



**Universidad de Granada
Facultad de Odontología**

TESIS DOCTORAL

**Genotipos de Streptococcus mutans
de saliva y placa en escolares usando
la técnica AP-PCR y el cebador OPA-2**

Julia Liébana Cabanillas

DIRECTORES

**María del Pilar Baca García
Ana María Castillo Pérez
José Liébana Ureña**

Granada 2007

Universidad de Granada

Facultad de Odontología

El trabajo de investigación que se expone en la siguiente Tesis, titulada “**Genotipos de *Streptococcus mutans* de saliva y placa en escolares usando la técnica AP-PCR y el cebador OPA-O2**”, ha sido realizada bajo nuestra dirección por la Licenciada Doña Maria Julia Liébana Cabanillas durante los años 2002 a 2006. 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 26 de Febrero 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 y de la Beca que permitió su realización. Mujer de extraordinaria capacidad trabajadora y cuya sólida trayectoria académica y profesional hacen de ella un espejo en el que mirarse en el día a día. Fue la primera en exigirse a sí misma para el desarrollo de este trabajo, mostrándome en todo momento, con rigor y seriedad, su continuo apoyo personal y científico sin regatear sacrificios de ningún tipo.

A la **Profesora Ana María Castillo Pérez**, directora de esta Tesis Doctoral y persona de excelente formación científica, por su entusiasmo, su constante ayuda, su magnífica orientación en los momentos de mayores dificultades y como, teniéndola siempre a mi lado, con enorme paciencia y conocimientos ha resuelto una y otra vez los múltiples problemas que iban surgiendo en un mundo tan complejo y desconocido para mí como la Biología Molecular.

Al **Profesor José Liébana Ureña**, director, como las anteriores, de esta Tesis Doctoral, pero sobre todo **Padre**, amigo y maestro. Su ejemplo, al igual que ha hecho con tantos alumnos que bien sé de su admiración y respeto hacia su persona, marcará mi vida para siempre ¡Gracias Papá por ser como eres! Y, como no podía ser de otra forma, su cariño y aliento fueron vitales para la finalización de este trabajo.

A **Francisca Castillo Pérez**, ella ha sido, por su gran capacidad profesional y de trabajo, la persona que continuamente me dió aliento para seguir adelante. Sus desvelos, su magnífica formación y sus grandes conocimientos técnicos están fuera de toda duda. El control de tantas de cepas, su ordenado y meticuloso trabajo fueron fundamentales para llegar a la conclusión de esta Tesis Doctoral. Al final: amiga y consejera, sobre todo en los momentos más difíciles.

A la **Profesora Pilar Junco Lafuente** y a la **Doctora Adela Baca García**, que tanto me ayudaron en la parte de recogidas de datos y exploraciones bucodentales, contribuyendo además a mi formación como dentista.

A los **Profesores Manuel Martínez Bueno y Antonio Martín Platero**, por su desinteresada ayuda material y 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 **hermano José María**, por su ayuda a la hora de confeccionar algunas tablas.

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. Profesionales como el, además con su desbordante simpatía y paciencia, engrandecen nuestra Universidad.

A los que compartieron muchas horas de laboratorio como becarios, y hoy ya odontólogos, **Jesús, Rosa y Tere** porque formamos una piña de verdaderos amigos y compañeros.

A **Paloma, María Gertrudis e Inma** de las que recibí ayuda cada vez que la necesitaba.

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 que me dieron y, sobre todo a estos **últimos**, al fin y al cabo, los verdaderos protagonistas de esta "historia".

A **mi familia** y a **José Antonio** por soportar mis ausencias y mostrarme siempre su apoyo incondicional.

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

Dedicatoria:

A mi padre

*Solo habrá que dejar tiempo
al tiempo, para que el tiempo haga
tiempo y se descubra la verdad
con el tiempo*

José Liébana Ureña 2006

INDICE

1. Justificación y objetivos.....	13
2. Introducción	17
2.1. Caries	19
2.2. Estreptococos del grupo mutans y caries	29
2.3. Tipificación de los estreptococos del grupo mutans	37
2.3.1. Fenotipia.....	37
2.3.2. Genotipia	38
3. Material y método.....	51
3.1. Población de referencia y selección de la muestra	53
3.2. Diseño del estudio	55
3.3. Exploración bucodental	56
3.4. Toma de las muestras	61
3.5. Procesamiento de las muestras	62
3.6. Cepas bacterianas estudiadas	69
3.7. Extracción de ADN	80
3.8. Amplificación de ADN. AP-PCR o RAPD o RAPDNA.....	82
3.9. Detección de amplificados.....	84
3.10. Lectura e interpretación de las bandas de electroforesis.....	86
3.11. Reproducibilidad	90
3.12. Tratamiento estadístico	91
4. Resultados	93
4.1. Factores demográficos. Índices de caries. Recuentos de bacterias cariógenas. Aislamiento e identificación de estreptococos del grupo mutans	95
4.2. Resultados de la AP-PCR	97
5. Discusión.....	115
5.1. Medio selectivo utilizado y selección de las cepas	119
5.1.1. Selectividad del medio para aislamiento e identificación de los estreptococos del grupo mutans	119
5.1.2. Número de colonias seleccionadas	120
5.1.3. Toma de las muestras ¿Saliva o placa?.....	121
5.2. Tipificación de <i>Streptococcus mutans</i>	124
5.2.1. Metodología de la AP-PCR o RAPD o RAPDNA.....	125
5.3. Genotipos de <i>Streptococcus mutans</i> , ecología oral y enfermedad cariógena	133
5.3.1. Número de cepas por niño	133
5.3.2. Transmisión horizontal	134
5.3.3. Número de genotipos y caries	135
6. Conclusiones	137
7. Bibliografía	141

1. Justificación y objetivos

La caries es un proceso que si bien en los países desarrollados muestra clara tendencia a una regresión progresiva, no ocurre así en los del llamado “tercer mundo”. Por ello, sin lugar a duda, sigue siendo en la actualidad la patología oral de mayor incidencia y además la enfermedad que con mayor frecuencia afecta al ser humano.

Para comprender su fisiopatología es válida la definición¹ que la considera: “como una enfermedad infecciosa, crónica, transmisible, muy prevalente en el ser humano, que se caracteriza por la destrucción localizada de los tejidos duros dentales, por la acción de los ácidos producidos por los depósitos microbianos adheridos a los dientes”. Estas lesiones, por tanto, son causadas por bacterias acumuladas (placa o biopelícula) que metabolizando un sustrato, por su capacidad acidógena, determinan un descenso del pH y causan la desmineralización dental. Ésta puede afectar a varios tipos de tejidos: esmalte, dentina o cemento. Por otra parte, como ya señalara Miller en el siglo XIX con su celebre teoría focal, puede ser el origen de infecciones secundarias y a distancia que, en algunos casos, ponen en grave riesgo la vida de los pacientes. La caries continua siendo, como señalábamos anteriormente, un problema de salud de gran trascendencia en nuestra sociedad moderna.

Los estreptococos del grupo mutans (EGM) son las bacterias más cariogénicas, destacando *Streptococcus mutans* (SM) sobre las demás especies. Este hecho es conocido desde antiguo (sirvan como referencia las clásicas revisiones de Hamada y Slade² y Loesche³) y, aunque últimamente existen algunas discrepancias al respecto, no hay evidencias claramente objetivables que hagan, por el momento, dudar de su importancia en cuanto al papel predominante en la génesis de la caries.

Su cuantificación a partir de saliva, claramente relacionada con lo que ocurre a nivel de la biopelícula dental, ha sido uno de los parámetros más utilizados para determinar el riesgo de caries en grupos e individuos. Para realizar recuentos de SM a partir de placa o saliva, el medio más difundido y utilizado hasta el momento ha sido el agar Mitis Salivarius Bacitracina (MSB) descrito por Gold y cols. en 1973⁴. Sin embargo cada vez es más cuestionado en cuanto a su capacidad

1 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.

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

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

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

selectiva, el corroborar este hecho se podría considerar como un objetivo secundario en esta tesis.

Por otra parte, desde el punto de vista epidemiológico, es esencial determinar sus posibles mecanismos de transmisión mediante un método eficaz de tipificación. Los resultados de los últimos trabajos publicados, tal como se comentará ampliamente más adelante, han demostrado que las técnicas de biología molecular parecen tener un alto poder discriminativo. Por ello para el presente estudio se ha elegido la genotipificación de SM relacionándola con otros parámetros sanitarios. La población que se ha seleccionado ha sido la escolar de seis a siete años debido a que en esas edades los niños de una misma clase mantienen contactos que pueden dar lugar a una transmisión horizontal. Por otra parte es el grupo etareo de más susceptibilidad de padecer caries.

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

1. Determinar la diversidad genotípica de *Streptococcus mutans* en escolares de 6-7 años de nuestro entorno, utilizando la técnica AP-PCR con el primer OPA-02.

2. Comparar dicha diversidad entre cepas aisladas en saliva y placa en un mismo escolar.

3. Analizar si existe relación entre el número de genotipos de *Streptococcus mutans* y determinadas variables predictorias del riesgo de caries como recuentos de estreptococos del grupo mutans y lactobacilos e índices de enfermedad en dentición temporal (cos y cod).

4. Identificar en *Streptococcus mutans* grupos de homología de ADN que permitan evaluar la posible transmisión horizontal entre escolares que conviven en una misma aula y, si el hecho de compartir genotipos, se relaciona con las variables predictorias del riesgo de caries e índices de enfermedad señalados.

2. Introducción

2.1. Caries

La caries es una enfermedad infecciosa, habitualmente crónica, que causa la destrucción localizada de los tejidos duros dentales por los ácidos de los depósitos bacterianos adheridos a los dientes⁵. Se trata de un proceso multifactorial debido a la interacción de un sustrato, la microbiota, el hospedador y el tiempo. Por el contrario, su aparición y desarrollo se verán disminuidos por diversas circunstancias que interfieren algunos de los elementos que contribuyen a su fisiopatología (Figura 1).

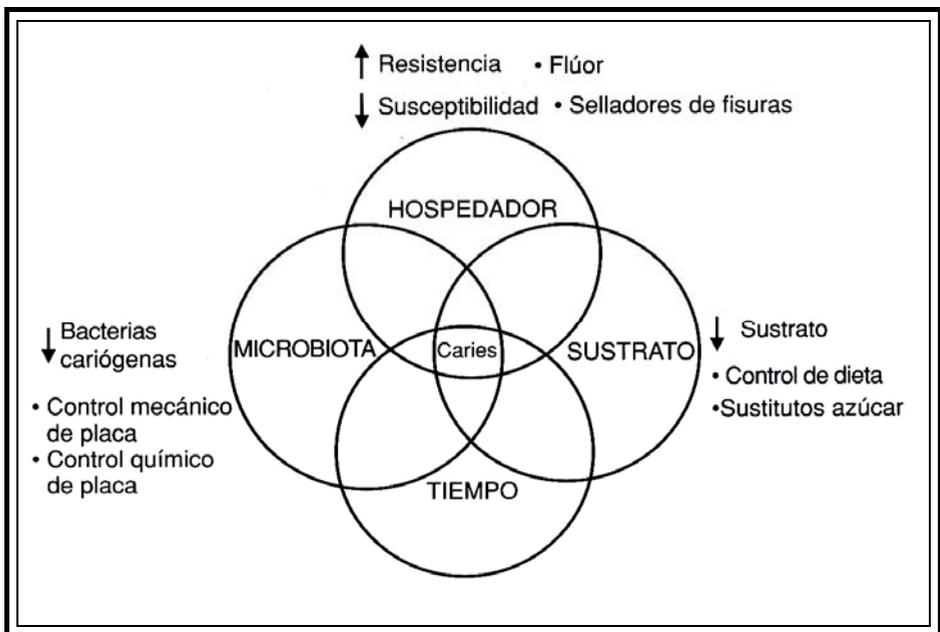


Figura 1. Factores que intervienen en la génesis de la caries y su prevención.

Los factores del hospedador implicados en su etiología son la edad, el diente, la saliva y otros que tienen un carácter general, en su mayoría relacionados con el medio ambiente en el que se desarrolla el individuo o con las enfermedades sistémicas de éste.

⁵ 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.

➤ **La edad del sujeto.** Es preciso tenerla en cuenta ya que existen unos periodos favorables para la formación de caries⁶. Hay que señalar que hasta que el diente no alcanza su madurez posteruptiva, 3 ó 4 años después de su aparición, éste es más sensible a la acción de los ácidos producidos por las bacterias⁷.

➤ **La saliva.** Desempeña un importante papel para el mantenimiento de las condiciones orales y protector de la integridad del diente, así ocurre con el flujo, la lactoperoxidasa, la lactoferrina, la mucina de bajo peso molecular, su capacidad tampón, su función remineralizante, la IgA secretora, etc⁸. 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 disminución de la cantidad del flujo salival.

➤ **El diente.** Es en definitiva el que padece la lesión y por tanto habrá que tener en cuenta todas aquellas circunstancias relacionadas con él. Así ocurre con las maloclusiones, aparatología en boca, anatomía, histología y todo aquello que impida una correcta eliminación de placa. Sin embargo, actualmente se sabe que la caries no es un simple proceso de desmineralización, sino que se caracteriza por una alternancia de periodos de destrucción, inactividad y actividad reparativa. Cuando la saliva se encuentra sobresaturada de calcio y fosfatos tiene lugar la actividad reparadora. Glucoproteínas o proteínas salivares como estaterinas, histatinas, cistatinas, y proteínas ricas en prolina (PRP), se unen a la hidroxiapatita inhibiendo la precipitación de fosfato cálcico presente en la saliva. Esto evita un depósito secundario excesivo de sales. Determinadas proteasas bacterianas y la calicreína salival, las inactivan alterando así este proceso regulador⁹ (Figura 2).

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

7 Hamada S, Slade H. Biology, immunology and Cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev 1980; 44: 331-384

8 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. 41-62.

9 *Ibidem*, p 50.

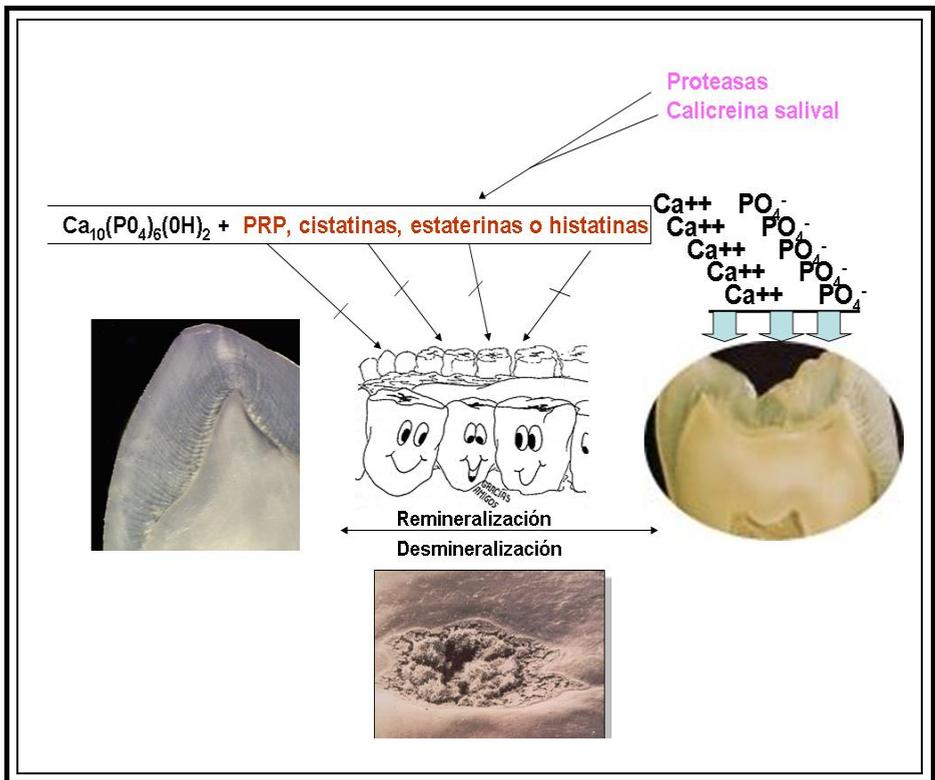


Figura 2. Regulación de la mineralización del diente (véase explicación en el texto).

El sustrato. Estaría representado por una dieta que contenga sustancias fermentables por los microorganismos capaces de transformarlas en ácidos orgánicos, especialmente láctico. Así se comportarían los azúcares, destacando la sacarosa en relación a la aparición de caries.

Los microorganismos con capacidad de provocar caries. Constituyen la microbiota cariogénica, destacando los EGM, lactobacilos (LB) y en menor grado actinomicas. Estos agentes formarían parte de las placas dentales o conjunto de microorganismos que, constituyendo una biopelícula, están firmemente adheridos entre si, y a una superficie dentaria, entremezclados, embebidos, y rodeados de un material extracelular abiótico de un triple origen: bacteriano, saliva y dieta (Figura 3). De acuerdo con su localización las placas dentales relacionadas con la caries son las supragingivales o coronales (de superficies lisas, proximales, oclusales o de fosas y fisuras), radiculares (si se acepta su existencia como tal hecho controvertido en los

últimos años) y las relacionadas con materiales artificiales intraorales¹⁰. En la figura 4 se observa una imagen de placa bacteriana después de haber sido teñida con reveladores y en la figura 5, restos de placa bacteriana depositada en un alambre de ortodoncia.

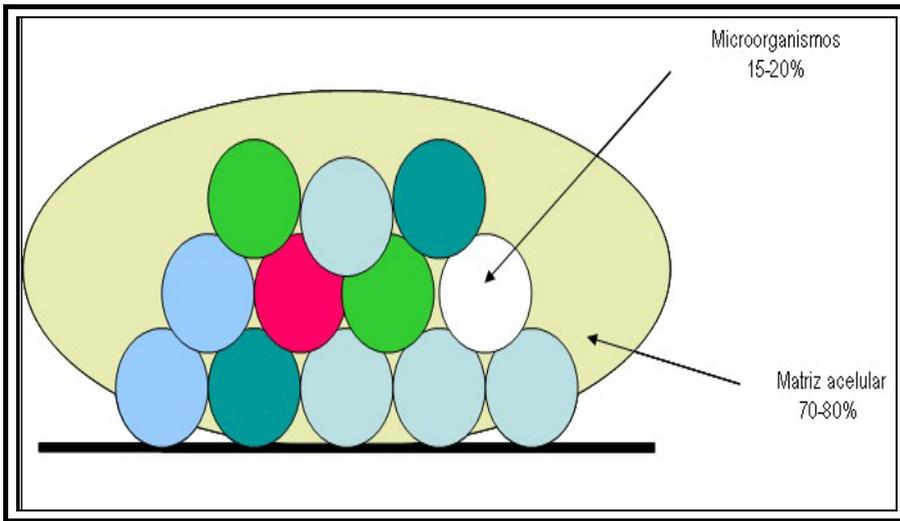


Figura 3. Representación esquemática de la biopelícula o placa dental.

¹⁰ *Ibidem*, pp.51-59.



Figura 4. Placa de superficies lisas teñida.
(Imagen reproducida con permiso de su autor: Dr. Blas Noguero Rodríguez).

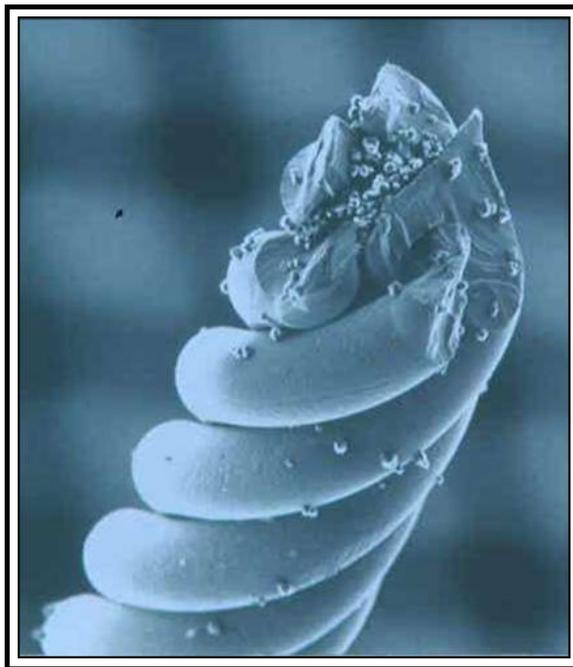


Figura 5. Restos de placa en un alambre de ortodoncia.
(Imagen reproducida con permiso de su autor: Dr. Arturo Baca García).

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: son muchos los microorganismos orales capaces de generar ácidos, pero los factores de cariogenicidad estarían especialmente relacionados con los tres grupos bacterianos señalados anteriormente y la producción de ácidos provocaría una selección microbiana de las bacterias cariogénicas¹¹.

Cuando las fuerzas destructivas predominan sobre las reparadoras, la enfermedad avanza y viceversa. Medidas preventivas como las reseñadas en la figura 1 pueden frenar la enfermedad. Así pues en definitiva una microbiota cariogénica más 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 (Figura 6).

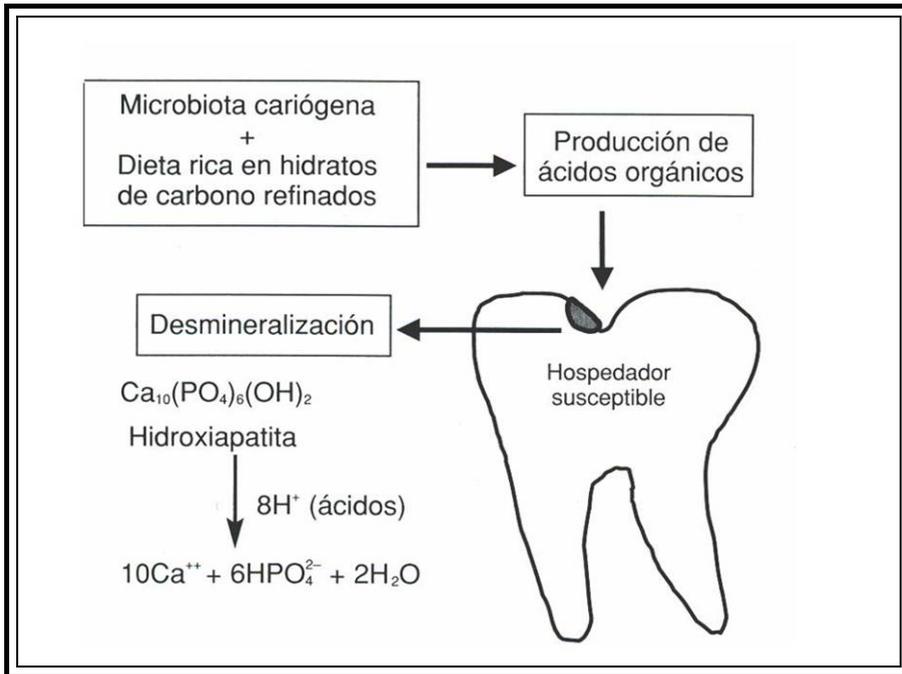


Figura 6. Patogenia de la caries.

¹¹ *Ibidem*, pp. 59-61.

De esta manera, **desde un punto de vista clínico**, la desmineralización de los tejidos duros dentarios daría origen desde inapreciables o insignificantes lesiones hasta grandes cavidades que podrían clasificarse bajo tres ópticas diferentes: 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; c) en activas e inactivas según su actividad y d) de esmalte, dentina y con afectación pulpar, en base a la profundidad de la lesión (En las figuras 7 y 8 se observan dos tipos de caries).



Figura 7. Caries rampante. Indica un fuerte desafío cariígeno normalmente asociado a un riesgo microbiológico elevado. (Imagen reproducida con permiso de su autora: Dra. Pilar Baca García¹²).

¹² Baca P, Baca A, Maestre J. Microbiología de la caries. En Liébana J, ed. Microbiología oral, 2ª ed. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana 2002, p 565.



Figura 8. Caries oclusal con dos lesiones enfrentadas que han progresado a dentina.
(Imagen reproducida con permiso de su autora: Dra. Pilar Baca García¹³).

Desde el **punto de vista epidemiológico** se considera una de las enfermedades infecciosas de mayor prevalencia; sin embargo en los últimos años se ha producido un importante descenso de la misma en las sociedades occidentales, debido a las campañas preventivas y a una mejor educación en salud buco dental¹⁴. En nuestro país este descenso ha sido claramente manifiesto. Así ha quedado demostrado desde la primera encuesta de Gimeno de Sande y cols., de 1969¹⁵, pasando por la de Cuenca en 1986¹⁶, la de Sicilia y cols., en 1987¹⁷, la de Noguerol y cols., en 1994¹⁸, la de Llodra y cols., en 2000¹⁹ y la de Bravo y cols., en 2005²⁰ (Tabla 1).

