	8	0	0	0	0	0
	F	6	5	0	0	0	0							
	L	6	5	0	0	0	1							
2-56	S	15	13	0	0	0	2	9	9	0	0	0	0	0
2-57	S	15	5	0	0	0	10	10	10	0	0	0	0	0
2-59	S	9	3	0	0	0	6	10	10	0	0	0	0	0
	F	5	2	0	0	0	1							
	L	11	2	0	0	0	8							
2-60	S	8	6	0	0	0	2	10	10	0	0	0	0	0
	F	8	8	0	0	0	0							
	L	8	8	0	0	0	0							
2-61	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-62	S	20	10	0	0	1	9	10	10	0	0	0	0	0
2-64	S	10	9	0	0	0	0	11	11	0	0	0	0	0
2-65	S	4	4	0	0	0	0	10	7	3	0	0	0	0
	F	6	5	0	0	0	1							
	L	4	3	0	0	0	1							
2-66	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-67	S	6	3	0	0	0	3	10	10	0	0	0	0	0
	F	6	4	2	0	0	0							
	L	13	3	4	0	0	6							
2-70	S	19	14	0	0	0	5	9	5	0	0	0	3	1
2-71	S	6	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0
2-72	S	13	13	0	0	0	0	10	10	0	0	0	0	0
	F	6	6	0	0	0	0							
	L	4	3	0	0	0	1							
2-73	S	17	8	2	0	0	7	8	8	0	0	0	0	0
2-74	S	21	14	0	0	0	5	10	10	0	0	0	0	0
2-75	S	5	3	0	0	0	0	10	10	0	0	0	0	0
2-76	S	8	7	0	0	0	1	8	8	0	0	0	0	0
	F	9	4	1	0	0	1							
	L	8	6	0	0	0	1							
2-79	S	8	8	0	0	0	0	12	12	0	0	0	0	0
	F	13	12	0	0	0	1							
	L	12	12	0	0	0	0							
2-80	S	6	6	0	0	0	0	9	9	0	0	0	0	0
2-82	S	7	7	0	0	0	0	10	10	0	0	0	0	0
2-83	S	26	3	0	0	0	10	8	0	0	0	0	0	8
2-84	S	13	12	0	0	0	1	18	10	0	0	0	0	8
2-85	S	23	3	0	0	1	16	5	1	0	0	1	0	3
2-87	S	22	6	5	0	0	11	11	8	2	0	0	1	0
2-88	S	4	4	0	0	0	0	10	10	0	0	0	0	0

E: escolar; col: número de colonias estudiadas; SM: *Streptococcus mutans*; SS: *Streptococcus sobrinus*; SC: *Streptococcus criceti*; SR: *Streptococcus ratti*; M(-): bacteria que no metaboliza el manitol; NC bacteria que no se desarrolla en el medio con este polialcohol; S: saliva; F: placa de fisuras; L: placa de superficies lisas.

Tabla 19. Distribución de las colonias identificadas a partir del medio MSB en el total de escolares. Evolución a los 18 meses. Media y desviación estándar [\bar{x} (DE)]

		Juan XXIII n =38		Padre Manjón n =29		Total	
		n	Media(DE)	n	Media (DE)	n	Media(DE)
N° total de colonias	Basal	321	8.45 (6.01)	465	10.03 (8.54)	786	11.73 (8.10)
	18 meses	281	7.39 (5.37)	255	8.79 (3.66)	535	8.00 (4.73)
Manitol -	Basal	90	2.36 (2.76)	128	4.41 (4.72)	218	3.25 (3.83)
	18 meses	12	0.31 (1.62)	4	0.14 (0.58)	16	0.23 (1.28)
No crecimient.	Basal	11	0.33 (1.08)	37	1.27 (2.64)	48	0.76 (2.00)
	18 meses	8	0.21(0.66)	20	0.69 (2.1)	28	0.41 (1.47)
<i>S. mutans</i>	Basal	196	5.94 (0.66)	283	9.76 (7.47)	479	7.73 (6.38)
	18 meses	255	8.79 (3.74)	225	7.76 (3.76)	480	8.28 (3.76)
<i>S. sobrinus</i>	Basal	16	0.48 (1.48)	14	0.48 (1.45)	30	0.48 (1.45)
	18 meses	6	0.16 (0.97)	5	0.17 (0.66)	11	0.16 (0.84)
<i>S. criceti</i>	Basal	7	0.21 (0.48)	1	0.03 (0.186)	8	0.13 (0.38)
	18 meses	0	0	0	0	0	0
<i>S. ratti</i>	Basal	1	0.03 (0.174)	2	0.07 (0.258)	3	0.05 (0.216)
	18 meses	0	0	1	0.014(0.121)	1	0.014(0.121)

Tabla 20. Número y porcentaje de especies de EGM identificadas a nivel basal y a los 18 meses.

		Juan XXIII n =38		Padre Manjón n =29		Total	
		n	%	n	%	n	%
EGM	Basal	220	65.53	300	64.51	520	66.15
	18 meses	261	92.88	230	90.19	491	91.77
	Total	481	79.9	530	73.61	1011	76.53
<i>S. mutans</i>	Basal	196	89.09	283	94.33	479	92.11
	18 meses	255	96.22	225	97.8	480	96.96
	Total	451	92.98	508	95.84	959	94.48
<i>S. sobrinus</i>	Basal	16	7.2	14	4.66	30	5.76
	18 meses	10	3.77	5	2.2	15	3.1
	Total	26	5.36	19	3.58	45	4.43
<i>S. criceti</i>	Basal	7	3.2	1	0.33	8	1.53
	18 meses	0	0	0	0	0	0
	Total	7	1.44	1	0.19	8	0.78
<i>S. ratti</i>	Basal	1	0.45	2	0.66	3	0.57
	18 meses	0	0	1	0.43	1	0.09
	Total	1	0.20	3	0.56	3	0.3

Tabla 21. Resumen descriptivo de los escolares colonizados por *S. mutans* y sus variaciones a lo largo del estudio.

	Tienen <i>S. mutans</i> antes y después.	No tienen <i>S. mutans</i> ni antes ni después.	Tienen <i>S. mutans</i> antes y no después.	Tienen <i>S. mutans</i> después.
Juan XXIII n = 38	n =25	n =11	n =1	n =1
Padre Manjón n =29	n =25	n =3	n =1	-
Total n =67	n =50	n =14	n =2	n =1

4.2. Resultados de la AP-PCR

Al amplificar con el cebador OPA-02 los ácidos nucleicos extraídos a las colonias de *S. mutans* y realizarles la electroforesis, se pudo comprobar que se separaban en gel de agarosa entre 10 y 20 bandas, con fragmentos cuyas longitudes variaban desde 3000 (± 100) pares de bases (bp) hasta 250 (± 30) bp.

En la figuras 30 y 31 se reflejan los dendogramas correspondientes a las cepas de los dos colegios estudiadas considerandose, tal como se señaló, que pertenecían al mismo genotipo cuando la homología era igual o superior al 80%.

En las figuras 32, 33 y 34 se recogen tres ejemplos de genotipia a los 18 meses: un caso en el que hay conservación del patrón de bandas, un ejemplo de una nueva adquisición que no se correspondía con ningún genotipo hallado al inicio y un último caso de adquisición por transmisión horizontal

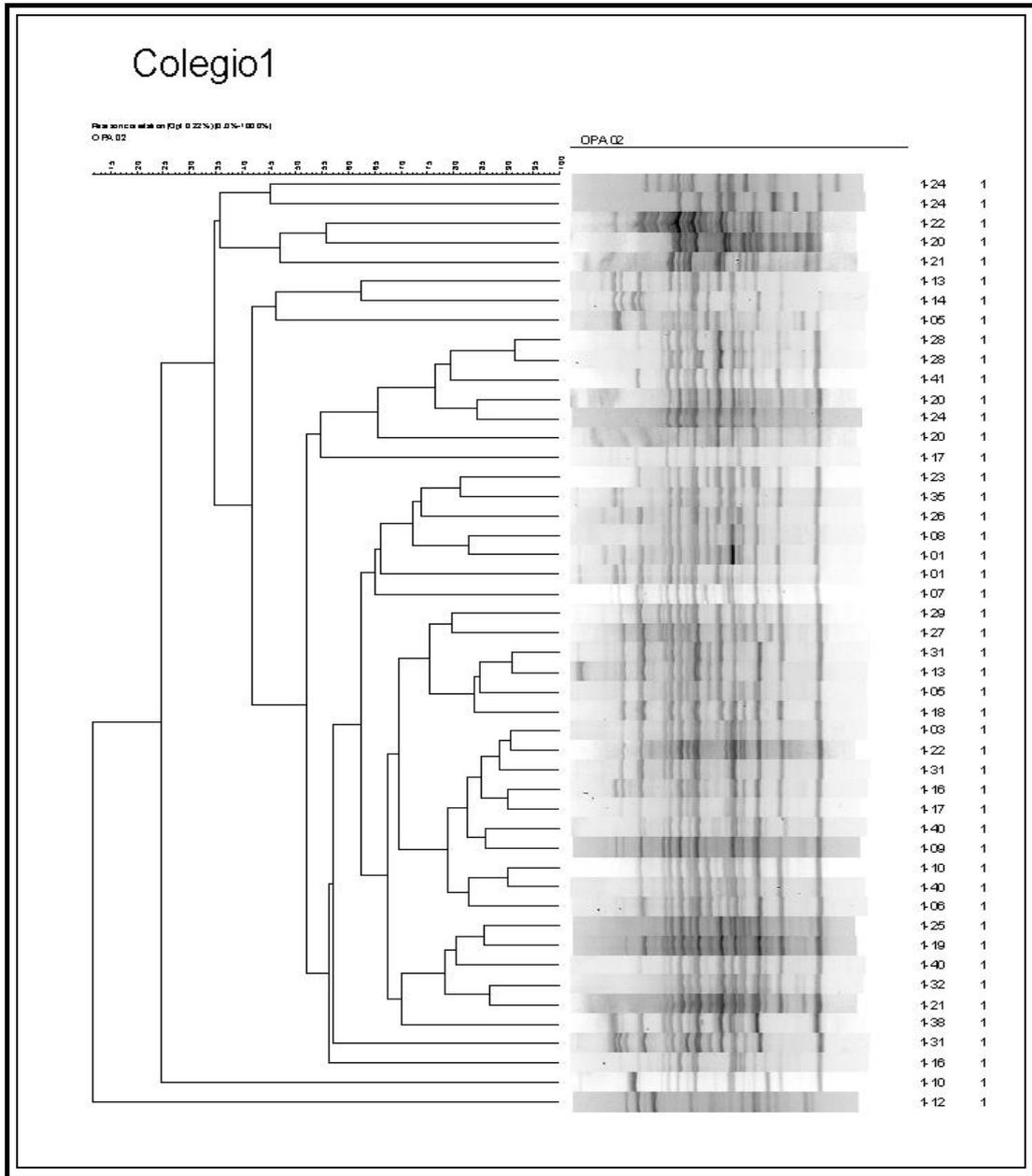


Figura 30. Dendrograma del colegio Juan XXIII.

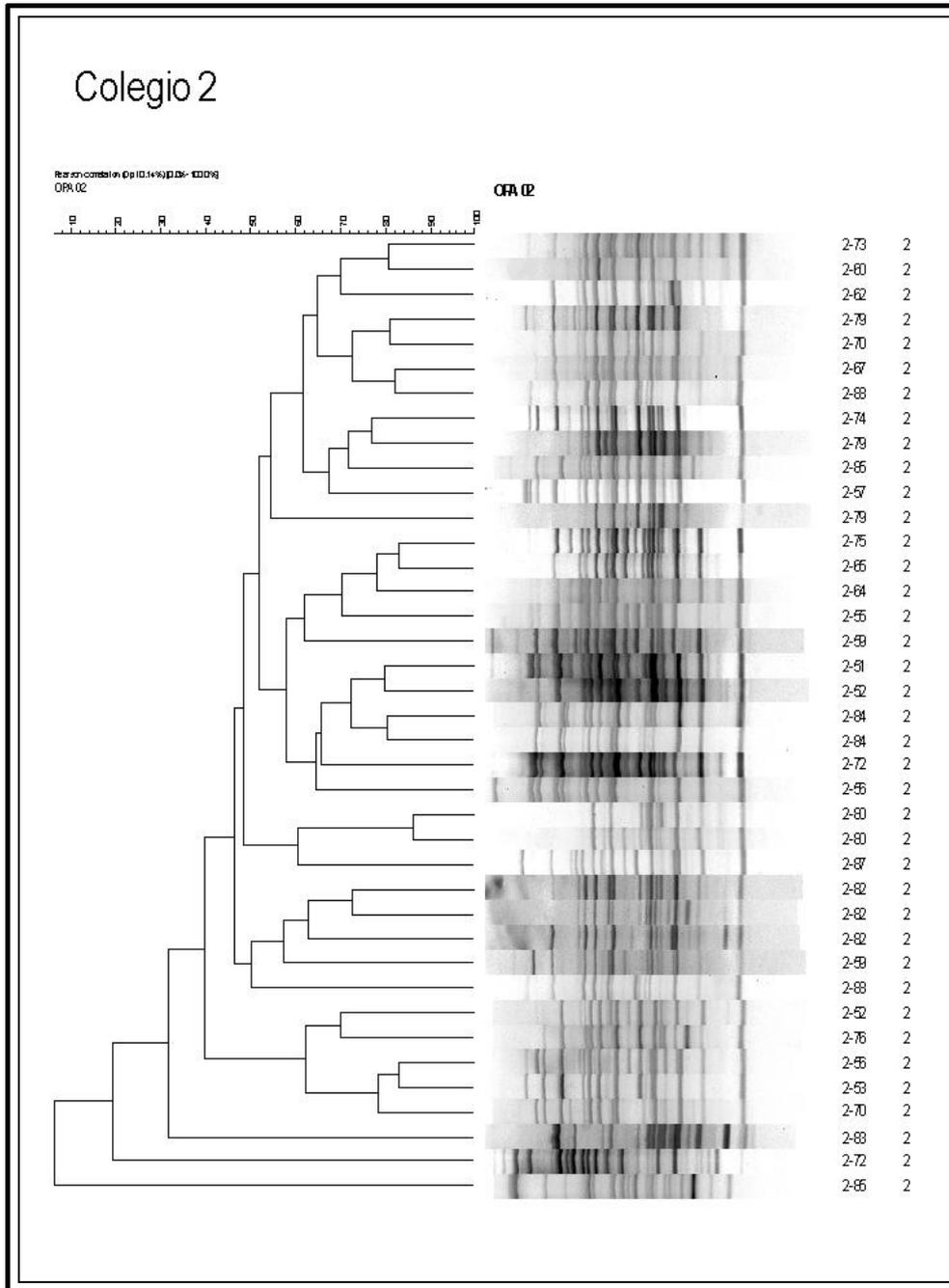


Figura 31. Dendrograma del colegio Padre Manjón.

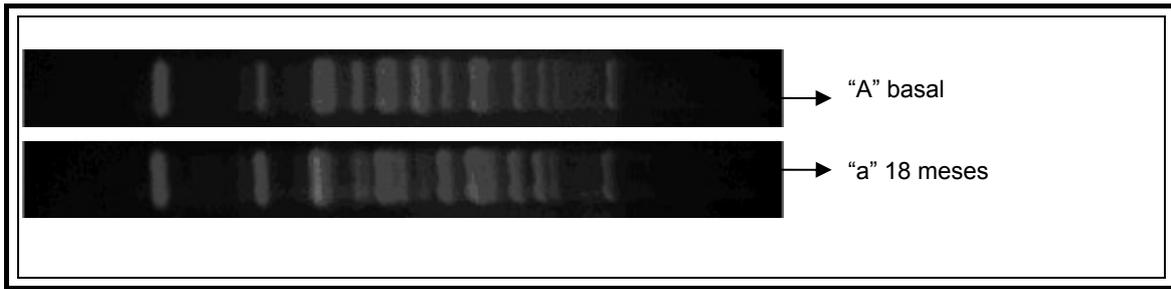


Figura 32. Conservación del genotipo a los 18 meses.

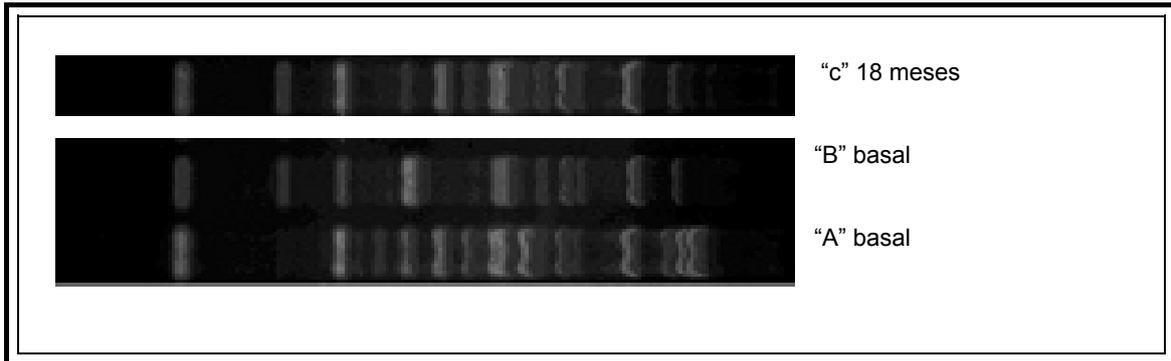


Figura 33. Adquisición de un nuevo genotipo que no se corresponde ni con sus patrones basales ni con los de ningún compañero.

