



IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN CEPILLOS DENTALES DE PACIENTES CON VARIADA ACTIVIDAD CARIOGÉNICA

Trabajo de Investigación requisito para optar al Título de Cirujano Dentista

Alumnos: María José Olivares Gómez
Sebastián Rebolledo Fernández
Katherine Urrea Valdés

Docente Guía: Prof. Dra. Alexandra Guerrero Devlahovic
Cátedra de Odontopediatría

Valparaíso – Chile
2010

DEDICATORIAS

Quisiera dedicar este trabajo a mi familia, especialmente a mis papás, René y Janet; y hermanos René, Laura y Valentina, que han sido mi fortaleza durante todos estos años de estudio, que me han entregado su amor y apoyo incondicional para alcanzar mis metas y sin quienes definitivamente no lo habría logrado. El esfuerzo de ustedes se ha convertido en su triunfo y el mío. Los amo con todo mi corazón.

A Pablo, por su comprensión y ayuda en este trabajo, por este tiempo juntos y por hacerme tan feliz.

A mi abuelo Pedro, mi Papito Pelluco, por su preocupación hasta el último minuto y quien me impulsó siempre a salir adelante. Te extraño y espero que donde estés te sientas orgulloso de mí.

A mis compañeros tesistas, Seba y Jo, por su paciencia, alegría y ánimo de tantos años y en este trabajo que compartimos y que finalmente ha llegado a feliz término. A mis demás amigos, también les agradezco su apoyo, los quiero mucho.

A Dios, por iluminar el camino que me ha llevado hasta este momento y por poner en él a las personas con las que lo he recorrido.

A todos ellos, muchísimas gracias...

Katherine Urrea V.

A mi mamá, por su apoyo incondicional durante todo este largo proceso, por ser mi paciente estrella, y por darme siempre la fuerza para seguir adelante.

A mis hermanos Nicolás y Andrés, por su desinteresado amor y por hacerme siempre feliz. A primo Pablo Andrés, por ser un hermano más y estar conmigo en todas!!.

A mis hermosos abuelitos, Juanita y Waldo, por no fallar nunca conmigo y estar en cada etapa de mi vida dándome un apoyo único e incondicional, por sus consejos y porque siempre supieron escucharme y aconsejarme de la mejor manera.

A mi pololo Andrés, por creer siempre en mí, por su amor, paciencia y comprensión.

A mis amigos y compañeros de trabajo, que siempre tuvieron una palabra de aliento en los momentos de cansancio y una sonrisa para compartir en la alegría.

A mis amigos y compañeros de tesis, Katty y Seboh, por su comprensión, su compañerismo e incondicional ayuda, por haber estado en las buenas y en las malas, les agradeceré toda la vida amigos lindos!!!!

María José Olivares Gómez

A mi papá y mi mamá, por darme todo su apoyo y haber sacrificado tanto para poder llegar a esta instancia. Los quiero mucho.

A mis amigos, los de siempre, que han estado conmigo en todo momento y circunstancia. Y a Jo y Katty, mis compañeras de tesis, sin quienes esto no podría haber llegado a tan buen puerto. Han sido 6 largos años juntos, y he aprendido a conocerlas y quererlas. Un beso para ambas.

Sebastián Rebolledo F.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación no habría sido posible sin la colaboración de las siguientes personas:

- Dra. Alexandra Guerrero D., Docente Guía de nuestra tesis y Docente de la Cátedra de Odontopediatría de la Universidad de Valparaíso, por la confianza depositada en nosotros y por su apoyo durante la realización de esta investigación.
- Dra. Rosa Moya Calderón, Directora Pregrado Escuela de Odontología de la Universidad de Valparaíso, por demostrar interés en nuestra investigación, colaborando en todo aspecto para que ésta se llevara a cabo.
- Dr. Jorge Torres, Docente de la Cátedra de Microbiología de la Universidad de Valparaíso, por su orientación y dirección en la realización de la etapa de toma de muestra, siembra y cultivo bacteriano de nuestra investigación.
- Dra. Nora Silva Steffens, Directora (S) de la Escuela de Odontología Pregrado de la Universidad de Chile, por su orientación en la adquisición de medios de cultivo bacteriano.
- Sra. Leila Gómez Carranza, Tecnólogo Médico, encargada de Laboratorio Clínico Bucomaxilofacial de la Universidad de Chile, por la confección de medios de cultivo TYCSB, utilizados en nuestra investigación.
- Sra. Cecilia Carvajal S., Jefa del Laboratorio de Asistencia Técnica de la Escuela de de Alimentos, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile (PUCV), por facilitarnos las instalaciones e implementos necesarios para la realización de los medios de cultivo.
- Sra. Olaya Leiva C., Tecnólogo Médico, encargada del Laboratorio de Asistencia Técnica de la Escuela de Alimentos, PUCV, por su dirección, orientación y asistencia en la realización de medios de cultivo necesarios para nuestra investigación.
- Al personal del Laboratorio de Asistencia Técnica de la de la Escuela de Alimentos, PUCV, por su amabilidad y disposición durante nuestras visitas al lugar.
- Sra. Dini Vergara R., Encargada de Adquisiciones y Almacén de la Escuela de Odontología de la Universidad de Valparaíso, por su cooperación y celeridad en la adquisición de insumos.
- Al Servicio de Esterilización de la Facultad de Odontología, especialmente a Rodolfo, por la esterilización de los materiales utilizados y cultivo bacteriano en las estufas.
- Al personal de Biblioteca, Marcos y Elena, por su voluntad para solucionar nuestros problemas.
- A todos los auxiliares de nuestra Escuela que nos ayudaron siempre con gran disposición y cariño.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
1. Caries dental	5
1.1 Estado actual de la caries	5
1.2 Triada de Keyes	8
1.3 Biofilm	8
1.3.1 Cariogenicidad del Biofilm	9
1.4 Microorganismos como agente etiológico principal de la caries	10
1.4.1 <i>Streptococcus mutans</i>	11
1.4.2 <i>Lactobacillus spp.</i>	13
2. Actividad cariogénica	15
3. Higiene bucal	15
3.1 Cepillos dentales	16
3.1.1 Contaminación microbiana de cepillos dentales	18
4. Identificación y cuantificación de Microorganismos	20
4.1 Identificación y cuantificación de <i>Str. mutans</i>	20
4.2 Identificación y cuantificación de <i>Lactobacillus spp.</i>	21
III. OBJETIVOS	22
1. Objetivo general	23
2. Objetivos específicos	23
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	24
1. Tipo de estudio	25
2. Área de estudio	25
3. Universo	25
4. Muestra	25
5. Unidad de estudio	25
6. Variables	25
7. Criterios de exclusión	28
8. Metodología de trabajo	29
8.1 Examen clínico e instrucciones	29