13 *Ibidem*, p. 562

14 Subirá C. La caries en el paciente de edad avanzada. En Bullón P. Odontostomatología geriátrica. Madrid: IM&C 1996, pp.175-195.

15 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.

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

17 Sicilia A, Cobo J, Noguerol 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.

18 Noguerol B, Llodra J, Sicilia A, Follaza M. La salud bucodental en España 1994. Antecedentes y perspectivas de futuro. Madrid. Avances Medico-Dentales 1995.

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

20 Bravo M, Casals E, Cortes J. Encuesta de salud oral en España 2005. RCOE 2006 (en prensa).

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

Estudios	Edad	cod	CAOD	IR o ir (%)
OMS, 1984	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
Noguerol 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
			00.4	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: índices de restauración (o/co x 100, O/CO x100). c-C: componente cariado. o-O componente obturado.

Otro tanto ocurre en Andalucía de acuerdo con las cuatro encuestas realizadas hasta el momento (Tabla 2).

Tabla 2. Índices de caries en la población escolar andaluza.

Estudios	Edad	CAOD	IR (%)	cod	ir (%)
1985 ²¹	7	0.66	3.58	3.45	-
	12	2.70	12.5	-	-
	14	4.01	10	-	-
1995 ^{22,23}	7	0.39	13	2.00	29
	12	2.69	25	-	-
	14	3.95	35	-	-
2001 ²⁴	7			1.37	-
	12	1.38	44	-	-
	14	2.23	46	-	-
2006 ²⁵	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. *referido a caod: suma de dientes temporales cariados, ausentes por caries y obturados. CAOD: suma de dientes permanentes cariados, ausentes por caries y obturados. IR/ir: índices de restauración(o/co x 100, O/CO x100). c-C: componente cariado. o-O componente obturado.

21 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.

22 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.

23 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.

24 Consejería de Salud (Junta de Andalucía). Encuesta de Salud bucodental en escolares andaluces 2001. Sevilla: Junta de Andalucía 2002.

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

2.2. Estreptococos del grupo mutans y caries

La implicación de los EGM (especialmente SM) en la etiología de la caries está ampliamente demostrada²⁶. También se conoce la relación de estos microorganismos en la saliva con el riesgo de padecer enfermedad²⁷. Diversos estudios muestran los factores que influyen en la colonización y supervivencia de estas bacterias en la cavidad oral; así ocurre por ejemplo con las interacciones microbianas, las fluctuaciones de pH y las concentraciones de carbohidratos.

Después de la erupción de los dientes, el medio ambiente de la cavidad oral del niño es similar al del adulto²⁸. La **transmisión** de EGM se lleva a cabo de forma directa (pe. un beso) o indirecta (pe. cucharas, chupetes o tetinas del biberón). Aún así existen algunas otras fuentes de transmisión pero no todas están bien documentadas. Se sabe que ocurre entre madre e hijos^{29,30,31}, pero por ejemplo se conoce poco de lo que acontece entre niños en las escuelas o adultos durante su actividad profesional.

Igualmente se ha descrito que son necesarios unos niveles mínimos de EGM salivares para que pueda tener lugar la transmisión o la colonización. Se ha establecido una correlación entre los niveles de EGM y el número de superficies colonizadas³². Una característica de gran importancia para EGM deriva de la persistencia en la cavidad oral debido a su capacidad de sobrevivir en las placas dentales gracias a su poder de adhesión. Un ejemplo clásico fue el de un genotipo de SM que, presente antes de ser tratado con barniz de clorhexidina, recolonizó posteriormente la cavidad oral, aunque también se aislaron otros diferentes³³. Así si un clon de gran virulencia se establece sobre una superficie dentaria, en principio se puede considerar que va a permanecer un largo periodo de tiempo, haciendo que ese individuo deba considerarse como un reservorio para esa bacteria en concreto.

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

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

28 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.

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

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

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

32 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.

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

La cavidad oral es un ecosistema cuya carga microbiana solo es comparable a la del colón. Sin embargo en cualquier localización de la misma, salvo el surco gingival, los más abundantes son los estreptococos orales.

Estudios de biología molecular realizados en los últimos años han revolucionado el campo de la taxonomía y estas bacterias no podían ser una excepción. Así se han producido, y se siguen produciendo, continuos cambios en sus denominaciones o agrupamientos. Son evidentes sus ventajas, pues suponen una aproximación a la realidad genética, pero también son numerosos sus inconvenientes, baste señalar dos: a) la dificultad para establecer modelos comparativos de forma retrospectivas entre trabajos realizados sobre especies actuales que no se corresponden a las del pasado y b) la provisionalidad, pendiente de nuevos hallazgos, que todavía persiste en la nomenclatura. Teniendo en cuenta dicho carácter provisional, en el momento actual los estreptococos orales, también conocidos como viridans, relacionados con el hombre, pueden clasificarse en los grupos y especies que se reflejan en la tabla 3. Hemos seguido los criterios de Fackclan, los de mayor fiabilidad. Aunque sean de 2002, posteriormente no se han producidos hechos reseñables y universalmente aceptados que alteren su vigencia.

Tabla 3. Clasificación de los estreptococos orales relacionados con el hombre³⁴.

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

Las especies de EGM, incluidas las no aisladas en humanos salvo *S. hyovaginalis* cuestionada por Fackclan, se recogen, en orden

³⁴ Facklam R. What happened to streptococci overview of taxonomic and nomenclature changes. Clin Microbiol Rew 2002; 15: 616-630.

a su frecuencia en la cavidad oral y su cariogenicidad en el hombre, en la tabla 4; en ella se referencia además la capacidad de producir fructanos (todas elaboran glucanos, solubles o dextranos e insolubles o mutanos), de sintetizar polisacáridos intracelulares (especialmente glucógeno), los serotipos a los que pertenecen (en función de hidratos de carbonos parietales diferentes del C) y el porcentaje de guanina (G) más citosina (C) en su ADN cromosómico.

Diversos estudios ponen de manifiesto la prevalencia de estas especies en diferentes países (tabla 5).

Tabla 4. Algunas características diferenciales de los EGM³⁵.

Especies	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 neuroaminidasa. # produce H₂O₂. +: carácter positivo.- : carácter negativo. D: propiedad débil.*No detectadas en el hombre.

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

Tabla 5. Prevalencia de los EGM³⁶.

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. Saudi)	76	53	0	0
Adultos (Mozambique)	81	26	0	83
Ancianos (Suecia)	72	44	0	0
Ancianos (USA)	>85	7	2	3

Los principales **factores de virulencia** de estos microorganismos se relacionan con estrategias para producir ácidos (sobre todo láctico) y resistir las bajadas de pH consiguientes.

❖ Acidogénesis (o rápida capacidad de alcanzar el pH crítico de desmineralización de 4.5-5.5) y acidofilia (o poder sobrevivir a pH ácido). Tanto una como otra se deben a la apertura de la puerta del lactato, por activación de la lactatodeshidrogenasa (LDH), a una potente ATPasa que expelle al exterior hidrogeniones, a la disminución del ingreso de sacarosa por el sistema fosfoenolpiruvatofosfotransferasa al activarse la piruvatocinasa y a la elevada velocidad con la que metabolizan los azúcares por la vía glucolítica.

36 Microbiología General y Bucal [pagina web]. Disponible en www.ehu.es/~oivmoral/microral.html. [Acceso septiembre 2006].

❖ 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 (Figura 9).



Figura 9. Poder acidógeno, acidófilo y acidúrico de los EGM.
(Imagen reproducida con permiso de su autor: Dr. José Liébana Ureña).

❖ 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.

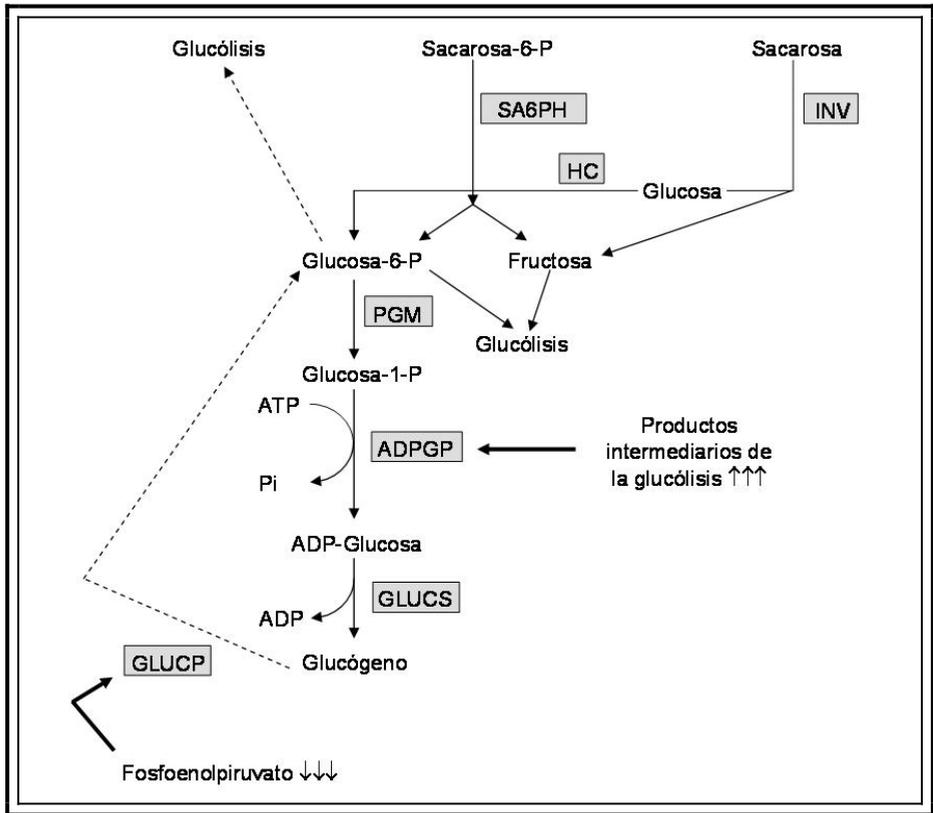
❖ Síntesis de capa mucosa cuando hay una alta disponibilidad de azúcar. Constituida por homopolisacáridos: a) solubles, dextranos y fructanos, que pueden movilizarse por dextranasas y fructanasas hasta alcanzar el estado de glúcidos elementales asimilables y b) insolubles o mutanos, que facilitan la adhesión, agregación y coagregación. Su producción se debe a enzimas como las glucosiltransferasas I y II y fructosiltransferasa, esta última solo producida por SM y *S. ratti* (SR).

❖ Síntesis de polisacáridos intracelulares (con la excepción de SS). Es el caso del glucógeno que, como los dextranos y fructanos, puede metabolizarse ante la falta de aporte exógeno de azúcar, por la acción de la glucogenofosforilasa. Su formación se debe a la activación de ADP-glucopirofosforilasa ante un incremento de productos intermediarios de la glucólisis. (Figura 10).

❖ Adhesión a superficies duras. En ella se involucra especialmente a los mutanos y glucosiltransferasas. Además SM puede unirse a la película adquirida en las zonas donde existen proteínas ricas en prolina.

❖ Producción de agua oxigenada, que ejercería un efecto antagónico sobre microorganismos próximos. Esta capacidad solo la posee SS.

❖ Producción de mutacinas, sustancias que pueden conferir una ventaja ecológica para su establecimiento y colonización en la placa dental.



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

Figura 10. Síntesis y movilización de polisacáridos intracelulares

(Los datos sobre los factores de virulencia han sido resumidos de Liébana J, Castillo A y Rodríguez-Avial C³⁷).

En cuanto a lactobacilos y actinomices su capacidad cariogénica es muy diferente. Los primeros (especialmente los homofermentativos) son especialmente importantes, así por ejemplo tienen poder acidogénico y acidúrico, inician su crecimiento a pH 5, son particularmente acidófilicos y ejercen una débil, pero constante, actividad proteolítica. Algunas cepas incluso sintetizan polisacáridos intra y extracelulares a partir de la sacarosa. Sin embargo se adhieren mal a las

37 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.

superficies duras por lo que suelen utilizar otros mecanismos para colonizar el diente mediante 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 dentales³⁸. Al igual que los EGM, los recuentos, determinados especialmente en medio Rogosa-Mitchell-Wiseman, sirven para valorar la susceptibilidad individual a la caries. Diferente es el caso de los actinomicetes en los que sólo algunas especies 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 sólo algunas cepas producen capa mucosa (a expensas de fructanos con más carácter nutricional que adherente), elaboran ácidos como productos finales pero son heterofermentativas y tienen cierta actividad proteolítica.

Por otra parte son capaces de formar cristales intracelulares que sirven para generar cálculos, tienen fimbrias y producen ureasa y neuraminidasa³⁹.

38 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.

39 *Ibidem*, p. 347

2.3. Tipificación de los estreptococos del grupo mutans.

La tipificación es el único método que permite el seguimiento epidemiológico de los microorganismos. Puede realizarse por métodos fenotípicos y genotípicos. Un amplio número de trabajos sobre este particular se han publicado en las últimas décadas en relación a los EGM.

2.3.1. Fenotipia.

Entre las diversas metodologías utilizadas destacan:

❖ Bacteriocinotipia. Fue una de las primeras formas de realizar tipificación con fines epidemiológicos^{40,41,42,43,44,45}. 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 cepas estandar bacteriocinógenas o susceptibles a bacteriocina. Sin embargo son técnicas complejas y que a menudo suelen dar como resultado una excesiva diversificación de bacteriocinotipos. Por otra parte, no tienen que corresponderse siempre con la realidad genética⁴⁶. Por ello la tendencia actual, salvo muy raros estudios, es su abandono.

❖ Serotipia. En 1969 Bratthall⁴⁷ publicó los resultados obtenidos empleando la inmunodifusión radial y al año siguiente describió cinco grupos serológicos⁴⁸. Estudios posteriores como los efectuados por los grupos de Perch⁴⁹ y Beighton⁵⁰, sirvieron para distinguir un

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

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

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

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

44 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.

45 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.

46 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.

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

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

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

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

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, es hoy 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) sólo poseen uno y las de *S. sobrinus* (SS), aunque la mayoría se incluyen como d o g, a veces carecen de estos polisacáridos de pared.

❖ **Biotipia.** Un grupo de investigación de la Universidad de Granada ha publicado 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 biotipos⁵¹.

2.3.2. Genotipia.

En general, el estudio de los caracteres fenotípicos es útil desde el punto de vista económico, sin embargo su reproducibilidad y poder discriminatorio es usualmente bajo⁵². Los métodos genéticos de tipificación por el contrario no suelen plantear estos problemas⁵³. 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 epidemiológicos⁵⁴, sin embargo, a causa del bajo porcentaje de cepas de EGM que portan estos elementos⁵⁵, dicha técnica no se difundió.

➤ **Análisis con endonucleasas de restricción (REA, Restriction Endonucleases Analysis).** 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 con luz ultravioleta. Debido a la especificidad del reconocimiento y corte de las enzimas, los patrones de bandas se pueden

51 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.

52 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.

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

54 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.

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

comparar. Ha sido utilizada con éxito tanto en la genotipificación de los EGM, bien individualmente^{56,57,58,59,60} o asociada a la AP-PCR (véase después)^{61,62}, o para identificar especies del grupo^{63,64}. 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 o nylon. La ribotipia es una variación de esta técnica, 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^{65,66}.

➤ **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

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

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

58 Emanuelsson I, Thornqvist E. distribution of mutans streptococci in families: a longitudinal study. *Acta Odontol Scand* 2001; 59: 93-99.

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

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

61 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.

62 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.

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

64 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.

65 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.

66 Alaluusua S, Alaluusua SJ, Karjalainen J, Saarela M, Holttinen T, Kallio M, Hölltä 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.

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. A pesar de ello, no se ha difundido en el estudio de EGM, con la excepción de pocos trabajos⁶⁷.

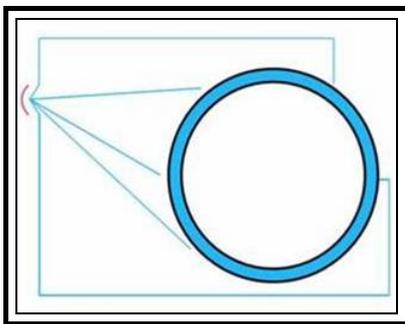
➤ Reacción en cadena de la polimerasa con cebador de hibridación al azar (*AP-PCR, Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction*). Es el menos laborioso de los métodos de genotipificación, aplicados en EGM y puede ejecutarse en muestras de muy pequeño volumen. La reacción en cadena de la polimerasa se realiza en condiciones especiales de temperatura y tiempo y los cebadores son oligonucleótidos de 9 a 10 bases. El resultado de la amplificación es una serie ordenada de fragmentos de ADN, de acuerdo con su peso molecular. Estos pueden ponerse de manifiesto a través de una electroforesis cuyo patrón de bandas resulta característico para cada cepa (Figuras 11, 12 y 13). Por esa razón se la conoce como *RAPD* o *RAPDNA (Random Amplified polymorphic DNA)* o también como ADN polimórfico por amplificación al azar. 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 1998⁶⁸, 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 y 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 de esta forma la validez de la técnica y de la capacidad del cebador para distinguir dos cepas muy relacionadas. Dos años antes, Saarela y cols.⁶⁹ realizaron una

67 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.

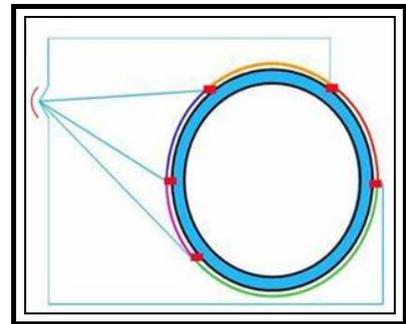
68 Li Y, Caufield P. Arbitrarily primed polymerase chain reaction fingerprinting for the genotypic identification of mutans streptococci from humans. *Oral Microbiol Immunol* 1998; 13: 17-22.

69 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.

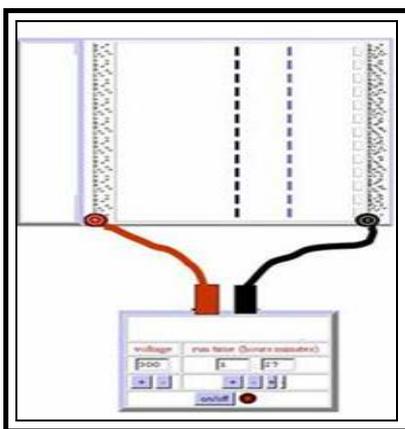
experiencia similar, para ello compararon AP-PCR con ribotipia y evaluaron 10 oligonucleóticos, como potenciales cebadores de hibridación al azar. Estudiaron OPA-01, OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-05, OPA-06, OPA-07, OPA-08, OPA-13 Y OPA-17, hallando mayor capacidad de discriminación con OPA-05 (5'-AGGGGTCTTG-3') 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 concluyeron que, a pesar de ser la ribotipia una técnica de mayor poder de discriminación, AP-PCR tiene buen poder de diferenciación entre clones lo que junto a su simplicidad la hacen aconsejable en estudios epidemiológicos y taxonómicos.



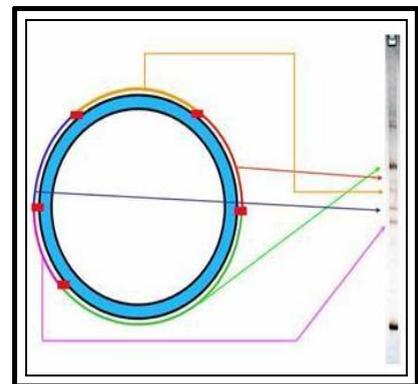
1. El primer reconoce la secuencia del ADN diana



2. Amplificación



3. Electroforesis



4. Resultado

Figura 11. Reacción en cadena de la polimerasa con cebador de hibridación al azar (AP-PCR o RAPDNA). Fundamento.

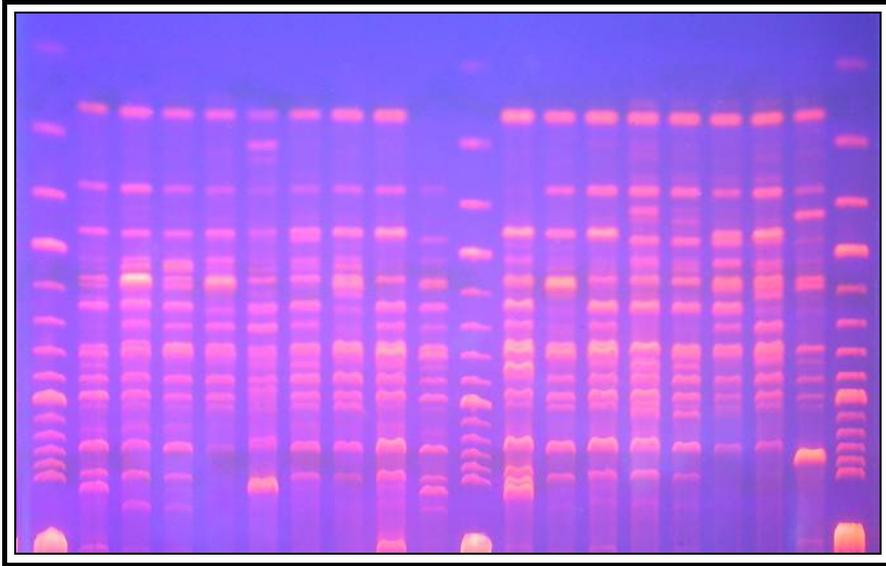


Figura 12 Reacción en cadena de la polimerasa con cebador de hibridación al azar (AP-PCR o RAPD). Revelado de amplificados. Electroforesis en gel de agarosa (transiluminador de UV).

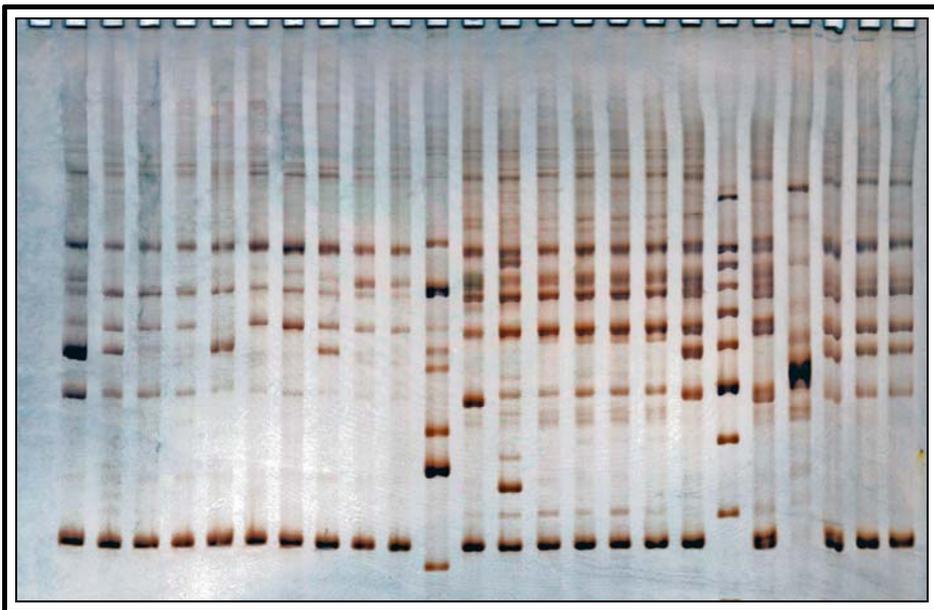


Figura 13 Reacción en cadena de la polimerasa con cebador de hibridación al azar (AP-PCR o RAPD). Revelado de amplificados. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

En la tabla 6, se resumen esquemáticamente las aportaciones más significativas de los trabajos publicados sobre la genotipificación de los EGM en relación a los objetivos propuestos y que han sido localizados a través de una búsqueda Medline (1980-2006) con las siguientes estrategias: *mutans streptococci and dental caries*, *mutans streptococci and ADN*, *mutans streptococci and genotypes*, *mutans streptococci and transmissions*, *mutans streptococci and saliva*, *mutans streptococci and dental plaque*, *mutans streptococci and colonization*, *mutans streptococci and diversity*; *mutans streptococci and virulence factors* y *mutans streptococci and stability*. Los estudios, que analizan la importancia de estos microorganismos en la génesis de la caries, se han recogido en el texto.