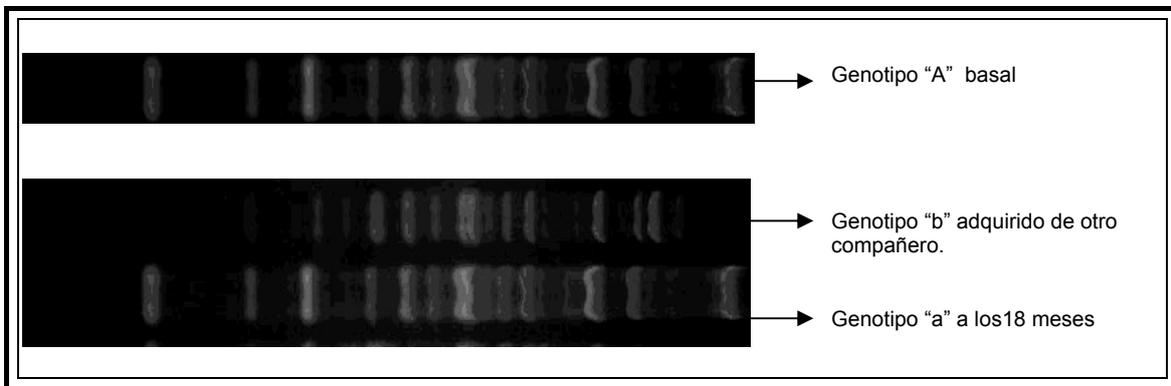


Figura 34. Adquisición de un nuevo genotipo por transmisión horizontal

4.3. Estudio de los genotipos.

En las tablas 22 y 23 se recogen los genotipos identificados en cada uno de los escolares para ambos colegios tanto a nivel basal como a los 18 meses, incluyendo además ganancia o pérdida de genotipos para cada caso. Así, para el Colegio Juan XXIII, 19 niños mantienen estables sus genotipos, 2 escolares pierden un genotipo y uno de ellos gana otro diferente y por último, 5 niños ganan al menos un genotipo: uno de ellos gana dos y los otros cuatro sólo uno. En el Colegio Padre Manjón hay 16 niños que presentan estabilidad en sus genotipos, 6 pierden un genotipo, pero dos de ellos adquieren otro diferente, para finalizar, 4 escolares ganaron uno o más genotipos: 3 ganan uno y 1 ganó dos.

En las tablas 24, 25 y 26 se resumen los balances de pérdidas y adquisiciones de genotipos y se hace una descriptiva de la distribución del número de genotipos en las dos fases del estudio.

En la tabla 27 quedan reflejados los porcentajes de estabilidad de genotipos: 91.42% para el Colegio Juan XXIII y 81.25% en el Padre Manjón. En la tabla 26 se recoge un resumen general de estabilidad con un balance de pérdidas y adquisiciones de genotipos.

Tabla 22. Genotipos identificados a nivel basal y a los 18 meses en escolares con *S. mutans* aislados en escolares del Colegio Juan XXIII (n=27)

E	BASAL		18 MESES		ESTABILIDAD		
	Col SM	Genotipos	C SM	Genotipos	Genotipos perdidos	Genotipos nuevos	Nº Total genotipos
1-1	S 7	AB	9	AB	0	0	2
1-3	S 3	A	12	A	0	0	1
1-5	S 4	A	12	AB	0	1	2
1-8	S 0	-	5	A	0	1	1
1-9	S 4	A	12	A	0	0	1
1-10	S 8	AB	9	A	1	0	1
1-12	S 3	A	0	-	1	0	1
1-13	S 3	AB	11	AB	0	0	2
1-14	S 13	A	12	A	0	0	1
1-16	S 5	AB	11	AB	0	0	2
1-17	S 14	AB	9	AB	0	0	2
1-18	S 5	A	9	A	0	0	1
1-19	S 4	A	10	A	0	0	1
1-20	S 5	A	11	ABC	0	2	3
1-21	S 6	A	2	AB	0	1	2
1-22	S 6	A	12	AB	0	1	2
1-23	S 3 F 6 L 4	A A A	9	A	0	0	1
1-24	S 6 F 0 L 6	A - AB	10	ABC	0	1	3
1-25	S 2 F 6 L 4	A A A	7	A	0	0	1
1-26	S 1 F 0 L 5	A - A	10	A	0	0	1
1-27	S 3 F 0 L 1	A - A	9	A	0	0	1
1-28	S 5 F 0 L 6	AB - B	10	AB	0	0	2
1-29	S 6	A	9	A	0	0	1
1-31	S 6 F 4 L 6	A AB -	11	ABC	0	1	3
1-35	S 9	A	11	A	0	0	1
1-38	S 6	A	12	A	0	0	1
1-40	S 11	AB	11	BC	1	1	2

E: escolar; Col SM: colonias de *S. mutans*; S: saliva; F: placa de fisuras; L: placa de superficies lisas.

Resultados

Tabla 23. Genotipos identificados a nivel basal y a los 18 meses en escolares con *S. mutans* aislados en escolares del Colegio Padre Manjón (n=26).

E	BASAL		18 MESES		ESTABILIDAD		
	Col SM	Genotipos	C SM	Genotipos	Genotipos perdidos	Genotipos nuevos	Nº Total genotipos
2-51	S5 F0 L6	A - A	10	A	0	0	1
2-52	S0 F0 L3	- - A	7	AB	0	1	2
2-53	S3 F2 L6	A A A	10	A	0	0	1
2-55	S9 F5 L5	A A A	8	A	0	0	1
2-56	S13	A	9	AB	0	1	2
2-57	S5	A	10	A	0	0	1
2-59	S3 F2 L2	A B A	10	AB	0	0	2
2-60	S6 F8 L8	A A A	10	A	0	0	1
2-62	S10	A	10	A	0	0	1
2-64	S9	A	11	A	0	0	1
2-65	S4 F5 L3	A A A	7	A	0	0	1
2-67	S3 F4 L3	A A A	10	A	0	0	1
2-70	S14	AB	5	A	1	0	1
2-72	S13 F6 L3	AB AB AB	10	A	1	0	1
2-73	S8	A	8	A	0	0	1
2-74	S14	A	10	A	0	0	1
2-75	S3	A	10	A	0	0	1
2-76	S7 F4 L6	A A A	10	A	0	0	1
2-79	S8 F12 L12	AB AB B	12	BC	1	1	2
2-80	S6	A	9	AB	0	1	2
2-82	S7	A	10	ABC	0	2	3
2-83	S3	A	0	-	1	0	1
2-84	S12	AB	10	AB	0	0	2
2-85	S3	A	1	B	1	1	1
2-87	S6	A	8	A	0	0	1
2-88	S4	AB	10	A	1	0	1

E: escolar; Col SM: colonias de *S. mutans*; S: saliva; F: placa de fisuras; L: placa de superficies lisas.

Tabla 24. Descriptiva general de las pérdidas y adquisiciones de genotipos en los escolares.

	Perdida de un genotipo	Perdida de uno y adquisición de un genotipo	Estables	Adquisición de un genotipo	Adquisición de dos genotipos
Juan XXIII n=27	2	1	17	6	1
Padre Manjón n=26	4	2	16	3	1
Total n=53	6	3	33	9	2

Tabla 25. Genotipos por niño al inicio y a los 18 meses incluyendo balance de pérdidas y adquisiciones.

	Genotipos basales	Genotipos 18 meses	Genotipos perdidos	Genotipos ganados	Total genotipos aislados
Juan XXIII	35	41	3	9	44
Padre Manjón	32	35	6	7	39
Total	67	76	9	16	83

Tabla 26. Número de genotipos por niño al inicio y a los 18 meses.

		0 genotipos	1 genotipo	2 genotipos	3 genotipos
Juan XXIII n =38	Basal	12	17	9	0
	18 meses	12	14	9	3
Padre Manjón n =29	Basal	3	20	6	0
	18 meses	4	18	6	1
Total n =67	Basal	15	37	15	0
	18 meses	16	32	15	4

Tabla 27. Número y porcentaje de genotipos que se mantienen estables a los 18 meses.

	Genotipos iniciales	Genotipos conservados a 18 meses	Porcentaje de genotipos estables (%)
Juan XXIII	35	32	91.42
Padre Manjón	32	26	81.25
Total	67	58	86.56

En las tablas 28, 29 y 30, se comparan para cada colegio y en la globalidad del estudio las siguientes variables: número de genotipos por niño (0,1 y 2), recuentos en CRT bacteria EGM y CRT bacteria LB a nivel basal, el cod y el cos basales y la variaciones de los índices de caries: Δ CAOD, Δ CAOS, Δ COcoD, Δ COcoS. En el Colegio Juan XXIII se demostró una asociación estadísticamente significativa entre el número de genotipos con el recuento de CRT Bacteria® EGM, el cod y el cos basales y el Δ COcoS. En el Colegio Padre Manjón, se sigue observando significación estadística entre número de genotipos y el recuento de CRT Bacteria® EGM a nivel basal y entre el número de genotipos y los incrementos de índices de caries: Δ CAOD, Δ CAOS,

Resultados

Δ COcoD, Δ COcoS. En el estudio conjunto de ambos colegios, se obtiene significación estadística entre el número de genotipos y el resto de las variables exceptuando el recuento de CRT Bacteria[®] LB.

En las tablas 31, 32 y 33, se realiza el mismo tipo de análisis pero excluyendo de las variables los niños a los que no se le aisló ninguna cepa de SM. En este caso en el Colegio Juan XXIII sólo hay significación estadística entre el número de genotipos y el cos basal. No hay ninguna asociación significativa en el Colegio Padre Manjón. Igual ocurre cuando se realiza el estudio conjuntamente para ambos centros .

Tabla 28. Comparación de bacterias cariogénicas e índices de caries para niños seguidos 18 meses con 0,1 y 2 genotipos. Estudio longitudinal, en el Colegio Juan XXIII. Media y desviación estándar [\bar{x} (DE)].

	0 genotipos	1 genotipo	2 genotipos	Significación. Valor de p^*
Recuentos CRT [®] Bacteria EGM	2.08 (1.24)	3.83 (3.83)	4 (0)	0.000
Recuentos CRT [®] Bacteria LB	3.33 (1.07)	3.39 (1.04)	3.75 (0.46)	0.781
cod basal	0.08 (0.289)	1.33 (1.68)	5.88 (5.9)	0.000
cos basal	0.17 (0.57)	2.33 (4.13)	11 (12.189)	0.000
Δ CAOD	0.42 (1.16)	1.33 (1.53)	1 (1.6)	0.134
Δ CAOS	0.5 (1.45)	1.72 (2.21)	1.25(2.2)	0.122
Δ COcoD	0.9 (1.44)	2.83 (2.75)	1.63 (2.06)	0.124
Δ COcoS	1.17 (1.8)	5.22 (4.64)	2.25 (2.66)	0.046

EGM: estreptococos del grupo mutans; LB: lactobacilos; cod: número de dientes temporales cariados y obturados; cos: número de superficies temporales cariadas y obturadas; Δ CAOD: incremento de CAOD a los 18 meses; Δ CAOS: incremento de CAOS a los 18 meses; Δ COcoD: incremento de dientes cariados y obturados; Δ COcoS: incremento de superficies cariadas y obturadas.

* Test de Kruskal-Wallis.

Tabla 29. Comparación de bacterias cariogénicas e índices de caries para niños seguidos 18 meses con 0,1 y 2 genotipos. Estudio longitudinal, en el Colegio Padre Manjón. Media y desviación estándar [\bar{x} (DE)].

	0 genotipos	1 genotipo	2 genotipos	Significación. Valor de p^*
Recuentos CRT [®] Bacteria EGM	0 (0)	2.15 (1.5)	2.00 (1.26)	0.040
Recuentos CRT [®] Bacteria LB	2.33 (2.08)	2.25 (1.55)	2.33 (1.86)	0.989
cod basal	1.33 (2.3)	1.85 (2.31)	1.83 (2.04)	0.905
cos basal	0 (0)	3.10 (3.97)	2.83 (3.25)	0.683
Δ CAOD	0 (0)	1.45 (1.50)	0.17 (0.41)	0.040
Δ CAOS	0 (0)	1.95 (2.18)	0.17 (0.41)	0.060
Δ COcoD	0 (0)	2.80 (2.16)	0.83 (0.75)	0.028
Δ COcoS	0 (0)	4.95 (3.92)	2.17 (2.32)	0.048

EGM: estreptococos del grupo mutans; LB: lactobacilos; cod: número de dientes temporales cariados y obturados; cos: número de superficies temporales cariadas y obturadas; Δ CAOD: incremento de CAOD a los 18 meses; Δ CAOS: incremento de CAOS a los 18 meses; Δ COcoD: incremento de dientes cariados y obturados; Δ COcoS: incremento de superficies cariadas y obturadas.

* Test de Kruskal-Wallis.

Tabla 30. Comparación de bacterias cariogénicas e índices de caries para niños seguidos 18 meses con 0,1 y 2 genotipos. Estudio longitudinal, en el total de escolares. Media y desviación estándar [\bar{x} (DE)].

	0 genotipos	1 genotipo	2 genotipos	Significación. Valor de p^*
Recuentos CRT [®] Bacteria EGM	1.67 (1.4)	2.95 (1.39)	3.14 (1.29)	0.005
Recuentos CRT [®] Bacteria LB	3.13 (1.3)	2.79 (1.44)	3.14 (1.4)	0.584
cod basal	0.33 (1.05)	1.61 (1.87)	4.14 (4.99)	0.002
cos basal	0.40 (1.12)	2.74 (4.0)	7.5 (10.08)	0.002
Δ CAOD	0.33 (1.05)	1.39 (1.5)	0.64 (1.27)	0.009
Δ CAOS	0.40 (1.12)	1.84 (2.17)	0.79 (1.71)	0.012
Δ COcoD	0.73 (1.33)	2.82 (2.43)	1.29 (1.67)	0.005
Δ COcoS	0.93 (1.67)	5.08 (4.23)	2.21 (2.42)	0.002

EGM: estreptococos del grupo mutans; LB: lactobacilos; cod: número de dientes temporales cariados y obturados; cos: número de superficies temporales cariadas y obturadas; Δ CAOD: incremento de CAOD a los 18 meses; Δ CAOS: incremento de CAOS a los 18 meses; Δ CocoD: incremento de dientes cariados y obturados; Δ CocoS: incremento de superficies cariadas y obturadas.

* Test de Kruskal-Wallis.

Tabla 31. Comparación de bacterias cariogénicas e índices de caries para niños seguidos 18 meses con 1 y 2 genotipos. Estudio longitudinal, en el Colegio Juan XXIII. Media y desviación estándar [\bar{x} (DE)].

	1 genotipo	2 genotipos	Significación. Valor de p^*
Recuentos CRT [®] Bacteria EGM	3.83 (0.383)	4 (0)	0.998
Recuentos CRT [®] Bacteria LB	3.39 (1.04)	3.75 (0.46)	0.998
cod basal	1.33 (1.68)	5.88 (5.94)	0.091
cos basal	2.33 (4.13)	11 (12.19)	0.038
Δ CAOD	1.33 (1.53)	1 (1.6)	0.994
Δ CAOS	1.72 (1.22)	1.25 (2.19)	0.994
Δ COcoD	2.83 (2.75)	1.63 (2.06)	0.917
Δ COcoS	5.22 (4.65)	2.25 (2.66)	0.224

EGM: estreptococos del grupo mutans; LB: lactobacilos; cod: número de dientes temporales cariados y obturados; cos: número de superficies temporales cariadas y obturadas; Δ CAOD: incremento de CAOD a los 18 meses; Δ CAOS: incremento de CAOS a los 18 meses; Δ CocoD: incremento de dientes cariados y obturados; Δ CocoS: incremento de superficies cariadas y obturadas.

* Test de Kolmogorov-Smirnov.

Resultados

Tabla 32. Comparación de bacterias cariogénicas e índices de caries para niños seguidos 18 meses con 1 y 2 genotipos. Estudio longitudinal, en el Colegio Padre Manjón. Media y desviación estándar [\bar{x} (DE)].

	1 genotipo	2 genotipos	Significación. Valor de p^*
Recuentos CRT [®] Bacteria EGM	2.15 (1.49)	2 (1.26)	1
Recuentos CRT [®] Bacteria LB	2.25 (1.55)	2.33 (1.86)	1
cod basal	1.85 (2.03)	1.83 (2.04)	1
cos basal	3.10 (3.97)	2.83 (3.25)	1
Δ CAOD	1.45 (1.5)	0.17 (0.41)	0.307
Δ CAOS	1.95 (2.18)	0.17 (0.41)	0.199
Δ COcoD	2.80 (2.16)	0.83 (0.75)	0.123
Δ COcoS	4.95 (3.92)	2.17 (2.31)	0.307

EGM: estreptococos del grupo mutans; LB: lactobacilos; cod: número de dientes temporales cariados y obturados; cos: número de superficies temporales cariadas y obturadas; Δ CAOD: incremento de CAOD a los 18 meses; Δ CAOS: incremento de CAOS a los 18 meses; Δ COcoD: incremento de dientes cariados y obturados; Δ COcoS: incremento de superficies cariadas y obturadas.

* Test de Kolmogorov-Smirnov.

Tabla 33. Comparación de bacterias cariogénicas e índices de caries para niños seguidos 18 meses con 1 y 2 genotipos. Media y desviación estándar [\bar{x} (DE)].

	1 genotipo	2 genotipos	Significación. Valor de p^*
Recuentos CRT [®] Bacteria EGM	2.95 (1.39)	3.14 (1.3)	1
Recuentos CRT [®] Bacteria LB	2.79 (1.43)	3.14 (1.40)	0.811
cod basal	1.61 (1.86)	4.14 (4.99)	0.313
cos basal	2.74 (4.011)	7.50 (10.08)	0.247
Δ CAOD	1.39 (1.49)	0.64 (1.27)	0.343
Δ CAOS	1.84 (2.17)	0.79 (1.71)	0.299
Δ COcoD	2.82 (2.42)	1.29 (1.63)	0.173
Δ COcoS	5.08 (4.22)	2.21 (2.42)	0.033

EGM: estreptococos del grupo mutans; LB: lactobacilos; cod: número de dientes temporales cariados y obturados; cos: número de superficies temporales cariadas y obturadas; Δ CAOD: incremento de CAOD a los 18 meses; Δ CAOS: incremento de CAOS a los 18 meses; Δ COcoD: incremento de dientes cariados y obturados; Δ COcoS: incremento de superficies cariadas y obturadas.