8.2	Elaboración de medio de cultivo Agar SL Rogosa (Biomark®)	30
8.3	Elaboración de medio de cultivo TYCSB	33
8.4	Método de toma de muestra del cepillo de uso	34
8.5	Dilución, siembra e incubación	35
8.6	Calibración	38
8.7	Petitorios	38
9.	Análisis de datos	39
V.	RESULTADOS	40
VI.	DISCUSIONES	45
VII.	CONCLUSIONES	49
VIII.	SUGERENCIAS	51
IX.	RESUMEN	53
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
XI.	ANEXOS	63

I. INTRODUCCIÓN

La aparición y desarrollo de la caries está gobernada por complejos mecanismos iniciados por múltiples factores, entre los que se incluyen un hospedero susceptible, microorganismos cariogénicos, una dieta rica en carbohidratos fermentables y el tiempo en que interactúan estos factores, generando un desequilibrio entre los procesos de desmineralización y remineralización en la estructura dentaria.

La caries es una enfermedad infecciosa polimicrobiana, donde cada especie bacteriana puede contribuir colectivamente a la cariogenicidad total del biofilm dental y, consecutivamente, en el desarrollo de lesiones cariosas, como lo señala la “Hipótesis de placa específica”. Actualmente es aceptada la “Hipótesis ecológica de placa” como teoría explicativa del proceso de caries dental, la cual propone que la des y remineralización son el resultado de un desbalance en la microbiota residente provocado por un cambio en el entorno local.

Dentro del factor microbiano, según Brown, la presencia de bacterias es fundamental para el inicio y progresión de las lesiones, es decir, sin bacterias no hay caries. Las bacterias presentes en la cavidad oral se encuentran unidas entre sí por una matriz de proteínas y carbohidratos, que además actuará como fuente nutritiva para ellas. Éstas se depositan sobre la película formada por las proteínas propias de la saliva, o película adquirida, conformando el biofilm dental, el cual puede tener un carácter ácido o básico según sea el tipo de bacterias que predominan en ella. Entre los métodos que se utilizan actualmente para determinar el riesgo y actividad cariogénica, se realiza el recuento en saliva de microorganismos identificados como agentes etiológicos, entre ellos encontramos aquellos del grupo *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus spp.*

El *Streptococcus mutans* es reconocido como el principal agente etiológico de la caries, su colonización en la microbiota bucal se inicia con la erupción dentaria y se mantiene mientras existan dientes en boca. Esta bacteria es encontrada principalmente en las etapas iniciales de la caries y en la progresión de la misma, ya que presenta la propiedad patogénica de adherirse a la superficie dental y generar ácidos que causan la desmineralización de los tejidos duros del diente.

Por otra parte, el *Lactobacillus spp.* ha sido asociado históricamente al desarrollo de la caries, debido a su capacidad para producir ácidos orgánicos a partir de los carbohidratos consumidos en la dieta, disminuyendo el pH local, lo que predispone al individuo al ataque bacteriano.

Resultados de estudios epidemiológicos y clínicos sugieren que la distribución de la caries dental en la población no es uniforme. De esto se desprende la inconveniencia de que los programas preventivos y de atención sean globalizados e indiscriminados, ya que se dedicará tiempo y recursos en la protección de pacientes que no lo necesitan, mientras que aquellos que requieren atención prioritaria, viéndose más beneficiados de ello, no lo hacen. Por esto, es de suma importancia comprender la influencia que ejerce la presencia de una u otra especie bacteriana específica en los distintos niveles de actividad cariogénica, sea ésta alta, moderada o baja.

Para la remoción y desorganización del biofilm dental, uno de los elementos ampliamente utilizados es el cepillo dental, el cual se encuentra constantemente expuesto a la contaminación, ya sea por microorganismos propios de la cavidad bucal durante el cepillado, o bien, por aquellos presentes en el ambiente donde se mantiene tras su uso. Existe evidencia de transmisión bacteriana entre individuos y translocación de estas desde tejidos infectados a tejidos sanos.

Este trabajo de investigación pretende relacionar actividad cariogénica y cantidad de colonias de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus spp.* presentes en cepillos dentales de pacientes pediátricos. Además nos permitirá evaluar la necesidad de crear estrategias y recomendaciones respecto a los parámetros de uso, mantención y recambio de estos, de acuerdo a los distintos rangos de actividad cariogénica, con el fin de lograr una disminución de los niveles de infección bucal en cada aspecto que nos sea posible.

I. MARCO TEÓRICO

1. Caries dental

1.1 Estado actual de la caries

La caries dental es una enfermedad de alta prevalencia (Palomer, 2006). Según el informe mundial sobre salud bucodental, la OMS (WHO) ha declarado que se estima que cinco mil millones de personas en el planeta han sufrido caries dental. Si no se atiende oportunamente, afecta la salud general y la calidad de vida de los individuos de todas las edades (WHO, 2003).

Es una de las enfermedades más prevalentes en la población mundial y en Chile afecta al 85% de los niños en edad escolar (Palomer, 2006). El daño producido por caries dental en niños chilenos de entre 6 y 8 años es de 0.93 dientes permanentes afectados (COPD) y 4.19 dientes temporales afectados (ceod) (Ministerio De Salud - Chile, 2005). En la V región, donde fue realizado el estudio, el índice COPD y ceod alcanza los valores de 0.42 y 2.24, respectivamente (Ministerio De Salud - Chile, 2005) (Anexo 11.1; Anexo 11.2).