Tabla 6. Estudios que evalúan la genotipificación de los EGM.

Referencia Año	Población	Metodología Análisis Bandas	Resultados y conclusiones
Li Y, Caufield P. 1995 ⁷⁰	34 parejas de madres-hijos. Madres de alto riesgo de caries. Niños: de 0 a 3 años.	Muestras de saliva y placa. Tomas cada 3 meses durante 3 años. Cultivo en MSB. Utilizan REA, cortan el ADN cromosómico con la enzima Hae III Análisis visual de bandas. 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 en niñas que en varones: 88% vs 53%. La transmisión podría ser género dependiente
Alaluusua S, Mättö J, Grönroos L y cols., 1996 ⁷¹	12 parejas madres-hijos, Niños de 1.5 a 3 años. 6 de ellos con caries del biberón (grupo NCB) y 6 libres de caries (grupo NLC).	Muestras de placa de superficies sanas y cariadas. A las madres se les realizó recuentos de EGM en saliva. Cultivo en MSB. Ribotipia: el corte del ADN lo realizan con la enzima Hind III e hibridan con el plásmido pKK3535 que contiene el operon del ARNr de <i>E. coli</i> cromosómico Análisis visual de bandas.	Siete niños (58,33%) poseían 1 ribotipo, cinco más de 1 (41,67%), de estos, cuatro padecían NCB (80%) y uno pertenecía al 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 la suyas. Las parejas con NCB tenían mayores recuentos y mayor variabilidad que las NLC. Indican una relación directa entre recuentos y variabilidad genética.

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

71 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.

Referencia Año	Población	Metodología Análisis Bandas	Resultados y conclusiones
Emanuelsson I, Wang X. 1998 ⁷²	18 familias chinas que incluyen padres, madres e hijos de 3 años.	Muestras de placa. Cultivo en MSB Emplean REA cortando el ADN cromosómico con la enzima HaeIII. Análisis visual de las bandas, los aislados eran distintos con una de ellas diferente	Aislaron EGM en once familias (61,1%). En cuatro, madres e hijos compartían genotipos, en tres entre padres e hijos y en dos familias todos sus miembros tenían los mismos genotipos. En una sólo los compartían los esposos y en otra ninguno. Concluyen que hay divergencias en la transmisión intrafamiliar entre caucásicos y chinos.
Li Y, Wang W, Caufield P. 2000 ⁷³	48 madres, 42 padres y 50 niños (27 niños y 23 niñas, de ellos había 2 gemelos)	Recogen el tipo de lactancia. Toma de muestras de placa de superficies proximales en dientes superiores e inferiores. Cultivo en MSB. Utilizan REA, cortando el ADN cromosómico con la enzima Hae III, simultaneándola con AP-PCR según método de Li y Caufield de 1998 con primer OPA-O2. Las imágenes digitalizadas se analizaron con un programa computarizado. Emplean coeficiente de Pearson.	Encuentran correlación positiva entre SM y la edad de los niños, debido probablemente al incremento del número de dientes. Piensan que la transmisión madre-hijo ocurre a los dos años Demuestran que la lactancia materna influye en la transmisión de SM de la madre a los niños y que la colonización temprana aumenta el riesgo de caries.
Emanuelsson I, Thornqvist E. 2000 ⁷⁴	Participaron 11 familias, madres, padres (salvo uno) y niños. La media de edad de estos últimos, en el curso del estudio, fue de 7.2 años	Tomas de muestras de saliva y de placas de superficies bucales y oclusales. Cultivo en MSB Examen inicial y a los 2 y 5 años. Emplean REA, usando la enzima Hae III para cortar el ADN cromosómico. Análisis visual de bandas.	Encuentran de 1 a 4 genotipos de SM por individuo. 21 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 otras fuentes de transmisión.
Grönroos L, Alaluusua S. 2000 ⁷⁵	7 niños de 3 a 7 años, con caries activas.	Muestras de siete niños en 50 sitios de placas en dientes cariados y sanos. En cinco de los sujetos también se tomaron muestras salivares. Cultivo en MSA + 20% de sacarosa. Utilizaron AP-PCR con el primer OPA-O5. Análisis visual de bandas.	Total de aislamientos: 598 correspondientes a SS y SM. En 6 muestras de dos niños diferentes (42%) aislaron tanto SS como SM. En otras 6 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 2 de las muestras de saliva no se detectaron los genotipos hallados en las placas. El 80% si estaban en saliva. Sugieren que determinados clones de SM tienen preferencia para colonizar tejidos específicos.

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

73 Li Y, 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.

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

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

Referencia Año	Población	Metodología Análisis Bandas	Resultados y conclusiones
Truong TL, Ménard C y cols., 2000 ⁷⁶	Analizan 45 cepas de referencia: 25 de SM, 15 de otros EGM y 5 de otras especies. También estudian 81 cepas de EGM de 41 pacientes adultos.	En los pacientes toman las muestras de placas. Usan AP-PCR con tres primers: 970-11, OPA-03 y OPA-18. Emplean para el aislamiento MSA y TYE+ glucosa 0.5%. Realizan análisis visuales de los genotipos aislados en los pacientes tomando como base los de las cepas conocidas.	Concluyen que la AP-PCR es una técnica muy útil para identificar y subclasificar estreptococos orales.
Mattos-Graner R, Li Y, Caufield P y cols., 2001 ⁷⁷	35 niños de entre 12 y 30 meses que convivían en una guardería (Piracicaba, Brasil)	Tratan de detectar en niños genotipos que no provienen de sus madres. Toman muestras de saliva con depresor lingual. Cultivo en 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 utilizando el coeficiente de Dice. Consideran el punto de corte para la identidad genética superior al 95%. Los perfiles similares son también analizados por RFLP con la enzima Hae III	Encuentran que el 70.8% de los niños poseían un genotipo de SM, el 25% dos y el 4.2% tres. Detectan genotipos idénticos en el 87% de los casos. Los resultados les sugieren que puede existir una transmisión horizontal en estos grupos de población sobre todo cuando están altamente colonizados, ya que la identidad genotípica es mayor en los niños con altos recuentos de EGM
Emanuelsson I, Thornqvist E. 2001 ⁷⁸	6 niñas y 7 varones de 3 años	Toma de muestras de saliva y placa. Analizan niveles de EGM en saliva (Dentocult SM strip®) y posterior cultivo en MSB. Las evaluaciones las hicieron a tiempo 0, a los 2 y 5 años. Utilizan RAE con la enzima Hae III. Realizan análisis visual para establecer la identidad genotípica.	Durante el estudio, el 1 ^{er} molar había hecho erupción en nueve niños pero solo tres 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.

76 Truong 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.

77 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.

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

Referencia Año	Población	Metodología Análisis Bandas	Resultados y conclusiones
Jordan C, LeBlanc D. 2002 ⁷⁹	27 niños de 13 años de edad media portadores de bandas de ortodoncia	Estudian placas y saliva. Los recuentos de saliva mediante 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. Se efectúan evaluaciones al inicio y mensualmente durante 4 meses. Realizan REA con digestión del ADN con la enzima Sma I. Digitalizan mediante fotografía las bandas, pero no informan de cómo realizan la lectura de las mismas.	Los resultados en cuanto a la evolución de la cuantificación de los EGM no son concluyentes. Solo en diecinueve pacientes se pudo confirmar que SM estaba presente en todos los aislamientos obtenidos de una misma persona. La identificación de SM en base a la morfología de las colonias y a partir de MSB no la consideran fiable. De los diecinueve pacientes, doce tenían 1 solo clon, en seis se detectaron 2 clones y en un paciente 3.
Emanuelsson I, Carlsson P, Hamberg K y cols., 2003 ⁸⁰	13 sujetos de 20-40 años.	Analizan niveles de EGM en saliva (Dentocult SM strip®) y nivel de higiene. Posterior cultivo en MSB. Estudian la distribución de los genotipos en distintos sitios de las superficies dentales (1 ^{er} y 2 ^o premolar) y la persistencia de los mismos. Tomas de muestras al inicio y a los 4 y 7 meses. Utilizan PCR para identificar SM y AP-PCR (primer 4) y REA para genotipificar. Escanearon las fotografías de los geles y realizan análisis visual. Similitud cuando las bandas entre 300 y 1500pb fueron idénticas	Obtienen una elevada correlación entre AP-PCR y RAE en 148 cepas estudiadas. Detectan hasta 7 genotipos distintos en algunos individuos. En una misma superficie señalan que puede haber hasta 4 genotipos diferentes y un mismo genotipo puede estar en otros sitios. Encuentran los mismos genotipos en 25 sitios en doce sujetos al finalizar el estudio. Señalan el comportamiento inherente de los genotipos a la hora de colonizar las superficies dentales.
Kohler B, Lundberg A, Birkhed D y cols., 2003 ⁸¹	16 familias (madres hijos 7 padres y 4 hermanos)	Estudian un total de 192 SM y 62 SS. Realizan recuentos de saliva en MSB. Estudian cepas al inicio y a los 16 años. Emplean ribotipificación. Evalúan patrones de ribotipos visualmente.	Se aislaron 1-5 ribotipos por persona. 2-9 por cada familia. De 16 parejas madre-hijo, 14 mostraron homología entre ellos en al menos 1 cepa. Otro tanto en 6 parejas de los 7 padres-hijo. En diez de los trece niños que se examinaron longitudinalmente, al menos persistía 1 ribotipo en el periodo de 16 años

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

80 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.

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

Referencia Año	Población	Metodología Análisis Bandas	Resultados y conclusiones
Lindquist B, Emilson C. 2004 ⁸²	El estudio longitudinal completo se realizó a doce madres de 30 años, colonizadas por SM y SS, y 15 hijos.	Muestras de las madres: solo saliva, de los niños: saliva, placas y lengua. Realizaron seguimiento desde el nacimiento hasta 7 años. Recuentos por el método tradicional. Utilizan MSB. Realizan digestión del ADN cromosómico con la enzima Hind III y, para reducir el número de bandas detectadas, efectuaron hibridación usando una sonda comercial. Los geles se fotografiaron en un transiluminador UV. No indican como realizan el análisis de bandas	Durante el estudio diez de quince niños adquirieron SM y solo cuatro tenían simultáneamente SM y SS. Se les aislaron 26 genotipos de los que 9 eran idénticos a los de sus madres. Nueve de estas últimas poseían 24 genotipos al principio (14 de SM y 10 de SS) y a los siete años 20 (12 de SM y 8 de SS), a lo largo del estudio 15 genotipos persistieron. Los niños tenían 15 genotipos en la primera toma, a los seis meses perdieron 9 y adquieren 11 (3 de sus madres) En los 7 años, tanto madres como niños presentaron algunos genotipos diferentes a los iniciales, lo que indica que los adquirieron de otras fuentes.
Ersin N, Kocabas E, Alpoz A, Uzel A. 2004 ⁸³	8 parejas madre-hijo de 2-3 años y 3 padres.	Toman muestras de placa. Estudian cepas de SM aisladas en el medio TYCSB. Usan AP-PCR con el primer OPA-05 y evalúan similitud de genotipos. Realizan análisis visual considerando 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.	En las 8 parejas madre-hijos hubo transmisión. Los tres matrimonios tenían las mismas cepas, lo que sugiere una transmisión horizontal.
Nascimento M, Hoffing F, Goncalves B. 2004 ⁸⁴	9 adultos de 50-75 años con caries de corona y/o raíz.	Evalúan aislamientos de SM y SS desde saliva, placas dentales, caries de corona y raíz con dos objetivos distintos: el perfil de colonización de las lesiones de caries coronales y de raíz y la correlación entre la distribución de los clones de SM y el tipo de caries. Cultivo en MSB. Genotipan con AP-PCR y primers OPA-02 y OPA-13. Las imágenes de los geles las fotografiaron y escanearon. Las bandas fueron individualmente analizadas por un programa computarizado, usando el coeficiente de Dice.	Aislaron 691 colonias, de ellas 438 de SM Seis sujetos presentaban de 2 a 4 genotipos de SM 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.

82 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.

83 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.

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

Referencia Año	Población	Metodología Análisis Bandas	Resultados y conclusiones
Liu J, Bian Z, Fan M, y cols., 2004 ⁸⁵	17 niños de 9 a 14 años	Muestras de placa y recuentos de SM en MSB. Estudio al inicio, al mes, 3 y 6 meses de comenzar tratamiento de ortodoncia. Utilizaron AP-PCR con el primer OPA-02. Análisis visual de las bandas con cinco observadores.	Se obtienen 713 colonias con 25 genotipos diferentes. Un niño tuvo 3 genotipos distintos, seis niños presentaron 2 y el resto uno solo. Hay estabilidad desde el principio del tratamiento y en los sucesivos muestreos.
Klein M, Florio F, Pereira A, Hofling J, Gonçalves R. 2004 ⁸⁶	16 madres de 28 años. 16 hijos de 6 meses	En las madres: muestras de saliva. En los niños: saliva, dorso de lengua, cresta alveolar y placa si había dientes. Cultivo en MSB. Estudian la estabilidad de genotipos de SM y SS que presentan las madres y su transmisión a los hijos en un periodo de 20 meses. Utilizaron AP-PCR con los primers OPA-02 y OPA-13. Las imágenes fueron digitalizadas. Evaluaron tamaños moleculares para cada banda y emplearon un programa computarizado para establecer homología (punto de corte > 95%. Usaron el coeficiente de Dice.	En el 81.25% de los casos se confirma la transmisión vertical. Compararon los genotipos con los de los niños que eran entre si compañeros de guardería pero no se observó transmisión horizontal.
Kamiya R, Napimoga M y cols., 2005 ⁸⁷	16 individuos de 18-29 años, 8 con dientes cariados	Muestras de saliva y placa Realizan estudios de bacteriocinogenia de SM. Cultivo en MSA y MSB. Genotipan usando AP-PCR con dos primers: OPA-02 y OPA-13. Análisis de patrones de bandas por programa computarizado. Utilizan coeficiente de Dice. Los genotipos fueron considerados idénticos con el 100% de similitud.	Aislaron un total un total de 319 cepas de SM. Obtienen 48 fenotipos por actividad mutacinogena y 101 genotipos. Encuentran hasta 13 genotipos en un sólo paciente. Demuestran fuerte asociación entre CAOD y diversidad de genotipos. Señalan que la AP-PCR con dos primers OPA-02 y OPA-13 posee alto poder discriminatorio. Individuos no relacionados presentaron genotipos distintos.
Li S, Liu T, Xiao X, Yang J, Yang D, Zhuang H, Liu Z. 2005 ⁸⁸	20 madres de 26-30 años, con sus hijos de 3-4 años.	Toman muestras de placa y recogen los índices de caries CAOD y cos. Cultivo en MSB Realizan PCR para detectar el gen MutA. Para genotipar usan AP-PCR con OPA-02. Estudio visual de bandas.	Aíslan un total de 200 cepas de SM y encuentran 45 diferentes amplitipos. Un total de 25 genotipos se detectaron en los niños y 36 en las madres. 16 de estos fueron transmitidos a los niños. Las cepas portadoras del gen MutA tienen reducida su transmisión.

85Liu 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.

86 Klein M, Florio F, Pereira A, Hofling J, Gonçalves R. Longitudinal study of transmission, diversity, and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes in Brazilian nursery children. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4620-6.

87 Kamiya R, Napimoga M, Rosa R, Hofling J, Gonçalves R. Mutacin production in *Streptococcus mutans* genotypes isolated from caries-affected and caries-free individuals. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20: 20-4.

88 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: 417-21.

Referencia Año	Población	Metodología Análisis Bandas	Resultados y conclusiones
Li Y, Caufield P, Dasanayake A y cols., 2005 ⁸⁹	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	Muestras de saliva y placa. Realizan recuentos de SM en MSB. Usan AP-PCR con primer OPA- 02 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. Análisis visual de bandas.	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 presentaron 1-3 genotipos con un 83.3% de homología con respecto a los de sus madres.
Cogulu D, Sabah E, Uzel A, Ozkinay F. 2006 ⁹⁰	60 niños con síndrome de Down (SD) y 64 niños control (NSD) entre 7-12 años.	Toma de muestras de saliva. Evalúan niveles de caries. Estudian SM a partir de TYCSB. Usan AP-PCR con OPA-05. Análisis de bandas por programa computarizado.	No detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de ambos grupos. Los niños con síndrome de Down presentan menores índices de caries. Obtienen 3 perfiles de homología en SD y 8 en NSD que no guardan relación entre los dos grupos. Encuentran diferencias estadísticamente significativas entre perfiles y los índices de caries.

SM: *Streptococcus mutans*; SS: *Streptococcus sobrinus*; EGM: estreptococos del grupo mutans; MSA: Agar Mitis Salivarius; MSB: Agar Mitis Salivarius Bacitracina; TYE: *Trypticase Yeast Extract*; TYCSB: *Trypticase Yeast Cysteine Sucrose Bacitracin Extract*; AP-PCR: *Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction*; RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*; REA: *Restriction Endonucleases Analisis*; CAOD: índice de caries, como la suma de dientes permanentes cariados, ausentes por caries y obturados, cos: índice de caries, como la suma de la superficie cariada y obturada de dientes primarios.

89 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.

90 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.

3. Material y método

3.1. Población de referencia y selección de la muestra

El presente estudio se realizó en escolares de primer ciclo de Educación Primaria (primer curso) del Distrito Norte de Granada Capital. Se seleccionaron aleatoriamente dos colegios: Juan XXIII y Padre Manjón. La recogida de las muestras se efectuó durante los meses de octubre y noviembre del año 2002. El número total de niños matriculados con edad de 6-7 años en primero de Primaria en los dos colegios seleccionados y en el curso académico 2002-2003 era de 97. De todos los escolares, 85 cumplían los criterios de inclusión, aunque al final solo 75 participaron (tabla 7).

Tabla 7. Población estudiada.

Colegio	Nº de escolares al inicio	Carácter
Juan XXIII	42	Público
Padre Manjón	33	Concertado
Total	75	

Los criterios de inclusión fueron:

- No recibir tratamiento antibiótico en las cuatro semanas previas a la toma de muestra.
- No estar utilizando colutorios o cualquier otra medida preventiva que implique el uso de antimicrobianos
- Consentimiento informado por escrito de los padres y tutores de los escolares (Figura 14). Además se obtuvo permiso de la Dirección del colegio y del Consejo escolar.

**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 con 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 muestras de saliva y placas

Dicha exploración se realizará en el propio colegio por un odontólogo y se repetirá a los 18 meses. De ésta información se os enviará un informe del estado de los dientes de su hijo, junto con unas recomendaciones oportunas para que 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 _____

Profesión de la madre _____

Profesión del tutor _____

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

Fecha de nacimiento del niño/a _____

¿Está su hijo tomando antibióticos en la actualidad o en las últimas 4 semanas? _____

Granada, ___ de _____ del _____

Firma del padre o tutor

Rogamos devuelva la autorización una vez firmada al colegio

Figura 14. Autorización para las exploraciones y recogida de saliva y placa.

3.2. Diseño del estudio

A todos los escolares se les realizó una exploración bucodental y se procedió a tomar una muestra de saliva. Además se les recogieron muestras de placa de superficies lisas y oclusales a un total de veinte niños. (Figura 15).



Figura15. Exploración bucodental.

3.3 Exploración bucodental

La exploración de los escolares se realizó al mismo tiempo que se hacían las tomas de muestras. Fueron efectuadas en el colegio en las propias aulas en zonas que tuvieran buenas condiciones de luz, bien natural, artificial o ambas. El material necesario para realizar la exploración incluyó guantes y mascarillas desechables, servilletas de papel, sondas de exploración del número 23-17, espejos planos del número 5, glutaraldehído y un recipiente para desinfección. La sistemática seguida para la exploración fue la siguiente: el escolar se colocaba junto a la luz y delante se situaba el explorador con todo el material requerido en una mesa a su derecha. La ficha de recogida de datos se observa en la figura 16.

Todas las exploraciones fueron llevadas a cabo por un explorador principal o A (dentista), aunque para establecer la concordancia diagnóstica se contó con un segundo explorador B también dentista. La concordancia diagnóstica intra e interobservador se realizó en las exploraciones orales, y se hicieron como máximo a la semana del estudio inicial, representando al menos un 15% del total de la muestra. Para aclarar cualquier duda sobre el diagnóstico de caries los exploradores tuvieron varias reuniones de calibración previas a la recogida de datos utilizando para el diagnóstico de caries los criterios de la OMS⁹¹. El análisis se llevó a cabo mediante el coeficiente de correlación intraclase (CCI), utilizado en variables cualitativas y obteniendo unos valores superiores a 0.80 lo que indica una concordancia adecuada.

91 Organización Mundial de la Salud. Encuestas de salud bucodental. Métodos básicos. Ginebra: Organización Mundial de la Salud 1997, p. 41.

- **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

• **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 es-

tán restauradas. Puede aplicarse tanto para dentición temporal (ir) como permanente (IR). Se obtiene del cociente entre el número de dientes cariados divididos por la suma total de dientes con historia de caries; cariados, ausentes por caries y restaurados.

- **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.

- **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.

3.4. Toma de las muestras

- **Recogida de la saliva**

Se tomaba en las clases y de forma simultánea en los escolares de cada aula. Antes del recreo, a cada uno se le daba una pastilla de parafina y un bote estéril de boca ancha para la recogida de saliva estimulada. Los escolares tragaban la saliva durante los dos primeros minutos y posteriormente escupían en el frasco durante cinco minutos.

- **Recogida de placa bacteriana**

Igualmente se efectuaba en las aulas. Tras secar las zonas en las que se iba a efectuar la toma de muestra con torundas de algodón, mediante cuñas de madera estériles, se recogió la placa bacteriana de superficies lisas de molares e incisivos permanentes y de superficies oclusales de los primeros. Éstas se introducían en eppendorf con 1ml de tampón fosfato pH 7.3, 0.05M.

<u>Composición del tampón fosfato</u>	
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	

Obtenidas las muestras de la forma descrita se trasladaban rápidamente, en recipiente con hielo, al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología.

3.5. Procesamiento de las muestras

En cuanto estas llegaban al laboratorio se procesaban siguiendo la sistemática que se describe a continuación

- Saliva

- ❖ Inoculación en CRT[®] Bacteria para recuento de EGM y LB.

Tras la apertura del vial e introducción de una pastilla para crear una atmósfera de CO₂, se retiraba la cubierta de plástico que recubre los medios de ambos lados, cada uno de ellos selectivo para el recuento de los microorganismos indicados. Posteriormente, ambas superficies de saliva fueron impregnadas de saliva con pipeta estéril. Una vez cerrado el vial, se procedía a la incubación durante 48 h a 36 ± 1^o C. Los resultados se leyeron y compararon con la escala facilitada por la casa comercial (Ivoclar Vivadent Clinical, Schaan, Liechtenstein) (Figuras 17, 18,19 y 20). Sin embargo, por considerarlo más satisfactorio para nuestro propósito, a la hora de informatizar los datos, hemos tenido en cuenta cinco valores: 0 (ausencia de crecimiento), 1 ($\leq 10^3$), 2 ($>10^3$ - $<10^5$), 3 ($\geq 10^5$ - $<10^6$) y 4 ($\geq 10^6$).

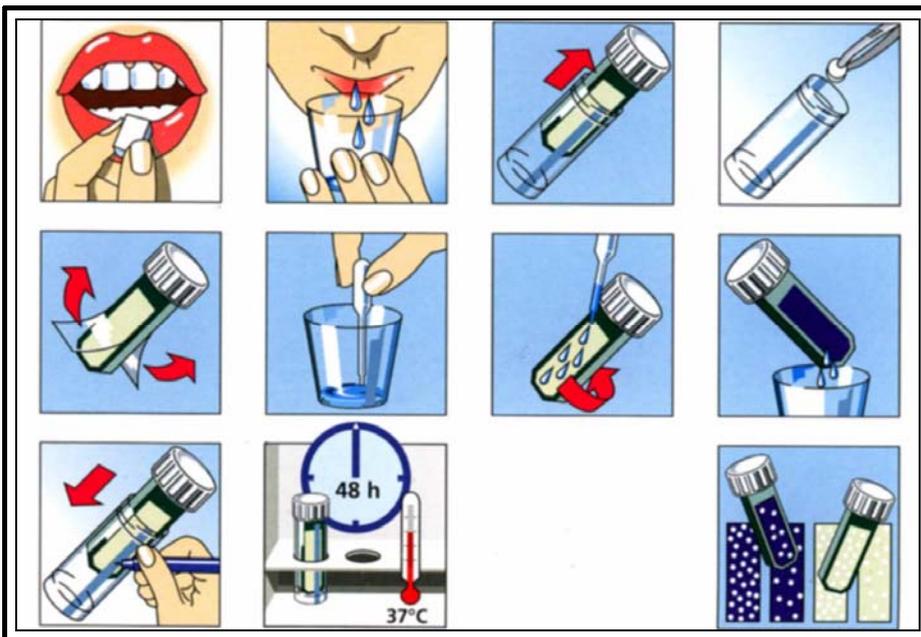


Figura 17. Procesamiento de la saliva en CRT[®] Bacteria.