* Test de Kolmogorov-Smirnov.

En las tablas 34 y 35 se hace una descriptiva sobre los genotipos compartidos por escolares, y en la tabla 36 se resumen el porcentaje de los nuevos genotipos que forman parte de los compartidos. Así en el Colegio Juan XXIII de los 27 niños en los que fue posible aislar SM, en 11 de ellos ninguna cepa fue compartida por otro compañero, mientras que 16 compartían genotipo con, al menos, otro. El número total de grupos de homología fue de 6 a nivel basal y de 7 a los 18 meses. De ellos, al inicio, cuatro genotipos (de los grupos I, II, III y V) son compartidos por dos niños, un genotipo (grupo VI) por tre y un genotipo (grupo IV) por cinco. A los 18 meses, cuatro genotipos (grupos I, II, V y VII) son compartidos por dos niños, un genotipo (grupo VI) por tres, un genotipo (grupo III) por cuatro y un genotipo (grupo IV) por siete. En el Colegio Padre Manjón de los 26 escolares en los que fue posible aislar SM, en 16

ninguna cepa fue compartida por otro compañero, mientras que 10 sí lo fueron siempre con otro niño. El número de grupos de homología fue de 5 al inicio y de 6 a los 18 meses, en ambos casos todos ellos compartidos por dos niños. Parece pues evidente que con la evolución en el tiempo se incrementan los genotipos compartidos por niños, hecho particularmente destacable en el Colegio Juan XXIII.

Tabla 34. Escolares que compartan genotipos con una homología superior al 80% a nivel basal y a los 18 meses en el Colegio Juan XXIII.

Grupos de homología	Escolar	GENOTIPOS		Otros genotipos no compartidos	
		Basal	18 meses	Basal	18 meses
I	1-20	A	a	No	bc
	1-24	B*	b	A	ac
II	1-23	A	a	No	No
	1-35	A	a	No	No
III	1-5		b		a
	1-18	A	a	No	No
	1-31		c		ab
	1-13	A	a	B	b
IV	1-22	A	a	No	b
	1-3	A	a	No	No
	1-31		b		ac
	1-16	A	a	B	b
	1-17	A	a	B	b
	1-40		c		No
	1-9	A	a	No	No
V	1-10	A	a	B	No
	1-40	A	b	No	No
VI	1-25	A	a	No	No
	1-19	A	a	No	No
	1-40	B	b	A	ac
VII	1-8**		a		No
	1-1		a		b

* genotipo hallado en placa.

** escolar sin SM al inicio.

Tabla 35. Escolares que comparten genotipos con una homología superior al 80% a nivel basal y a los 18 meses en el Colegio Padre Manjón.

Grupos de homología	Escolar	GENOTIPOS		Otros genotipos no compartidos	
		Basal	18 meses	Basal	18 meses
I	2-73	A	a	No	No
	2-60	A	a	No	No
II	2-79	B	b	A	c
	2-70	A	a	B	No
III	2-67	A	a	No	No
	2-88	A	a	B	No
IV	2-75	A	a	No	No
	2-65	A	a	No	No
V	2-56	A	a	No	b
	2-53	A	a	No	No
VI	2-51		a		No
	2-52		b		a

Tabla 36. Resumen descriptivo de ganancias de genotipos y porcentaje de los mismos que entran a formar parte de los grupos de homología.

	Adquisición de nuevos genotipos	Nuevos genotipos compartidos	Porcentaje de genotipos compartidos
Juan XXIII n=27	9	6	66.66%
Padre Manjón n=26	7	2	28.57%
Total n=54	16	8	50%

En las tablas 37, 38 y 39 se recogen los resultados obtenidos al relacionar si el hecho de que los niños que compartan genotipos a nivel basal y a los 18 meses, se asocia o no con los recuentos de EGM y LB en CRT bacteria, con cod y cos basales y con los incrementos de índices de caries: Δ CAOD, Δ CAOS, Δ COcoD, Δ COcoS. El estudio llevado a cabo en cada colegio y en la totalidad de los escolares, muestra que no existe ninguna relación estadísticamente significativa con las variables analizadas.

Tabla 37. Comparación de bacterias cariogénicas e índices de caries en escolares que comparten y no comparten genotipos a nivel basal y a los 18 meses en el Colegio Juan XXIII. Media y desviación estándar [\bar{x} (DE)].

	Sí comparten genotipos	No comparten genotipos	Significación. Valor de p^*
Recuentos CRT [®] Bacteria EGM	3.94 (0.25)	3.78 (0.44)	0.999
Recuentos CRT [®] Bacteria LB	3.75 (0.44)	3 (1.32)	0.544
cod basal	2.81 (4.52)	2.78 (3.52)	0.999
cos basal	4.81 (9.12)	5.78 (7.71)	0.964
Δ CAOD	0.94 (1.34)	1.89 (1.76)	0.655
Δ CAOS	1.25 (2.02)	2.33 (2.45)	0.655
Δ COcoD	1.63 (1.82)	4.22 (2.99)	0.236
Δ COcoS	3.75 (4.64)	5.78 (3.52)	0.191

EGM: estreptococos del grupo mutans; LB: lactobacilos; cod: número de dientes temporales cariados y obturados; cos: número de superficies temporales cariadas y obturadas; Δ CAOD: incremento de CAOD a los 18 meses; Δ CAOS: incremento de CAOS a los 18 meses; Δ COcoD: incremento de dientes cariados y obturados; Δ COcoS: incremento de superficies cariadas y obturadas.

* Test de Kolmogorov-Smirnov.

Tabla 38. Comparación de bacterias cariogénicas e índices de caries en escolares que comparten y no comparten genotipos a nivel basal y a los 18 meses en el Colegio Padre Manjón. Media y desviación estándar [\bar{x} (DE)].

	Sí comparten genotipos	No comparten genotipos	Significación. Valor de p^*
Recuentos CRT [®] Bacteria EGM	2.33 (1.23)	2 (1.63)	0.894
Recuentos CRT [®] Bacteria LB	3.08 (1.65)	1.69 (1.60)	0.314
cod basal	2.33 (1.67)	1.54 (2.26)	0.397
cos basal	3.92 (3.17)	2.46 (4.27)	0.443
Δ CAOD	1.33 (1.55)	1.08 (1.38)	1
Δ CAOS	1.67 (2.23)	1.54 (2.02)	1
Δ COcoD	2.67 (2.23)	2.23 (2.00)	0.995
Δ COcoS	4.83 (3.81)	4.15 (3.80)	0.782

EGM: estreptococos del grupo mutans; LB: lactobacilos; cod: número de dientes temporales cariados y obturados; cos: número de superficies temporales cariadas y obturadas; Δ CAOD: incremento de CAOD a los 18 meses; Δ CAOS: incremento de CAOS a los 18 meses; Δ COcoD: incremento de dientes cariados y obturados; Δ COcoS: incremento de superficies cariadas y obturadas.

* Test de Kolmogorov-Smirnov.

Tabla 39. Comparación de bacterias cariogénicas e índices de caries en escolares que comparten y no comparten genotipos a nivel basal y a los 18 meses en total de escolares. Media y desviación estándar [\bar{x} (DE)].

	Sí comparten genotipos	No comparten genotipos	Significación. Valor de p^*
Recuentos CRT [®] Bacteria EGM	3.25 (1.14)	2.73 (1.55)	0.963
Recuentos CRT [®] Bacteria LB	3.46 (0.88)	2.23 (1.60)	0.045
cod basal	2.61 (3.54)	2.05 (2.83)	0.604
cos basal	4.43 (7.11)	3.82 (5.98)	0.902
Δ CAOD	1.11 (1.43)	1.41 (1.56)	0.874
Δ CAOS	1.43 (2.08)	1.86 (2.19)	0.624
Δ COcoD	2.07 (2.03)	3.05 (2.16)	0.681
Δ COcoS	4.21 (4.26)	4.82 (3.7)	0.7

EGM: estreptococos del grupo mutans; LB: lactobacilos; cod: número de dientes temporales cariados y obturados; cos: número de superficies temporales cariadas y obturadas; Δ CAOD: incremento de CAOD a los 18 meses; Δ CAOS: incremento de CAOS a los 18 meses; Δ COcoD: incremento de dientes cariados y obturados; Δ COcoS: incremento de superficies cariadas y obturadas.

* Test de Kolmogorov-Smirnov.

5. Discusión

A través de diferentes encuestas nacionales, ha quedado demostrado que, a pesar de la disminución que muestran los índices epidemiológicos, la caries continúa siendo un problema de salud pública. La participación en este proceso de EGM y en especial *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* es evidente a la luz de los trabajos científicos que así lo demuestran. Sin embargo quedan muchas incógnitas pendientes de respuesta y que la bacteriología oral tradicional, basada en la morfología de colonias y en la investigación de propiedades fenotípicas de las bacterias, no puede responder. Gracias a los avances que han supuesto las diversas técnicas de biología molecular, se han podido esclarecer muchos de los interrogantes que estaban planteados. Así, poco después de ser descritos los procedimientos capaces de tipificar genéticamente a las bacterias, éstos fueron aplicados al estudio de la microbiota oral, surgiendo algunos trabajos pioneros¹³⁶ que marcaron líneas de trabajo para futuros investigadores. De este modo, a mediados de la última década del siglo XX, se comenzaron a investigar métodos más sencillos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en los que se puso de manifiesto la relación genética que guardaban dos cepas fenotípicamente iguales.

Pese a lo expuesto, el diagnóstico bacteriológico, tal como ha sido llevado a cabo durante décadas no puede verse relegado completamente por la nueva metodología. Destacados investigadores¹³⁷ han elaborado esquemas de identificación, recientemente actualizados^{138,139}, que llevan más de una década en uso y han presentando trabajos de tipificación por metodología genética¹⁴⁰. En ellos demuestran que estos últimos son sólo adecuados para investigación clínica y epidemiológica pero no son convenientes para la determinación a nivel de especie. Otros grupos de trabajo¹⁴¹ afirman que los métodos de fenotipia y biotipia no son lo suficientemente adecuados para realizar tipificación taxonómica, debido al hecho de que no todas las cepas de una especie presentan un resultado positivo para un rasgo genotípico en particular. Sobre la base de estas afirmaciones y a la luz de la experiencia alcanzada en el transcurso del desarrollo experimental de la tesis, se puede sugerir que las muestras clínicas estudiadas, con fines epidemiológicos deben ser procesadas por ambos métodos. El basado en el fenotipo es insustituible como método de tamizado y los basados en el genotipo informarán de la asociación que puedan tener dos microorganismos entre sí.

136 Russell R. The application of molecular genetics to the microbiology of dental caries. *Caries Res* 1994;28:69-82.

137 Beighton D, Hardie J, Whiley R. A scheme for identification of viridans streptococci. *J Med Microbiol* 1991;35:367-372.

138 Whiley R, Beighton D. Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol* 1998;13:195-216.

139 Facklam R. What happened to streptococci overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:616-630.

140 Alam S, Brailsford S, Whiley R, Beighton D. PCR-based method for genotyping viridans group streptococci. *J Clin Microbiol* 1999;37:2772-2776.

141 Li Y, Caufield P, Redmo Emanuelsson I, Thornqvist E. Differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* via genotypic and phenotypic profiles from three different populations. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16:16-23.

5.1. Toma de muestras. ¿Saliva o placa?

Lógicamente es la placa bacteriana el ecosistema primario en el cual la presencia de un alto porcentaje de bacterias cariogénicas determina el inicio y progresión de la enfermedad. Los estudios microbianos a partir de ella son numerosos, sin embargo, la técnica es compleja. Otro problema añadido es la posibilidad de que una toma de muestra se realice en una superficie poco o nada colonizada en un paciente de alto riesgo¹⁴². Esta dificultad se incrementa aún más en especímenes procedentes de placa de superficies oclusales o proximales con un diente adyacente¹⁴³.

La toma de saliva soluciona en parte estos problemas por la facilidad que supone recoger una muestra y además es más sencillo realizar a partir de ella recuentos de células viables. Además es la fuente de transmisión de las bacterias orales, bien de forma directa como a través de fómites. No obstante su utilización ha sido cuestionada por diversos motivos los cuales han sido sistematizados por Baca¹⁴⁴.

1º Los autores que defienden la toma de muestras de placa afirman que las bacterias de la saliva no solo provienen de placa sino también de otros ecosistemas orales primarios^{145,146}. Sin embargo, esto no es un problema debido a que los estreptococos del grupo mutans y los lactobacilos pertenecen casi exclusivamente al ecosistema de la placa bacteriana.

2º En la saliva no es posible saber si las bacterias cariogénicas provienen de superficies sanas o cariadas. En realidad esta crítica constituye en sí una ventaja, pues representarían un promedio de toda la boca, lo cual es importante porque las bacterias cariogénicas no están repartidas por igual en todos los dientes y superficies. Por otro lado, las medidas preventivas para el control de las caries tales como la higiene oral, control de dieta, fluoruros y tratamiento antibacteriano benefician a la dentición más que a una superficie de un diente concreto.

3º Aunque la validez de la saliva para determinar la presencia de bacterias cariogénicas en boca puede ser cuestionada, está demostrada la correlación entre los niveles bacterianos salivares y de placa^{147,148,149,150}. Los niveles salivares de estreptococos

142 Shklair J, Keene HJ, Simonsen Lg. Distribution and frequency of *Streptococcus mutans* in caries active individuals. J Dent Res 1972;51:882-887.

143 Baca P. Saliva y microbiota oral. Simposio sobre Saliva y Salud Dental. Valencia. Promolibro, 1998. pp. 93-111.

144 Ibidem.

145 Van Houte J. Microbiological predictors of caries risk. Adv Dent Res 1981;89:19-25.

146 Sullivan A, Borsgröm M, Granath L, Nilsson G. Number of mutans streptococci or lactobacillo in a total dental plaque samples does not the variation in caries better than the numbers in simulated whole saliva. Comun Dent oral Epidemiol 1996;24: 159-163.

147 Van Houte J. Microbiological predictors of caries risk. Adv Dent Res 1981;89:19-25.

148 Apostole P, Vanderas DDS. Bacteriologic and nonbacteriologic criteria for identifying individual at high risk of developing dental caries. J Public Health Dent 1986;46:106-113 .

149 Krasse B, Sweden G. Bacteriological factors as indicators of future caries. Int Dent J 1988;38:219-225.

del grupo mutans reflejan el número de sitios colonizados y la proporción de estas bacterias en la placa dental¹⁵¹.

En nuestro caso, para el estudio inicial se han utilizado todos los genotipos (saliva y placa) y a los 18 meses, teniendo en cuenta los resultados básales en los que la practica totalidad de los genotipos de placa también eran aislados en saliva¹⁵², se decidió tomar únicamente esta última muestra.

Diversos trabajos sobre genotipificación de EGM, realizan tomas de saliva y placa pero, como los objetivos planteados están referidos especialmente a los mecanismos de transmisión, no diferencian entre genotipos de uno u otro origen^{153,154}. Otros autores^{155,156} se basan enteramente en recogida de saliva para el aislamiento y la genotipificación de EGM. En este contexto, las mediciones realizadas en saliva representan una adecuada validez, lo que junto a la facilidad de recogida la convierten en un tipo de muestra recomendable¹⁵⁷. Además es el espécimen con mayor idoneidad para ser utilizado en salud pública y es el que han empleado la mayoría de los autores en estudios sobre test microbiológicos.

150 Demers M, Brodeur JM, Simard PL, Mouton C, Veilleux G, Fréchette S. Caries predictors suitable for mass-screening in children: a literature review. *Community Dent Health* 1990;7:11-21.

151 Bratthal D. The global epidemiology of mutans streptococci . En Johnson NW(ed). Risk cuarerkers for oral diseases. *Dental Caries* ,pp. 287-312. Cambridge University Press. Cambridge. UK.

152 Liébana J. Genotipos de *Streptococcus mutans* de saliva y placa en escolares usando la técnica AP-PCR y el cebador OPA-02. Tesis doctoral. Universidad de Granada 2007.

153 Nascimento MM, Höfling JF, Goncalves RB. *Streptococcus mutans* genotypes isolated from root and coronal caries. *Caries Res* 2004; 38:454-63.

154 Li Y, Cauffield P, Dasanayake AP, Wiener HW, Vermund SH. Mode of delivery and other maternal factors influence the acquisition of *Streptococcus mutans* in infants. *J Dent Res* 2005;84:806-11.

155 Cogulu D, Sabah E, Uzel A, Ozkinay F. Genotyping of *Streptococcus mutans* by using arbitrarily primed polymerase chain reaction in children with Down Syndrome. *Arch Oral Biol* 2006; 51: 177-182.

156 Hames-Kocabas E, Ucar F, Kocatas N, Uzel A, Alpöz A. Colonization and vertical transmission of *Streptococcus mutans* in Turkish Children. *Microbiol Res* 2006. Article in press. Available on line in www.sciencedirect.com.

157 Leverett DM, Featherstone JDB, Proskin HM, Aclair SM, Eisenberg AD, Mundorff-Sheestha SA, y cols. Caries risk assessment by cross-sectional discrimination model. *J Dent Res* 1993;72:529-537.