De acuerdo a la definición entregada por el MINSAL:

“La caries dental es una enfermedad infecto-contagiosa que afecta el tejido calcificado del diente y se caracteriza por desmineralización progresiva de la parte inorgánica y destrucción de la porción orgánica del diente. La lesión cariosa es una manifestación del estado del proceso en un punto del tiempo. La progresión de la caries ocurre cuando se produce el desbalance entre la desmineralización y la remineralización, con la consiguiente pérdida de minerales” (Ministerio De Salud - Chile, 2005).

A través de la historia, diversas teorías han tratado de explicar la etiología de la caries. En un inicio se estableció la *“Hipótesis de placa específica”*, donde sólo algunos de los organismos existentes en la placa dental estarían activamente involucrados en la enfermedad. Luego, apareció la *“Hipótesis de placa no específica”* que consideraba que el proceso cariogénico es causado por la actividad total de toda la placa bacteriana.

Finalmente, es aceptada en la actualidad la *“Hipótesis ecológica de placa”*, la cual propone que los organismos asociados con la enfermedad pueden estar presentes en los sitios de actividad. Los fenómenos de des y remineralización serán el resultado de un cambio en el balance de esta microbiota residente conducido por un cambio en el entorno local. El consumo frecuente de azúcares o la disminución del “clearance” de azúcares (si la secreción de saliva es baja), favorece el crecimiento de especies acidogénicas, acidófilas y acidúricas, lo que predispone un sitio para caries, infiriéndose que la limpieza mecánica y restricciones en el consumo de carbohidratos son importantes en el control del avance de la caries, además de la aplicación de flúor para favorecer la remineralización de la estructura dental dañada.

La caries es producida por la colonización de bacterias específicas, un huésped cuya resistencia no es óptima y un ambiente adecuado, como es la cavidad bucal. La conjunción de estos factores favorece la acidificación local del medio, producidos por los depósitos microbianos adheridos a los dientes en presencia de los carbohidratos fermentables provenientes de la dieta (Keyes y Jordan, 1963; Liébana, 2002; Henostroza, 2007), seguida de la destrucción progresiva del material mineralizado y proteico del diente. A menos que este proceso sea detenido con una terapia específica, puede llevar a la pérdida total de la corona dentaria (Palomer, 2006).

Durante el desarrollo del proceso infeccioso se pueden distinguir 2 fases: una subclínica y otra clínica.

1) Subclínica:

- Contagio con *Streptococcus mutans*.
- Pérdida de minerales a nivel molecular.

2) Clínica:

- Lesión visible clínicamente.
- Formación de cavidad.
- Destrucción coronaria.
- Diseminación de la infección.

Al administrar azúcares sobre el biofilm específico, el pH de la cavidad bucal disminuye rápidamente, desde 7 hasta incluso bajo 5,5, restableciéndose a los 20 minutos (Liébana, 2002). Esta disminución del pH se debe a la producción de ácido láctico, generado principalmente por la actividad fermentadora del *Streptococcus mutans*. Estos ácidos alcanzan la superficie dentaria, produciendo una desmineralización en el esmalte, lo cual se aprecia clínicamente como una mancha blanca en el diente, siendo ésta la primera señal del proceso. Las superficies dentarias en las que se observa este fenómeno son las superficies libres vestibular y lingual, en las caras proximales por debajo del punto de contacto, y en las paredes que limitan las fosas y las fisuras. Clínicamente la desmineralización se ve como un esmalte opaco sin traslucidez tras secar la superficie.

En esta etapa, el esmalte dañado presenta 4 capas:

- 1.- Zona superficial de esmalte.
- 2.- Cuerpo de la lesión.
- 3.- Zona oscura.
- 4.- Zona translúcida.

Estas zonas poseen diferentes porosidades, siendo la más permeable el cuerpo de la lesión, con gran pérdida de mineral, lo que llevará consecuentemente a la pérdida de estructura (cavitación) (Brown et al., 1991).

La mancha blanca presenta etapas de desmineralización seguidas de etapas de remineralización; cuando el proceso de remineralización es mayor que el de desmineralización la caries es reversible. El diente será más resistente a esta desmineralización si posee en su estructura fluoruros, los cuales pueden ser incorporados a su porción orgánica, favoreciendo su remineralización, tanto en la odontogénesis como después de la erupción, siendo más importante ésta última (Brown et al., 1991).

También es posible que los ácidos producidos en la placa bacteriana penetren a través de los cristales de la capa superficial, que aún no se ve afectada, a causa de su alto grado de mineralización, y difunden por el límite amelo-dentinario debido a la permeabilidad del esmalte, hacia la dentina o apatita subsuperficial descalcificándola. Sus constituyentes se difunden hacia la interfaz o placa dental-diente en forma de fosfato de calcio y oxidrilos. Estas sustancias permitirían mantener la viabilidad de los microorganismos cuando la capacidad buffer de la saliva ya no pudiera beneficiarlos por la incapacidad de ésta para penetrar en esa biopelícula. Esta capa se conoce como cuerpo de la lesión, donde la pérdida mineral es más importante (aproximadamente 25%) (Brown et al., 1991).

En la periferia del cuerpo de la lesión es posible observar una zona oscura de remineralización.

La zona de avance de la lesión se encuentra por fuera de la zona oscura con una pérdida de mineral del 1 al 5%. Si no se prevé un cambio en el medio bucal (higiene, dieta, flúor) que favorezca la remineralización, la dentina se verá más o menos afectada. Cuando la superficie del esmalte se fractura, se produce la penetración de microorganismos, sobretodo *Streptococcus mutans* acidógenos, los cuales se alojan en los túbulos dentinarios alternando procesos de desmineralización y proteolíticos, afectando la porción inorgánica y orgánica respectivamente. Toda esta capa es la zona descalcificada e infectada (penetración bacteriana) (Brown et al., 1991).

A continuación se encuentra la zona descalcificada pero no infectada; la dentina esclerótica, la dentina normal y finalmente la dentina reparativa (Brown et al, 1991). La difusión de sustancias ácidas y toxinas produciendo respuesta a nivel de tejido odontoblástico, el cual comienza a calcificar los túbulos dentinarios, liberándose calcio, reteniendo así los ácidos y obliterando los túbulos, originando una capa de dentina irritativa o reparativa. Su formación es producto de alguna alteración o estímulo intenso de los odontoblastos. Frente a este daño la pulpa reacciona produciendo dentina en forma rápida frente a la zona comprometida; los odontoblastos generan una capa de dentina hacia la pulpa que aumenta el espesor de la dentina, para contrarrestar el proceso de irritación; esa dentina se caracteriza por poseer odontoblastos más bajos y los túbulos dentinarios son de trayectoria irregular, con una cantidad de túbulos

dentinarios menor. Si la intensidad del estímulo sobre la dentina es de poca magnitud, el desorden puede ser menor (cambio de dirección menor) incluso sin muerte de odontoblastos, y además de la dentina reaccional, los odontoblastos se van retrayendo y van mineralizando el túbulo dentinario, formando una dentina muy endurecida o dentina esclerótica (Barrancos, 2006).