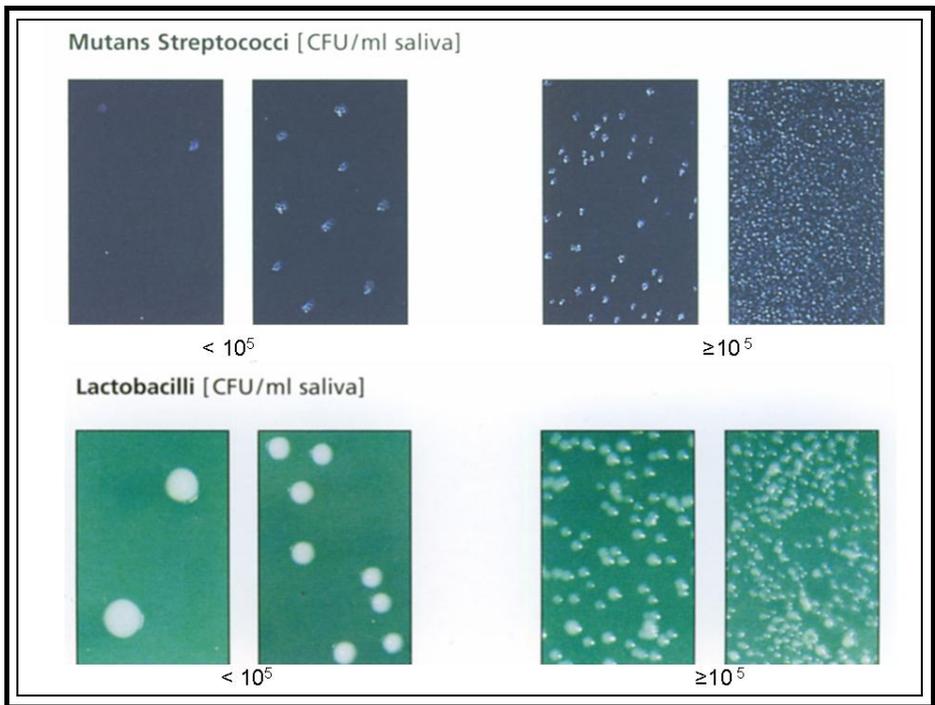


Figura 18. Valoración de los resultados en CRT® Bacteria según instrucciones de la casa comercial.

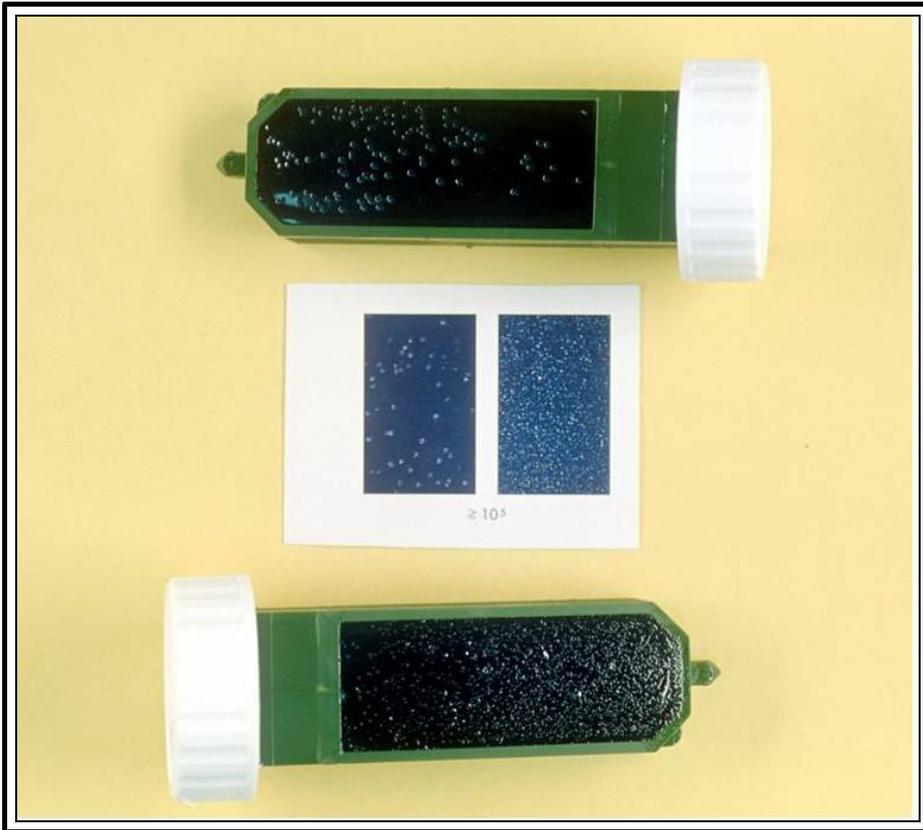


Figura 19. Recuentos en CRT[®] Bacteria para EGM indicando alto riesgo y su comparación con la escala proporcionada por la casa comercial.

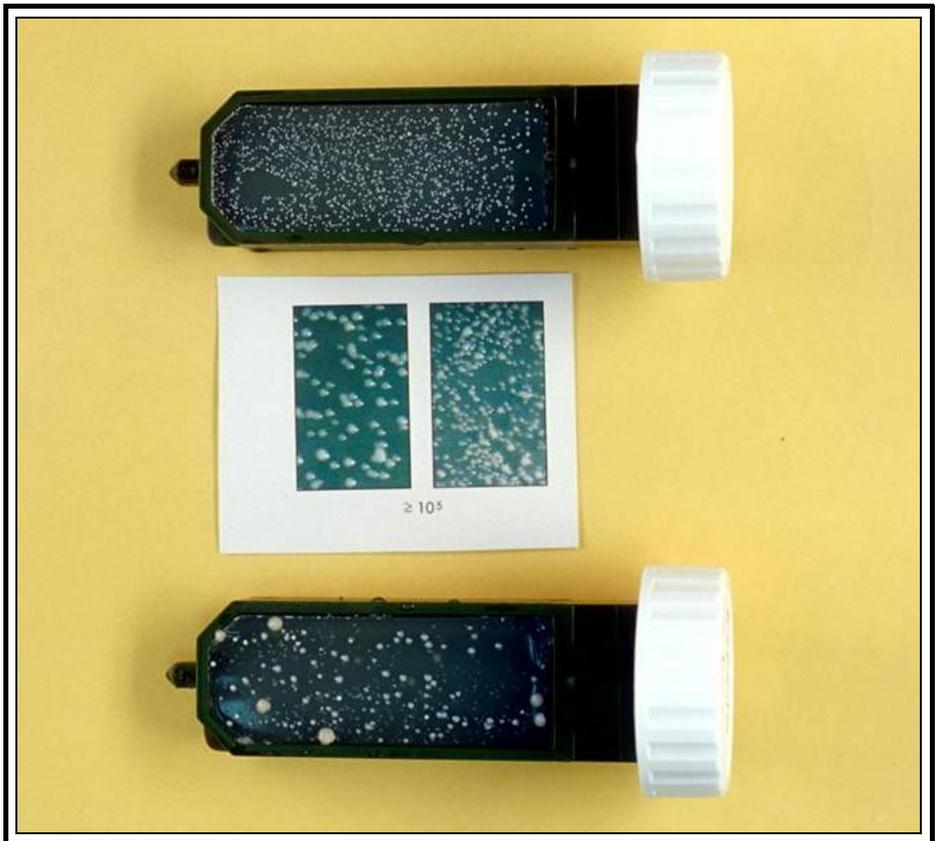


Figura 20. Recuentos en CRT[®] Bacteria para LB indicando alto riesgo y su comparación con la escala proporcionada por la casa comercial.

❖ Agitación

En los frascos se introducía un imán estéril y se colocaban sobre un agitador (Selecta, agimatic- n). Su finalidad era romper el moco para fluidificar la saliva.

❖ Aislamiento e identificación de EGM.

Se realizaron diluciones seriadas en tampón fosfato en base 10 desde 10^{-1} a 10^{-7} . De cada tubo se tomaron 100 μ l que se distribuían uniformemente sobre la superficie de placas de Petri que contenían MSB (Agar Mitis Salivarius Bacitracina) (Figura 21). Este medio⁹² se obtiene a partir del MSA (Agar Mitis Salivarius) (MSA, Difco Becton

⁹² Gold O, Jordan H, Van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol 1973; 18: 1357-1364.

Dickinson, Francia) suplementado con 0.2U/ml de bacitracina (Sigma) y 15% de sacarosa (Difco, USA). Todas las placas se incubaron 48 horas a 36 ± 1 °C en atmósfera anaerobia (GENbox anaer, bioMerieux SA. Marcy l'Etoile. Francia).

<u>Composición del MSA:</u>	
Triptona	10 g
Proteasa-peptona nº3	5 g
Glucosa	1 g
Sacarosa	50 g
Fosfato dipotasico	4 g
Azul tripán	00.75 g
Cristal violeta	0.0008 g
Agar	15 g

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.

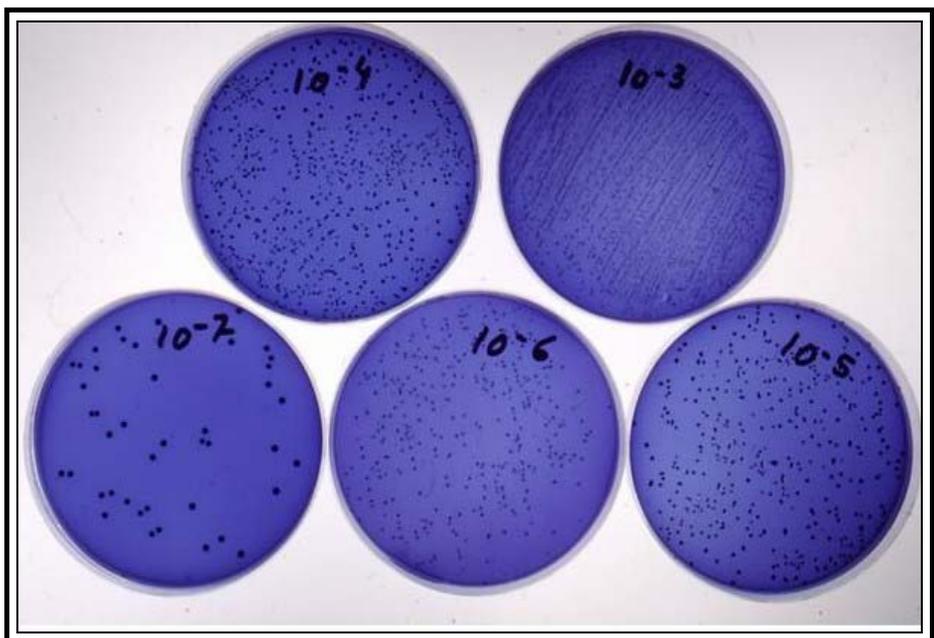


Figura 21. Diluciones seriadas de saliva en Agar MSB para la identificación de colonias de los EGM.

- Placas dentales

Los eppendorf se sometieron a agitación vibratoria (Labolan modelo 51076, Navarra. España) para que las bacterias se desprendieran bien de las cuñas. Tras ello se siguió el mismo procedimiento utilizado para la saliva en cuanto al proceso de dilución pero sólo hasta 10^{-3} .

3.6. Cepas bacterianas estudiadas

A partir de la dilución óptima se seleccionó una media de 11.89 ± 8.78 colonias. Se utilizó como criterio diferencial el aspecto morfológico cuando fuera compatible con EGM, es decir, de mediano tamaño, azul oscuro casi negro, 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. Se trató de seleccionar las colonias de entre todos los morfotipos diferentes que aparecían en el medio siempre que fueran compatibles con la descripción anterior. (Figuras 22, 23 y 24).



Figura 22. Colonias prominentes y rugosas compatibles con EGM.

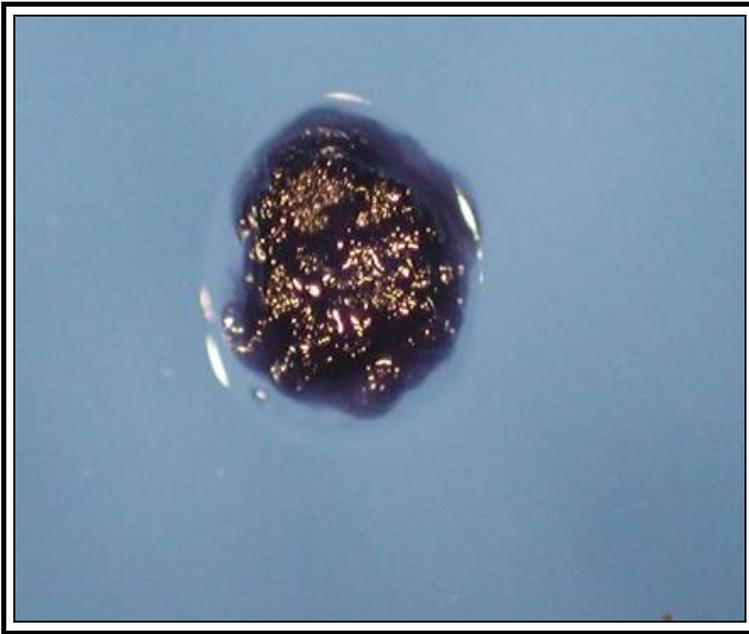


Figura 23. Colonia rodeada de capa mucosa compatible con EGM.

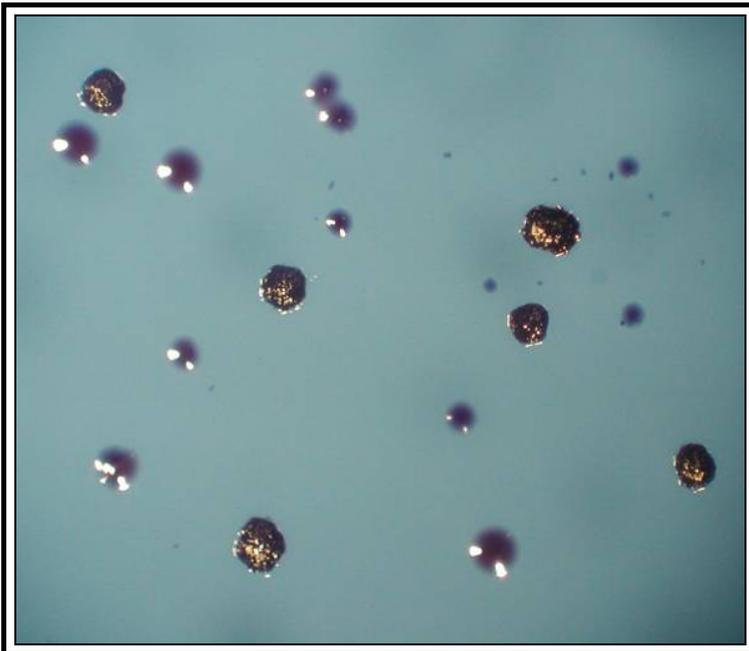


Figura 24. Colonias típicas de EGM y de otros grupos.

Las seleccionadas se inocularon en caldo manitol, único polialcohol que es metabolizado por estos estreptococos y no por los de otros grupos. Se ensayaron varias formulaciones, obteniéndose los mejores resultados con el medio original que proponemos.

Composición del caldo manitol	
TSB	10 g/l
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



Figura 25. Caldo manitol negativo y positivo.

Tras la incubación de 48 h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, los resultados que se obtenían podían ser de tres tipos: manitol - (caso que los microorganismos no metabolizasen el polialcohol), manitol + (caso que sí lo hiciesen) (Figura 25). Igualmente era posible que no se detectase crecimiento (NC), debido probablemente a no cubrir el medio las necesidades nutricionales de algunas cepas de estreptococos o a no haberse inoculado correctamente las colonias.

Las colonias manitol +, desde el mismo medio, se sembraron en tres placas con TSA (Tryptic Soy Agar Difco. Becton Dickinson, Francia).

Formulación del TSA:	
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

Se procedió a la incubación 48 horas a $36\pm 1^\circ\text{C}$ en atmósfera anaerobia. De una de las placas se arrastraban las colonias para su liofilización en leche desnatada (Skim milk Difco. Becton Dickinson, Francia) e incorporar los liofilizados a nuestra colección de EGM. De la segunda se inocularon caldos con TSB (Bacto Tryptic Soy Broth Difco. Becton Dickinson, Francia), que tiene la misma formulación que el TSA pero sin agar. Tras 24 horas a $36\pm 1^\circ\text{C}$ en anaerobiosis, se les añadía glicerol al 50% y se congelaban a -20°C . Estos últimos servían para realizar los estudios de biología molecular caso de que en la identificación final se llegase a SM.

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.

En el caso de la prueba del agua oxigenada, tras inocular e incubar 48h a $36\pm 1^\circ\text{C}$ se procedió a la lectura. La prueba era positiva cuando la masa microbiana aparecía de color marrón y negativa si era incolora (Figura 26).

Medio para detectar la producción de agua oxigenada:	
Peptona trípsica	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

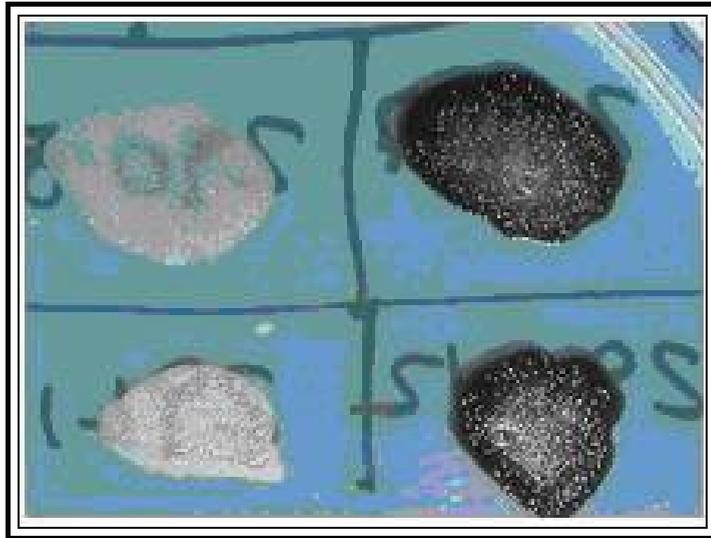


Figura 26. Producción del agua oxigenada negativa y positiva.

Para comprobar la sensibilidad o resistencia a 2U/ml de bacitracina (Sigma) se adicionó 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.

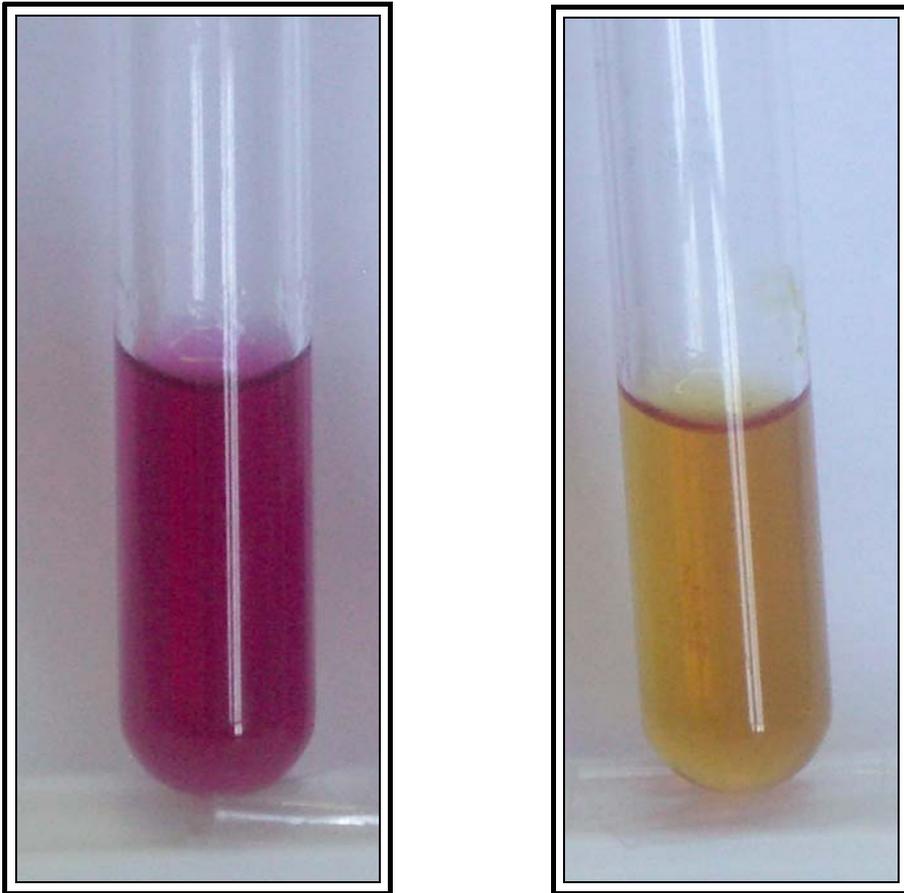


Figura 27. Prueba de la sensibilidad y resistencia a 2U/ml bacitracina.

<u>Prueba ADH por la técnica de Möller (bio-Mérieux, Francia):</u>	
Biothione	5g
Extracto de carne de buey	5g
Purpura de bromocresol	0.01g
Rojo cresol	0.005g
Glucosa	0.5g
Piridoxal	0.005g
Disolver 10.5 g en 1000ml de agua destilada.	
Ajustar el pH a 6	
Adicionar L-arginina al 1%	
Dejar un testigo sin aminoácidos	
Autoclavar	

Para la 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 vendrá 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 deberá observarse igual que en el caso de una prueba negativa (Figura 28).

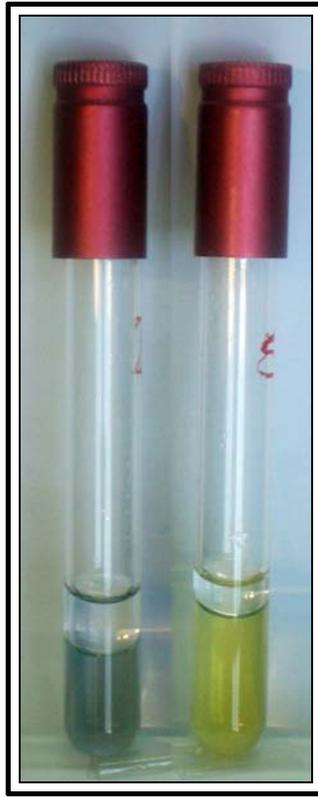


Figura 28. Prueba de la ADH.
A la derecha positiva, a la izquierda negativa.

La interpretación de los resultados se realizó siguiendo el diagrama mostrado en la figura 29.

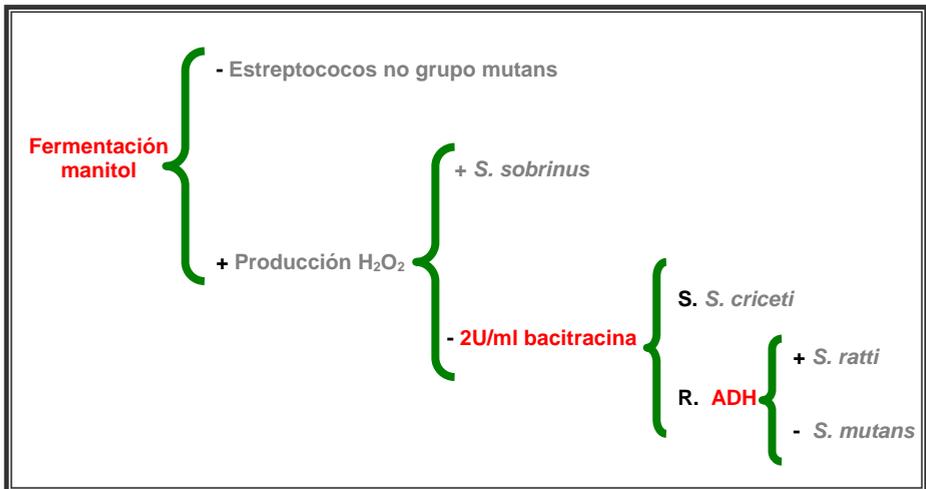


Figura 29. Diagrama para identificar las colonias aisladas en agar MSB.