5.2 Estudio microbiológico.

5.2.1. Selectividad del medio para aislamiento e identificación de EGM.

El medio de cultivo selectivo utilizado en nuestro caso, MSB¹⁵⁸, es aceptado, salvo puntuales excepciones¹⁵⁹, por todos los autores para la identificación de EGM y su posterior tipificación; sin embargo, en el transcurso de este trabajo se obtuvo el crecimiento de bacterias que no pertenecían EGM. De un total de 1321 colonias estudiadas, 23.46% no pudieron ser identificadas como tales, bien porque no fermentaron el manitol o no se desarrollaron en este medio. A lo largo del estudio no se produjeron cambios de marcas ni lotes de los componentes con los que se realizó dicho medio y no hubo contaminación en ninguna de las placas que se sembraron en el mismo momento. Esto lleva a poner en tela de juicio el completo poder de inhibición de la microbiota acompañante por parte del MSB. Puede considerarse la hipótesis de que en estos casos se trata de estreptococos orales que portaban algún tipo de resistencia adquirida a la bacitracina. Por señalar dos ejemplos, tanto Emanuelsson y Wang¹⁶⁰ como Arancegui¹⁶¹ tuvieron similar inconveniente de crecimiento de colonias de bacterias no pertenecientes a EGM. Así pues este hecho no es nuevo y existen, desde antiguo, numerosos trabajos que señalan la menor capacidad selectiva del MSB, el no desarrollo de algunas especies del grupo así como la búsqueda de un medio más idóneo^{162,163,164,165}. Igualmente surge un grave inconveniente a la hora de valorar fiablemente los resultados obtenidos en laminocultivos y otros sistemas de recuentos que llevan como soporte MSB (pe. Cariescreen SM, Dentocult SM Strip mutans, CRT[®] Bacteria y otros). Este hecho hace que los datos obtenidos con estos últimos deban ser manejados con cautela y hasta pondrían en duda la relación caries-recuentos de EGM¹⁶⁶. En este trabajo también hemos tenido constancia de estas discrepancias. Así, elevados recuentos en CRT[®] Bacteria EGM no se correspondían con los índices de caries y a 14 niños no se les pudo hacer el seguimiento en las dos fases del estudio porque a pesar de que mostraban laminocultivos positivos, no fue posible aislar ninguna colonia compatible con EGM. En el

158 Gold O, Jordan H, Van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol 1973;18:1357-1362.

159 Troung T, Ménard C, Moutond C, Trahan L. Identification of mutans and other oral streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis. J Med Microbiol 2000; 49:63-71.

160 Redmo Emanuelsson I, Wang X. Demonstration of identical strain of mutans streptococci within Chinese families by genotyping. Eur J Oral Sci 1998; 106:788-794.

161 Arancegui N. Importancia epidemiológica de la genotipificación de *Streptococcus mutans* en escolares granadinos. Tesis Doctoral. Universidad de Granada 2002.

162 Van Palestein W, Ijsseldij M, Huis I, Veld J. A selective medium for the two major subgroups of the bacterium *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol 1983; 28: 599-603.

163 Tanzer J, Borgesson A, Laskowski L, Kurasz A, Testa M. Glucose-sucrose-tellurite-potassium-bacitracine agar, an alternative to mitis salivarius-bacitracine agar for numeration of *Streptococcus mutans*. J Clin Microbiol 1984; 20: 635-659.

164 Schaecken M, Van der Hoven J, Franjen H. Comparative recovery of *Streptococcus mutans* on five isolation media, including a new simple selective medium. J Dent Res 1986; 65: 906-908.

165 Kimmel L, Tinanoff N. A modified mitis salivarius medium for a caries diagnostic test. Oral microbial Immunol 1991; 6: 275-279.

166 Hildebrandt G, Bretz W. Comparison of culture media and chairside assays for enumerating mutans streptococci. J Appl Microbiol 2006;100:1339-47.

desarrollo inicial de este trabajo se ensayaron diversos medios como MSKB, TYCSB, TYCS20B, GTSB y otros que presentaron similares problemas o superiores. Por ello pese a sus inconvenientes el medio MSB sigue siendo actualmente referencia en la mayoría de los estudios para recuentos, aislamientos e identificación de EGM.

5.2.2. Número de colonias seleccionadas.

La elección del número de colonias, basada en su morfología como expresión del fenotipo, para identificarlas y realizar posterior extracción del ADN, muestra una amplia gama de valores. Mattos-Graner y cols¹⁶⁷ eligieron de 1 a 5 por muestra, basándose en trabajos anteriores de los mismos autores¹⁶⁸. Alaluusua y cols¹⁶⁹ en el año 1996 tomaron 3 a 13 colonias por su tipo diferencial. Otros autores¹⁷⁰, del mismo grupo de investigación, al estudiar la colonización sitio específica tomando como referencia una pequeña población, 7 niños, y un importante número de muestras por diente, llegan a investigar 9 a 15 colonias por individuo. Li y cols¹⁷¹ en 2000 estudiaron una media de 4,6 ufc. Lindquist y Emilson¹⁷² en 2004 lo hicieron con 143 de 25 sujetos. En este trabajo se optó por una elección basada en la morfología de las colonias, pero no poniendo límites cuando la heterogeneidad era alta y así se investigó una media de 11.73 (± 8.10) y de 8.00 (± 4.73) por alumno en cada una de las fases de toma de muestra.

167 Mattos-Graner R, Li Y, Caufield P, Duncan M, Smith D. Genotypic diversity of mutans streptococci in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. J Clin Microbiol 2001;39:2313-2316.

168 Li Y, Wang W, Caufield P. The fidelity of mutans streptococci transmission and caries status correlate with breast-feeding experience among Chinese families. Caries Res 2000; 34: 123-132.

169 Alaluusua S, Mättö J, Grönroos L, Innilä S, Torkko H, Asikainen S, Jousimies-Somer H, Saarela M. Oral colonization by more type of mutans streptococci in children with nursing-bottle dental caries. Arch Oral Biol 1996;41:167-173.

170 Grönroos L, Alaluusua S. Site-specific oral colonization of mutans streptococci detected by arbitrarily primed PCR fingerprinting. Caries Res 2000; 34: 474-480.

171 Li Y, Wang W, Caufield P. The fidelity of mutans streptococci Transmission and caries status correlate with breast-feeding experience among chinese families. Caries Res 2000; 34: 123-132.

172 Lindquist B, Emilson C. Colonization of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes and caries development in children to mothers harboring both species. Caries Res 2004;38: 95-103.

5.3. Tipificación de *Streptococcus mutans*. Metodología de la AP-PCR.

Estos procedimientos son fundamentales para explicar el seguimiento epidemiológico de los microorganismos y, en el caso concreto de los EGM para evaluar tanto su estabilidad como la transmisión de los mismos, así como si esta se realiza de forma horizontal o vertical.

Aunque ya durante la revisión doctrinal se ha señalado que los métodos fenotípicos están en desuso, conviene no olvidar la importancia que en su momento tuvieron la descripción de los ocho serotipos del grupo^{173,174,175} y la bacteriocinotipia.

Con la aparición de las técnicas moleculares y genéticas¹⁷⁶, se han resuelto algunas controversias de tipo taxonómico y se ha profundizado en la investigación epidemiológica de la transmisión y la patogenia de la caries. Ya se han comentado en la revisión bibliográfica las diferentes técnicas genotípicas: análisis de plásmidos, REA, RFLP, rep-PCR y PFGE. Distintos autores publican estudios^{177,178,179} dónde demuestran la utilidad de una variedad de la técnica PCR, que por emplear cebadores de poco peso molecular que hibridan al azar, recibe el nombre de AP-PCR¹⁸⁰ (*Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction*) o RAPD o RAPDNA (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

5.3.1. Cebador OPA-02.

No existe acuerdo definitivo entre los investigadores acerca del cebador más útil, para poner de manifiesto las diferencias genéticas entre dos cepas muy relacionadas. Incluso otros siguen empleando técnicas más complejas y a veces de difícil interpretación como es el patrón de bandas que aparece tras la digestión enzimática del ADN (REA)^{181,182,183} que sin embargo es la de referencia, pero que por lo señalado la hace menos

173 Bratthall D. Immunodiffusion studies on the serological specificity of streptococci resembling *Streptococcus mutans*. *Odontol Rev* 1969; 20:231-243.

174 Bratthall D. Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling *Streptococcus mutans*. *Odontol Rev* 1970; 21:143-152.

175 Perch B, Kjems E, Ravn T. Biochemical and serological properties of *Streptococcus mutans* from various human and animal sources. *APMIS* 1974; 82:357-370.

176 Russell R. The application of molecular genetics to the microbiology of dental caries. *Caries Res* 1994;28:69-82.

177 Williams J, Kubelik A, Livak K, Rafalski J, Tingey S. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 1990;18:6531-6535.

178 Saarela M, Hannula J, Mättö J, Asikainen S, Alaluusua S. Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Archs Oral Biol* 1996;41:821-826.

179 Li Y, Caufield P. Arbitrarily primed polymerase chain reaction fingerprinting for the genotypic identification of mutans streptococci from human. *Oral Microbiol Immunol* 1998;13:17-22.

180 Williams J, Kubelik A, Livak K, Rafalski J, Tingey S. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 1990;18:6531-6535.

181 Redmo Emanuelsson I, Thornqvist E. Genotypes of mutans streptococci tend to persist in their host for several years. *Caries Res* 2000;34:133-139.

182 Redmo Emanuelsson I, Thornqvist E. Distribution of mutans streptococci in families: a longitudinal study. *Acta Odontol Scand* 2001;59:93-98.

183 Redmo Emanuelsson I, Carlsson P, Hamberg K, Bratthall D. Tracing genotypes of mutans streptococci on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Oral Microbiol Immunol* 2003 ;18:24-29.

útil aplicada a grandes masas de población. En detrimento de la AP-PCR está la falta de uniformidad de criterios en cuanto a su desarrollo metodológico.

El grupo de investigación del *St. Thomas Dental Institute* de Londres, en uno de sus trabajos¹⁸⁴, afirman que la AP-PCR les ha resultado insatisfactoria y no reproducible cuando trabajaban con octanucleótidos. En dicho estudio no se describen las secuencias empleadas, ni las condiciones a las que se realizó la PCR, ni como evaluaron los amplificadores, como tampoco si efectuaron la discriminación de todas las cepas que probaron con las otras técnicas. Es de destacar que son pocos los autores que descartan esta técnica tan taxativamente, mientras que otros¹⁸⁵ dan un poder de discriminación comparable al REA, para distinguir genomas. El punto oscuro de esta metodología es el oligonucleótido que se debe emplear como cebador, aunque algunas escuelas los pusieron a prueba con el fin de realizar estudios comparativos y contrastar los diversos cebadores.

El grupo finés de Saarela y cols¹⁸⁶, analizó 127 cepas de EGM por ribotipia y comparó los resultados con los obtenidos tras la amplificación con 10 oligonucleóticos distintos. Encontraron la mayor sensibilidad en la combinación de los cebadores denominados OPA-05 y OPA-13.

El empleo del cebador OPA-02 fue evaluado por Li y Caufield¹⁸⁷ de la Universidad de Alabama en EE.UU. En el trabajo original lo eligen tras comparar 40 oligonucleótidos amplificando 3 cepas patrones. Una vez determinado el cebador y las condiciones de realización de la PCR, estudiaron 14 muestras clínicas confrontando los resultados con REA. Obtuvieron por esta última técnica un índice medio de similitud, para el ADN cromosómico, de 0,69 y por AP-PCR con OPA-02 de 0,74. Concluyen que a pesar del menor poder de discriminación, AP-PCR con dicho cebador proporciona unos resultados muy aceptables y comparables con REA.

Un grupo de investigación de Québec¹⁸⁸, cuyo objetivo era la identificación y tipificación de estreptococos orales, incluido *S. mutans*, examinó 56 oligonucleótidos con el ADN de la cepa NCTC 10449. De acuerdo a sus resultados los cebadores de mayor capacidad de diferenciación fueron OPA-03 y OPA-18; con dichos cebadores realizaron el estudio de 45 cepas de referencia. En sus conclusiones reconocen que han podido diferenciar especies, pero no son específicos como para establecer genotipos.

184 Alam S, Brailsford S, Whiley R, Beighton D. PCR-based method for genotyping viridans group streptococci. *J Clin Microbiol* 1999;37:2772-2776.

185 Li Y, Caufield P, Redmo Emanuelsson I, Thornqvist E. Differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* via genotypic and phenotypic profiles from three different populations. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16:16-23.

186 Saarela M, Alaluusua S, Takei T, Asikainen S. Genetic diversity within isolates of mutans streptococci recognized by an RNA probe. *J Clin Microbiol* 1993; 31:5 84-587.

187 Li Y, Caufield P. Arbitrarily primed polymerase chain reaction fingerprinting for the genotypic identification of mutans streptococci from human. *Oral Microbiol Immunol* 1998;13:17-22.

188 Troung T, Ménard C, Mouton C, Trahan L. Identification of mutans and other oral streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Med Microbiol* 2000;49:63-71.

El grupo sueco de Redmo Emanuelsson^{189,190,191,192} se mantuvo al margen de la controversia, realizando las genotipias por REA, manteniendo la línea de investigación en la epidemiología de la transmisión intrafamiliar y la persistencia de las cepas. Pese a ello, su último trabajo fue realizado en conjunto con Li y Caufield, empleando la AP-PCR y cebador OPA-02¹⁹³.

En un estudio anterior llevado a cabo en 2002 en el seno de nuestro grupo de investigación, Arancegui¹⁹⁴ puso a prueba los cebadores OPA-02 y OPA-05 inclinando los resultados obtenidos al uso del OPA-02 para efectuar todas las amplificaciones por su mayor poder discriminatorio.

En el 2002 y 2003 aparecen nuevos trabajos de genotipia mediante REA¹⁹⁵ y ribotipia¹⁹⁶ y ya, a partir del año 2004 la mayoría de los autores que realizaron estudios de genotipificación de SM se inclinaron por el uso de AP-PCR usando siempre OPA-02, OPA-05 y OPA-13 bien de forma independiente como cebadores únicos en cada estudio o comparando dos entre sí.

De esta manera Ersin y Kokabas¹⁹⁷ partieron de 8 madres con altos niveles de SM estudiándolas junto con sus hijos de 2-3 años e incluyendo en tres de las familias a los padres; para esta experiencia utilizaron OPA-05 y se halló similitud entre los genotipos de los esposos entre sí. Algunos de los integrantes de este estudio repiten la experiencia dos años más tarde usando el mismo cebador y ampliando la población para comprobar el componente de transmisión vertical intrafamiliar¹⁹⁸.

El grupo científico de Nascimento y Höffling¹⁹⁹ empleó AP-PCR con cebadores OPA-02 y OPA-13 para el estudio de SM de 9 adultos cariados en distintos puntos de la cavidad oral, con el fin de trazar un mapa de distribución de genotipos en un mismo individuo, así como su relación con el estado de salud bucodental. Estos cebadores también fueron

189 Redmo Emanuelsson I, Li Y, Bratthal D. Genotyping shows different strain of mutans streptococci between father and child and within parental pairs in Swedish families. *Oral Microbiol Immunol* 1998;13:271-277.

190 Redmo Emanuelsson I, Wang X. Demonstration of identical strain of mutans streptococci within Chinese families by genotyping. *Eur J Oral Sci* 1998; 106:788-794.

191 Redmo Emanuelsson I, Thornqvist E.; Genotypes of mutans streptococci tend to persist in their host for several years. *Caries Res* 2000;34:133-139.

192 Redmo Emanuelsson I., Thornqvist E. Distribution of mutans streptococci in families: a longitudinal study. *Acta Odontol Scand* 2001;59:93-98.

193 Li Y, Caufield P, Redmo Emanuelsson I, Thornqvist E. Differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* via genotypic and phenotypic profiles from three different populations. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16:16-23.

194 Arancegui N. Importancia epidemiológica de la genotipificación de *Streptococcus mutans* en escolares granadinos. Tesis Doctoral 2002. Universidad de Granada.

195 Nie M, Fan M, Bian Z. Transmission of mutans streptococci in adults within a Chinese population. *Caries Res* 2002; 36: 161-166.

196 Kohler B, Lundberg A, Birkhed D, Papapanou PN. Longitudinal study of intrafamilial mutans streptococci ribotypes. *A Eur J Oral Sci* 2003;111:383-389.

197 Ersin N, Kocabas E. Transmission of *Streptococcus mutans* in a group of Turkish families. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 408-410.

198 Hames-Kocabas E, Ucar F, Kocatas N, Uzel A, Alpöz A. Colonization and vertical transmission of *Streptococcus mutans* in Turkish Children. *Microbiol Res*. 2006. Article in press. Available on line in www.sciencedirect.com.

199 Nascimento M, Höffling J, Goncalves R. *Streptococcus mutans* genotypes isolated from root and coronal caries. *Caries Res* 2004; 38: 454-463.

puestos a prueba por Klein y cols²⁰⁰ en un estudio de estabilidad y transmisión vertical de madres a sus hijos asistentes a una misma guardería.

En 2004 Liu y cols²⁰¹ estudiaron 17 niños de 9-14 años con repeticiones al mes, a los 3 y a los 6 meses después de la realización de ortodoncia, con el fin de evaluar la estabilidad de los genotipos después del tratamiento; para hacer la genotipia se sirvieron de AP-PCR con cebador OPA-02.

Un año después, en el 2005 otros autores asiáticos Li y Liu²⁰² analizaron muestras de 20 madres y de sus hijos de 3-4 años, efectuando de nuevo la genotipia con AP-PCR y cebador OPA-02.

En ese mismo año el grupo japonés de Kamiya y cols²⁰³ sometieron a 16 adultos, la mitad de ellos sin caries, a genotipia de los SM aislados en muestras de saliva empleando en este caso los cebadores OPA-02 y OPA-13.

Los primers OPA-02 y OPA-03 fueron empleados por Barone y cols²⁰⁴ en 2005 cuando compararon los genotipos comunes en parejas madre-hijo entre dos grupos, uno de niños sanos y otro de niños afectados con síndrome de Down.

En 2006 los índices de caries y los patrones de bandas en niños con síndrome de Down fueron objeto de estudio para Cogulu y cols²⁰⁵ mediante el empleo de AP-PCR y cebador OPA-05 encontrando diferencias con un grupo de niños control.