La difusión de material orgánico a través de los grandes poros característicos de la mancha blanca puede producir un cambio de color y, en este caso, la lesión se denomina mancha marrón.

La etapa más avanzada del proceso de caries es observada como una cavidad profunda, con dentina expuesta, que puede extenderse hasta la pulpa.

1.2 Triada de Keyes

El desarrollo de la caries dental involucra una tríada de factores indispensables: bacterias (biofilm dental), carbohidratos (dieta), y dientes susceptibles (hospedero). Esta triada es conocida como "Triada de Keyes" (Keyes y Jordan, 1963; Borgström et al., 1997; Henostroza, 2007). El proceso esencial involucra la desmineralización del esmalte dentario, y comúnmente también de las superficies radiculares, por una alta concentración de ácidos orgánicos producidos por bacterias en el biofilm dental al degradar los carbohidratos de la dieta. Se sabe que la microbiota del biofilm consiste en una variedad de organismos acidogénicos y no acidogénicos, y que difieren en su composición en distintos sitios de la dentición (van Houte, 1994; Svensäter et al., 2003). El desarrollo de la investigación sobre caries dental durante los últimos 30 años ha establecido la relación dinámica entre los factores de la triada citados anteriormente. Esto significa que la microbiota del biofilm debe ser considerada como un solo componente de un sistema integrado, el que incluye a la saliva en adición a la triada de Keyes. La naturaleza de este sistema es ejemplificada por el profundo efecto de la dieta en la composición (Levy et al., 2003) y actividades de la placa y, por lo tanto, en la actividad cariogénica. (van Houte, 1994; Poeta et al., 2009; Badet et al., 2008).

1.3 Biofilm

El término biofilm, define una comunidad bacteriana metabólicamente integrada, que se adosa a una superficie, viva o inerte, blanda o dura, normalmente en una interfaz líquido-sólido. Dicha comunidad se encuentra espacialmente organizada como una estructura tridimensional, formada por una matriz adherente, en una cuantía que puede exceder la masa bacteriana por un factor de 100 a 1 ó aun más (Henostroza, 2007).

El biofilm de la cavidad bucal, puede definirse como un ecosistema compuesto por estructuras microbianas agrupadas densamente, glucoproteínas salivales insolubles, productos microbianos extracelulares y en menor proporción detritus alimentario, firmemente adheridos a la superficie dentaria. Este biofilm muestra una

organización muy compleja, cuyos microorganismos son capaces de comunicarse entre sí (Henostroza, 2007), que se mantiene relativamente estable en el tiempo a pesar de los cambios periódicos del medio ambiente. La población bacteriana de la placa, o cualquier ecosistema estacionario en la boca, es considerada parásita, lo que significa que requieren de un hospedero para su supervivencia. Cuando el equilibrio es comprometido y un desequilibrante aparece entre las bacterias nativas, ocurren patologías como la caries dental o periodonciopatías (Hamada y Slade, 1980; Escobar, 2004; Badet et al., 2008; Poeta et al., 2009). El metabolismo bacteriano en el biofilm dental, como en todo biofilm, produce gradientes localizadas de pH, oxígeno y nutrientes, así como también acumulación de productos metabólicos, los que en conjunto afectan el sistema. De esa manera, el medio ambiente es modificado formándose microambientes donde coexisten especies que de otro modo serían incompatibles (Henostroza, 2007).

La formación del biofilm dental es el resultado de una serie de complejos procesos, que tienen lugar en la cavidad bucal del hospedero, los mismos que involucran una variedad de componentes bacterianos. Tales procesos se pueden sintetizar en (Henostroza, 2007; García-Godoy y Hicks, 2008; Wolff y Larson, 2009):

- a. Formación de película adquirida: depósito de proteínas provenientes de la saliva y del fluido crevicular, que se establece sobre la superficie del diente debido a un fenómeno de adsorción. La película varía entre 0,1 μm y 3 μm y presenta un alto contenido de grupos carboxilo y sulfatos, lo que incrementa la carga negativa del esmalte.
- b. Colonización por microorganismos específicos, se produce en varias etapas:
 1. Depósito: aproximación inicial de las bacterias a la superficie de la película.
 2. Adhesión: fase irreversible. Participan componentes de la bacteria (adhesinas, puentes de calcio y magnesio) y del hospedero (ligandos, polisacáridos extracelulares), que unen los microorganismos a la película salival. Estas dos primeras fases ocurren durante las primeras cuatro horas.
 3. Crecimiento y reproducción: permite conformar una capa confluyente y madura llamada biofilm dental. Esta fase demanda de 4 a 24 horas.

El biofilm, en relación a la caries dental, funciona de varias maneras. Es un sitio de proliferación y crecimiento bacteriano, una locación de regulación ácido/base en la superficie dentaria, y un reservorio para el intercambio de ión calcio entre el diente y la saliva (Wolff y Larson, 2009).

1.3.1 Cariogenicidad del Biofilm

El grado de cariogenicidad del biofilm es dependiente de una serie de factores (Seif, 1997):

1. La localización de la masa de microorganismos en zonas específicas del diente como son las superficies lisas, fosas y fisuras y superficies radiculares.
2. El gran número de microorganismos concentrados en áreas no accesibles a higiene o autolimpieza.
3. La producción de una gran variedad de ácidos (láctico, acético, propiónico, etc.), capaces de disolver las sales cálcicas del diente.
4. La naturaleza gelatinosa de la placa favorece la retención de compuestos formadores de ella y la difusión de elementos neutralizantes hacia su interior.