En las muestras en las que no fue posible identificar ninguna ufc morfológicamente compatible con EGM, se realizaron nuevas tomas de saliva y placa hasta un total de 3 a 5. Sólo la ausencia en ellas de colonias con morfología de EGM, hizo que el resultado final se incluyese entre los no portadores de estos microorganismos. Si en alguna de las tomas aparecían morfotipos compatibles, se incluían como positivos y se continuaba su estudio igual que se hacía con las muestras en las que se detectaban EGM desde el principio.

3.7. Extracción de ADN

La extracción se realizó siguiendo las pautas establecidas por Promega (Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Promega Corporation, Madison, USA), que se describen 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 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 μ l de EDTA 50mM y 60 μ l de lisozima (10mg/ml) (Roche 837 059, Biomol, Sevilla, España), dejándose incubar 30 minutos a 37° C y posterior centrifugación 2 minutos a 14.000 rpm. Al sedimento se le incorporaron 600 μ l de Nuclei Lysis Solution, incubándose 5 minutos a 80°C. Pasado ese tiempo se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se les añadieron 3 μ l de RNAsa Solution. Tras mezclar suavemente se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Seguidamente se adicionaron 200 μ l 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 μ l de isopropanol (Panreac Quimica SA. Barcelona, España) a temperatura ambiente, mezclando 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 μ l de DNA Rehydration Solution, dejando incubar a 65°C una hora o bien toda la noche a 4°C. Los extraídos así preparados se conservaron a -20 °C hasta su uso para posterior amplificación (Figura 30).

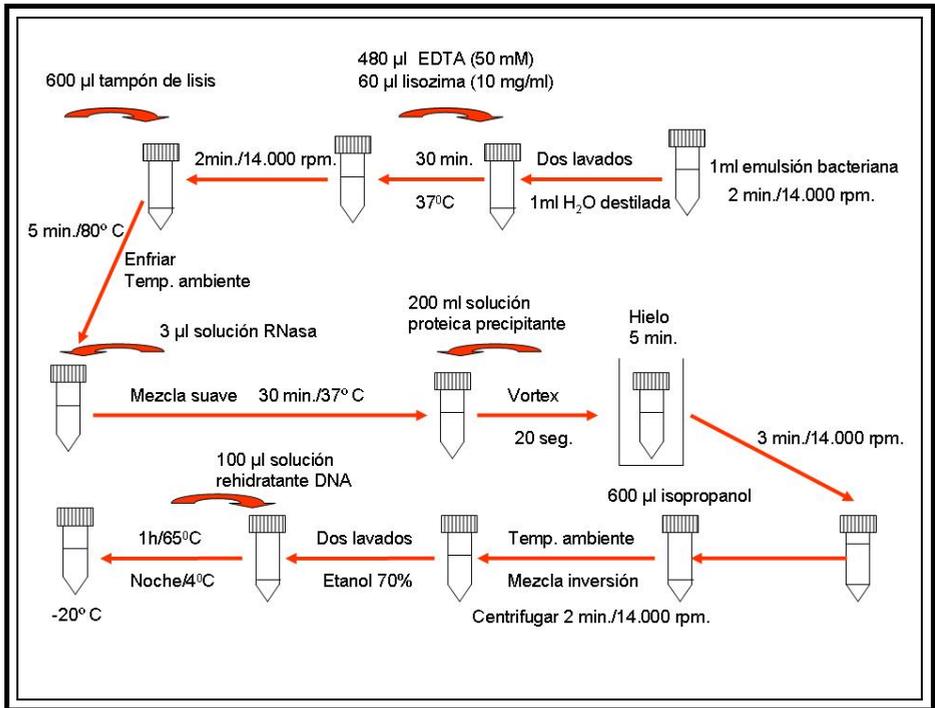


Figura 30. Extracción de ADN.

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

La amplificación de ADN se desarrolló siguiendo los criterios establecidos por Li Y y cols., 2001⁹³(tabla 8).

Tabla 8. Fórmula de la AP-PCR con el cebador OPA-02.

	Concentraciones
Tampón 10X	5 µl
Cloruro de magnesio	3.5 mM
Primer	50 pmol
Dexosinucleótidos	200 µM
Taq-polimerasa	1.25 U
Extraído	20 ng
Volumen final (H ₂ O destilada csp.)	50 µl

Para un volumen total de 50 µl, la mezcla contenía para cada reacción, los siguientes componentes: 200 µM de cada uno de los dexosinucleotidos dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Promega C1141; Promega Corporation, Madison, USA); 3.5 mM de Cl₂Mg; 1.25 unidades de Taq-polimerasa (Promega M1661; Corporation, Madison, USA); 5µl 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 20 ng de extraído de ADN (espectrofotómetro de barrido UV-VIS4418 Zuzi series 4200. Beijing China).

La reacción se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler® personal Eppendorf AG (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) (Figura 31), 94°C, durante 2 minutos, seguidos de 45 ciclos con las siguientes temperaturas: 94°C durante 30 segundos, 36°C 30 segundos y 72°C 1 minuto, seguidos de una extensión para completar la amplificación de 7 minutos a 72°C .

93 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.



Figura 31. Termociclador Mastercycler® personal Eppendorf AG.

3.9. Detección de amplificados

El producto de la PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, preparado con TBE 1x y adición de bromuro de etidio (0.5µg/ml).

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 32 a 38):



Figura 32. Gel con peine.

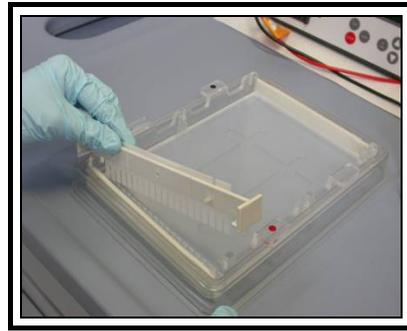


Figura 33. Fraguado el gel, se retira el peine.

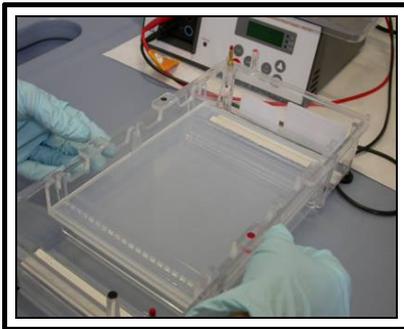


Figura 34. Introducción de gel en la cubeta de electroforesis.

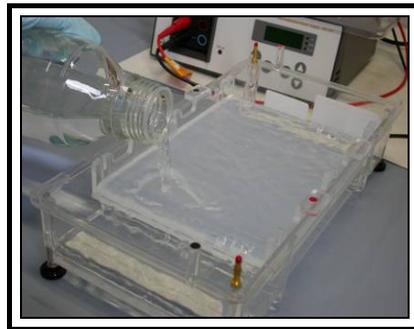


Figura 35. Se añade tampón TBE.

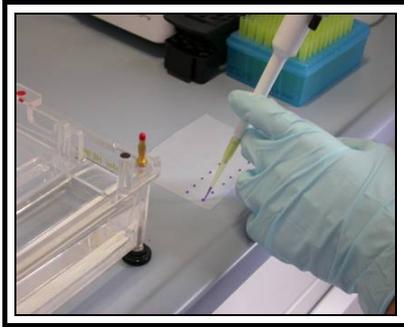


Figura 36. Mezcla de la muestra con el buffer de carga.

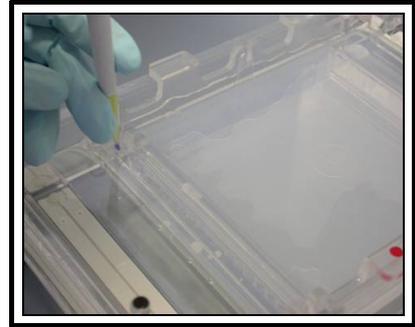


Figura 37. Carga de la muestra en el gel.



Figura 38. Cubeta preparada y conectada.

3.10. Lectura e interpretación de las bandas de electroforesis

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

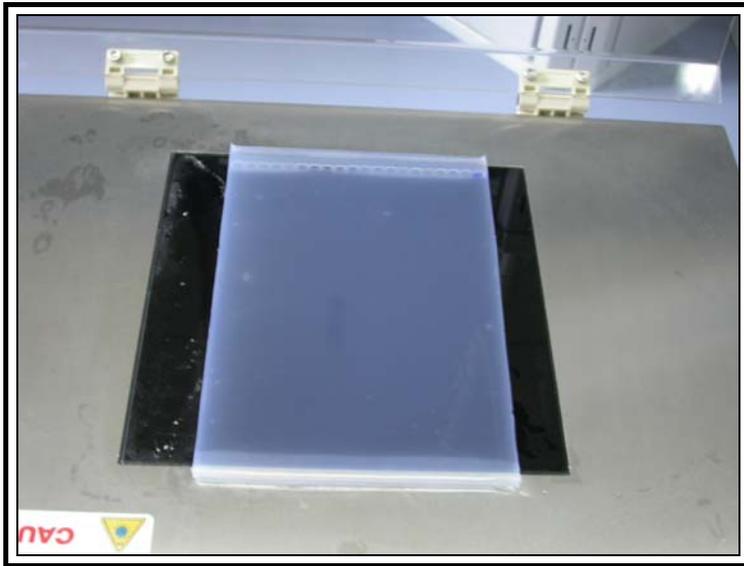


Figura 39. Transiluminador ultravioleta.

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.

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 permite 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 Caufield⁹⁴ 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; c) los resultados proporcionados, una vez analizarlos 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 cada uno de los escolares se comenzaba siempre 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, I - VII para la colegio 1 y I - V para el 2) a fin de 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. Igualmente se determinó el porcentaje de colonias que pertenecían a cada genotipo.

En las figuras 40, 41 y 42 se observan algunos geles, señalándose los marcadores de peso molecular, 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.

94 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.

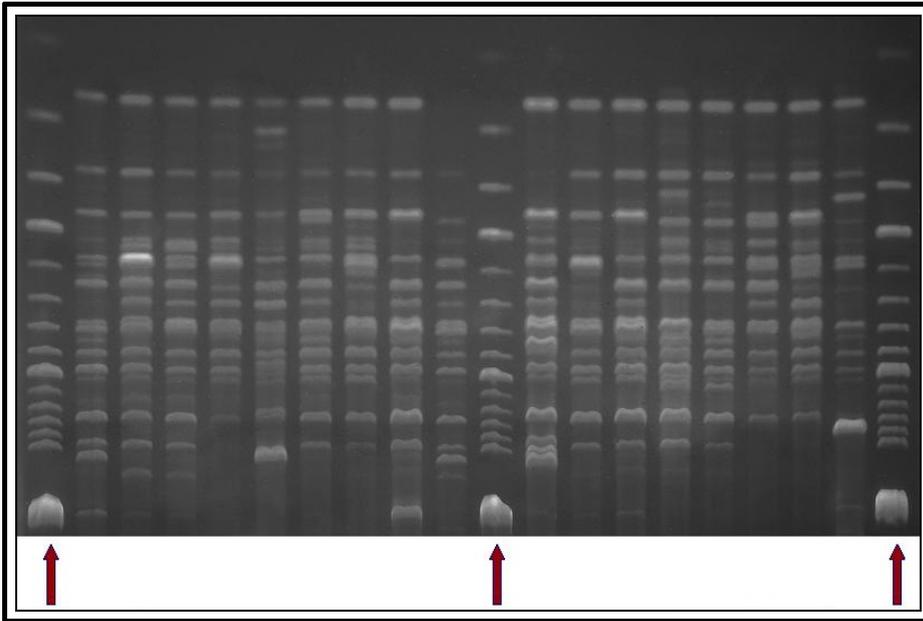


Figura 40. Marcadores de peso molecular.

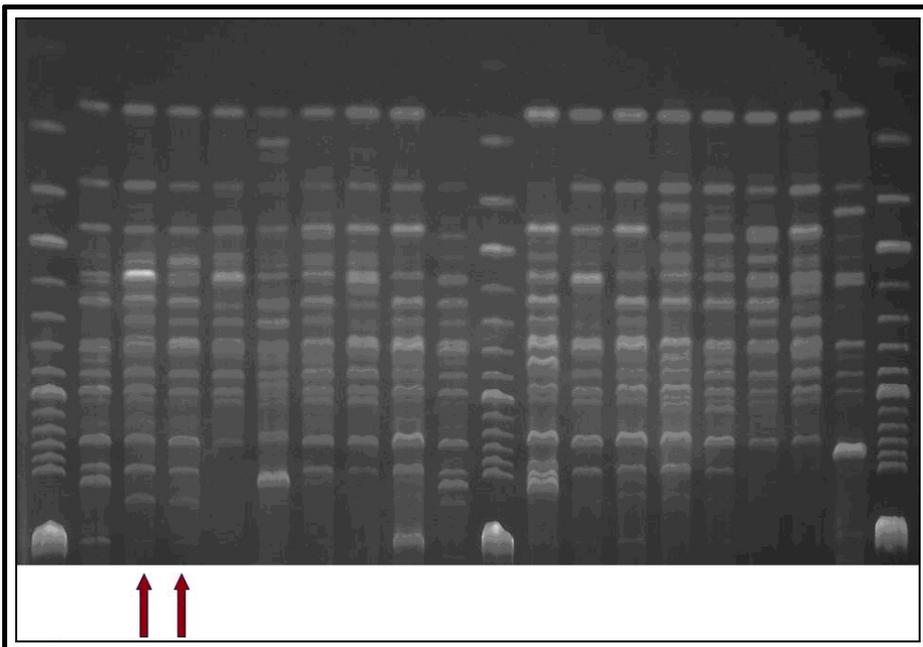


Figura 41. Bandas con homología superior al 80% según el programa Fingerprinting II Informatix™ Software

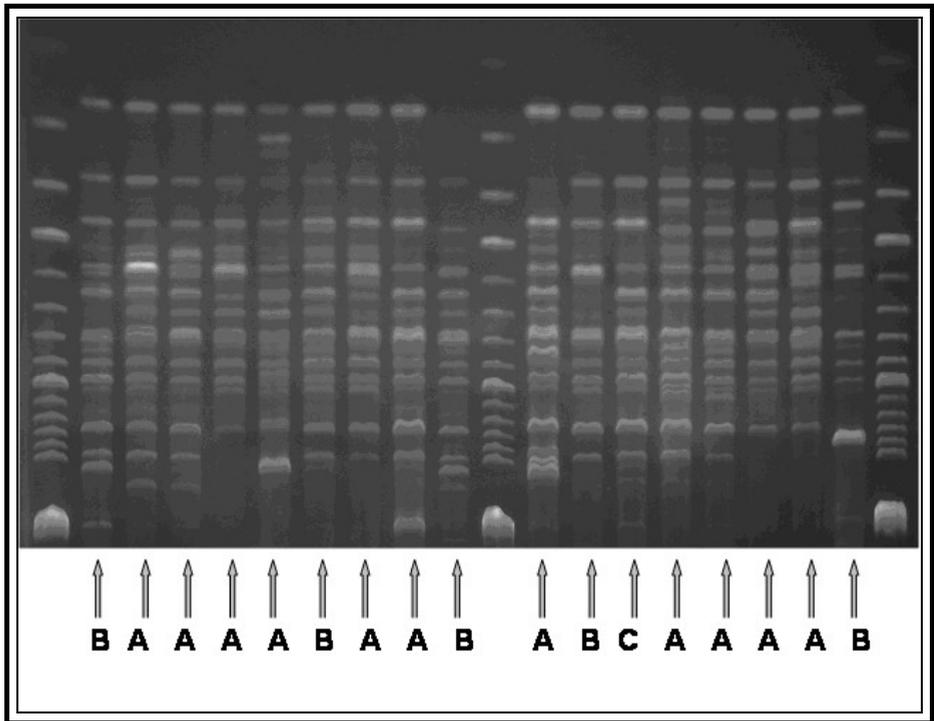


Figura 42. Gel con genotipos para incluirlos en los grupos de homología.

3.11. Reproducibilidad

En las diversas etapas se efectuaron controles, algunos de los cuales ya se han señalado.

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 AP-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.

3.12. 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 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 estreptococos del grupo mutans

En las tablas 9 y 10 se recogen, de cada uno de los escolares incluidos en el estudio, los datos demográficos, índices de enfermedad de caries (CAOD, cod, cos e ir) y recuentos de bacterias cariógenas (referidos a EGM Y LB en CRT[®] Bacteria).

La mayoría de estos datos en forma resumida, e indicando los valores medios (\bar{x}) y desviaciones estándar (DE), para cada uno de los colegios y en la globalidad, se indican en la tabla 11. La edad media de los niños fue de 6.80 (± 0.37), el 53.3% eran varones y el 46.7 niñas. En el Colegio Juan XXIII el nivel social predominante fue el IV (47.61%) y en el Padre Manjón el V-VI (39.39%). En el primero los recuentos de CRT[®] Bacteria EGM fueron de 3.31 (± 1.14), los de CRT[®] Bacteria LB de 3.43 (± 0.99), el índice de caries cod de 2.14 (± 3.95) y el cos de 3.79 (± 7.61). En el segundo los recuentos CRT[®] Bacteria EGM y LB eran respectivamente de 1.85 (± 1.50) y 2.30 (± 1.59), el cod de 1.85 (± 2.03) y el cos de 3.21 (± 4.12). Al comparar ambos colegios, no se obtuvieron diferencias en los índices de caries, aunque sí en los recuentos de bacterias cariógenas observándose un mayor riesgo microbiológico en el Colegio Juan XXIII.

En las tablas 12 y 13 se recogen, para ambos colegios, los datos microbiológicos referidos, niño a niño, a las colonias estudiadas (en saliva, placas de superficies lisas y fisuras), las que no metabolizaban el manitol, las que no crecieron en el medio con este polialcohol, las especies halladas y los genotipos con sus respectivos porcentajes según las ufc identificadas. Estos datos se resumen en las tablas 14, 15 y 16.

En total se estudiaron 893 colonias compatibles con morfotipos de EGM lo que representa una media por niño de 11.89 (± 8.78), independientemente del origen de la muestra (saliva o placas); 252 no degradaron el manitol, es decir una media de 28.21 (± 3.95). No se desarrollaron en el medio con el mismo 48, media de 0.69 (± 1.9). Se identificaron 593 cepas de EGM. De ellas 517 pertenecían a SM (87.2%), distribuidas: 354 en saliva, 95 en placas de superficies lisas y 68 en placas de fisuras; 63 (10.62%) pertenecían a la especie *Streptococcus sobrinus* (SS); 10 colonias fueron identificadas como *Streptococcus criceti* (SC) (1.68%) y solo 3 como *Streptococcus rattii* (SR) (0.50%). Tras la realización de entre tres y cinco tomas, en 18 niños (12 pertenecientes al Colegio Juan XXIII y 6 al Padre Manjón)

no se detectaron EGM en ninguna de las muestras, lo que representa un 24 %. Así pues la genotipificación sólo fue posible realizarla en 57 niños.

4.2. Resultados de la AP-PCR.

Al amplificar con el cebador OPA-02 los ácidos nucleicos extraídos a las colonias de SM y realizarles la electroforesis, se pudo comprobar que, de acuerdo con la metodología recogida en el apartado de material y método, 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 43 y 44 se reflejan los dendogramas correspondientes a las cepas de los dos colegios estudiados considerándose, tal como se señaló, por las razones apuntadas en el material y método, que pertenecían al mismo genotipo cuando la homología era igual o superior al 80%.

Tabla 9. Escolares del Colegio Juan XXIII (n= 42). Factores demográficos. Recuentos de bacterias cariogénicas. Índices de caries.

Escolar	Sexo	Edad	Nivel Social	Recuentos CRT [®] Bacteria EGM	Recuentos CRT [®] Bacteria LB	CAOD	cod	cos	ir(%)
EAM(1)	F	6.70	VI	4	4	0	10	20	60
AAR(2)	M	7.10	IVb	1	1	0	0	0	.
AA(3)	M	6.61	II	4	4	0	0	0	.
PCC(4)	F	6.50	III	1	4	0	0	0	.
JCF(5)	M	6.60	IVa	4	4	0	1	1	0
LCH(6)	F	6.70	VI	4	4	0	0	0	.
FCG(7)	M	7.10	IVb	1	1	0	1	1	0
ACC(8)	M	6.67	IVa	1	3	0	0	0	.
DCG(9)	M	6.92	IVa	4	4	0	4	4	0
FDM(10)	M	7.23	IVb	4	4	1	0	0	.
AEM(11)	M	7.05	IVb	1	2	0	0	0	.
RDM(12)	M	7.31	IVb	4	4	0	1	1	100
MJE(13)	F	6.83	IVb	4	4	0	18	36	0
CEH(14)	F	6.67	IVb	3	1	0	1	1	0
CFB(15)	M	6.78	VI	1	4	0	0	0	0
AFG(16)	M	7.03	VI	4	4	0	1	2	0
CFC(17)	F	6.19	VI	4	3	0	3	4	0
AGO(18)	F	7.13	IVb	4	4	0	1	1	0
SGG(19)	F	6.93	IVa	4	4	0	1	1	0
YGJ(20)	F	7.32	IVa	4	3	0	0	0	.
PGM(21)	M	6.45	I	4	4	0	5	11	0
FC(22)	M	6.55	VI	4	4	0	4	4	0
AHM (23)	M	6.26	II	3	3	0	0	0	.
LJB(24)	F	6.59	VI	4	3	0	2	2	0
MJ(25)	F	7.33	IVa	4	4	0	0	0	.
CMA(26)	M	6.41	VI	4	3	0	1	2	0
CMC(27)	F	6.82	III	3	1	0	0	0	.
MMR(28)	F	6.66	IVb	4	4	0	7	12	29
CMH (29)	M	7.34	IVb	4	4	0	1	1	0
JMM(30)	M	6.57	V	4	4	0	1	2	0
TMG(31)	M	6.76	VI	4	4	0	4	15	0
AMA(32)	F	7.31	V	4	4	0	15	24	13
ENM(34)	M	6.60	III	3	4	0	0	0	.
YNM(35)	M	7.12	VI	4	4	0	0	0	.
MPG(36)	F	7.27	III	4	4	0	0	0	.
VRV(37)	M	6.91	III	1	2	0	0	0	.
CSS(38)	F	6.95	IVa	4	2	0	0	0	.
JVL(39)	M	6.67	II	3	4	0	0	0	.
DVN(40)	F	6.35	VI	4	4	0	6	12	0
JVA(41)	M	7.15	IVb	4	4	0	2	2	100
IYL(42)	M	6.51	IVb	3	4	0	0	0	.
NMC(43)	F	6.41	IVa	2	4	0	0	0	.

EGM: estreptococos del grupo mutans; LB: lactobacilos; CAOD: suma de dientes permanentes cariados, ausentes por caries y obturados; cod: suma de dientes temporales cariados u obturados; cos: suma de superficies de dientes temporales cariados u obturados; ir%: porcentaje de dientes temporales obturados del total de cariados+obturados.

Tabla 10. Escolares del Colegio Padre Manjón (n=33). Factores demográficos. Recuentos de bacterias cariogénicas. Índices de caries.