Los trabajos más recientes de 2007 también utilizan AP-PCR con OPA-02, para la investigación de transmisión horizontal en guarderías en el caso de Yuan y cols.²⁰⁶ y para comparar patrones de bandas en grupos de individuos con caries activa y libres de ella en un estudio de Lembo y cols.²⁰⁷

Como podemos observar a lo largo de los años se han establecido evaluaciones y comparaciones entre distintos cebadores y las últimas tendencias abogan por el empleo de AP-PCR como herramienta idónea para estudios con diversos fines, perfilándose la utilización del cebador OPA-02 como uno de los que mayor rendimiento aportan a esta técnica.

200 Klein M, Florio F, Pereira A, Höfling J, Goncalves R. Longitudinal study of transmission, diversity, and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes in Brazilian nursery children. J Clin Microbiol 2004;42:4620-4626.

201 Liu J, Bian Z, Fan M, He H, Nie M, Fan B, Peng B, Chen Z. Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed PCR in patients undergoing orthodontic treatment. Caries Res 2004;38:523-529.

202 Li S, Liu T, Xiao X, Yang J, Yang D, Zhuang H, Liu Z. Detection of MutA genes in transmitted strains and nontransmitted strains of mutans streptococci. Caries Res 2005; 39: 417-421.

203 Kamiya R, Napimoga M, Rosa R, Höfling J, Goncalves R. Mutacin production in *Streptococcus mutans* genotypes isolated from caries-affected and caries-free individuals. Oral Microbiol Immunol 2005; 20: 20-24.

204 Barone S, Macedo C, Marin JM. Arbitrarily primed polymerase chain reaction for fingerprinting the genotype identification of mutans streptococci in children with Down syndrome. Spec Care Dentist 2005; 25: 37-42.

205 Cogulu D, Sabah E, Uzel A, Ozkinay F. Genotyping of *Streptococcus mutans* by using arbitrarily primed polymerase chain reaction in children with Down Syndrome. Arch Oral Biol 2006; 51: 177-182.

206 Yuan L, Jing Z, Ran S, Xue D. Genotypic diversity of *Streptococcus mutans* in 3-to-4-year-old Chinese nursery children suggests horizontal transmission. Arch Oral Biol 2007;81: 1904-1910.

207 Lembo F, Longo P, Ota-Tsuzuki C, Rodrigues C, Mayer M. Genotypic and phenotypic analysis of *Streptococcus mutans* from different oral cavity sites of caries-free and caries-active children. Oral Microbiol Immunol 2007; 22: 313-319.

5.3.2. Condiciones de trabajo.

Como hemos ido observando a lo largo del desarrollo de este estudio, uno de los principales inconvenientes de la AP-PCR es la carencia de unificación de criterios entre los diferentes laboratorios para conseguir un adecuado consenso entre los resultados desprendidos de las distintas experiencias. Las condiciones de trabajo también se ven afectadas por esta disparidad de criterios:

➤ Extracción del ADN. Caufied y Walker²⁰⁸ y Rudney y cols²⁰⁹ usaron una técnica con cloroformo, mientras que, tanto Poyart y cols²¹⁰ como De Lamballerie y cols²¹¹ utilizaron un método comercial; Igarashi y cols²¹² y Shiroza y cols²¹³, siguieron una técnica basada en la purificación con cloroformo, empleando la centrifugación para la disrupción bacteriana; Boom y cols²¹⁴ usaron también disrupción bacteriana, desintegración celular e inactivación de las enzimas presentes. En nuestro caso seguimos los criterios marcados por la casa comercial PROMEGA (Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Promega Corporation, Madison, USA) que, a nuestro juicio, resulta menos laboriosa y mucho más reproducible que las anteriores.

➤ Amplificación del ADN. Li y Caufield en 1998²¹⁵ emplearon unas condiciones bien diferentes a un trabajo posterior de 2001²¹⁶ pero curiosamente citan al primero como referencia del segundo. En la fase inicial de esta tesis utilizamos los criterios de 1998 con resultados insatisfactorios. Por ello en la totalidad de este trabajo se prefirieron los de 2001. Pese a ello otros autores siguen usando los de 1998,^{217,218} con razones que no alcanzamos a comprender.

208 Caufield P, Walker T. Genetic diversity within *Streptococcus mutans* evident by chromosomal DNA restriction fragment length polymorphisms. J Clin Microbiol 1989;27:274-278.

209 Rudney J, Neubar E, Soberay A. Restriction endonuclease-fragment polymorphisms of oral viridans streptococci, compared by conventional and field-inversion gel electrophoresis. J Dent Res 1992;71:1182-1188.

210 Poyart C, Gilles Q, Coulon S, Berche P, Trieu-Cout P. Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. J Clin Microbiol 1997;36:41-47.

211 De Lamballerie X, Zandotti C, Vignoli C, Bollet C, de Micco P. A one-step microbial DNA extraction method using "Chelex 100" suitable for gene amplification. Res Microbiol 1992;143:785-790.

212 Igarashi, T, Yamamoto A, Goto N. Direct detection of *Streptococcus mutans* in human dental plaque by polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol 1996;5:294-298.

213 Shiroza T, Shinozaki N, Watanabe T, Ikemi T, Fukushima K, Abiko Y. Rapid isolation of chromosomal DNA from oral streptococci and polymerase chain reaction-oriented restriction fragment-length polymorphism analysis for genetic heterogeneity. Ora Microbiol Immunol 1998;13:11-16.

214 Boom R, Sol CJA, Salimans M, Jansen CL, Wertheim-Van Dillen PME, Van Der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol 1990;28:495-503.

215 Li Y, Caufield P. Arbitrarily primed polymerase chain reaction fingerprinting for the genotypic identification of mutans streptococci from humans. Oral Microbiol Immunol 1998; 13:17-22.

216 Li Y, Caufield P, Redmo Emanuelsson I, Thornqvist E. Differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* via genotypic and phenotypic profiles from three different populations. Oral Microbiol Immunol 2001;16:16-23.

217 Nascimento M, Höfling J, Goncalves R. *Streptococcus mutans* genotypes isolated from root and coronal caries. Caries Res 2004;38:454-463.

218 Liu J, Bian Z, Fan M, He H, Nie M, Fan B, Peng B, Chen Z. Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed PCR in patients undergoing orthodontic treatment. Caries Res 2004;38:523-529.

➤ Tipo de gel para electroforesis. En un trabajo previo de nuestro grupo²¹⁹ se utilizaron geles de poliacrilamida enumerándose las ventajas sobre los de agarosa: no debe recurrirse al uso de luz ultravioleta para el examen, puede emplearse cada gel para un mayor número de muestras, para archivar los resultados no es necesario fotografiar las cubetas, ya que se emplea un escáner de alta definición común y no se expone el personal en exceso al bromuro de etidio, etc. Sin embargo prácticamente todos los autores consultados realizan la separación de las bandas en geles de agarosa en concentraciones del 1,5 al 2%^{220,221,222} y esa ha sido la técnica seguida por nosotros, ya que compartiendo los criterios señalados en relación a los geles de poliacrilamida, su menor complejidad la hace más asequible para el estudio de un amplio número de cepas.

5.3.3. Lectura de bandas.

Efectuadas las amplificaciones del material genético bacteriano, se encontró una gran diversidad de métodos para la lectura de las bandas separadas por electroforesis. En un número importante de trabajos^{223,224,225,226,227,228} se realiza una lectura visual de las bandas, mientras que otros investigadores, incluso algunos de los anteriores, emplean diversos programas de análisis^{229,230,231,232} o bien una mezcla de ambos procedimientos²³³. Este último ha sido el seguido por nosotros, así, los patrones de bandas se analizaron visualmente a modo de screening, para después confirmar con el programa Fingerprinting II

219 Arancegui N. Importancia epidemiológica de la genotipificación de *Streptococcus mutans* en escolares granadinos. Tesis Doctoral 2002. Universidad de Granada.

220 Mineyama R, Yoshino S, Fukushima K. Genotypic analysis of strains of mutans streptococci by pulsed-field gel electrophoresis. Microbiological Research 2004;159:181-186.

221 Lindquist B, Emilson C. Colonization of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes and caries development in children to mothers harboring both species. Caries Res 2004 38:95-103.

222 Li S, Liu T, Xiao X, Yang J, Yang D, Zhuang H, Liu Z. Detection of mutA genes in transmitted strains and nontransmitted strains of mutans streptococci. Caries Res 2005 ;39:417-21.

223 Li Y, Caufield P. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. J Den Res 1995;74:681-684.

224 Truong T, Menard C, Mouton C, Trahan L. Identification of mutans and other oral streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis. J Med Microbiol 2000;49:63-71.

225 Redmo Emanuelsson I, Thornqvist E. Distribution of mutans streptococci in families: a longitudinal study. Acta Odontol Scand 2001;59:93-98.

226 Redmo Emanuelsson I, Carlsson P, Hamberg K, Bratthall D. Tracing genotypes of mutans streptococci on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Oral Microbiol Immunol 2003;18:24-9.

227 Kohler B, Lundberg A, Birkhed D, Papapanou PN. Longitudinal study of intrafamilial mutans streptococci ribotypes. A Eur J Oral Sci 2003;111:383-389.

228 Li S, Liu T, Xiao X, Yang J, Yang D, Zhuang H, Liu Z. Detection of mutA genes in transmitted strains and nontransmitted strains of mutans streptococci. Caries Res 2005 S;39:417-21.

229 Li Y, Wang W, Caufield P. The fidelity of mutans streptococci transmission and caries status correlate with breast-feeding experience among chinese families. Caries Res 2000;34:123-132.

230 Mattos-Graner R, Li Y, Caufield P, Duncan M, Smith D. Genotypic diversity of mutans streptococci in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. J Clin Microbiol 2001;39:2313-2316.

231 Klein M, Florio F, Pereira A, Höfling J, Goncalves R. Longitudinal study of transmission, diversity, and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes in Brazilian nursery children. J Clin Microbiol 2004;42:4620-4626.

232 Kamiya R, Napimoga M, Rosa R, Höfling J, Goncalves R. Mutacin production in *Streptococcus mutans* genotypes isolated from caries-affected and caries-free individuals. Oral Microbiol Immunol 2005;20:20-24.

233 Ersin N, Kocabas E, Alpoz A, Uzel A. Transmission of *Streptococcus mutans* in a group of Turkish families. Oral Microbiol Immunol 2004; 19: 408-410.

Informatix™ Software (BioRad, Laboratorios, Inc. California, Usa). Mientras que para establecer la identidad de genotipos, unos autores utilizan el coeficiente de Dice^{234,235,236,237,238} otros, minoritariamente, emplean el de Pearson²³⁹, que es el que nosotros hemos aplicado a nuestro estudio.

En experimentos de tipo “fingerprint” como RAPD, PFGE, rep-PCR, etc, se suelen emplear dos tipos principales de cálculos de similaridad para el patrón de bandas obtenido: el coeficiente de correlación de Pearson y el coeficiente de Dice²⁴⁰. El primero determina los valores de similaridad basándose en las curvas densitométricas derivadas del patrón de bandas. Por el contrario el coeficiente de Dice compara las bandas en una posición concreta y calcula la probabilidad de que sea la misma banda o diferentes²⁴¹.

Existe igualmente una amplia diversidad de criterios para establecer el punto de corte a la hora de reconocer dos cepas genéticamente idénticas: desde 90%²⁴² a 100%²⁴³ pasando por valores intermedios²⁴⁴. En nuestro caso las cepas se consideraron pertenecientes al mismo genotipo cuando existía una homología igual o superior al 80%. Se tomó este valor después de un amplio número de ensayos. En ellos se hacían correr extraídos de la misma cepa en geles distintos con las condiciones estandarizadas previamente indicadas. Mientras que los valores 90% u otros intermedios nos parecen aceptables, creemos que usando AP-PCR, y con la amplia diversidad de bandas que se obtienen, difícilmente puede llegarse al 100%, al menos en nuestro trabajo este hecho nunca ocurrió. Considerando el 80% como punto de corte obtuvimos un máximo de 3 genotipos por escolar, si lo hubiésemos hecho con el 100% la diversidad habría sido enorme.

234 Alam S, Brailsford S, Whiley R, Beighton D. PCR-based method for genotyping viridans group streptococci. J Clin Microbiol 1999;37:2772-2776.

235 Mattos-Graner R, Li Y, Caufield P, Duncan M, Smith D. Genotypic diversity of mutans streptococci in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. J Clin Microbiol 2001;39:2313-2316.

236 Nascimento M, Höfling J, Goncalves R. *Streptococcus mutans* genotypes isolated from root and coronal caries. Caries Res 2004;38:454-63.

237 Klein M, Florio F, Pereira A, Höfling J, Goncalves R. Longitudinal study of transmission, diversity, and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes in Brazilian nursery children. J Clin Microbiol 2004 ;42:4620-4626.

238 Kamiya R, Napimoga M, Rosa R, Höfling J, Goncalves R. Mutacin production in *Streptococcus mutans* genotypes isolated from caries-affected and caries-free individuals. Oral Microbiol Immunol 2005;20:20-24.

239 Li Y, Caufield P, Dasanayake A, Wiener H, Vermund S. Mode of delivery and other maternal factors influence the acquisition of *Streptococcus mutans* in infants. J Dent Res 2005;84:806-11.

240 Vauterin L, Vauterin P. Computer-aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. Eur. Microbiol 1992; 1: 37-41.

241 Yokoyama, E., y Uchimura, M. Optimal settings of fingerprint-type analysing computer software for the analysis of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pulsed-field gel electrophoresis patterns. Epidemiol Infect 2006; 134: 1004-1014.

242 Alam S, Brailsford S, Whiley R, Beighton D. PCR- based method for genotyping viridans grow streptococci. J Clin Microbiol 1999;37:2772-2776.

243 Kamiya R, Napimoga M, Rosa R, Hofling J, Goncalves R. Mutacin production in *Streptococcus mutans* genotypes isolated from caries-affected and caries-free individuals. Oral Microbiol Immunol 2005;20:20-24.

244 Mattos-Graner R, Li Y, Caufield P, Duncan M, Smith D. Genotypic diversity of mutans streptococci in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. J Clin Microbiol 2001;39:2313-2316.

Una vez que disponíamos del mapa de distribución en grupos de homología, el análisis de cepas a los 18 meses requirió una relativa menor complejidad: cuando se aislaban e identificaban los genotipos de cada escolar, se volvían a hacer correr con los genotipos basales en un mismo gel, lo que permitía una fácil comparación. El programa Adobe Photoshop resultó de gran utilidad para el análisis visual, en concreto para determinar las cepas de distintos niños cuyo patrón de bandas era muy parecido. A estas se las hizo correr en un mismo gel para luego confirmar con el programa informático.

5.4. Persistencia de genotipos de *Streptococcus mutans*.

5.4.1. Intervalo de tiempo entre las tomas de muestra.

A la hora de evaluar como ha sido tratada la persistencia de los genotipos entre la amplia diversidad de literatura científica revisada, hemos encontrado que la gran mayoría de los trabajos en los que se investigaba la estabilidad pueden agruparse bajo cuatro tipos de enfoques diferentes:

- Aquellos en los que se estudian parejas madre-hijo a lo largo de un periodo de tiempo con la finalidad de demostrar la adquisición vertical y la persistencia posterior de los genotipos infantiles^{245,246,247,248}. Este tipo de trabajos suelen efectuarse con tomas que varían entre uno y tres meses desde el nacimiento de los niños y continuándolos hasta alcanzar edades variables porque el principal objetivo se centra en la descriptiva de la adquisición materno filial. De hecho algunas de estas investigaciones, cuando se prolongaban durante mucho tiempo, ampliaban los intervalos hasta realizar las tomas anualmente y seguimientos hasta edades entre los 4 y los 7 años. Se entiende que en este tipo de experiencias se trata de reducir marcadamente el espacio entre las tomas cuando los niños son más pequeños y el contacto con sus padres es mayor, para ir luego distanciándolas cuando los pequeños crecen, asisten a clases y reducen el contacto con sus progenitores.
- Genotipia a partir de muestras de individuos recogidas en espacios temporales que variaban entre 4 y 7 meses cuando se trataba de establecer relaciones con estados de salud bucodental y localizaciones de los genotipos²⁴⁹.
- Trabajos en los que se quiere observar la estabilidad a lo largo del tiempo cuando se introduce algún factor externo que pueda modificar las condiciones del entorno oral de la bacteria, como por ejemplo el tratamiento con ortodoncia²⁵⁰, el sometimiento a radioterapia en pacientes con carcinoma nasofaríngeo²⁵¹ o la aplicación de barniz de clorhexidina²⁵². Lógicamente cuando se trata de evaluar la estabilidad o no de un

245 Li Y, Caufield P. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. J Den Res 1995; 74:681-684.

246 Grönroos L, Saarela M, Mätö J, Luoma A, Jousimies-Somer H, Pyälä L, Asikainen S, Alaluusua S. Chlorhexidine susceptibilities of mutans streptococcal serotypes and ribotypes. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 894-898.

247 Emanuelsson I, Thornqvist E. Distribution of mutans streptococci in families: a longitudinal study. Acta Odontol Scand 2001;59:93-98.

248 Lindquist B, Emilson C. Colonization of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes and caries development in children to mothers harboring both species. Caries Res 2004; 38: 95-103.

249 Emanuelsson I, Carlsson P, Hamberg K, Bratthall D. Tracing genotypes of mutans streptococci on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Oral Microbiol Immunol 2003;18:24-29.

250 Liu J, Bian Z, Fan M, He H, Nie M, Fan B, Peng B, Chen Z. Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed PCR in patients undergoing orthodontic treatment. Caries Res 2004;38:523-529.

251 Meng L, Liu J, Peng B, Fan M, Nie M, Chen Z, Gan Y, Bian Z. The persistence of *Streptococcus mutans* in nasopharyngeal carcinoma patients after radiotherapy. Caries Res. 2005; 39: 484-89.