Dos características son realmente distintivas como propiedades de las bacterias cariogénicas y ellas son (Seif, 1997):

- La capacidad de transportar rápidamente los azúcares cuando compiten con otras bacterias del biofilm.
- Convertir esos azúcares rápidamente en ácidos, aún bajo condiciones ambientales extremas, como niveles bajos de pH.

Esta combinación de propiedades confiere una ventaja selectiva sobre otras bacterias del biofilm dental. Las bacterias cariogénicas son encontradas naturalmente en este biofilm. Pero a pH neutro, estos microorganismos, producto de la competencia microbiana, representan solo una pequeña proporción del total de la comunidad del biofilm dental. Sin embargo, si la frecuencia de carbohidratos fermentables de la dieta se incrementa, entonces el biofilm permanece mayor tiempo a niveles bajos de pH, debido a la alta producción de ácidos por parte de los microorganismos (Seif, 1997).

1.4 Microorganismos como agente etiológico principal de la caries

El reconocimiento del ácido como el agente etiológico principal en la caries dental, inició una búsqueda por el microorganismo causal de entre la variada microbiota bucal (Klinke et al., 2009). Un criterio crucial para determinar la cariogenicidad es la cantidad de ácido secretado por unidad de tiempo, por lo que muchos autores han estudiado cambios de pH de microorganismos bucales durante su crecimiento. (Klinke et al., 2009)

Dentro de las propiedades patogénicas de los microorganismos cariogénicos, tenemos (Kidd, 2005):

- Transportar azúcar y convertirla en ácido (acidogénico).
- Producir polisacáridos extra e intracelulares, los cuales contribuyen a la matriz del biofilm; los polisacáridos intracelulares pueden ser usados para producción de energía y ser convertidos en ácidos cuando no hay disponible carbohidratos.
- Prosperar en pH bajo (acidúricos).

Así, el pH de la placa disminuye, por lo que un factor vital será la capacidad de los microorganismos de sobrevivir en ambientes ácidos. Los primeros organismos que fueron implicados como agentes cariogénicos específicos fueron los lactobacilos debido a la producción de ácido y supervivencia de éste (van Houte, 1994; Tanzer et al., 2001;

Badet et al., 2008). Su desaparición como principal agente etiológico, fue seguida por un período dominado por el concepto de etiología bacteriana no específica, considerando que durante en la década del '60 el concepto de etiología bacteriana específica fue revivida con el re-descubrimiento del *Streptococcus mutans* (van Houte, 1994). Además de los *Streptococcus* y lactobacilos, el concepto de que otros microorganismos juegan un rol en la desmineralización del esmalte y dentina está apoyado por investigaciones recientes en el desarrollo y avance de la caries en la superficie radicular (Svensäter et al., 2003). Así, el conocimiento acumulado indica que la diversidad entre las bacterias tolerantes al ácido en el biofilm es más grande de lo que se pensó originalmente. Más aun, el número y tipos de estas bacterias varían significativamente entre sitios enfermos y libres de caries, y entre los distintos tipos de lesión, por ejemplo, esmalte y raíz, incipiente y avanzada (Svensäter et al., 2003).

Al determinar la presencia de ciertas especies en cada etapa de avance de la lesión, se ha podido evidenciar que algunas especies bacterianas predominan sólo en las etapas iniciales, y otras predominan exclusivamente en las etapas avanzadas. Este hecho demuestra una sucesión microbiana a lo largo del progreso o avance de la lesión, que puede estar mediado por la dieta y otros factores, tales como un hospedero susceptible y tiempo de evolución (Loesche y Syed, 1973; citado en Nishikawara et al, 2006). Cada lesión de caries representa un ecosistema único, donde las especies microbianas presentes conforman una biopelícula, y en el que ocurren interrelaciones de sinergismo y antagonismo que determinan la presencia y el crecimiento de microorganismos oportunistas más patógenos y la inhibición de microorganismos residentes menos patógenos (Kidd, 2005).

Borgström y colaboradores, reportaron que el método más común usado para identificar pacientes susceptibles a caries es estimando el número de bacterias cariogénicas, como Lactobacilos y *Streptococcus mutans* en saliva o muestras de placa tomadas del paciente. De todas maneras, la relevancia del conteo bacteriano para explicar y predecir el riesgo del paciente de desarrollar caries no ha sido suficiente. La recomendación de Borgström y colegas fue evaluar un factor de patogenicidad, como acidogenicidad de estas bacterias, en el intento de identificar una persona susceptible a caries (Borgström et al., 1997; Nishimura et al., 2008).

Los *Streptococcus* son uno de los grupos microbianos dominantes en la microbiota del biofilm supragingival y, de esta manera, su habilidad de adquirir tolerancia al ácido debería ser de gran importancia para su contribución en el inicio y avance de la caries.

1.4.1 *Streptococcus mutans*

El *Streptococcus mutans* es considerado el mayor agente etiológico en el desarrollo de la caries dental en humanos (Li y Caufield, 1995; Koga-Ito et al., 2003).

Es la especie más frecuente del grupo. Son fundamentalmente anaerobios facultativos, α y γ hemolíticos, catalasa negativos. Su metabolismo es fermentativo con rápida producción de ácido láctico, proceso que lleva a un descenso en el pH del medio, originalmente de 7 hasta 4,2 (Hamada y Slade, 1980; García-Godoy y Hicks, 2008), lo cual es su principal característica (Liébana, 2002). Se aísla en el 70-90% de la población no desdentada y pacientes portadores de la bacteria (resistente a la caries).

Presenta la propiedad patogénica de adherirse a la superficie dental y generar ácidos que causan la desmineralización de los tejidos duros del diente. La adhesión de *Str. mutans* al esmalte dental ocurre por medio de la producción de polímeros extracelulares solubles e insolubles, sintetizados a partir de carbohidratos, los cuales en su conjunto se conoce como biofilm. Estos productos bacterianos impiden la actividad de fagocitos, anticuerpos, enzimas, biodetergentes y antibióticos sobre el microorganismo productor, jugando un particular rol en la protección del agente etiológico (Donlan y Costerton, 2002).