Escolar	Sexo	Edad	Nivel Social	Recuento CRT® Bacteria EGM	Recuento CRT® Bacteria LB	CAOD	cod	cos	ir (%)
AJS(51)	F	7.10	V	3	2	0	3	5	0
ASL(52)	M	7.32	II	1	1	0	0	0	.
IBV(53)	F	7.03	II	2	1	0	2	2	100
PLM(55)	M	6.67	III	2	2	0	0	0	.
CF(56)	F	6.59	III	4	4	0	1	1	0
DR(57)	M	6.66	III	0	0	0	1	1	0
PC(58)	F	6.35	II	0	1	0	0	0	.
PMC(59)	M	7.16	IVa	3	0	0	0	0	.
JF(60)	M	6.50	VI	4	3	0	3	6	33.33
JSH(61)	M	6.19	I	0	0	0	0	0	.
AML(62)	F	6.54	IVb	2	3	0	0	0	.
MT(63)	F	6.41	VI	1	1	0	0	0	.
LFD(64)	F	6.45	III	4	3	0	1	2	100
JMH(65)	M	6.26	III	2	4	1	4	4	100
ETC(66)	F	6.16	IVb	0	4	0	0	0	.
MR(67)	M	7.80	V	3	3	0	4	8	0
VMG(70)	M	6.70	VI	2	3	0	0	0	.
FBJ(71)	M	6.78	V	0	3	0	4	4	0
RZC(72)	F	7.10	III	4	3	0	4	4	100
FBR(73)	M	6.95	VI	4	4	0	4	8	0
JLB(74)	M	6.41	VI	1	4	0	4	6	0
VPP(75)	F	6.83	V	1	4	0	0	0	.
NMC(76)	F	6.78	IVa	4	2	0	3	4	.
FCL(78)	M	6.26	VI	1	4	0	5	9	60
ZLF(79)	F	6.41	VI	1	4	0	3	6	0
ERS(80)	M	7.33	IVb	4	4	0	7	15	0
ERP(81)	F	7.82	IVb	4	4	0	4	14	0
LRR(82)	F	6.75	III	1	1	2	0	0	.
AGG(83)	F	6.78	III	1	0	0	0	0	.
AOG(84)	M	7.15	IVb	1	0	0	0	0	.
JMF(85)	M	6.23	I	0	0	0	0	0	.
SBG(87)	F	7.40	V	0	0	0	0	0	.
RR(88)	F	6.92	V	1	4	0	4	7	25

EGM: estreptococos del grupo mutans; LB: lactobacilos; CAOD: suma de dientes permanentes cariados, ausentes por caries y obturados; cod: suma de dientes temporales cariados u obturados; cos: suma de superficies de dientes temporales cariados u obturados; ir%: porcentaje de dientes temporales obturados del total de cariados+obturados

Tabla 11. Escolares estudiados. Factores demográficos. Índices de caries y recuentos de bacterias cariogénicas. Media y desviación estándar [\bar{x} (DE)]

	Edad	Sexo n (%)		Nivel social %	Recuento CRT® Bacteria EGM	Recuento CRT® Bacteria LB	cod	cos
		M	F					
Juan XXIII n= 42	6.81 (0.23)	24 (51.14)	18 (42.85)	I-II-7.14 III-14.28 IV-47.61 V-VI-30.95	3.31 (1.14)	3.43 (0.99)	2.14 (3.95)	3.79 (7.61)
Padre Manjón n= 33	6.78 (0.43)	16 (48.48)	17 (51.51)	I-II-15.15 III-24.24 IV-21.21 V-VI-39.39	1.85 (1.50)	2.30 (1.59)	1.85 (2.03)	3.21 (4.12)
valor p^*					0.000	0.001	0.619	0.546
Total escolares n= 75	6.80 (0.37)	40 (53.33)	35 (46.66)	I-II-10.66 III-18.66 IV-36.00 V-VI-34.66	2.67 (1.49)	2.93 (1.39)	2.03 (3.23) 2.01 (3.24)	3.55 (6.28) 3.53 (6.30)

EGM: estreptococos del grupo mutans. LB: lactobacilos; cod: suma de dientes temporales cariados u obturados; cos: suma de superficies de dientes temporales cariados u obturados.

*Kolmogorov-Smirnov

Tabla 12. Estreptococos investigados en saliva y placas en los escolares del Colegio Juan XXIII (n=42).

Escolar	Colonias estudiadas	Manitol (-)	NC	SM	SS	SC	SR	Genotipos SM (%)
1-01	S 7	0	0	7	0	0	0	A (14.3%) B (85.7%)
1-02	S 9	8	1	0	0	0	0	-
1-03	S 6	2	0	3	0	1	0	A (100%)
1-04	S 1	1	0	0	0	0	0	-
1-05	S 6	2	0	4	0	0	0	A (100%)
1-06	S 6	0	0	6	0	0	0	A (100%)
1-07	S 8	4	0	3	0	1	0	A (100%)
1-08	S 6	6	0	0	0	0	0	-
1-09	S 6	2	0	4	0	0	0	A (100%)
1-10	S 20	4	0	8	8	0	0	A (57.14%) B (42.85%)
1-11	S 10	10	0	0	0	0	0	-
1-12	S 11	8	0	3	0	0	0	A (100%)
1-13	S 6	1	0	3	0	2	0	A (33.3%) B (67.7%)
1-14	S 19	4	1	13	1	0	0	A (100%)
1-15	S 6	6	0	0	0	0	0	-
1-16	S 6	0	0	5	0	1	0	A (80%) B (20%)
1-17	S 21	4	1	14	2	0	0	A (78.57%) B (21.42%)
1-18	S 12	5	0	5	2	0	0	A (100%)
1-19	S 6	1	0	4	0	1	0	A (100%)
1-20	S 6	1	0	5	0	0	0	A (100%)
1-21	S 6	0	0	6	0	0	0	A (100%)
1-22	S 6	0	0	6	0	0	0	A (100%)
1-23	S 3	0	0	3	0	0	0	A (100%)
	F 6	0	0	6	0	0	0	A (100%)
	L 6	2	0	4	0	0	0	A (100%)
1-24	S 6	0	0	6	0	0	0	A (100%)
	F 1	0	1	0	0	0	0	-
	L 6	0	0	6	0	0	0	A (16.6%) B (83.3%)
1-25	S 3	1	0	2	0	0	0	A (100%)
	F 6	0	0	6	0	0	0	A (100%)
	L 6	2	0	4	0	0	0	A (100%)
1-26	S 2	0	0	1	0	1	0	A (100%)
	F 0	0	0	0	0	0	0	-
	L 6	1	0	5	0	0	0	A (100%)
1-27	S 3	0	0	3	0	0	0	A (100%)
	F 0	0	0	0	0	0	0	-
	L 2	1	0	1	0	0	0	A (100%)
1-28	S 6	0	0	5	0	1	0	A (33.3%) B (67.7%)
	F 0	0	0	0	0	0	0	-
	L 6	0	0	6	0	0	0	B (100%)
1-29	S 6	0	0	6	0	0	0	A (100%)
1-30	S 6	6	0	0	0	0	0	-
1-31	S 6	0	0	6	0	0	0	A (100%)
	F 6	2	0	4	0	0	0	A (67%) B (33%)
	L 6	0	0	6	0	0	0	A (100%)
1-32	S 6	1	0	5	0	0	0	A (100%)
	F 4	0	0	4	0	0	0	A (80%) B (20%)
	L 6	1	0	4	0	1	0	A (100%)
1-34	S 0	0	0	0	0	0	0	-
1-35	S 14	1	1	9	2	0	1	A (100%)
1-36	S 6	6	0	0	0	0	0	-
1-37	S 0	0	0	0	0	0	0	-
1-38	S 6	0	0	6	0	0	0	A (100%)
1-39	S 0	0	0	0	0	0	0	-
1-40	S 21	3	6	11	1	0	0	A (67.3%) B (33.3%)
1-41	S 14	8	0	6	0	0	0	A (100%)
1-42	S 0	0	0	0	0	0	0	-
1-43	S 0	0	0	0	0	0	0	-

Manitol (-): bacteria que no metabolizaba el polialcohol; NC: bacteria que no se desarrollaba en el medio con manitol; SM: *Streptococcus mutans*; SS: *Streptococcus sobrinus*; SC: *Streptococcus criceti*; SR: *Streptococcus rattii*; S: saliva; F: placa de fisuras; L: placa de superficies lisas.

Tabla 13. Estreptococos investigados en saliva y placas en los escolares del Colegio Padre Manjón (n= 33)

Escolar	Colonias estudiadas	Manitol (-)	NC	SM	SS	SC	SR	Genotipos SM (%)
2-51	S 5	0	0	5	0	0	0	A (100%)
	F 0	0	0	0	0	0	0	-
	L 6	0	0	6	0	0	0	A (100%)
2-52	S 8	3	5	0	0	0	0	-
	F 0	0	0	0	0	0	0	-
	L 6	2	0	3	0	1	0	A (100%)
2-53	S 6	3	0	3	0	0	0	A (100%)
	F 3	0	1	2	0	0	0	A (100%)
	L 11	4	1	6	0	0	0	A (100%)
2-55	S 10	1	0	9	0	0	0	A (100%)
	F 6	0	1	5	0	0	0	A (100%)
	L 6	1	0	5	0	0	0	A (100%)
2-56	S 15	2	0	13	0	0	0	A (100%)
2-57	S 15	10	0	5	0	0	0	A (100%)
2-58	S 0	0	0	0	0	0	0	-
2-59	S 9	6	0	3	0	0	0	A (100%)
	F 5	1	2	2	0	0	0	B (100%)
	L 11	8	1	2	0	0	0	A (100%)
2-60	S 8	2	0	6	0	0	0	A (100%)
	F 8	0	0	8	0	0	0	A (100%)
	L 8	0	0	8	0	0	0	A (100%)
2-61	S 0	0	0	0	0	0	0	--
2-62	S 20	9	0	10	0	0	1	A (100%)
2-63	S 13	13	0	0	0	0	0	-
2-64	S 10	0	1	9	0	0	0	A (100%)
2-65	S 4	0	0	4	0	0	0	A (100%)
	F 6	1	0	5	0	0	0	A (100%)
	L 4	1	0	3	0	0	0	A (100%)
2-66	S 0	0	0	0	0	0	0	-
2-67	S 6	3	0	3	0	0	0	A (100%)
	F 6	0	0	4	2	0	0	A (100%)
	L 13	6	0	3	4	0	0	A (100%)
2-70	S 19	5	0	14	0	0	0	A (6.6%) B (93.33)
2-71	S 6	5	1	0	0	0	0	-
2-72	S 13	0	0	13	0	0	0	A (61.5%) B (38.46%)
	F 6	0	0	6	0	0	0	A (83.33) B (16.66%)
	L 4	1	0	3	0	0	0	A (33.33%) B (66.66%)
2-73	S 17	7	0	8	2	0	0	A (100%)
2-74	S 21	5	2	14	0	0	0	A (100%)
2-75	S 5	0	2	3	0	0	0	A (100%)
2-76	S 8	1	0	7	0	0	0	A (100%)
	F 9	1	3	4	1	0	0	A (100%)
	L 8	1	1	6	0	0	0	A (100%)
2-78	S 4	4	0	0	0	0	0	-
2-79	S 8	0	0	8	0	0	0	A (37.5%) B (62.5%)
	F 13	1	0	12	0	0	0	A (72.72%) B (27.27%)
	L 12	0	0	12	0	0	0	B (100%)
2-80	S 6	0	0	6	0	0	0	A (100%)
2-81	S 17	0	1	8	8	0	0	A (87.50%) B (12.50%)
	F 14	1	0	0	13	0	0	-
	L 14	0	0	2	12	0	0	A (100%)
2-82	S 7	0	0	7	0	0	0	A (100%)
2-83	S 26	10	13	3	0	0	0	A (100%)
2-84	S 13	1	0	12	0	0	0	A (25%) B (75%)
2-85	S 23	16	3	3	0	0	1	A (100%)
2-87	S 22	11	0	6	5	0	0	A (100%)
2-88	S 4	0	0	4	0	0	0	A (75%) B (25%)

Manitol (-): bacteria que no metabolizaba el polialcohol; NC: bacteria que no se desarrollaba en el medio con manitol; SM: *Streptococcus mutans*; SS: *Streptococcus sobrinus*; SC: *Streptococcus criceti*; SR: *Streptococcus ratti*; S: saliva; F: placa de fisuras; L: placa de superficies lisas

Tabla 14. Estudio microbiológico realizado en escolares a partir de saliva y placas de superficies lisas y de fisuras

	Nº colonias estudiadas	Manitol (-)	NC	SM	SS	SC	SR
Juan XXIII (n= 42) [*]							
-Saliva	298	95	10	168	16	8	1
-Lisas	44	7	0	36	0	1	0
-Fisuras	23	2	1	20	0	0	0
Total	365	104	11	224	16	9	1
Padre Manjón (n=33) ^{**}							
-Saliva	349	119	27	186	15	0	2
-Lisas	103	24	3	59	16	1	0
-Fisuras	76	5	7	48	16	0	0
Total	528	148	37	293	47	1	2
Total escolares (n=75) ^{***}							
-Saliva	647	214	37	354	31	8	3
-Lisas	147	31	3	95	16	2	0
-Fisuras	99	7	8	68	16	0	0
Total	893	252	48	517	63	10	3

Manitol (-): bacteria que no metabolizaba el polialcohol; NC: bacteria que no se desarrollaba en el medio con manitol; SM: *Streptococcus mutans*; SS: *Streptococcus sobrinus*; SC: *Streptococcus criceti*; SR: *Streptococcus rattii*.

^{*} no se aislaron colonias compatibles con EGM en 12 escolares

^{**} no se aislaron colonias compatibles con EGM en 6 escolares.

^{***} no se aislaron colonias compatibles con EGM en un total de 18 escolares.

Tabla 15. Media y desviación estándar de las distintas especies de estreptococos del grupo mutans identificadas en saliva y placa en ambos colegios y en el total de escolares. Media y desviación estándar [\bar{x} (DE)].

	Total colonias	Manitol (-)	NC	SM	SS	SC	SR
Juan XXIII n=42	8,69(5,9)	2,81(2,8)	0,3(1,02)	6,05(4,57)	0,43(1,41)	0,24(0,5)	0,03(0,16)
Padre Manjón n=33	15,97(10,84)	4,48(4,83)	1,12(2,5)	8,88(7,55)	1,42(5,8)	0,03(0,174)	0,06(0,242)
Total escolares n=75	11,89(8,78)	3,6(3,95)	0,69(1,9)	7,39(6,27)	0,90(4,13)	0,14(0,4)	0,04(0,204)

Manitol (-): bacteria que no metabolizaba el polialcohol; NC: bacteria que no se desarrollaba en el medio con manitol; SM: *Streptococcus mutans*; SS: *Streptococcus sobrinus*; SC: *Streptococcus criceti*; SR: *Streptococcus rattii*.

Tabla 16. Número y porcentaje de especies de estreptococos del grupo mutans identificadas.

	Total		SM		SS		SC		SR	
	N	N	%	N	%	N	%	N	%	
Juan XXIII n= 30	250	224	89.6	16	6.4	9	3.6	1	0.4	
Padre Manjón n=33	343	293	85.4	47	13.7	1	0.29	2	0.58	
Total escolares n= 75	593	517	87.2	63	10.62	10	1.68	3	0.50	

SM: *Streptococcus mutans*; SS: *Streptococcus sobrinus*; SC: *Streptococcus criceti*; SR: *Streptococcus rattii*; n: tamaño muestra; N: número de colonias.

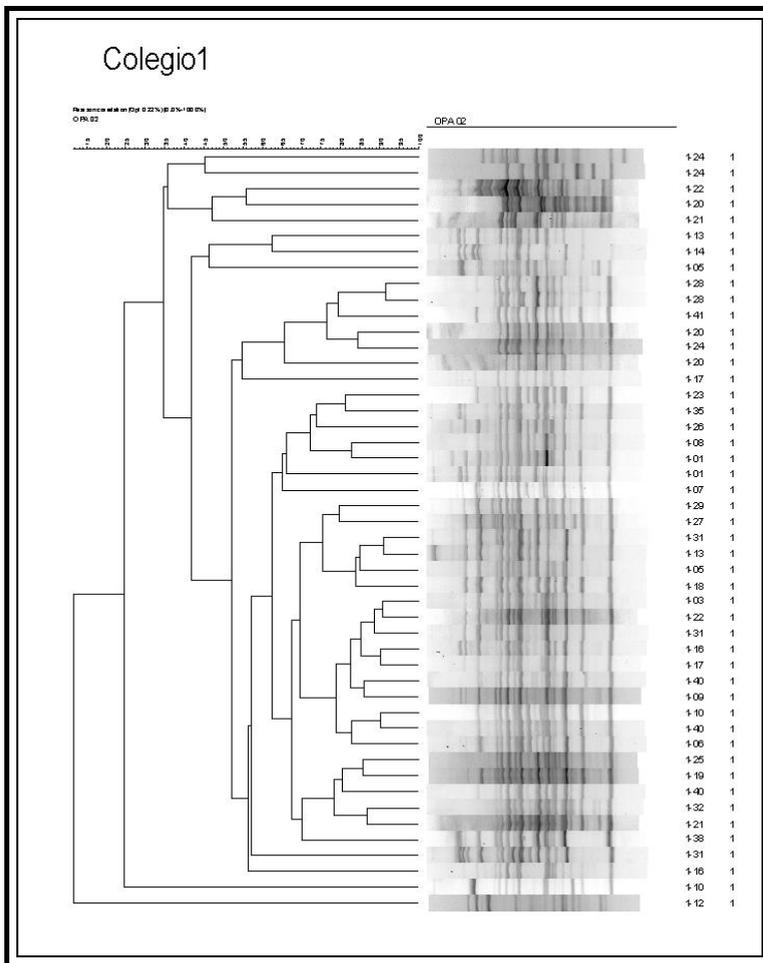


Figura 43. Dendograma del Colegio Juan XXIII.

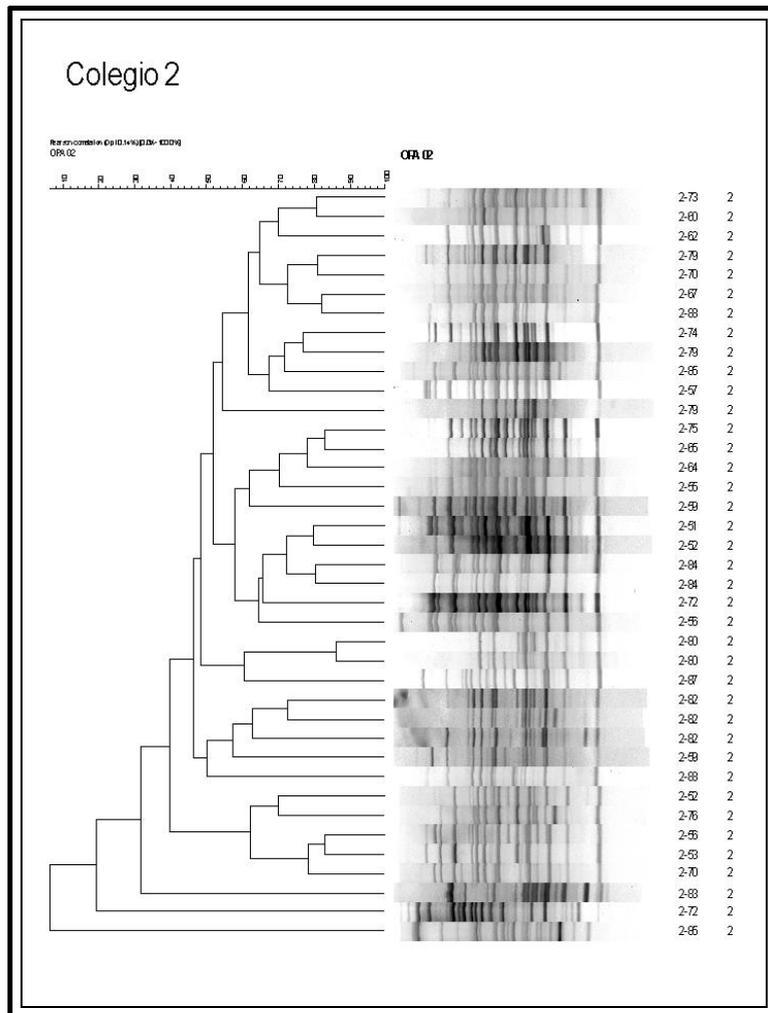


Figura 44. Dendograma del Colegio Padre Manjón.

En las tablas 17,18 y 19, se comparan para cada colegio y en la globalidad del estudio el número de genotipos por niño (0, 1 y 2) con las siguientes variables: recuentos en CRT[®] Bacteria de EGM y LB así como índices de caries cod y cos. En ningún centro se detectaron niños con más de dos genotipos. Los resultados de estas comparaciones han sido diferentes en los dos colegios. Así en el Juan XXIII (tabla 17), con 21 niños con un genotipo y 9 con dos, hay una asociación estadísticamente significativa entre el número de ellos y el resto de los parámetros a excepción de con el recuento de LB en CRT[®] Bacteria. Hay una tendencia marcada de que con ausencia de SM el

recuento en CRT® EGM y los índices de caries son inferiores a cuando se aíslan uno o dos genotipos. A medida que el número de estos aumenta, también lo hacen los recuentos en CRT® Bacteria EGM, y los índices de caries cod y cos . En el Padre Manjón (tabla 18), con 20 niños con un genotipo y 7 con dos, aunque se sigue observando la misma tendencia no hay, probablemente por la dispersión de datos, significación estadística entre número de genotipos y el resto de los parámetros estudiados salvo con los recuentos de EGM en CRT® Bacteria. En el estudio conjunto de ambos colegios (tabla 19), se obtiene la misma significación que la observada en el Colegio Juan XXIII, probablemente debido a los resultados estadísticos tan fuertemente consistentes obtenidos en el mismo.

En las tablas 20, 21, y 22, se realiza el mismo tipo de análisis pero excluyendo a los niños en los que no se aisló ninguna cepa de SM. En este caso en el Colegio Juan XXIII (tabla 20) solo hay significación estadística entre el número de genotipos, el cod y el cos (pero menor que cuando se incluían niños sin SM). No hay ninguna relación estadísticamente significativa en el Colegio Padre Manjón (tabla 21). Igual ocurre cuando se realiza el estudio conjuntamente para ambos centros, debido probablemente a la disminución de la consistencia de los datos procedentes del primero de los colegios.

De acuerdo con lo recogido en la tabla 23, en principio, todo apunta a que cuando no se aísla SM predomina el número de niños sin caries, hecho que no excluye que sí padezcan el proceso (en total 3). A medida que se incrementa el número de genotipos también lo hacen los escolares con la enfermedad cariogénica, sin embargo esto no excluye casos sin ella (3 niños con dos genotipos).

En las tablas 24 y 25 se hace una descriptiva sobre los genotipos compartidos por escolares. Así en el Colegio Juan XXIII de los 30 niños a los que se les aisló SM, 12 no compartían genotipos con otros compañero, mientras que 18 si lo hacían con, al menos, otro (60%). El número total de grupos de homología fue de 7. De ellos dos genotipos (de los grupos I, II, III y VII) son compartidos por 2 niños, dos (de los grupos V y VI) por 3 y uno (grupo IV) por 5 (el escolar 1-40, compartía sus dos genotipos con otros sujetos diferentes). En el Colegio Padre Manjón, de los 27 niños a los que se les detectó SM, 10 compartían genotipos (37.03%), el número de grupos de homología diferentes fue de 5 y en todos ellos los genotipos compartidos lo fueron por 2 escolares.

En las tablas 26, 27 y 28, se recogen los resultados obtenidos al relacionar si el hecho de que los niños compartan o no genotipos, se asociaba con las siguientes variables: recuentos de EGM y LB en CRT[®] Bacteria e índices de caries cod y cos. En el Colegio Juan XXIII (tabla 26) no hay ninguna asociación estadísticamente significativa. Esta sólo existe en el Padre Manjón (tabla 27) y cuando se hace el análisis en el conjunto de ambos centros (tabla 28) sólo para los recuentos de LB. En general los valores medios, tanto de los recuentos de bacterias cariógenas como de los índices de caries, son superiores en los niños que comparten genotipos frente a los que no lo hacen. Sin embargo sólo se aprecia la significación estadística ya señalada.

En la tabla 29 se recoge una relación de los genotipos de SM aislados de saliva y placas. Igualmente se señalan los porcentajes de los mismos en función de las colonias estudiadas. La genotipificación se realizó a las 263 colonias identificadas como SM. De saliva, procedían 5 ± 3.04 ; de placa de superficies lisas, 7.15 ± 10.58 ; y de placa de fisuras, 3.4 ± 3.3 . De los 20 escolares, en 12 (60%) se detectó un genotipo y en 8 (40%) dos genotipos. En la mayoría de la población ($n=13$, 65%) se aisló el o los mismos genotipos de saliva y algún tipo de placa, pero estos valores disminuyen al analizar en conjunto los tres tipos de muestras, de tal forma que sólo en nueve escolares (45%) se detectaron simultáneamente los mismos genotipos en saliva y en ambos tipos de placas. Esto es así porque en siete niños (35%) no se pudo, tras tres determinaciones, aislar SM en placa de fisuras. Por otra parte en un escolar tampoco fue posible detectar esta especie en saliva pese a encontrarse en placa de superficies lisas. En dos casos se aislaron más genotipos en saliva que en placas, mientras que en tres ocurrió al contrario. En cinco ocasiones (25%) aparecieron genotipos en algún tipo de placa que no pudieron aislarse en saliva. 66 de las 100 (66%) colonias aisladas de saliva mostraron una homología del 100% (todas pertenecieron al mismo genotipo), en placas de superficies lisas estas cifras fueron de 72 de 95 (75.78%) y en placas de fisuras 48 de 68 (70.58%). En el resto de las colonias dicha homología se repartió en porcentajes variables para los dos genotipos a los que pertenecían.