252 Kozai K, Wang DS, Sandham HJ, Philips HI. Changes in strains of mutans streptococci by treatment with chlorhexidine varnish. J Dent Res 1991; 70:1252-1257.

determinado clon bajo estas circunstancias concretas, los intervalos de muestreo deben reducirse lo máximo posible a fin de observar como afectan esos cambios a la capacidad de supervivencia o adaptación de los diferentes genotipos a su nuevo entorno; en función del tipo de factor desencadenante que provoque los cambios en el ecosistema oral del individuo la genotipia se realiza a partir de muestras tomadas en espacios de uno, tres y seis meses.

- Estudios intrafamiliares en los que la estabilidad es secundaria a la investigación de transmisión horizontal y vertical de los padres entre sí y con sus hijos^{253,254,255,256}. De nuevo aquí los tiempos entre tomas son muy variables: meses o años llegando incluso a seguimientos hasta los 16 años desde las tomas basales.

En nuestro caso nos hemos centrado en una población diana característica con un rango de edades comprendidas entre los 6 y los 7 años, que asistían a la misma clase para evaluar la estabilidad a los 18 meses y comprobar, al mismo tiempo, si se ha producido adquisición de nuevos genotipos compartidos en ese intervalo de muestreo, esto es, si han tenido lugar nuevos casos de transmisión horizontal. Se decidió realizar la segunda parte del estudio de estabilidad a los 18 meses por considerarlo un tiempo adecuado a los fines que perseguíamos:

- Por un lado no se trataba de un espacio temporal demasiado largo que impidiese el correcto seguimiento de la población estudiada.
- Intervalos menores carecían de sentido cuando uno de nuestros objetivos era el estudio de transmisión horizontal, ya que la ventana de exposición a la adquisición de los progenitores se ve reducida como consecuencia del menor tiempo de permanencia de los niños con sus padres, tiempo, que sí comparten con sus compañeros de clase.
- A los 8 años los niños suelen haber terminado el primer período de recambio y en todos ha erupcionado el primer molar permanente. Estos hechos podrían favorecer la adquisición de nuevos genotipos o variar la estabilidad de los ya presentes.

5.4.2. Estabilidad de genotipos.

La capacidad de una bacteria para sobrevivir y persistir en el ambiente oral, dependerá en parte de su inherente plasticidad genética, que determina su capacidad de

253 Kohler B, Lundberg A, Birkhed D, Papapanou PN. Longitudinal study of intrafamilial mutans streptococci ribotypes. *A Eur J Oral Sci.* 2003;111:383-389.

254 Nie M, Fan M, Bian Z. Transmission of mutans streptococci in adults within a Chinese population. *Caries Res* 2002; 36: 161-166.

255 Emanuelsson I, Thornqvist E. Genotypes of mutans streptococci tend to persist in their host for several years. *Caries Res* 2000;34:133-139.

256 Emanuelsson I, Thornqvist E. Distribution of mutans streptococci in families: a longitudinal study. *Acta Odontol Scand* 2001;59:93-98.

respuesta frente a las fluctuaciones en dicho medio²⁵⁷. La presencia estable de un determinado clon es un reflejo del continuo equilibrio mantenido en la cavidad oral del hospedador, convirtiendo a éste en un sujeto potencialmente importante en la cadena de transmisión de la bacteria.

Emanuelsson y Thornquist²⁵⁸ encontraron una elevada estabilidad de genotipos en adultos al estudiar familias y sus hijos con tomas repetidas a los 2 y los 5 años. También la estabilidad de los genotipos infantiles fue muy elevada, sobre todo de aquellas cepas que habían sido adquiridas de sus padres. En un estudio posterior del mismo autor²⁵⁹ se realizó un mapa de genotipos encontrados en diferentes zonas de la cavidad oral, hallando de nuevo una elevada persistencia que era además sitio-específica. En una experiencia a 16 años, Kohler y cols²⁶⁰ demostraron la estabilidad de al menos un ribotipo en 10 de los 13 sujetos sometidos a estudio.

Otros autores presentan conclusiones enfrentadas a las anteriores, es decir, concluyen baja persistencia de los genotipos de SM. Así quedó patente en un estudio de Nie y cols.²⁶¹ al estudiar transmisión horizontal entre parejas con intervalo de 3 meses, y en un mayor plazo de tiempo, Lindquist y Emilson²⁶² encontraron que en el seguimiento de madres e hijos durante siete años, los genotipos hallados al final del estudio diferían en la mayoría de los casos de los iniciales, tanto en los adultos como en los niños.

Un caso especial es el de Barone y cols.²⁶³, que al estudiar transmisión vertical y estabilidad a 6 meses entre parejas madre-hijo de un grupo control y otro con niños afectos de síndrome de Down, encontraron persistencia en los genotipos de todas las madres, y variaciones completas en los genotipos de los niños con síndrome de Down.

Nuestros resultados, sin duda, pertenecen al primer grupo de investigadores ya que los niveles de estabilidad para ambos centros fueron muy elevados: 91.42% de genotipos estables en el colegio Juan XXIII y 81.25% en el Padre Manjón. Nos ha resultado llamativo el hecho de esta discrepancia en la persistencia de SM, en la que dejando a un lado la diversidad de técnicas aplicadas para el aislamiento y la genotipia de las diferentes cepas sólo nos queda especular con la posibilidad de que sean las variaciones conductuales,

257 Napimoga M, Höfling JF, Klein M, Kamiya R, Goncalves R. Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. J Oral Science 2005; 47: 59-64.

258 Emanuelsson I, Thornqvist E. Genotypes of mutans streptococci tend to persist in their host for several years. Caries Res 2000;34:133-139.

259 Emanuelsson I, Carlsson P, Hamberg K, Bratthall D. Tracing genotypes of mutans streptococci on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Oral Microbiol Immunol. 2003;18:24-29.

260 Kohler B, Lundberg A, Birkhed D, Papapanou PN. Longitudinal study of intrafamilial mutans streptococci ribotypes. A Eur J Oral Sci 2003;111:383-389.

261 Nie M, Fan M, Bian Z. Transmission of mutans streptococci in adults within a Chinese population. Caries Res 2002; 36: 161-166.

262 Lindquist B, Emilson C. Colonization of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes and caries development in children to mothers harboring both species. Caries Res 2004;38 95-103.

263 Barone S, Macedo C, Marin JM. Arbitrarily primed polymerase chain reaction for fingerprinting the genotype identification of mutans streptococci in children with Down syndrome. Spec Care Dentist 2005; 25: 37-42.

sociales y de hábitos de higiene entre los diferentes grupos de población, así como las características inherentes a cada cepa, las causantes de estas diferencias.

5.5. Distribución de genotipos y evolución a 18 meses.

5.5.1. Número de cepas por niño.

En cuanto al máximo número de cepas distintas encontradas, una de las incógnitas aún no completamente resueltas, es el número de genotipos diferentes de EGM que colonizan a un individuo y que por lo tanto participarían en el proceso carioso. En la literatura de referencia existente hasta el momento, las cifras de genotipos aislados varían entre 2 y 13^{264,265,266,267} en una misma persona partiendo en este último caso de elevados recuentos de SM.

En nuestra experiencia el máximo número de genotipos fue de tres por alumno en niños de aproximadamente 8 años de edad, no pudiendo afirmarse que exista un genotipo que predominase en los escolares encuestados. Lo que sí parece derivarse de la comparación entre los distintos ensayos científicos es una tendencia a encontrar mayor número de genotipos en adultos que en niños²⁶⁸ y así cuando comparamos nuestros resultados con otros trabajos similares llevados a cabo también sobre población infantil encontramos casos en los que el máximo número de genotipos diferentes aislados oscilaba de dos a cuatro como los de Alaluusua y Grönroos^{269,270}, los de Mattos-Graner²⁷¹ o ya en nuestro entorno más cercano los de Arancegui²⁷².

5.5.2. Distribución de genotipos. Adquisiciones y pérdidas.

En cuanto a la distribución de genotipos por individuo también encontramos una amplia heterogeneidad de resultados, así, en el estudio realizado por Alaluusua y cols²⁷³ en 1996 en parejas madre-hijo, en los niños de 1.5 a 3 años encuentran que en el 58.33% se aislaba 1 solo ribotipo y en el resto 2 ó 3. Este estudio fue realizado en un número muy limitado de pacientes (12 en total) y en una población con características muy especiales ya que se trataba de niños muy pequeños y las madres con menor recuento de EGM se

264 Nascimieno MM, Höfling JF, Goncalves R. *Streptococcus mutans* genotypes isolated from root and coronal caries. *Caries Res* 2004; 38: 454-463.

265 Liu J, Bian Z, Fan M, He H, Nie M, Fan B, Peng B, Chen Z. Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed PCR in patients undergoing orthodontic treatment. *Caries Res* 2004; 38:523-529.

266 Redmo Emanuelsson I, Carlsson P, Hamberg K, Bratthall D. Tracing genotypes of mutans streptococci on tooth by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18:24-29.

267 Kamiya RU, Napimoga M, Rosa RT, Höfling JF, Goncalves RB. Mutacin production in *Streptococcus mutans* genotypes isolated from caries-affected and caries-free individuals. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20: 20-24.

268 Li Y, Wang W, Caufield P. The fidelity of mutans streptococci transmission and caries status correlate with breast-feeding experience among Chinese families. *Caries Res* 2000;34:123-132.

269 Alaluusua S, Mättö J, Grönroos L, Innilä S, Torkko H, Asikainen S, Jousimies-Somer H, Saarela M. Oral colonization by more type of mutans streptococcus in children with nursing-bottle dental caries. *Arch Oral Biol* 1996;41:167-173.

270 Grönroos L, Alaluusua S. Site-specific oral colonization of mutans streptococci detected by arbitrarily primed PCR fingerprinting. *Caries Res* 2000;34:474-480.

271 Mattos-Graner R, Li Y, Caufield P, Duncan M, Smith D. Genotypic diversity of mutans streptococci in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. *J Clin Microbiol* 2001;39:2313-2316.

272 Arancegui N. Importancia epidemiológica de la genotipificación de *Streptococcus mutans* en escolares granadinos. Tesis Doctoral. Universidad de Granada 2002.

273 Alaluusua S, Mättö J, Grönroos L, Innilä S, Torkko H, Asikainen S, Jousimies-Somer H, Saarela M. Oral colonization by more type of mutans streptococcus in children with nursing-bottle dental caries. *Arch Oral Biol* 1996;41:167-173.

encontraban en un programa de prevención y efectuaban un tratamiento periódico con digluconato de clorhexidina.

Grönroos y Alaluusua²⁷⁴, estudiando 7 niños, entre tres y siete años, encuentran que el 28.56% presentan un genotipo, el 42.86% dos, el 14.29% tres y el 14.29% cuatro. En este estudio el número muy reducido de pacientes, hace difícil una comparación, con respecto a la población seleccionada para esta tesis.

Mattos-Graner y cols²⁷⁵ en una guardería maternal de Brasil, con niños de 12 a 30 meses, encontraron que el 70.8% poseía un genotipo, el 25% dos y el 4.2% tres genotipos. Por último, los datos aportados por Arancegui²⁷⁶ en escolares granadinos no fueron tan aproximados: 39.29% con un genotipo, con dos genotipos un 28.57% y para tres y cuatro genotipos un 14.29% y un 7.14% respectivamente.

En nuestro trabajo los escolares presentaban una escasa colonización por SM ya que de los 67 escolares, 15 (22.38%) no poseían ningún genotipo en la primera fase del estudio y tampoco 16 (23.88%) a los 18 meses. La distribución basal fue de 55.22% de niños con un genotipo y el 22.30% con dos.

En el transcurso de los 18 meses y como consecuencia de la ganancia y pérdida de genotipos encontramos por primera vez escolares con más de dos cepas diferentes, apareciendo una nueva distribución en la que el 47.76% de los escolares portaban un genotipo, el 22.38% eran portadores de dos y en el 5.97% de los niños se encontraron tres genotipos. Estos resultados guardan gran semejanza con los de Liu J y cols.²⁷⁷

En el Colegio Juan XXIII se perdieron tres genotipos con respecto a los resultados basales y en ocho escolares se detectaron nueve nuevos. Por otro lado, en la Institución del Padre Manjón, se perdieron seis genotipos y seis niños adquirieron siete diferentes. Como podemos ver, el resultado neto en cuanto a pérdida y ganancia fue favorable para las nuevas adquisiciones de genotipos, especialmente en el primero de los colegios.

5.5.3. Grupos de homología y transmisión horizontal.

Ya hemos señalado la importante revolución que ha supuesto las técnicas de biología molecular y en particular las dirigidas a estudios de genotipificación para el estudio epidemiológico y taxonómico de las bacterias orales. Así, cuando la adquisición vertical de

274 Grönroos L, Alaluusua S. Site-specific oral colonization of mutans streptococci detected by arbitrarily primed PCR fingerprinting. *Caries Res* 2000;34:474-480.

275 Mattos-Graner R, Li Y, Caufield P, Duncan M, Smith D. Genotypic diversity of mutans streptococci in Brazilian nursery children suggests horizontal transmisión. *J Clin Microbiol* 2001;39:2313-2316.

276 Arancegui N. Importancia epidemiológica de la genotipificación de *Streptococcus mutans* en escolares granadinos. Tesis Doctoral. Universidad de Granada 2002.

277 Liu J, Bian Z, Fan M, He H, Nie M, Fan B, Peng B, Chen Z. Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed PCR in patients undergoing orthodontic treatment. *Caries Res* 2004;38:523-529.

estos microorganismos era un hecho claramente demostrado desde antiguo, cuando se preconizaban métodos fenotípicos²⁷⁸, a la hora de aplicar las diversas técnicas de genotipificación quedó plenamente confirmado^{279,280,281,282}. Igual sucede con la transmisión horizontal aunque se ha investigado más tarde y en menor proporción.

Mattos-Graner y cols²⁸³ en uno de sus trabajos con niños de 12 a 30 meses de edad, en una guardería infantil, en la que permanecían 10 horas por día y 5 días por semana, encontraron una baja transmisión horizontal de , dejando entrever que esta sería mayor en individuos altamente colonizados. En otro trabajo anterior, Saarela y cols²⁸⁴ también sugieren, pero no de forma taxativa, una transmisión horizontal entre esposos, y otro tanto señalan Ersin y cols²⁸⁵, aunque Klein y cols²⁸⁶ no la encuentran en su estudio y abren la puerta a otras posibles vías de transmisión.

En nuestro trabajo, a través de la creación de grupos de homología de ADN hemos podido reunir aquellos genotipos compartidos por los distintos escolares, deduciendo de esta manera los casos en los que ha podido tener lugar una transmisión horizontal. En el estudio basal para el Colegio Juan XXIII se establecieron seis grupos de homología de entre los 26 escolares a los que se le detectó SM; de ellos, 16 (61.53%) compartían genotipos, dos niños en los grupos I, II, III y V; tres en el VI y cinco en el IV. Por el contrario en el colegio Padre Manjón de los cinco grupos de homología en los 26 escolares en los que se aisló SM, sólo diez compartían genotipos (38.46%), dos niños en cada grupo.

Como consecuencia de las ganancias y pérdidas de genotipos se producen variaciones en el número de niños que comparten al menos un genotipo con algún compañero; así, en el caso del centro Juan XXIII pasaría del 61.53% al 84.61%, mientras que en el Padre Manjón, la variación es del 38.46% al 46.15%. Hay que destacar además que en ningún caso las pérdidas de genotipos afectaron a los pertenecientes a los grupos de homología.

278 Baca P, Liébana J, Piédrola G. Epidemiological application of a new bacteriocin typing scheme for *Streptococcus mutans*. Community Dent Oral Epidemiol 1990; 18:194-196.

279 Kohler B, Lundberg A, Birkhed D, Papapanou PN. Longitudinal study of intrafamilial mutans streptococci ribotypes. A Eur J Oral Sci. 2003;383-386.

280 Lindquist B, Emilson I. Colonization of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes and caries development in children to mothers harboring both species. Caries Res 2004; 38:95-103.

281 Ersin N, Kocabas E, Alpoz AR, Uzel A. Transmission of *Streptococcus mutans* in a group of Turkish families. Oral Microbiol Immunol 2004; 19: 408-410.

282 Klein M, Florio F, Pereira A, Höfling J, Goncalves R. Longitudinal study of transmission, diversity, and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes in Brazilian nursery children. J Clin Microbiol. 2004;42:4620-4626

283 Mattos-Graner R, Li Y, Caufield P, Duncan M, Smith D. Genotypic diversity of mutans streptococci in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. J Clin Microbiol 2001;39:2313-2316.

284 Saarela M, von Troil-Lindén B, Torkko H, Stucki AM, Alaluusua H, Jousimies-Somer H, Asikainen S. Transmission of oral bacterial species between spouses. Oral Microbiol Immunol 1993;8:349-354.

285 Ersin N, Kocabas E, Alpoz A, Uzel A. Transmission of *Streptococcus mutans* in a group of Turkish families. Oral Microbiol Immunol 2004; 19: 408-410.

286 Klein M, Florio F, Pereira A, Höfling J, Goncalves R. Longitudinal study of transmission, diversity, and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes in Brazilian nursery children. J Clin Microbiol. 2004;42:4620-4626

De forma más detallada, las nuevas incorporaciones supusieron que para el Colegio Juan XXIII, de los nueve genotipos adquiridos en 18 meses, seis de ellos (66.66%), entraron a formar parte de los grupos de homología, concretamente dos en cada uno de los grupos III y IV y los otros configurando uno nuevo que sólo compartían entre ellos. En el Colegio Padre Manjón solamente dos genotipos de los siete adquiridos (28.57%) conforman un nuevo grupo de homología, por lo que la tasa de transmisión horizontal en este caso es mucho menor.