Debido a que la presencia de dientes u otras superficies no descamables es un prerrequisito para establecer la colonización del *Streptococcus mutans*, los infantes adquieren esta bacteria después de la erupción dentaria (Liébana, 2002; Li y Caufield, 1995; Filho et al., 2000). La pregunta de cómo y de quién los niños adquieren esta bacteria no ha sido definitivamente respondida, debido a que la mayoría de los estudios que muestran homologías entre las cepas son transversales, y por lo tanto, comparan el aislamiento después de su adquisición original. Investigaciones previas sugieren que los niños adquieren el *Streptococcus mutans* de sus madres después de la erupción dentaria (Hamada y Slade, 1980; Li y Caufield, 1995; García-Godoy y Hicks, 2008). Esta hipótesis parece razonable, ya que las madres usualmente mantienen contacto íntimo y frecuente con sus hijos en los primeros dos años de vida, cuando el *Str. mutans* es inicialmente transferido (Li y Caufield, 1995).

Por su especial capacidad de colonizar superficies duras, es aislado en la cavidad bucal, sobre todo a partir de placas supragingivales, radiculares y saliva. Los estudios epidemiológicos han demostrado una correlación significativa entre los niveles de estas bacterias en la placa y la saliva con la prevalencia e incidencia de caries (Hamada y Slade, 1980; Babaahmady et al., 1998; Liébana, 2002). Se han aislado en distintas superficies dentarias antes de la aparición de las lesiones y están implicadas en el inicio de las mismas, por lo que su elevado recuento en saliva es un indicador de riesgo cariogénico.

El poder cariogénico de los *Streptococcus* del grupo *mutans* es, aunque con algunas diferencias, muy similar en todas las especies y está muy ligado a la sacarosa, ya que tienen la capacidad de metabolizarla mucho más rápidamente que cualquier otro microorganismo de la cavidad bucal. El *Str. mutans* emplea parte de la sacarosa como fuente de energía para su desarrollo. Para ello posee enzimas invertasas que originan fructosa y glucosa. Ambos azúcares entran a la vía glucolítica para producir fundamentalmente ácido láctico, pues esta bacteria es prácticamente homoláctica, aunque también produce pequeñas cantidades de formiato, acetato y etanol (Liébana,

2002). Por lo tanto, este germen actúa en gran parte por las enzimas que elabora, siendo las glucosiltransferasas las más importantes y con las cuales pueden sintetizar gran cantidad de polisacáridos extracelulares a partir de sacarosa.

PROPIEDADES PATÓGENAS S. MUTANS
Poder acidógeno, acidófilo y acidúrico
Síntesis de polisacáridos extracelulares (glucanos y fructanos)
Síntesis de polisacáridos intracelulares
Adhesión a superficies duras en ausencia de glucanos
Capacidad agregativa y coagregativa
Producción de bacteriocinas con actividad sobre otros microorganismos

Tabla I: Resumen propiedades patógenas de *Str. mutans* (Seif., 1997).

El *Streptococcus mutans* fue aislado por primera vez desde una lesión cariosa en 1924 por J.K. Clarke (Hamada y Slade, 1980). Un gran aumento en el conteo de *Str. mutans* en lesiones de manchas blancas fue descrito por Duchi y van Houte en 1978 (Duchi y van Houte, 1978; citado en Babaahmady et al., 1998). Ellos encontraron diferencias de 100 veces en la concentración de *Str. mutans* en muestras tomadas de una única lesión de mancha blanca comparada con aquella de esmalte adyacente sano (Babaahmady et al., 1998).

Por otra parte, Becker y colaboradores, en 2002, a través de técnicas moleculares de identificación bacteriana, señalaron la presencia de *Str. mutans* en todas las lesiones de caries profundas examinadas, indicando una fuerte asociación de esta especie con lesiones avanzadas de caries. Este hallazgo contrasta con estudios anteriores donde se emplearon medios de cultivo, como los realizados por Loesche y Syed, en 1973, y por Hoshino y colaboradores, en 1984, quienes reportaron que el *Str. mutans* sólo constituye una pequeña parte de la flora cultivable en áreas profundas de dentina cariada (Figuroa-Gordon et al., 2009).

A pesar de la evidencia que soporta la fuerte asociación de *S. mutans* con caries inicial y caries avanzada, Loesche y Straffon, en 1979, señalaron que la caries dental puede ocurrir en ausencia de *Streptococcus mutans*; asimismo, Kleinberg, en 2002, observó que individuos con altos contajes de *S. mutans* no necesariamente desarrollan lesiones de caries (Figuroa-Gordon et al., 2009).

1.4.2 *Lactobacillus spp.*

Bacilo anaeróbico facultativo Gram positivo. Se encuentran formando parte de la flora microbiana de la cavidad oral, donde históricamente ha sido asociado al desarrollo de la caries. Se aísla preferentemente en la saliva, dorso de lengua y biofilm

supragingival y radicular; su concentración variará según el estado de salud oral, incrementándose con la caries (Liébana, 2002).

Los *Lactobacillus* aparecen durante los primeros años de vida. Son grandes productores de ácido láctico a partir de la degradación de carbohidratos y se encuentran entre las bacterias más acidófilas que se conocen. Son capaces de producir ácidos en un pH bajo (acidúricos), iniciando su crecimiento a pH 5. No obstante ésta es una característica cariogénica, tienen poca afinidad por las superficies dentarias, y en consecuencia, no se los relaciona con el comienzo de la caries de esmalte. Sin embargo, son los primeros implicados en la progresión y avance de la caries de dentina (Van Houte, 1994; Barrancos, 2006; Badet et al., 2008; Klinke et al., 2009).

Actúan como invasores secundarios, aprovechando las condiciones ácidas (pH <5,4) y la retentividad existente en la lesión cariosa o superficies de difícil acceso como fosas y fisuras para su colonización (Loesche y Syed, 1973; citado en Nishikawara et al., 2006). Dependen de la acción previa de los *Streptococcus* del grupo *mutans*, utilizando la matriz adherente formada por ellos (Barrancos, 2006). Además, los *Lactobacillus* colonizan preferentemente el dorso de la lengua y son transportados a la saliva debido al desprendimiento epitelial de la lengua (van Houte et al., 1972; citado en: Nishikawara et al., 2006).