Tabla 17. Estudio comparativo de los recuentos en CRT[®] bacteria de EGM y LB, cod y cos para niños con 0, 1 y 2 genotipos del Colegio Juan XXIII. Media y desviación estándar [\bar{x} (DE)]

Nº genotipos	Recuentos CRT [®] Bacteria EGM	Recuentos CRT [®] Bacteria LB	cod	cos
0(n=12)	2.09 (1.24)	3.33 (1.07)	0.08 (0.28)	0.17 (0.57)
1(n=21)	3.71 (0.01)	3.33 (1.11)	1.29 (1.58)	2.14 (3.85)
2(n=9)	4 (0)	3.78 (0.44)	6.89 (6.33)	12.44 (12.2)
valor de p*	0.000	0.678	0.000	0.000

EGM: estreptococos del grupo mutans; LB: lactobacilos; cod: suma de dientes temporales cariados y obturados; cos: suma se superficies de dientes temporales cariadas y obturadas.

* Test de Kruskal-Wallis.

Tabla 18. Estudio comparativo de los recuentos en CRT[®] bacteria de EGM y LB, cod y cos para niños con 0, 1 y 2 genotipos del Colegio Padre Manjón. Media y desviación estándar [\bar{x} (DE)]

Nº genotipos	Recuentos CRT [®] Bacteria EGM	Recuentos CRT [®] Bacteria LB	cod	cos
0(n=6)	0.33 (0.51)	2.17 (1.72)	1.5 (2.34)	2.17 (3.70)
1(n=20)	2.15 (1.50)	2.25 (1.55)	1.85 (2.03)	3.10 (3.90)
2(n=7)	2.29 (1.38)	2.57 (1.81)	2.14 (2.03)	4.43 (5.16)
valor de p*	0.013	0.882	0.835	0.643

EGM: estreptococos del grupo mutans; LB: lactobacilos; cod: suma de dientes temporales cariados y obturados; cos: suma se superficies de dientes temporales cariadas y obturadas.

* Test de Kruskal-Wallis.

Tabla 19. Estudio comparativo de los recuentos en CRT[®] bacteria de EGM y LB, cod y cos para niños con 0, 1 y 2 genotipos en el total de escolares. Media y desviación estándar [\bar{x} (DE)]

Nº genotipos	Recuentos CRT [®] Bacteria EGM	Recuentos CRT [®] Bacteria LB	cod	cos
0(N=18)	1.50 (1.34)	2.94 (1.40)	0.56 (1.40)	0.83 (2.28)
1(N=41)	2.95 (1.40)	2.80 (1.43)	1.56 (1.81)	2.61 (3.89)
2(N=16)	3.25 (1.24)	3.25 (1.34)	4.81 (5.38)	8.94 (10.33)
valor de p^*	0.000	0.554	0.001	0.001

EGM: estreptococos del grupo mutans; LB: lactobacilos; cod: suma de dientes temporales cariados y obturados; cos: suma se superficies de dientes temporales cariadas y obturadas.

*Test de Kruskal-Wallis.

Tabla 20. Relación del número de genotipos con recuentos bacterianos e índices de caries. Colegio Juan XXIII. Media y desviación estándar [\bar{x} (DE)]

Nº genotipos	Recuentos CRT [®] Bacteria EGM	Recuentos CRT [®] Bacteria LB	cod	cos
1 n =21	3.71 (0.71)	3.33 (1.11)	1.29 (1.58)	2.14 (3.85)
2 n =9	4 (0)	3.78 (0.44)	6.89 (6.33)	12.44 (12.2)
Valor p^*	0.97	0.97	0.041	0.020

EGM: estreptococos del grupo mutans; recuento LB: lactobacilos; cod: suma de dientes temporales cariados y obturados; cos: suma se superficies de dientes temporales cariadas y obturadas.

*Kolmogorov-Smirnov.

Tabla 21. Relación del número de genotipos con recuentos bacterianos e índices de caries. Colegio Padre Manjón. Media y desviación estándar [\bar{x} (DE)]

Nº genotipos	Recuentos CRT® Bacteria EGM	Recuentos CRT® Bacteria LB	cod	cos
1 n =20	2.15 (1.50)	2.25 (1.55)	1.85 (2.03)	3.10 (3.9)
2 n =7	2.29 (1.38)	2.57 (1.81)	2.14 (2.03)	4.43 (5.16)
Valor de p^*	1	0.97	0.99	0.99

EGM: estreptococos del grupo mutans; recuento LB: lactobacilos; cod: suma de dientes temporales cariados y obturados; cos: suma se superficies de dientes temporales cariadas y obturadas.

*Kolmogorov-Smirnov.

Tabla 22. Relación del número de genotipos con recuentos bacterianos e índices de caries. Total escolares. Media y desviación estándar [\bar{x} (DE)]

Nº genotipos	Recuentos CRT® Bacteria EGM	Recuentos CRT® Bacteria LB	cod	cos
1 n =41	2.95 (1.40)	2.80 (1.43)	1.56 (1.81)	2.61 (3.89)
2 n = 16	3.25 (1.24)	3.25 (1.34)	4.81 (5.38)	8.94 (10.33)
valor de p^*	0.993	0.654	0.127	0.102

EGM: estreptococos del grupo mutans; recuento LB: lactobacilos; cod: suma de dientes temporales cariados y obturados; cos: suma se superficies de dientes temporales cariadas y obturadas.

*Kolmogorov-Smirnov.

Tabla 23. Número de genotipos identificados en niños con y sin dientes cariados. Colegios Juan XXIII, Padre Manjón y total escolares

Nº Genotipos	Juan XXIII			Padre Manjón			Total niños		
	Con caries	Sin caries	Total	Con caries	Sin caries	Total	Con caries	Sin caries	Total
0	1	11	12	2	4	6	3	15	18
1	12	9	21	12	8	20	24	17	41
2	9	0	9	4	3	7	13	3	16

Tabla 24. Genotipos compartidos entre los escolares del Colegio Juan XXIII con homología igual o superior al 80%*.

Grupos de homología	Genotipos compartidos	Escolares que comparten genotipos	Otros genotipos no compartidos
I	A	1-20	No
	B**	1-24	A
II	A	1-23	No
	A	1-35	No
III	A	1-18	No
	A	1-13	B
IV	A	1-22	No
	A	1-03	No
	A	1-16	B
	A	1-17	B
V	A	1-09	No
	A	1-10	No
	A	1-40	B
VI	A	1-06	No
	A	1-25	No
	A	1-19	No
VII	B	1-40	A
	A	1-32	B
	A	1-21	No

*Ver explicación en texto **Genotipo aislado en placa

Tabla 25. Genotipos compartidos en escolares del Padre Manjón con una homología igual o superior al 80%*.

Grupos de homología	Genotipos compartido	Escolares que comparten genotipo	Otros genotipos no compartidos
I	A	2-73	No
	A	2-60	No
II	B	2-79	A
	A	2-70	B
III	A	2-67	No
	A	2-88	B
IV	A	2-75	No
	A	2-65	No
V	A	2-56	No
	A	2-53	No

*Ver explicación en texto

Tabla 26. Comparación de los recuentos en CRT[®] Bacteria de EGM y LB, cod y cos para niños que comparten y no comparten genotipos en el Colegio Juan XXIII. Media y desviación estándar [\bar{x} (DE)]

Compartir genotipo	Recuentos CRT [®] Bacteria EGM	Recuentos CRT [®] Bacteria LB	cod	cos
Sí (n=18)	3.94 (0.23)	3.78 (0.42)	3.33 (5.19)	5.61 (9.78)
No (n=12)	3.58 (0.90)	3 (1.34)	2.42 (3.08)	4.67 (6.88)
valor de p^*	0.948	0.4	0.869	0.869

EGM: estreptococos del grupo mutans; LB: lactobacilos; cod: suma de dientes temporales cariados y obturados; cos: suma se superficies de dientes temporales cariadas y obturadas.

*Kolmogorov-Smirnov.

Tabla 27. Comparación de los recuentos en CRT[®] bacteria de EGM y LB, cod y cos para niños que comparten y no comparten genotipos en el colegio Padre Manjón. Media y desviación estándar [\bar{x} (DE)]

Compartir genotipo	Recuentos CRT [®] Bacteria EGM	Recuentos CRT [®] Bacteria LB	cod	cos
Sí (n=10)	2.40 (1.26)	3.40 (0.96)	2.50 (1.65)	4.20(3.22)
No (n=17)	2.06 (1.56)	1.71 (1.57)	1.59 (2.15)	3 (4.78)
valor de p^*	0.990	0.004	0.434	0.502

EGM: estreptococos del grupo mutans; LB: lactobacilos; cod: suma de dientes temporales cariados y obturados; cos: suma se superficies de dientes temporales cariadas y obturadas.

*Kolmogorov-Smirnov.

Tabla 28. Comparación de los recuentos en CRT[®] bacteria de EGM y LB, cod y cos para niños que comparten y no comparten genotipos en el total de escolares. Media y desviación estándar [\bar{x} (DE)]

Compartir genotipo	Recuentos CRT [®] Bacteria EGM	Recuentos CRT [®] Bacteria LB	cod	cos
Sí (n=28)	3.39 (1.06)	3.64 (0.67)	3.04 (4.24)	5.11 (8.01)
No (n=29)	2.69 (1.51)	2.24 (1.24)	1.93 (2.56)	3.69 (5.64)
valor de p^*	0.430	0.003	0.677	0.871

EGM: estreptococos del grupo mutans; LB: lactobacilos; cod: suma de dientes temporales cariados y obturados; cos: suma se superficies de dientes temporales cariadas y obturadas.

*Kolmogorov-Smirnov.

Tabla 29. Relación entre los genotipos de SM de saliva y placas de superficies lisas y fisuras

Escolar	Total de cepas SM	Cepas de saliva y placas			Nº total genotipos	Genotipos de saliva y placas		
		Saliva	Lisas	Fisuras		Saliva	Lisas	Fisuras
1-23	13	3	4	6	1	A (100%)	A (100%)	A (100%)
1-24	12	6	6	0	2	A (100%)	A (16.70%) B (83.30%)	-
1-25	12	2	4	6	1	A (100%)	A (100%)	A (100%)
1-26	6	1	5	0	1	A (100%)	A (100%)	-
1-27	4	3	1	0	1	A (100%)	A (100%)	-
1-28	11	5	6	0	2	A (33.33%) B (67.76%)	B (100%)	-
1-31	16	6	6	4	2	A (100%)	A (100%)	A (67.70%) B (33.30%)
1-32	13	5	4	4	2	A (100%)	A (80%) B (20%)	A (100%)
2-51	11	5	6	0	1	A (100%)	A (100%)	-
2-52	3	0	3	0	1	-	A (100%)	-
2-53	11	3	6	2	1	A (100%)	A (100%)	A (100%)
2-55	19	9	5	5	1	A (100%)	A (100%)	A (100%)
2-59	7	3	2	2	2	A (100%)	A (100%)	B (100%)
2-60	22	6	8	8	1	A (100%)	A (100%)	A (100%)
2-65	12	4	3	5	1	A (100%)	A (100%)	A (100%)
2-67	10	3	3	4	1	A (100%)	A (100%)	A (100%)
2-72	22	13	3	6	2	A (61.54%) B (38.46%)	A (33.3%) B (66.6%)	A (83.33%) B (16.66%)
2-76	17	7	6	4	1	A (100%)	A (100%)	A (100%)
2-79	32	8	12	12	2	A (37.50%) B (62.50%)	B (100%)	A (72.72%) B (27.27%)
2-81	10	8	2	0	2	A (87.50%) B (12.50%)	A (100%)	-

SM: *Streptococcus mutans*

5. Discusión

Gracias a las últimas encuestas nacionales realizadas, ha quedado demostrado que la caries, a pesar de la disminución que muestran los estudios epidemiológicos, continúa siendo un problema de salud pública. La participación en este proceso carioso de EGM y en especial SM y SS es evidente a la luz de los trabajos científicos que así lo demuestran. Quedan sin embargo muchas preguntas por responder que la bacteriología oral tradicional, basada en la morfología de colonias y en la investigación de propiedades fenotípicas de las bacterias, como la fermentación de azúcares, la expresión de enzimas, la capacidad bacteriocinógena o la estructura antigénica, no puede responder. La biología molecular, a través de diversas técnicas, ha supuesto un avance importante para esclarecer muchos de los interrogantes que aún siguen 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 pioneros⁹⁵ que marcaron líneas para futuros investigadores. La microbiología oral también ha llevado a que, a mediados de la última década del siglo XX, se comiencen a investigar métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) más simples. Los mismos permitieron conocer 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, con múltiples experiencias en distintos centros, no puede verse relegado por la nueva metodología que deberá demostrar su utilidad real con el transcurso de los años. Destacados investigadores⁹⁶ han elaborado esquemas de identificación, recientemente actualizados, que llevan más de una década en uso y los mismos autores^{97,98}, han presentando trabajos de tipificación por metodología genética⁹⁹. En ellos demuestran que estos últimos son sólo adecuados para investigación clínica y epidemiológica pero no son convenientes para la determinación al nivel de especie. Otros investigadores¹⁰⁰ afirman que los métodos de fenotipia 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 ese rasgo genotípico en particular. Sobre la ba-

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

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

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

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

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

100 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.

se 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 fundamentados en el genotipo darán la asociación que puedan tener dos microorganismos entre sí.

5.1. Medio selectivo utilizado y selección de las cepas

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

El medio de cultivo selectivo utilizado en nuestro caso, agar MSB¹⁰¹, es aceptado, salvo escasas excepciones¹⁰², por todos los autores para el aislamiento, 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 a EGM. De un total de 893 colonias estudiadas, 33,63% no pudieron ser identificadas como tales, bien porque no fermentaron el manitol o no se desarrollaron en el medio con dicho polialcohol. A lo largo del estudio no se produjeron cambios de marcas ni lotes de los componentes con los que se realizó dicho medio; y además 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 aventurarse 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 Wang¹⁰³ como Arancegui¹⁰⁴ tuvieron similar inconveniente de crecimiento de colonias de bacterias no pertenecientes a los EGM. Así pues este hecho no es nuevo y existen, desde antiguo, numerosos trabajos que señalan la cada vez menor selectividad del agar MSB, el no desarrollo de algunas especies del grupo y la búsqueda de un medio más idóneo^{105,106,107,108}. Según nuestra propia experiencia en dicho medio se desarrollaron colonias que mostraban una morfología que no era compatible con los EGM; sin embargo en otros casos aparecían ufc que visualmente podrían ser confundidas con dichos microorganismos. Esta dificultad ha sido

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

102 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.

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

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

105 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.

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

107 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.

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

descrita por otros autores¹⁰⁹, lo que hace que la confirmación por identificación bioquímica de los EGM sea totalmente necesaria. 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 agar MSB (pe. Cariescreen[®] SM, Dentocult SM strip[®], CRT[®] Bacteria y otros). Este hecho hace que los datos obtenidos con estos últimos deben ser manejados con cautela y hasta pondrían en duda la relación caries-recuentos de EGM¹¹⁰. En este trabajo también hemos tenido constancia de estas discrepancias. Tal y como se señala en los resultados, elevados recuentos en CRT[®] Bacteria EGM no se correspondían con los índices de caries y en 18 niños, de los 75 incluidos en el estudio, con recuentos de células viables con colonias no compatibles con EGM, sí mostraban laminocultivos positivos. En la fase inicial del estudio se ensayaron diversos medios como MSKB, TYCSB, TYCS20B, GTSB y otros que presentaron los mismos problemas o superiores. Por ello pese a sus inconvenientes el medio MSB sigue siendo actualmente de referencia en la mayoría de los estudios para recuentos, aislamientos e identificación de EGM.

5.1.2. 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 cols.¹¹¹, eligieron de 1 a 5 por muestra, basándose en trabajos anteriores de los mismos autores¹¹². Alaluusua y cols.¹¹³, en el año 1996, tomaron de 3 a 13 colonias por su tipo diferencial. Otros autores¹¹⁴, del mismo grupo de investigación, al estudiar la colonización sitio específica tomando como referencia una pequeña población de 7 niños y un importante número de muestras por diente, llegan a investigar de 9 a 15 colonias por individuo. Li y cols.¹¹⁵, en 2000, estudia-

109 *Ibidem*

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

111 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.

112 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.

113 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.

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

115 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

ron una media de 4.6 ufc Lindquist y Emilson¹¹⁶, en 2004, lo hicieron con 143 de 25 sujetos. En nuestro 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 11.89 (± 8.78) incluyendo muestras salivares y biopelículas.

En algunos casos el número de colonias por niño incluidas para la genotipificación ha sido bajo, debido a dos factores: a) solo se aislaron escasas ufc compatibles con EGM, incluso después de procesar un mínimo de tres a cinco muestras por niño, de hecho en un 24% de los escolares no se pudo demostrar la presencia de estos microorganismos y b) en ocasiones se observaba un número de colonias visualmente compatibles con EGM pero no se pudo confirmar que lo eran por identificación bioquímica.

5.1.3. Tomas de las 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 que es posible tomar una muestra de una superficie poco o nada colonizada en un paciente de alto riesgo¹¹⁷. Esta dificultad se incrementa aun más en especímenes procedentes de placa de superficies oclusales o proximales con un diente adyacente¹¹⁸.

La toma de saliva soluciona en parte estos problemas ya que es más fácil recoger una muestra y además es más sencillo realizar a partir de ella recuentos de células viables. No obstante su utilización ha sido cuestionada por diversos motivos los cuales han sido sistematizados por Baca¹¹⁹.

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^{120,121}. Sin embargo,

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

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

119 *Ibidem*.

120 Van Houte J. Microbiological Predictors of caries risk. *Adv Dent Res* 1981; 89: 19-25.

esto no es un problema debido a que los EGM y los LB pertenecen casi exclusivamente al ecosistema de la placa bacteriana.

2° En la saliva no es posible saber si las bacterias cariogénicas provienen de superficies sanas o cariadas. Sin embargo generalmente no es necesaria esta información sobre una superficie concreta, ya que las medidas preventivas para el control de las caries tales como la higiene oral, control de dieta, fluoruros y tratamiento antibacteriano benefician a toda la dentición más que a una superficie de un diente concreto. Esto es en sí una ventaja, pues representan 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.

3° Aunque la validez de la saliva para determinar la presencia de bacterias cariogénicas en boca puede ser cuestionada, esta demostrada la correlación entre los niveles bacterianos salivales y de placa^{122,123,124,125}. Los niveles salivales de EGM reflejan el número de sitios colonizados y la proporción de estas bacterias en la placa dental¹²⁶.

Diversos trabajos sobre genotipificación de EGM, realizan tomas de muestras de saliva y placa pero, al ser los objetivos planteados referidos especialmente a los mecanismos de transmisión, no diferencian entre genotipos de uno u otro origen^{127,128}. En este contexto, las mediciones realizadas en saliva representan una razonable validez, lo que junto a la facilidad de recogida la convierten en una muestra recomendable¹²⁹. Además es el espécimen con mayor idoneidad para ser utilizado en salud pública y es el que han utilizado la mayoría de los autores en estudios sobre test microbiológicos. Por

121 Sullivan A., Borsgröm Mk, 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.

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

123 Apostole P, Vanderas D. Bacteriologic and non bacteriologic criteria for identifying individual at high risk of developing dental caries. *J Public Health Dent* 1986; 46: 106-113 .

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

125 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.

126 Bratthal D. The global epidemiology of mutans streptococci . En Johnson N,ed. *Risk cuarerkers for oral diseases. Dental Caries*. Cambridge: Cambridge University Press 1999, 99. 287-312.

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

128 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.

129 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.

estas razones para este trabajo han sido utilizadas sistemáticamente muestras de saliva, aunque en 20 niños también se hicieron tomas de placas de superficies lisas y de fisuras para comparar la identidad o no de genotipos de ambos ecosistemas primarios.

En la mayoría de la población (n=13, 65%) se aislaron los mismos genotipos de saliva y también en algunas de las placas, pero estos valores disminuyeron al analizar en conjunto los tres tipos de muestras, de tal forma que solo en nueve escolares (45%) se detectaron simultáneamente idénticos genotipos en saliva y en ambos tipos de placas. Esto fue así, por el hecho de que en siete niños (35%) no se pudo, tras tres determinaciones, aislar SM en placa de fisuras. Esto último podría justificarse por la ya referida dificultad de las tomas a este nivel y a la colonización puntual de estos microorganismos que “escaparían” al raspado con las cuñas de madera. El caso en el que se detectó SM en superficies lisas y no en saliva quizás fuese debido a una mayor capacidad adherente de dicha cepa a tejidos duros, a no haberse “desprendido” casualmente de los mismos en el momento de la toma o a su paso con rapidez al tracto digestivo. Lógicamente también pensamos que pudo deberse a un fallo en el procesado de la muestra, sin embargo esta hipótesis fue descartada tras corroborarse el mismo resultado en tres cultivos realizados en tres días distintos.

La diferencia en el número de genotipos aislados de placa y saliva también podría ir ligada a las mismas circunstancias ya comentadas o a propiedades inherentes a cada cepa. Es cierto que estamos de acuerdo en que conocer la composición exacta de la microbiota cariogéna sería lo ideal para predecir el riesgo de la enfermedad, pero pretenderlo es una utopía a nivel rutinario. En estos casos los estudios de SM en placas podrían ser complementarios de los de saliva y nunca referidos a un elevado número de sujetos y, esto además es así, porque, como se ha indicado previamente, al menos en nuestro estudio, en la mayoría de las ocasiones se aislaron los mismos genotipos de saliva y en algún tipo de placa. Creemos en resumen que nuestros resultados no invalidan la preferencia de las tomas salivares sobre las de placa.

5.2. Tipificación de *Streptococcus mutans*

Estos procedimientos son fundamentales para explicar el seguimiento epidemiológico de los microorganismos y, en el caso concreto de los EGM, la transmisión de los mismos y si ésta se realiza de forma horizontal o transversal. Aunque en el apartado de revisión doctrinal ya 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^{130,131,132} y la bacteriocinotipia. Referida a esta última nos gustaría resaltar que nuestro grupo de trabajo describió un esquema nuevo, demostrándose como tenía lugar la transmisión vertical de SM¹³³ y como, curiosamente, al comparar la capacidad bactericinógena entre cepas de dos grupos étnicos, la del racial blanco era superior a otro gitano¹³⁴.

Es preciso señalar que la biotipia, aunque no se hace mención a ella en el material y método ni en los resultados, en las fases preliminares de nuestro trabajo fue realizada a 214 cepas provenientes de 20 niños escogidos al azar (11 del Colegio Juan XXIII y 9 del Colegio Padre Manjón). Se llevó a cabo según la sistemática descrita por De la Higuera y cols.¹³⁵. El sistema API ZYM plantea, a la hora de efectuar la lectura, grandes problemas de subjetividad. Para evitar falsear los resultados, se optó por considerar las pruebas positivas únicamente cuando de forma clara objetivamente lo eran y descartando las valoraciones con discretos cambios de color. Siguiendo estos criterios, las actividades enzimáticas que se incluían primitivamente en el esquema (valina arilamidasa, fosfatasa ácida y α -galactosidasa) fueron en el 100% negativas. En el resto de los pocillos se obtuvieron siempre resultados positivos para esterasa (C 4), leucina arilamidasa, naftol-As-Bi-fosfohidrolasa y α -glucosidasa y variaciones mínimas para las otras pruebas. Estos resultados nos han llevado a considerar el sistema API ZYM con nulo poder discriminativo para ser usado co-

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

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

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

133 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

134 Baca P, Liébana J, Baca A. Estudio *in vitro* de la capacidad bacteriocinógena de streptococci mutans. *Avanc Odontostomatol* 1991; 6: 471-474.

135 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.

mo marcador diferencial infraespecífico en SM y no se volverán a efectuar más comentarios al respecto.

Con la aparición de las técnicas moleculares y genéticas¹³⁶, 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 doctrinal las diferentes técnicas genotípicas: análisis de plásmidos, REA, RFLP y PFGE. Distintos autores publican estudios^{137,138,139}, en donde 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-PCR¹⁴⁰ (*Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction*) o RAPD o RAPDNA (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

5.2.1. Metodología de la AP-PCR o RAPD o RAPDNA

➤ Primers

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)^{141,142,143} que sin embargo es la de referencia, pero que por lo señalado la hace menos 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.

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

137 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.

138 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.

139 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.

140 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.

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

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

143 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.