Por otra parte debemos considerar el hecho de que en cada centro se ha formado un nuevo grupo compartido por dos escolares cuyos genotipos no habían sido detectados con anterioridad, por lo que nos encontraríamos con que estas nuevas adquisiciones han podido tener diferentes orígenes:

- Que fueran incorporadas desde otro entorno y/o por otras vías en ambos escolares de cada colegio.
- Que se adquirieran por alguno de los niños en otro entorno y que tuviera lugar una transmisión horizontal con su compañero con el que comparten patrón de bandas.

Teniendo en cuenta estas circunstancias y eliminando a estos escolares, los genotipos transmitidos se ven reducidos aún más, de manera que en el Padre Manjón no se habrían producido nuevos casos de transmisión horizontal y que ésta habría disminuido en el colegio Juan XXIII, pues se tratarían de cuatro los genotipos adquiridos que entran a formar parte de los grupos de homología.

A la luz de estos datos y bajo nuestro punto de vista podemos señalar que al ser la caries un proceso multifactorial y debido a que las condiciones necesarias para una transmisión se ven a su vez influenciadas por diferencias culturales, sociales, geográficas y conductuales de cada individuo, sí es posible afirmar la existencia de una transmisión horizontal, pero no podemos predecir en que grado tiene lugar. De esta forma, en nuestros resultados, la homología de genotipos entre escolares sí que nos permitió distinguir que cuando se producía transmisión entre los mismos, ésta no tenía lugar en el mismo grado en ambos centros.

5.6. Diversidad genotípica, ecología oral y enfermedad cariogénica.

En este sentido tampoco los resultados obtenidos por los diversos autores muestran uniformidad. Así en un estudio realizado por Mattos-Graner y cols en Brasil²⁸⁷ señalan que no existe asociación entre diversidad genotípica y edad, número de dientes erupcionados, recuentos de EGM o prevalencia de caries. Tanto Lembo y cols²⁸⁸, como Yuan y cols²⁸⁹ tampoco encuentran relación entre número de genotipos y caries, los primeros al estudiar 21 escolares de 5-8 años separados en dos grupos: sujetos con caries activa y libres de ella, y los segundos en un estudio sobre transmisión horizontal en niños de 3-4 años asistentes a diferentes turnos de una guardería.

Años antes Alaluusua y cols²⁹⁰, por ribotipia, hallaron una relación entre el mayor número de ribotipos que colonizaban a las madres y la presencia de caries de biberón en los hijos. Cogulu y cols²⁹¹ señalan que los niños con síndrome de Down presentan menores índices de caries y genotipos diferentes con respecto al grupo control.

Por último, en el estudio de grupos con caries activa y su comparación con sujetos libres de ella, Napimoga puso de manifiesto una fuerte asociación entre el CAOD y la diversidad de genotipos en población adulta, concluyendo además una mayor intensidad en la expresión de los factores de virulencia de las cepas que afectaban a los individuos cariados²⁹².

5.6.1. Relación entre diversidad genotípica y recuento de bacterias cariogénicas.

Recuentos de EGM.

Si consideramos a todos los escolares, incluyendo aquellos en los que no se pudo aislar ningún genotipo, los resultados indican que los recuentos son más elevados a mayor diversidad genotípica. Sin embargo estos datos son controvertidos si tenemos en cuenta la ineficacia del medio CRT Bacteria[®], en el que se obtienen recuentos positivos en muestras en cuyo exámen más detallado con diluciones de saliva en agar MSB, no era posible aislar ninguna cepa de esta bacteria.

287 Mattos-Graner R, Li Y, Caufield P, Duncan M, Smith D. Genotypic diversity of mutans streptococci in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. J Clin Microbiol 2001;39:2313-2316.

288 Lembo F, Longo P, Ota-Tsuzuki C, Rodrigues C, Mayer M. Genotypic and phenotypic analysis of *Streptococcus mutans* from different oral cavity sites of caries-free and caries-active children. Oral Microbiol Immunol. 2007; 22: 313-19.

289 Yuan L, Jing Z, Ran S, Xue D. Genotypic diversity of *Streptococcus mutans* in 3-to-4-year-old Chinese nursery children suggests horizontal transmission. Arch Oral Biol. 2007;81: 1904-1910.

290 Alaluusua S, Mättö J, Grönroos L, Innilä S, Torkko H, Asikainen S, Jousimies-Somer H, Saarela M. Oral colonization by more type of mutans streptococcus in children with nursing-bottle dental caries. Arch Oral Biol 1996;41:167-173.

291 Cogulu D, Sabah E, Uzel A, Ozkinay F. Genotyping of *Streptococcus mutans* by using arbitrarily primed polymerase chain reaction in children with Down Syndrome. Arch Oral Biol 2005; 51: 177-182.

292 Napimoga M, Kamiya R, Rosa R, Rosa E, Höfling J, Mattos-Graner R, Goncalves R. Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries active individuals. J Med Microbiol 2004;53:697-703.

Si excluimos a los niños que no tenían EGM, es decir con cero genotipos, los resultados varían ya que no se demuestra la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los recuentos de EGM de niños con uno y dos genotipos.

Este resultado es una constante para ambos centros y puede deberse a que realmente no exista dicha asociación o a la ineficacia del medio CRT Bacteria[®], tal y como se ha evidenciado antes.

Recuentos de LB.

Es una constante la ausencia de relación entre los recuentos de LB y número de genotipos de SM. En principio pensamos que esta relación podía tener una base lógica ya que se trata de bacterias que, al igual que los EGM, disminuyen el pH salival y este hecho podría potenciar de alguna manera el proceso de colonización. Por otra parte, los valores de recuentos de LB han mostrado muy poca variabilidad, con resultados dentro de un intervalo muy pequeño, lo que hace que la discriminación no sea posible.

5.6.2. Relación entre diversidad genotípica con los índices de caries y sus incrementos a los 18 meses.

En general, la relación entre diversidad genotípica al inicio e índices de caries a nivel basal muestra unos resultados no uniformes. Teniendo en cuenta a todos los niños, incluso los que no tienen EGM, hay una asociación significativa entre caries en dentición temporal y número de genotipos. Sin embargo esto no ocurre en los dos colegios, sino sólo en el Juan XXIII. Si comparamos a los niños con EGM, los resultados son iguales, es decir, mayor nivel de enfermedad de caries en dentición temporal en niños con dos genotipos frente a los portadores de uno en el Colegio Juan XXIII.

Por otra parte, la situación descrita previamente para los recuentos de EGM, es similar a la que nos encontramos cuando se relaciona diversidad genotípica e incrementos de caries. Teniendo en cuenta a todos los escolares, incluidos aquellos en los que no fue posible detectar EGM, sí que encontramos una diferencia significativa entre estos y los niños portadores de SM. Estos datos sugieren una fuerte dependencia entre la presencia de al menos un genotipo con el mayor desarrollo de enfermedad cariogénica. Por otro lado al comparar niños con uno y dos genotipos vemos que no existen diferencias significativas en cuanto a los incrementos en los índices de caries, tanto si estos son de dientes permanentes como en el total de la dentición en general.

La ausencia de uniformidad en estos resultados coincide con las discrepancias encontradas entre los diferentes trabajos consultados, tal como señalábamos al comienzo de este punto. Hay varias razones que pueden explicar este hecho:

- Baja diversidad genotípica en la población estudiada, ya que la gran mayoría de los autores obtienen entre tres y cuatro genotipos a estas edades^{293,294} y otros incluso hasta siete²⁹⁵.
- El tamaño de muestra puede ser insuficiente, ya que el número de niños con más de un genotipo es bajo.
- En algunos niños sólo se pudieron aislar pocas colonias de SM en MSB y existe la posibilidad de que algunos portadores de una cepa lo sean en realidad de dos o incluso más.
- Que en los escolares estudiados no exista relación entre diversidad genotípica e incrementos en los índices de caries. Hay que tener en cuenta que es una población con unas características específicas y que en un alto porcentaje del total de los escolares (46.26%) no fue posible aislar ningún SM, lo que indica un nivel bajo-medio de colonización.

En otro orden de cosas se ha intentado encontrar una asociación en la que pudiera demostrarse si el hecho de compartir o no genotipo guarda o no relación con el estado de salud oral pero con nuestros datos no pudo hallarse significación estadística entre este hecho y los recuentos en CRT[®] Bacteria EGM y LB ni con ninguno de los índices de caries o sus incrementos.

A la vista de los resultados obtenidos en esta tesis, y comparándolos con los de otros autores, podemos observar diferentes tipos de coincidencias, pero también datos discordantes. Esto puede ser debido a diversas de causas, pero de forma especial a la falta de uniformidad de criterios en las técnicas para la detección de genotipos y a que la caries, al ser un proceso multifactorial, se ve influida por variables que son diferentes en cada lugar. Así pues quedan muchos aspectos por dilucidar en un cuadro clínico que, pese a ser tan antiguo como la propia humanidad, continúa representando un importante problema de salud pública.

293 Grönroos L, Alaluusua S. Site-specific oral colonization of mutans streptococci detected by arbitrarily primed PCR fingerprinting. *Caries Res* 2000;34:474-480.

294 Arancegui N. Importancia epidemiológica de la genotipificación de *Streptococcus mutans* en escolares granadinos. Tesis Doctoral. Universidad de Granada 2002.

295 Lembo F, Longo P, Ota-Tsuzuki C, Rodrigues C, Mayer M. Genotypic and phenotypic analysis of *Streptococcus mutans* from different oral cavity sites of caries-free and caries-active children. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22: 313-19.

6. CONCLUSIONES.

1. El empleo de agar MSB como medio de trabajo permitió la obtención de un elevado porcentaje de *Streptococcus mutans*, seguido de lejos por *Streptococcus sobrinus*. Las colonias aisladas de *Streptococcus criceti* y *Streptococcus rattii* resultaron irrelevantes. Se puso de manifiesto una baja selectividad del medio MSB al identificar una considerable cantidad de colonias como estreptococos orales no mutans.
2. La mayoría de los escolares eran portadores de un solo genotipo en las dos fases del estudio. Sólo a los 18 meses se encontraron niños que tenían hasta tres genotipos.
3. Se determinó un elevado grado de estabilidad de los genotipos aislados en los escolares de ambos centros.
4. Quedó recogida la existencia de genotipos compartidos en escolares de los dos colegios. A los 18 meses del muestreo inicial tienen lugar nuevas adquisiciones de genotipos en los grupos de homología, poniendo de manifiesto la existencia de una transmisión horizontal, si bien ésta no se produce con igual intensidad en ambos centros.
5. No existe asociación significativa entre el mayor número de genotipos y los distintos índices de enfermedad de caries. No obstante al incluir en el estudio a los niños con ausencia de *Streptococcus mutans* sí se demostró una correlación positiva con los recuentos de los estreptococos del grupo mutans mediante CRT[®] bacteria, con el y cod y el cos y con la mayoría de las variaciones de los incrementos de los índices de caries a los 18 meses.

7. Bibliografía.

1. Alaluusua S, Alaluusua SJ, Karjalainen J, Saarela M, Holttinen T, Kallio M, Hölttä P, Torkko H, Relander P, Asakainen S. The demonstration by ribotyping of the stability of oral *Streptococcus mutans* infection over 5 to 7 years in children. Arch Oral Biol 1994; 39: 467-471.
2. Alaluusua S, Mättö J, Grönroos L, Innilä S, Torkko H, Asikainen S, Jousimies-Somer H, Saarela M. Oral colonization by more type of mutans streptococcus in children with nursing-bottle dental caries. Arch Oral Biol 1996; 41:167-173.
3. Alam S, Brailsford S, Whiley R, Beighton D. PCR-based method for genotyping viridans group streptococci. J Clin Microbiol 1999; 37:2772-2776.
4. Amerongen A, Nieuw A, Veerman E. Saliva: the defender of the oral cavity. Oral Dis 2002; 8: 12-22.
5. Arancegui N. Importancia epidemiológica de la genotipificación de *Streptococcus mutans* en escolares granadinos. Tesis Doctoral. Universidad de Granada 2002.
6. Apostole P, Vanderas D. Bacteriologic and nonbacteriologic criteria for identifying individual at high risk of developing dental caries. J Public Health Dent 1986; 46:106-113.
7. Baca P, Baca A, Maestre J. Microbiología de la caries. En Liébana J, ed. Microbiología oral, 2ª ed. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana 2002, pp. 561-570.
8. Baca P, Liébana J, Baca A. Estudio in vitro de la capacidad bacteriocinógena de streptococci mutans. Avanc Odontoestomatol 1991; 6:471-474.
9. Baca P, Liébana J, Piédrola G. Epidemiological application of a new bacteriocin typing scheme for *Streptococcus mutans*. Community Dent Oral Epidemiol 1990; 18:194-196.
10. Baca P. Saliva y microbiota oral. Simposio sobre Saliva y Salud Dental. Valencia. Promolibro, 1998. pp. 93-111.
11. Baca P. Caries: fundamentos actuales de su prevención y control. En Cuenca E, Baca P, eds. Odontología preventiva y comunitaria. Principios, métodos y aplicaciones. 3ª edición. Barcelona. Masson 2005, pp. 19-40.
12. Barone S, Macedo C, Marin JM. Arbitrarily primed polymerase chain reaction for fingerprinting the genotype identification of mutans streptococci in children with Down síndrome. Spec Care Dentist 2005; 25: 37-42.
13. Beighton D, Hardie J, Whiley R. A scheme for identification of viridans streptococci. J Med Microbiol 1991; 35: 367-372.
14. Berkowitz R, Jones P. Mouth-to-mouth transmission of the bacterium *Streptococcus mutans* between mother and child. Arch Oral Biol 1985; 30: 377-379.

15. Brading M, Marsh P. The oral environment: the challenge for antimicrobials in oral care products. *Int Dent J.* 2003; 53:353-363.
16. Bravo M, Casals E, Cortés J. Encuesta de salud oral en España 2005. RCOE 2006.
17. Bratthall D. Immunodiffusion studies on the serological specificity of streptococci resembling *Streptococcus mutans*. *Odontol Rev* 1969; 20: 231-243.
18. Bratthall D. Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling *Streptococcus mutans*. *Odontol Rev* 1970; 21: 143-152
19. Bratthall D. The global epidemiology of mutans streptococci. En Johnson N, ed. Risk markers for oral diseases. Cambridge: Cambridge University Press 1999, pp. 287-312.
20. Boom R, Sol C, Salimans M, Jansen C, Wertheim-Van Dillen P, Van Der Noorda J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 495-503.
21. Bowden G. Survival of oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; 9: 54-85.
22. Caufield P, Walker T. Genetic diversity within *Streptococcus mutans* evident by chromosomal DNA restriction fragment length polymorphisms. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 274-278.
23. Caufield P, Wannemuehler Y, Hansen J. Familial clustering of the *Streptococcus mutans* cryptic plasmid strain in a dental clinic population. *Infect Immun* 1982; 38: 785-787.
24. Chow A. Infection of the oral cavity, neck and head. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases.* 5^a ed. Philadelphia: Churchill Livingstone 2000. pp:278-326.
25. Cogulu D, Sabah E, Uzel A, Ozkinay F. Genotyping of *Streptococcus mutans* by using arbitrarily primed polymerase chain reaction in children with Down syndrome. *Arch Oral Bio* 2005; 51: 177-182.
26. Cortés FJ. Medición de la salud y la enfermedad en odontología comunitaria. En Cuenca E, Baca P, eds. *Odontología preventiva y comunitaria. Principios, métodos y aplicaciones,* 3^a ed. Barcelona: Masson 2005, pp. 337-369.
27. Cuenca E. La encuesta de la OMS sobre la salud bucal en España. Una aproximación personal. *Arch Odontoestomatol* 1986; 2: 15-22.
28. De la Higuera A, Gutierrez J, Liébana J, García-Mendoza A, Castillo A. A new bio typing method for *Streptococcus mutans* with the API ZYM system. *Clin Microbiol Infect* 1999; 5: 88-91.

29. De Lamballerie X, Zandotti C, Vignoli C, Bollet C, de Micco P. A one-step microbial DNA extraction method using "Chelex 100" suitable for gene amplification. *Res Microbiol* 1992; 143: 785-790.
30. Demers M, Brodeur J, Simard P, Mouton C, Veilleux G, Fréchette S. Caries predictors suitable for mass-screening in children: a literature review. *Community Dent Health* 1990; 7:11-21.
31. Emanuelsson I. Mutans streptococci in families and on tooth sites. Studies on the distribution, acquisition and persistence. *Swed Dent J Suppl* 2001; 148-166.
32. Emanuelsson I, Carlsson P, Hamberg K, Bratthall D. Tracing genotypes of mutans streptococci on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 24-9.
33. Emanuelsson I, Li Y, Bratthal D. Genotyping shows different strain of mutans streptococci between father and child and within parental pairs in Swedish families. *Oral Microbiol Immunol* 1998; 13: 271-277.
34. Emanuelsson I, Wang X. Demonstration of identical strain of mutans streptococci within Chinese families by genotyping. *Eur J Oral Sci* 1998; 106: 788-794.
35. Emanuelsson I, Thornqvist E. Genotypes of mutans streptococci tend to persist in their host for several years. *Caries Res* 2000; 34: 133-139.
36. Emanuelsson I, Thornqvist E. Distribution of mutans streptococci in families: a longitudinal study. *Acta Odontol Scand* 2001; 59: 93-98.
37. Encuesta andaluza en escolares 2006. Consejería de Salud de la Junta de Andalucía. Informe técnico.
38. Ersin N, Kocabas E, Alpoz A, Uzel A. Transmission of *Streptococcus mutans* in a group of Turkish families. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 408-410.
39. Facklam R. What happened to streptococci overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 616-630.
40. Gimeno de Sande A, Sánchez B, Vieñes J, Gómez F, Mariño F. Estudio epidemiológico de la caries dental y patología bucal en España. *Rev Sanidad Hig Pub* 1971; 45: 361-433.
41. Gold O, Jordan H, Van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 1973; 18: 1357-1364.
42. González MA, Gutiérrez J, Maestre JR. Repercusiones generales de la patología infecciosa oral. En Liébana J. ed. *Microbiología oral* 2ª edición. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana 2002.pp. 619-629.
43. González V, Llodra J. Evolución de la caries dental en escolares andaluces (1985-1995) (comunicación oral). Madrid: V Congreso de la Sociedad Española de Epidemiología y Salud Pública Oral 1996.