Una fuerte correlación se ha establecido entre el conteo de *Lactobacillus* y la caries: mientras mayor sea el índice COPD, mayor es el número de niños que posee un alto conteo de *Lactobacillus* (Badet et al., 2008). La detección de una alta concentración de ellos en la saliva (>100.000/ml) funcionaría como un excelente indicador del riesgo de progresión de las caries iniciales existentes (Barrancos, 2006; Badet et al., 2008).

Altas concentraciones de estas bacterias reflejan severidad de caries y existencia de una dieta cariogénica (alta en carbohidratos fermentables). Se sabe que la restricción rigurosa del consumo de carbohidratos en general y la práctica sistemática de una correcta higiene bucal, después de cada comida, disminuye en forma considerable la actividad cariogénica y el número de *Lactobacillus* presentes en la saliva (Barrancos, 2006).

PROPIEDADES PATÓGENAS <i>LACTOBACILLUS</i>
Poder acidógeno, acidófilo y acidúrico
Escasa síntesis de polisacáridos extra e intracelulares a partir de la sacarosa
Escasa actividad proteolítica
Poca afinidad por superficie dental, colonizan en primera instancia las superficies mucosas bucales

Tabla II: Resumen propiedades patógenas de *Lactobacillus spp.* (Seif et al., 1997).

2. Actividad cariogénica

Las variables asociadas a caries detectadas en estudios longitudinales, son considerados factores de riesgo. Se trata de factores ambientales, conductuales o biológicos que pueden aumentar directamente si están presentes, o disminuir, si son removidos, la probabilidad de la ocurrencia de la enfermedad (Tagliaferro et al., 2008).

Estudios publicados recientemente han mostrado que la experiencia de caries en dentición primaria, biofilm dental, presencia de defectos de esmalte, género, nivel educacional de las madres, nivel socioeconómico, hábitos de higiene bucal, historia de fluoración, fluorosis dental, acceso a servicios de salud bucal, consumo de azúcares, hábitos dietéticos y lugar de residencia, están asociados con caries en niños y adolescentes (Tagliaferro et al., 2008).

La prevalencia es la proporción de una población afectada por una enfermedad o una condición en tiempo específico. Incidencia es la medición de la tasa en la que una enfermedad progresa. Antes de que la incidencia y prevalencia puedan ser registradas, es requerida una medición cuantitativa que reflejará precisamente la extensión de la enfermedad en una población (Kidd, 2005).

En el caso de la caries dental, las mediciones de prevalencia de enfermedad que son usadas son (Kidd, 2005):

- El número de dientes cariados (C)
- El número de dientes obturados (O)
- El número de dientes que han sido extraídos por causa de lesiones de caries (P)

Esta medida es conocida como "índice COP" y es un índice aritmético de los ataques de caries acumulados en una población, descrito por Palmer y Klein en 1937 y que ha sido ampliamente utilizado debido a que permite cuantificar los procesos cariosos, tanto actuales como pasados, es decir, la historia de caries. El COP(D) es usado para indicar dientes cariados, perdidos y obturados; el COP(S) indica superficies cariadas, perdidas y obturadas en dentición permanente. Los índices equivalentes para dentición temporal son ceo(d) y ceo(s), donde "e" indica diente extraído (para diferenciarlo de la pérdida debido a exfoliación natural) (Kidd, 2005).

3. Higiene Bucal

El manejo del biofilm cariogénico se ha llevado a cabo mediante tres estrategias en la historia de la odontología moderna:

- 1.- Eliminación/reducción de placa mediante cuidados en el hogar
- 2.- Reducción o eliminación de carbohidratos fermentables
- 3.- Introducción de fluoruros para reducir la caries.

Se ha demostrado que la educación en higiene bucal reduce el conteo bacteriano, pero no reduce la carga bacteriana en cantidades clínicamente significativas (Wolff y Larson, 2009).

Para la remoción del biofilm dental y los cuidados preventivos diarios se utilizan distintos elementos como el cepillo dental, seda dental y colutorios. El uso de la seda dental es un método efectivo para eliminar la biofilm de las superficies interdenciales, donde el cepillo no alcanza. Los colutorios son útiles para complementar el cepillado e instrumentos interdenciales, poseen compuestos químicos antibacterianos o flúor para prevenir la aparición de caries (Kidd, 2005).

Los cepillos dentales tienen gran importancia en la prevención de caries. El uso del cepillo de dientes es claramente efectivo en la remoción de placa, entre los instrumentos de higiene bucal, son el implemento ideal para impedir la organización bacteriana mediante la remoción mecánica de la placa, así como de residuos alimenticios de las superficies lisas de los dientes (Kidd, 2005).

3.1 Cepillos dentales

Según la Asociación Dental Americana (ADA), el primer cepillo de dientes fue creado en China en el siglo XV, por un emperador que fijó cerdas de jabalí siberiano a un mango de bambú o de hueso. Desde allí, fue llevado a Europa por mercaderes que viajaban alrededor del mundo exportando productos novedosos. Sin embargo, los europeos preferían aquellos de cerdas más blandas fabricados con pelos de caballo, o bien, mondarse los dientes tras la comida con una pluma de ave o mondadientes de bronce o plata. En cualquier caso, los cepillos no se popularizaron en el mundo occidental hasta el siglo XIX. En 1885, compañías manufactureras comienzan a producir cepillos manuales a gran escala. En 1938, DuPont presenta los primeros filamentos de nylon, material que se convirtió en símbolo del modernismo y prosperidad a través de su comercialización. Atrás quedarían las cerdas naturales, traumáticas ya que no poseían terminaciones romas y difíciles de secar, lo que facilitaba la acumulación de bacterias entre los filamentos.

Debido a la dureza del nylon en sus comienzos, fue necesario crear filamentos de mayor suavidad, las que aparecieron en 1950. Desde entonces, los cepillos dentales han sido objeto de muchos cambios y avances tecnológicos. En busca de resolver las diferentes necesidades personales, en la actualidad existen numerosas formas, tamaños y presentaciones de cepillos de dientes.

Básicamente, hay dos tipos de cepillos dentales en el mercado: manuales y mecánicos o eléctricos. Ambos, pueden limpiar los dientes de forma efectiva y meticulosa. Según la ADA, estudios realizados al respecto demuestran que no existe una diferencia significativa entre ellos en la remoción del biofilm.