El grupo de investigación del *St. Thomas Dental Institute* de Londres, en uno de sus trabajos¹⁴⁴, señala 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 en 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 otros¹⁴⁵ 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 finlandés de Saarela y cols.¹⁴⁶, 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 Caufield¹⁴⁷ de la Universidad de Alabama en EE.UU. En el trabajo original lo eligen tras comparar 40 oligonucleótidos amplificando 3 cepas patrones. 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 Québec¹⁴⁸, cuyo objetivo era la identificación y tipificación de estreptococos orales, incluido SM, examinaron 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

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

145 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.

146 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.

147 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.

148 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.

que han podido diferenciar especies, pero no son específicos como para establecer genotipos.

El grupo sueco de Emanuelsson^{149,150,151,152} 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-02¹⁵³.

En un estudio anterior llevado a cabo en 2002 en el seno de nuestro grupo de investigación, Arancegui¹⁵⁴ 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.

A partir del año 2004 la mayoría de los autores que realizaron estudios de genotipia de SM se inclinaron por el uso de AP-PCR empleando 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 Kokabas¹⁵⁵, 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 encontraron similitud entre los genotipos de los esposos entre sí.

El grupo científico de Nascimento y cols.¹⁵⁶, emplearon AP-PCR con cebadores OPA-02 y OPA-13 para el estudio de SM de 9 adultos con caries en distintos puntos de la cavidad oral, con el fin de

149 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.

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

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

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

153 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.

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

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

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

trazar un mapa de distribución de genotipos en un mismo individuo, así como su relación con el estado de salud bucodental.

En 2004 Liu y cols.¹⁵⁷, 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 2005 otros autores asiáticos Li y cols.¹⁵⁸, 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 cols.¹⁵⁹, 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.

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 (véase la tabla 6 en la que se esquematizan algunos de los resultados obtenidos por los autores señalados anteriormente).

➤ **Condiciones de la AP-PCR.**

En realidad las usadas por los diversos autores son muy variadas, lo que nos ratifica en la necesidad de unificar los criterios y poder realizar comparaciones fiables de los resultados finales.

Extracción del ADN.

Tampoco coinciden los grupos de investigación respecto a la mejor extracción del ADN. A continuación se recogen algunos ejem-

157 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.

158 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.

159 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.

plos; Caufield y Walker¹⁶⁰ así como también Rudney y cols.¹⁶¹, usaron una técnica con cloroformo. Poyart y cols.¹⁶², al igual que De Lamballerie y cols.¹⁶³, utilizaron un método comercial; Igarashi y cols.¹⁶⁴ y Shiroza y cols.¹⁶⁵, siguieron una técnica basada en la purificación con cloroformo, empleando la centrifugación para la disrupción bacteriana; Boom y cols.¹⁶⁶, 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.

Amplificación del ADN.

Li y Caufield, en 1998¹⁶⁷, emplearon unas condiciones bien diferentes a un trabajo posterior de 2001¹⁶⁸ pero curiosamente citan al primero como referencia del segundo. En la fase inicial de esta tesis utilizamos la metodología de 1998 con resultados insatisfactorios. Por ello en la totalidad de este trabajo se prefirió seguir las condiciones descritas en el trabajo de 2001. Pese a ello otros autores siguen usando, de forma incomprensible las de 1998^{169,170}.

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

161 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

162 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.

163 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.

164 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

165 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.

166 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 199; 28: 495-503.

167 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

168 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

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

170 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 grupo¹⁷¹ se utilizaron geles de poliacrilamida enumerándose las ventajas sobre los de agarosa; a saber, que no debe recurrirse al uso de luz ultravioleta para el examen, que puede emplearse cada gel para un mayor número de muestras, que no es necesario fotografiar las cubetas para archivar los resultados ya que se emplea un escáner de alta definición común, y que el personal no resulta expuesto 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%^{172,173,174} y esa ha sido la técnica seguida por nosotros, ya que estando de acuerdo con lo señalado en relación a los geles de poliacrilamida, su menor complejidad la hace más asequible para el estudio de un amplio número de cepas

Lectura de bandas

Efectuadas las amplificaciones del material genético bacteriano, se encontró con una cierta dificultad para la lectura de las bandas separadas por electroforesis. Un número importante de investigadores^{175,176,177,178,179,180} solo realizan una lectura visual de las bandas, mientras que otros, incluso algunos de los anteriores, emplean diversos programas de análisis^{181,182,183,184} o bien una mezcla de ambos

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

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

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

174 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

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

176 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.

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

178 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.

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

180 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: 417-21

181 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

182 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.

procedimientos¹⁸⁵. Este último ha sido el seguido por nosotros: los patrones de bandas inicialmente, a modo de screening, se analizaron visualmente. A las cepas seleccionadas de esta forma les fue aplicado el programa Fingerprinting II Informatix™ Software (BioRad, Laboratorios, Inc. California, Usa).

Mientras que para establecer la identidad de genotipos, unos autores utilizan el coeficiente de Dice^{186,187,188,189,190} otros, minoritariamente, emplean el de Pearson¹⁹¹. En nuestro estudio hemos empleado este último. Consideramos que 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 Dice¹⁹². El primero calcula los valores de similaridad basándose en las curvas densitométricas derivadas del patrón de bandas. Por el contrario el segundo compara las bandas en una posición concreta y calcula la probabilidad de que sea la misma o diferente¹⁹³. Nuestra opinión personal, es que el coeficiente de Pearson se acerca más a la realidad, porque no sólo consideraría la presencia o ausencia de bandas, sino también su intensidad: dos de ellas con el mismo tamaño no tienen porque ser iguales si poseen distinta intensidad.

Existe igualmente una amplia diversidad de criterios para establecer el punto de corte a la hora de reconocer dos cepas genética-

183 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;42:4620-6

184 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.

185 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.

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

187 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.

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

189 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: 4620-6

190 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.

191 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.

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

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

mente idénticas: desde 90%¹⁹⁴ a 100%¹⁹⁵ pasando por valores intermedios¹⁹⁶. En nuestro caso, y por las razones ya señaladas en el material y método, 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, es excepcional llegar al 100%; esa es, al menos, nuestra experiencia

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

195 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.

196 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.

5.3. Genotipos de *Streptococcus mutans*, ecología oral y enfermedad cariogénica.

5.3.1. Número de cepas por niño.

Una de las incógnitas aún no completamente resuelta, es el número de cepas diferentes de EGM que colonizan a un individuo y que por lo tanto participarían en el proceso carioso. En el estudio realizado en 1996 por Alaluusua y cols.¹⁹⁷, realizado en parejas madre-hijo, se observó que en el 58.33% de los niños de 1.5 a 3 años, se aislaba un sólo ribotipo y en el resto, dos ó tres; en las madres, el 33.3% portaba un sólo ribotipo. Grönroos y Alaluusua¹⁹⁸, estudiando 7 niños, entre tres y siete años, encuentran que el 28.56% presentaba un genotipo; el 42.86%, dos; el 14.29%, tres y, finalmente, el 14.29%, cuatro genotipos. En este estudio el número muy reducido de pacientes hace difícil una comparación, con respecto a la población seleccionada para nuestro trabajo. Mattos-Graner y cols.¹⁹⁹, 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. Emanuelsson y cols.²⁰⁰, quienes trabajaron con 11 familias, padre-madre-hijo, encontraron un 38.1% de adultos con un solo genotipo; mientras que con dos, estos autores obtuvieron también un 38.1%; para tres y cuatro genotipos dan valores del 19.05% y 4.76% respectivamente. En otros trabajos las cifras también son muy variables, desde dos a diez²⁰¹, siete por individuo²⁰² o uno a cinco²⁰³. Los resultados obtenidos por nosotros guardan cierta semejanza con los de Liu y cols.²⁰⁴, en los cuales la mayoría de la población que estudiaron poseía un sólo genotipo. Así pues, en nuestro trabajo, los escolares presentaban una escasa colonización por SM ya que de 75, 18 no poseían ningún genotipo (24%), 41 niños presentaban uno sólo

197 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.

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

199 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.

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

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

202 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

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

204 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.

(54.66%) y 16, dos (21.33%). No se encontraron sujetos con tres o más.

Las diferencias entre los diversos estudios pueden deberse a varios factores:

1. Poblacionales. En muchos trabajos parten directamente de muestras que están altamente colonizadas por los EGM, de origen geográfico diferente y edades diversas.

2. Metodológicas. Tal como se ha visto, diversos autores incorporan variaciones a la técnica de la AP-PCR que pueden dar lugar a resultados no totalmente comparables. Ya han sido comentados la utilización de diversos cebadores, distintos métodos de lectura de bandas, criterios de similitud diferentes etc.

5.3.2. Transmisión horizontal.

Mientras que la transmisión vertical de los EGM es un hecho claramente demostrado desde antiguo, cuando se preconizaban métodos fenotípicos²⁰⁵ y también usando la genotipificación^{206,207,208,209,210}, no ocurre igual con la horizontal.

Mattos-Graner y cols.²¹¹, encontraron genotipos compartidos por niños y adolescentes del mismo curso, también esos mismos genotipos aparecieron en individuos de otros establecimientos y edades, por lo que no se puede descartar, pero tampoco afirmar, que exista una transmisión horizontal de SM. Los mismos autores ya señalados, trabajando con niños de 12 a 30 meses de edad, de una guardería infantil, en la que permanecen 10 horas por día y 5 días por semana, encuentran una baja transmisión horizontal y dejan entrever que esta

205 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.

206 Kohler B, Lundberg A, Birkhed D, Papapanou P. Longitudinal study of intrafamilial mutans streptococci ribotypes. A Eur J Oral Sci 2003; 5: 111-383.

207 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

208 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.

209 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 .

210 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; 42:4620-6.

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

sería mayor en individuos altamente colonizados. En otro trabajo anterior, Saarela y cols.²¹², también sugieren, pero no de forma taxativa, una transmisión horizontal entre esposos, y otro tanto señalan Ersin y cols.²¹³. Tampoco Klein y cols.²¹⁴, la encuentran en su estudio y abren la puerta a otras posibles vías de transmisión.

Nuestros resultados demuestran un porcentaje alto de escolares que comparten genotipo aunque existen variaciones significativas entre una institución y otra. Así en el Juan XXIII en los siete grupos de homología establecidos en los 30 escolares en los que se le detectó SM, 18 (60%) compartían genotipos, 2 niños en los grupos I, II, III y VII, 3 en el V y VI y 5 en el IV. Por el contrario en el Colegio Padre Manjón en los cinco grupos de homología en los 27 escolares en los que se aisló SM, solo 10 compartían genotipos (37.03%), 2 niños en todos ellos. Si tenemos en cuenta que existe una alta variabilidad genotípica de EGM esas coincidencias no parecen ser debidas al azar sino a una transmisión horizontal real, lo cual tiene una plausibilidad biológica.

5.3.3. Número de genotipos y caries.

En este sentido tampoco los resultados obtenidos por los diversos autores muestran uniformidad. Así en un estudio realizado por Mattos-Graner y cols. en Brasil²¹⁵, se señala que no existe asociación entre diversidad genotípica, edad, número de dientes erupcionados, recuentos de EGM o prevalencia de caries. Liu y cols.²¹⁶ y Kamiya y cols.²¹⁷, tampoco encuentran relación entre número de genotipos y caries. Cogulu y cols.²¹⁸ señalan que los niños con síndrome de Down, presentan menores índices de caries y los genotipos eran diferentes al grupo control.

212 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.

213 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.

214 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; 42:4620-6

215 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.

216 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

217 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.

218 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.

Llegados a este punto, y años antes Alaluusua y cols.²¹⁹, 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. Estos datos no han sido confirmados por ningún otro autor para población adulta ni escolar.

Nuestros resultados, sin embargo, sí parecen corroborar lo señalado por estos autores. Aunque si analizamos las dos instituciones de forma independiente se han obtenido resultados distintos. En el Colegio Juan XXIII los índices de caries son mayores en escolares con dos genotipos frente a los que presentaban un genotipo. En el Colegio Padre Manjón, aunque se observa la misma tendencia las diferencias no tienen significación estadística. Por otra parte la distribución y gravedad de la caries no es la misma en ambas instituciones, por ejemplo en el Colegio Juan XIII siete de 42 niños tienen un índice cos mayor de uno, mientras que en el Padre Manjón solo dos de un total de 33 escolares tienen este índice tan elevado.

En otro orden de cosas, y aunque no hemos encontrado datos sobre este particular en la bibliografía consultada, en nuestro estudio el que los escolares compartan o no genotipos no muestra una asociación estadísticamente significativa con los recuentos en CRT[®] Bacteria EGM, cod y cos, solo con los recuentos en CRT[®] Bacteria LB.

A la vista de los resultados obtenidos en esta tesis, y comparándolos con los de otros autores, podemos observar bastantes datos discordantes. Esto puede ser debido a diversas causas, pero de forma especial a la falta de uniformidad en las técnicas para la detección de genotipos y a que la caries, al ser un proceso multifactorial, se ve influido por factores que no son los mismos en todos los lugares. Quedan pues 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.

219 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.

6. Conclusiones

1. El estudio de los estreptococos del grupo mutans a partir de la saliva y placa de escolares granadinos, utilizando como medio de aislamiento agar MSB, permitió obtener un elevado porcentaje de *Streptococcus mutans* seguido a gran distancia de *Streptococcus sobrinus*. El número de *Streptococcus rattii* y *Streptococcus criceti* fue intrascendente. Una gran cantidad de colonias fueron identificadas como estreptococos orales no mutans, quedando así demostrada la baja selectividad del agar MSB.
2. En casi un tercio de los escolares estudiados no se pudo aislar ninguna colonia compatible con estreptococos del grupo mutans. En aquellos niños que sí estaban colonizados por *Streptococcus mutans*, no existía una gran diversidad genética, detectándose un genotipo en el 72% y dos genotipos en el resto.
3. La mayoría de los genotipos obtenidos a partir de placas de superficies lisas y oclusales coinciden con los detectados en saliva.
4. Hay una correlación entre número de genotipos aislados por escolar y recuentos de estreptococos del grupo mutans mediante el sistema CRT[®] Bacteria aunque no con los de los lactobacilos. Así mismo se ha demostrado correlación con los índices de caries en dentición temporal cod y cos
5. De nuestros resultados se deduce que en algunos casos existe transmisión horizontal de genotipos en los escolares estudiados, aunque hay claras diferencias entre el Colegio Juan XXIII (más de la mitad) y el Colegio Padre Manjón (menos de la mitad).
6. Los niños que comparten genotipos tienen recuentos de lactobacilos superiores a los que no los comparten. Esta situación no se ha demostrado para los índices de caries ni para los recuentos de estreptococos del grupo mutans.

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, Joussimies-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. Arancegui N. Importancia epidemiológica de la genotipificación de *Streptococcus mutans* en escolares granadinos. Tesis Doctoral. Universidad de Granada 2002.
5. 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.
6. 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.
7. Baca P, Liébana J, Baca A. Estudio in vitro de la capacidad bacteriocinogena de streptococci mutans. Avanc Odontoestomatol 1991; 6:471-474.
8. 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.
9. Baca P. Saliva y microbiota oral. Simposio sobre Saliva y Salud Dental. Valencia. Promolibro, 1998, pp. 93-111
10. Beighton D, Hardie J, Whiley R. A scheme for identification of viridans streptococci. J Med Microbiol 1991; 35: 367-372.
11. Berkowitz R, Jones P. Mouth-to-mouth transmission of the bacterium *Streptococcus mutans*. Between mother and child. Arch Oral Biol 1985; 30: 377-379.
12. Bravo M, Casals E, Cortes J. Encuesta de salud oral en España 2005. RCOE 2006 (en prensa).
13. Bratthall D. Immunodiffusion studies on the serological specificity of streptococci resembling *Streptococcus mutans*. Odontol Rev 1969; 20: 231-243.
14. Bratthall D. Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling *Streptococcus mutans*. Odontol Rev 1970; 21: 143-152.
15. 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.
16. Boom R, Sol C, Salimans M, Jansen C, Wertheim-Van Dillen P, Van Der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol 1990; 28: 495-503.

17. Caufield P, Walker T. Genetic diversity within *Streptococcus mutans* evident by chromosomal DNA restriction fragment length polymorphisms. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 274-278.
18. 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.
19. 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.
20. Consejería de Salud (Junta de Andalucía). Encuesta de Salud bucodental en escolares andaluces 2001. Sevilla: Junta de Andalucía 2002.
21. Cuenca E. La encuesta de la OMS sobre la salud bucal en España. Una aproximación personal. *Arch Odontoestomatol* 1986; 2: 15-22.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. Emanuelsson I. Mutans streptococci in families and on tooth sites. Studies on the distribution, acquisition and persistence. *Swed Dent J Suppl* 2001; 148-166.
26. Emanuelsson I, Carlsson P, Hamberg K, Bratthal D. Tracing genotypes of mutans streptococci on tooth sites random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 24-29.
27. Emanuelsson I, Carlsson P, Hamberg K, Bratthal D. Tracing genotypes of mutans streptococci on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 24-9.
28. 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.
29. Emanuelsson I, Wang X. Demonstration of identical strain of mutans streptococci within Chinese families by genotyping. *Eur J Oral Sci* 1998; 106: 788-794.
30. Emanuelsson I., Thornqvist E.; Genotypes of mutans streptococci tend to persist in their host for several years. *Caries Res* 2000; 34: 133-139.
31. Emanuelsson I., Thornqvist E. Distribution of mutans streptococci in families: a longitudinal study. *Acta Odontol Scand* 2001; 59: 93-98.
32. Encuesta andaluza en escolares 2006. Consejería de Salud de la Junta de Andalucía. Informe técnico.
33. 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.
34. Facklam R. What happened to streptococci overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 616-630.

35. 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.
36. Gold O, Jordan H, Van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 1973; 18: 1357-1364.
37. 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.
38. Gold O, Jordan H, Van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 1973; 18:1357-1362.
39. Grönroos L, Alaluusua S. Site-specific oral colonization of mutans streptococci detected by arbitrarily primed PCR fingerprinting. *Caries Res* 2000; 34: 474-480.
40. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* 1980; 44: 331-384.
41. Hamada S, Ooshima T. Production and properties of some bacteriocins of *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Bioll* 1975; 20: 641-648.
42. Hildebrandt G, Bretz W. Comparison of culture media and chairside assays for enumerating mutans streptococci. *J Appl Microbiol* 2006; 100: 1339-1347.
43. 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.
44. 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.
45. Jordan C, LeBlanc D. Influences of orthodontic appliances on oral populations of mutans streptococci. *Microbiol Immunol* 2002; 17: 65-67.
46. 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.
47. Kelstrup J, Gibbons RJ. Bacteriocins from human and rodent streptococci. *Arch. Oral Biol* 1969; 14: 251-258.
48. Kimmel L, Tinanoff N. A modified mitis salivarius medium for a caries diagnostic test. *Oral microbial Immunol* 1991; 6: 275-279.
49. 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: 4620-646.
50. Kohler B, Lundberg A, Birkhed D, Papapanou P Longitudinal study of intrafamilial mutans streptococci ribotypes. *Eur J Oral Sci* 2003; 111: 383-389.
51. 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.

52. 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.
53. 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.
54. Krasse B, Sweden G. Bacteriological factors as indicators of future caries. *Int Dent J* 1988; 38: 219-225.
55. 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.
56. 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. 41-62.
57. 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.
58. 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.
59. 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.
60. Li Y, Caufield P. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. *J Dent Res* 1995; 74: 681-684.
61. 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.
62. 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.
63. 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.
64. 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.
65. 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.
66. 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.
67. Li Y, Caufield, P. Detection of mutA genes in transmitted strains and non-transmitted strains of mutans streptococci. *Caries Res* 2005; 39: 417-21.

68. 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.
69. 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.
70. 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.
71. Llodra J, Bravo M, Cortes J. Encuesta de salud oral en España 2000. *RCOE* 2002; 7: 19-63.
72. 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.
73. Loesche W. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev* 1986; 50: 353-380.
74. 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.
75. 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.
76. 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.
77. *Microbiología General y Bucal* [pagina web]. Disponible en la siguiente dirección web: www.ehu.es/~oivmoral/microral.html. [Acceso septiembre 2006].
78. Mineyama R, Yoshino S, Fukushima K. Genotypic analysis of strains of mutans streptococci by pulsed-field gel electrophoresis. *Microbiological Research* 2004; 159: 181-186.
79. Nadal-Valladura A. Caries dentaria. Etiología. En Nadal-Valladura A, ed. *Patología dentaria*. Barcelona: Rodas 1987, pp.207-216.
80. Nascimento M, Hofling J, Gonçalves R. *Streptococcus mutans* genotypes isolated from root and coronal caries. *Caries Res* 2004; 38: 454-463.
81. Nie M, Fan M, Bian Z. Transmisión of mutans streptococci in adults within a Chinese population. *Caries Res* 2002; 36:161-166.
82. Noguerol B, Llodra J, Sicilia A, Follaza M. La salud bucodental en España 1994. Antecedentes y perspectivas de futuro. Madrid. *Avances Medico-Dentales* 1995.
83. Olive D, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1661-1669.
84. Organización Mundial de la Salud. Encuestas de salud bucodental. Métodos básicos. Ginebra: Organización Mundial de la Salud 1997. p. 41.

85. Perch B, Kjems E, Ravn T. Biochemical and serological properties of *Streptococcus mutans* from various human and animal sources. *APMIS* 1974; 82: 357-370.
86. 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.
87. Powell L. Caries prediction: a review of literature. *Community Dent Oral Epidemiol* 1998; 26: 361-371.
88. Rogers A. The source of infection in the intrafamilial transfer of *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 1981; 15:26-31.
89. Rogers A. Bacteriocinogeny and the properties of some bacteriocins of *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol* 1976; 21: 99-104.
90. Rogers A. Bacteriocin patterns of strain belonging to various serotypes of *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol* 1976; 21: 243-249.
91. 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.
92. Russell R. The application of molecular genetics to the microbiology of dental caries. *Caries Res* 1994; 28: 69-82.
93. 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.
94. 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.
95. Saarela M, Von Troil-Lindén B, Torkko H, Stucki A, Alaluusua H, Joussimies-Somer H, Asikainen S. Transmission of oral bacterial species between spouses. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8: 349-354.
96. Salas-Wade M. Dental caries Experiencia in 7-12 and 14-year-old children in Andalucía, Spain. *Community Dent Oral Epidemiol* 1994; 41: 135-41.
97. 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.
98. 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.
99. 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.
100. Shklair J, Keene H, Simonsen L. Distribution and frequency of *Streptococcus mutans* in caries active individuals. *J Dent Res* 1972; 51: 882-887.

101. Sicilia A, Cobo J, Noguerol B y cols. Prevalencia de caries en los niños y jóvenes escolares españoles de 7-12 y 15-19 años. Arch Odontoes-tomatol 1990; 6: 323-330.
102. Subirá C. La caries en el paciente de edad avanzada. En Bullón Fer-nández P. Odontoestomatología geriátrica. Madrid: IM&C 1996, pp.175-195.
103. 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 sa-liva. Comun Dent oral Epidemiol 1996; 24: 159-163.
104. Tanzer J, Borgesson A, Larskowski L, Kurasz A, Testa M. Glucose-sucrose-tellurite-potassium-bacitracine agar, an alternative to mitis sali-varius-bacitracine agar for numeration of *Sreptococcus mutans*. J Clin Microbiol 1984; 20: 635-659.
105. Tedjosongko U, Kozai K. Initial adqusition and transmission of mu-tans streptococci in children al day nursey. ASDC J Dent Child 2002; 69: 234-235.
106. Troung T L, Ménard C, Moutond C, Trahan L. Identification of mutans and other oral streptococci by random amplified polymorphic DNA aná-lisis. J Med Microbiol 2000; 49: 63-71.
107. Van Houte J. Role of microorganism in caries etiology. J Dent Res 1994; 73: 672-681.
108. Van Houte J. Microbiological predictors of caries risk. Adv Dent Res 1981; 89: 19-25.
109. Van Palestein W, Ljsseldij M, Huis I, Veld J. A selective médium for the two major subgrups of the bacterium *Sreptococcus mutans*. Arch Oral Biol 1983; 28: 599-603.
110. Vauterin L, y Vauterin P. Computer-aided objective comparison of elec-trophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. Eur. Microbiol 1992; 1: 37-41.
111. Whiley R, Beighton D. Current classification of the oral streptococci. Oral Microbiol Immunol 1998; 13: 195-226.
112. Williams J, Kubelik A, Livak K, Rafalski J, Tingey S. DNA polymor-phisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 1990; 18: 6531-6535.
113. Yokoyama E, Uchimura M. Optimal settings of fingerprint-type analys-ing computer software for the analysis of enterohaemorrhagic *Es-cherichia coli* pulsed-field gel electrophoresis patterns. Epidemiol Infect 2006; 134: 1004-1014