44. Gold O, Jordan H, Van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol 1973; 18:1357-1362.
45. Grönroos L, Alaluusua S. Site specific oral colonization of mutans streptococci detected by arbitrarily primed PCR fingerprinting. Caries Res 2000; 34: 474-480.
46. Grönroos L, Saarela M, Mätö J, Tañer-Salo U, Vuorela A, Alaluusua S. Mutacin production by *Streptococcus mutans* may promote transmisión of bacteria from mother to child. Infect Immunol. 1998; 66: 2595-2600.
47. Grönroos L, Saarela M, Mätö J, Luoma A, Jousimies-Somer H, Pyälä L, Asikainen S, Alaluusua S. Chlorhexidine susceptibilities of mutans streptococcal serotypes and ribotypes. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 894-898.
48. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev 1980; 44: 331-384.
49. Hamada S, Ooshima T. Production and properties of some bacteriocins of *Streptococcus mutans*. Arch. Oral Biol 1975; 20: 641-648.
50. Hames-Kocabas E, Ucar F, Kocatas N, Uzel A, Alpöz A. Colonization and vertical transmisión of *Streptococcus mutans* in Turkish Children. Microbiol Res. 2007. Article in press. Available on line in www.sciencedirect.com.
51. Hildebrandt G, Bretz W. Comparison of culture media and chairside assays for enumerating mutans streptococci. J Appl Microbiol 2006; 100: 1339-1347.
52. Igarashi, T, Yamamoto A, Goto N. Direct detection of *Streptococcus mutans* in human dental plaque by polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol 1996; 5: 294-298.
53. Ikeda T, Koulourides T, Kurita T, Housch T, Hirasawa M. Antidental caries effect in rats and man of a bacteriocin purified from the oral bacterium *Streptococcus mutans* C3603. Arch. Oral Biol 1985; 30: 381-384.
54. Jensen M. Diet and dental caries. Dent Clin North Am 1999; 43:615-633.
55. Jordan C, LeBlanc D. Influences of orthodontic appliances on oral populations of mutans streptococci. Microbiol Immunol 2002; 17: 65-67.
56. Kamiya R, Napimoga M, Rosa R Hofling JF, Goncalves R. Mutacin production in *Streptococcus mutans* genotypes isolated from caries-affected and caries-free individuals. Oral Microbiol Immunol 2005; 20: 20-24.
57. Kelstrup J, Gibbons RJ. Bacteriocins from human and rodent streptococci. Arch. Oral Biol 1969; 14: 251-258.
58. Kimmel L, Tinanoff N. A modified mitis salivarius medium for a caries diagnostic test. Oral microbial Immunol 1991; 6: 275-279.
59. Klein M, Florio F, Pereira A, Höfling J, Goncalves R. Longitudinal study of transmission, diversity, and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus*

- sobrinus* genotypes in Brazilian nursery children. J Clin Microbiol 2004; 42: 4620-646.
60. Kohler B, Lundberg A, Birkhed D, Papapanou P. Longitudinal study of intrafamilial mutans streptococci ribotypes. Eur J Oral Sci 2003; 111: 383-389.
 61. Könönen E, Asikainen S, Jousimies-Somer H. The early colonization of Gram-negative anaerobic bacteria in edentulous infants. Oral Microbiol Immunol 1992; 7: 28-31.
 62. Kozai K, Nakayama R, Tedjosasongko U, Kuwahara S, Suzuki J, Okada M, Nagasaka N. Intrafamilial distribution of mutans streptococci in Japanese families and possibility of father-to-child transmission. Microbiol Immunol 1999; 43: 99-106.
 63. Kozai K, Wang D, Sandham HJ, Philips H. Changes in strains of mutans streptococci by treatment with chlorhexidine varnish. J Dent Res 1991; 70: 1252-1257.
 64. Krasse B, Sweden G. Bacteriological factors as indicators of future caries. Int Dent J 1988; 38: 219-225.
 65. Lembo F, Longo P, Ota-Tsuzuki C, Rodrigues C, Mayer M. Genotypic and phenotypic analysis of *Streptococcus mutans* from different oral cavity sites of caries-free and caries-active children. Oral Microbiol Immunol. 2007; 22: 313-19.
 66. Leverett D, Featherstone J, Proskin H, Aclair S, Eisenberg A, Mundorff-Sheestha S, y cols. Caries risk assessment by cross-sectional discrimination model. J Dent Res 1993; 72: 529-537.
 67. Liébana J, González M, Liébana MJ, Parra M. Composición y ecología de la microbiota oral. En Liébana J ed. Microbiología Oral 2ª edición. Madrid: Mc Graw-Hill/Interamericana 2002, pp 515-525.
 68. Liébana J, Castillo A. Saliva y placa bacteriana. En Cuenca E, Baca P, eds. Odontología preventiva y comunitaria. Principios, métodos y aplicaciones, 3ª ed. Barcelona: Masson 2005, p. 45-48.
 69. Liébana J, Castillo a J, Rodríguez-Avial C. Género *Streptococcus* y bacterias relacionadas. En Liébana J, ed. Microbiología oral, 2ª ed. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana 2002, pp. 324-344.
 70. Liébana J, Pontón J, Benito de Cárdenas L. Bacilos Grampositivos anaerobios facultativos de interés oral. En Liébana J, ed. Microbiología oral, 2ª ed. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana 2002, pp. 345-355.
 71. Liébana J. Genotipos de *Streptococcus mutans* de saliva y placa en escolares usando la técnica AP-PCR y el cebador OPA-02. Tesis doctoral. Universidad de Granada 2007.

72. Li Y, Caufield P. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. *J Dent Res* 1995; 74: 681-684.
73. Li Y, Caufield P, Redmo Emanuelsson I, Thornqvist E. Differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* via genotypic and phenotypic profiles from three different populations. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16:16-23.
74. Li Y, Caufield P. Arbitrarily primed polymerase chain reaction fingerprinting for the genotypic identification of mutans streptococci from humans. *Oral Microbiol Immunol* 1998; 13: 17-22.
75. Li Y, Caufield P, Dasanayake A, Wiener H, Vermund S. Mode of delivery and other maternal factors influence the acquisition of *Streptococcus mutans* in infants. *J Dent Res* 2005; 84: 806-811.
76. Li Y, Navia J, Caufield P. Colonization by mutans streptococci in the mouths of 3- and 4-year-old Chinese children with or without enamel hypoplasia. *Arch Oral Biol*. 1994; 39: 1057-1062.
77. Li Y, Wang W, Caufield P. The fidelity of mutans streptococci transmission and caries status correlate with breast-feeding experience among Chinese families. *Caries Res* 2000; 34:123-132.
78. Li Y, Caufield, P. Detection of mutA genes in transmitted strains and non-transmitted strains of mutans streptococci. *Caries Res* 2005; 39: 417-21.
79. Lindquist B, Emilson C, Wennerholm K. Relationship between mutans streptococci in saliva and their colonization of the tooth surfaces. *Oral Microbiol Immunol* 1989; 4: 71-76.
80. Lindquist B, Emilson C. Colonization of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes and caries development in children to mothers harboring both species. *Caries Res* 2004; 38: 95-103.
81. Liu J, Bian Z, Fan M, He H, Nie M, Fan B, Peng B, Chen Z. Typing of mutans streptococci by Arbitrarily Primed PCR in patients undergoing orthodontic treatment. *Caries Res* 2004; 38: 523-529.
82. Llodra J, Bravo M, Cortes J. Encuesta de salud oral en España 2000. *RCOE* 2002; 7: 19-63.
83. Llodra J, González V, Baca P y cols. Estudio de salud dental en escolares andaluces 1995 (comunicación oral). Madrid: V Congreso de la Sociedad Española de Epidemiología y Salud Pública Oral 1996.
84. Loesche W. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev* 1986; 50: 353-380.

85. Longo P, Mattos-Graner R, Mayer M. Determination of mutacin activity and detection of mut A genes in *Streptococcus mutans* genotypes from caries-free and caries-active children. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 144-149.
86. Marcantoni M. Ecología de la cavidad bucal. Negroni M ed. *Microbiología Estomatológica. Fundamentos y Guía Práctica*. Buenos Aires: Panamericana 1999, pp: 23-44.
87. Marsh P. Oral ecology and its impact on oral microbial diversity. En Kuramitsu H, Ellen R, eds. *Oral bacterial ecology. The molecular basis*. Norfolk: Horizon Scientific Press 1999, pp.11-66.
88. Mattös-Graner R, Li Y, Caufield P, Duncan M, Smith D. Genotypic diversity of *mutans* streptococci in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. *J Clin Microbiol* 2001; 39:2313-2316.
89. Meng L, Liu J, Peng B, Fan M, Nie M, Chen Z, Gan Y, Bian Z. The persistence of *Streptococcus mutans* in nasopharyngeal carcinoma patients after radiotherapy. *Caries Res*. 2005; 39: 484-89.
90. *Microbiología General y Bucal* [pagina web]. Disponible en la siguiente dirección web: www.ehu.es/~oivmoral/microral.html. [Acceso diciembre 2006].
91. Mineyama R, Yoshino S, Fukushima K. Genotypic analysis of strains of *mutans* streptococci by pulsed field gel electrophoresis. *Microbiological Research* 2004; 159: 181-186.
92. Nadal-Valladura A. Caries dentaria. Etiología. En Nadal-Valladura A, ed. *Patología dentaria*. Barcelona: Rodas 1987, pp.207-216.
93. Napimoga M, Höfling JF, Klein M, Kamiya R, Goncalves R. Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. *J Oral Science* 2005; 47: 59-64.
94. Napimoga M, Kamiya R, Rosa R, Rosa E, Höfling J, Mattos-Graner R, Goncalves R. Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries active individuals. *J Med Microbiol* 2004;53:697-703.
95. Nascimento M, Höfling J, Goncalves R. *Streptococcus mutans* genotypes isolated from root and coronal caries. *Caries Res* 2004; 38: 454-463.
96. Newbrun E. Current concepts of caries etiology. En Newbrun E ed. *Cariology*. Williams and Wilkins 1977, pp. 15-43.
97. Nomura R, Nakano K, Nemoto H, Fujita K, Inagaki S, Takahashi T, Taniguchi K, Takeda M, Yoshioka H, Amano A, Ooshima T. Isolation and characterization of *Streptococcus mutans* in heart valve and dental plaque specimens from a patient with infective endocarditis. *J Med Microbiol* 2006; 55:1135-1140.

98. Nie M, Fan M, Bian Z. Transmission of mutans streptococci in adults within a Chinese population. *Caries Res* 2002; 36:161-166.
99. Noguerol B, Llodra J, Sicilia A, Follaza M. La salud bucodental en España 1994. Antecedentes y perspectivas de futuro. Madrid. *Avances Medico-Dentales* 1995.
100. Olive D, Bean P. Principles and applications of methods for DNA based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1661-1669.
101. Organización Mundial de la Salud. Encuestas de salud bucodental. Métodos básicos. Ginebra: Organización Mundial de la Salud 1997. p. 41.
102. Paddick J, Brailsford S, Kidd E, Gilbert S, Clark D, Alam S, Killick Z, Beighton D. Effect of the environment on genotypic diversity of *Actynomices naeslundii* and *Streptococcus oralis* in the oral biofilm. *Appl Enviromen Microbiol* 2003; 11:6475-6480.
103. Paddick J, Brasilsford S, Kidd A, Beighton D. Phenotypic and genotypic selection of microbiota surviving under dental restorations. *Appl Enviromen Microbiol* 2005; 10: 2467-2472.
104. Perch B, Kjems E, Ravn T. Biochemical and serological properties of *Streptococcus mutans* from various human and animal sources. *APMIS* 1974; 82: 357-370.
105. Poyart C, Gilles Q, Coulon S, Berche P, Trieu-Cout P. Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *J Clin Microbiol* 1997; 36: 41-47.
106. Powell L. Caries prediction: a review of literature. *Community Dent Oral Epidemiol* 1998; 26: 361-371.
107. Rioboo R. La dinámica de la desmineralización-rem mineralización de las estructuras dentales. En Rioboo R ed. *Odontología preventiva y comunitaria*. Madrid: Avances 2002, pp. 119-141.
108. Rogers A, The source of infection in the intrafamilial transfer of *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 1981; 15:26-31.
109. Rogers A. Bacteriocinogeny and the properties of some bacteriocins of *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol*1976; 21: 99-104.
110. Rogers A. Bacteriocin patterns of strain belonging to various serotypes of *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol* 1976; 21: 243-249.
111. Rudney J, Neuvar E, Soberay A. Restriction endonuclease fragment polymorphisms of oral viridans streptococci, compared by conventional and field-inversion gel electrophoresis. *J Dent Res* 1992; 71: 1182-1188.
112. Russell R. The application of molecular genetics to the microbiology of dental caries. *Caries Res* 1994; 28: 69-82.

113. Saarela M, Alaluusua S, Takei T, Asikainen S. Genetic diversity within isolates of mutans streptococci recognized by an RNA probe. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 584-587.
114. Saarela M, Hannula J, Mättö J, Asikainen S, Alaluusua S. Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Arch Oral Biol* 1996; 41: 821-826.
115. Saarela M, Von Troil-Lindén B, Torkko H, Stucki A, Alaluusua H, Jousimies-Somer H, Asikainen S. Transmission of oral bacterial species between spouses. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8: 349-354.
116. Salas-Wade M. Dental caries Experiencia in 7-12 and 14 years old children in Andalucía, Spain. *Community Dent Oral Epidemiol* 1994; 41: 135-41.
117. Sato T, Hu J, Ohki K, Yamaura M, Washio J, Matsuyama J, Takahashi N. Identification of mutans streptococci by restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal 16S RNA genes. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 323-326.
118. Schaeken M, Van der Hoven J, Franjen H. Comparative recovery of *Streptococcus mutans* on five isolation media, including a new simple selective medium. *J Dent Res* 1986; 65: 906-908.
119. Shiroza T, Shinozaki N, Watanabe T, Ikemi T, Fukushima K, Abiko Y. Rapid isolation of chromosomal DNA from oral streptococci and polymerase chain reaction oriented restriction fragment length polymorphism analysis for genetic heterogeneity. *Oral Microbiol Immunol* 1998; 13: 11-16.
120. Shklair J, Keene H, Simonsen L. Distribution and frequency of *Streptococcus mutans* in caries active individuals. *J Dent Res* 1972; 51: 882-887.
121. Sicilia A, Cobo J, Noguero B y cols. Prevalencia de caries en los niños y jóvenes escolares españoles de 7-12 y 15-19 años. *Arch Odontostomatol* 1990; 6: 323-330.
122. Soet J, Bokhout B, Buijs J, van Loveren C, de Graaff J, Prah Andersen B. Transmission of mutans streptococci between mothers and children with cleft lip and/or palate. *Cleft Palate Craniofac J* 1998; 35: 460-465.
123. Straetemans MM, Van Loveren C, Soet J, de Graaff J, ten Cate JM. Colonization with mutans streptococci and lactobacilli and the caries experience of children after the age of five. *J dent Res* 1998; 77:1851-1855.
124. Subirá C. La caries en el paciente de edad avanzada. En Bullón Fernández P. *Odontostomatología geriátrica*. Madrid: IM&C 1996, pp.175-195.
125. Sullivan A, Borsgröm M, Granath L, Nilsson G. Number of mutans streptococci or lactobacillo in a total dental plaque samples does not the variation in caries better

- then the numbers in simulated whole saliva. *Comun Dent oral Epidemiol* 1996; 24: 159-163.
126. Tanzer J, Borgesson A, Larskowski L, Kurasz A, Testa M. Glucose-sucrose-tellurite-potassium-bacitracine agar, an alternative to mitis salivarius bacitracine agar for numeration of *Streptococcus mutans*. *J Clin Microbiol* 1984; 20: 635-659.
127. Tedjosasongko U, Kozai K. Initial adquisition and transmission of mutans streptococci in children al day nursesey. *ASDC J Dent Child* 2002; 69: 234-235.
128. Toi C, Bönecker M, Cleaton Jones P. Mutans streptococci strains prevalence before and after cavity preparation during atraumatic restorative treatment. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18:160-164.
129. Troung T L, Ménard C, Moutond C, Trahan L. Identification of mutans and other oral streptococci by random amplified polymorphic DNA analisis. *J Med Microbiol* 2000; 49: 63-71.
130. Van Houte J. Role of microorganism in caries etiology. *J Dent Res* 1994; 73: 672-681.
131. Van Houte J. Microbiological predictors of caries risk. *Adv Dent Res* 1981; 89: 19-25.
132. Van Palestein W, Ljsseldij M, Huis I, Veld J. A selective medium for the two major subgrups of the bacterium *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 1983; 28: 599-603.
133. Vauterin L, y Vauterin P. Computer aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. *Eur. Microbiol* 1992; 1: 37-41.
134. Whiley R, Beighton D. Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol* 1998; 13: 195-226.
135. Williams J, Kubelik A, Livak K, Rafalski J, Tingey S. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 1990; 18: 6531-6535.
136. Yokoyama E, Uchimura M. Optimal settings of fingerprint-type analysing computer software for the analysis of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pulsed-field gel electrophoresis patterns. *Epidemiol Infect* 2006; 134: 1004-1014.
137. Yuan L, Jing Z, Ran S, Xue D. Genotypic diversity of *Streptococcus mutans* in 3-to-4-year-old Chinese nursery children suggests horizontal transmission. *Arch Oral Biol.* 2007;81: 1904-1910.