Aunque cualquier individuo puede utilizarlo, el cepillo eléctrico está indicado preferentemente en personas con poca habilidad para la higiene, escasa motivación, discapacitados físicos o psíquicos y adultos mayores, que posean dificultades motrices para realizar un cepillado efectivo (Kidd, 2005).

Existe una variación considerable en la destreza manual. No obstante, a la mayoría de los individuos sanos se les puede enseñar a limpiar sus dientes efectivamente mediante el uso de un cepillo convencional (Kidd, 2005).

En el caso de los bebés, incluso antes que aparezca el primer diente, se deben limpiar las encías con una gasa húmeda. En cuanto aparezca el primer diente, la higiene debe ser realizada por un adulto utilizando un cepillo infantil y agua, sin dentífrico. Luego, entre los 3 y 5 años, la higiene se complementa con pasta fluorada en concentraciones indicadas de acuerdo al riesgo cariogénico del paciente. Entre los 6 y 8 años de edad aparecen los primeros dientes definitivos. Las manos de los niños son más grandes y desarrollan mayor motricidad fina, por lo que podrán realizar el cepillado por sí solos, pero aún es necesaria la supervisión de un adulto hasta que sea dominada la técnica utilizada (Kidd, 2005).

Los cepillos manuales o convencionales también ofrecen múltiples alternativas de diseño, variando ampliamente en forma y tamaño de la cabeza, el material, textura, y la inserción de los filamentos como también en el tamaño y forma de los mangos. Según la ADA, los cepillos deben tener (Kidd, 2005):

- Un mango apropiado para la edad y destreza del usuario.
- Una cabeza apropiada para la boca del usuario; generalmente es recomendado un cepillo con cabeza pequeña.
- Una inserción compacta de filamentos de nylon de suave/mediana dureza y redondeadas.
- Un patrón de orden de los filamentos que mejore la remoción de placa: hay disponibles cepillos con filamentos ordenados en diferentes alturas y ángulos, y algunos estudios han mostrado que éstos son más efectivos que los cepillos con corte plano en la remoción de placa y reducción de gingivitis.

Lo que importa es que el cepillo elegido por el paciente debe ser efectivo para ellos. Así, el profesional debe sólo establecer un cambio si percibe un problema. Es importante que el cepillo sea reemplazado regularmente, al menos cada 3 meses, o antes si los filamentos pierden su rigidez. Un cepillo que muestre signos de desgaste no puede limpiar efectivamente (Kidd, 2005).

3.1.1 Contaminación microbiana de cepillos dentales

La cavidad bucal tiene una temperatura entre 35 y 36 °C y abundante humedad, por lo que ofrece condiciones ideales para el crecimiento y desarrollo de microorganismos. También es un factor importante la presencia de nutrientes provenientes de la dieta y que serán utilizados como sustrato por las bacterias. (Fuentes y López, 2009)

Como se mencionó anteriormente, la flora microbiana de la cavidad bucal es abundante y variable en los tipos que la forman (Fuentes y López, 2009), existiendo un sin número de especies microbianas Gram positivas y Gram negativas, aerobias, facultativas y anaerobias que hacen parte de la flora bucal normal (Rodríguez, 2009). Algunas de estas especies patógenicas han sido implicadas como factores etiológicos, iniciadores y/o agravantes de la caries.

La transmisión de estos patógenos puede ser entre individuos, aunque también se ha evidenciado la transmisión a través de instrumentos dentales o elementos utilizados en la higiene oral diaria. Existe evidencia de que aunque los cepillos dentales tienen una gran importancia en la higiene bucal, también son una fuente importante en el desarrollo de bacterias. (Rodríguez, 2009). Contreras y colaboradores han evidenciado esta transmisión de especies cariogénicas y periodontopáticas a través de instrumentos dentales o por medio de elementos usados en la higiene bucal diaria como son la seda dental, los enjuagues bucales y los cepillos de dientes (Contreras et al., 2003; citado en: Fuentes y López, 2009). Otros microorganismos pueden transferirse de otras fuentes tales como del aerosol emanado del inodoro, dedos de la persona, sitios húmedos del cuarto de baño y en general, del medio ambiente

Los cepillos dentales se contaminan con bacterias, sangre, saliva, desechos bucales y pasta dental durante su uso; incluso después de ser enjuagados con agua y lucir aparentemente limpios, pueden permanecer contaminados con gérmenes potencialmente dañinos (Fuentes y López, 2009).

Los filamentos de los cepillos dentales son un medio idóneo para el desarrollo de microorganismos que se localizan en el medio ambiente, albergando una amplia variedad, que incluye bacterias, virus y hongos patógenos asociados a enfermedades, los que provienen del medio ambiente, de portadores o enfermos que pudieran transmitirlos a través de su uso. Esto podría facilitar la translocación en un mismo individuo desde tejidos infectados a tejidos no infectados y/o la transmisión entre individuos (Rodríguez, 2009).

La retención y supervivencia de microorganismos cariogénicos en los cepillos dentales representa una posible causa de recontaminación de la boca. Al ser usados regularmente se contaminan con organismos patógenos, los cuales colonizan la cavidad bucal. Mientras más usado sea el cepillo dental, mayor es el número de microorganismos, y una reinfección de la cavidad bucal con microorganismos puede causar enfermedades como gingivitis y estomatitis (Wetzel et al., 2005).

La retención y recuperación de bacterias de un cepillo dental depende del número de filamentos por penacho, como también del número de penachos por sí mismos (Wetzel et al., 2005).

Numerosos estudios se han llevado a cabo para observar la contaminación de los cepillos dentales por microorganismos de la cavidad bucal (Filho et al., 2000; Wetzel et al., 2005).

En 1920, Cobb sugiere que los cepillos dentales son la causa de repetidas infecciones en la boca, proponiendo que los cepillos son contaminados después de usarse y que se debería verificar su grado de contaminación (Cobb, 1920; citado en Filho et al., 2000).

Glass y Jensen, mediante una observación clínica de laboratorio, hallaron que tanto los virus como las bacterias pueden ser albergados y transmitidos por cepillos contaminados. Posteriormente Glass y Lave reportaron que los cepillos con estas características juegan un papel importante en enfermedades sistémicas o locales (Caundry, 1995).

Bunetel y colaboradores, en 2001, comprobaron que los cepillos de uso regular pueden ser altamente colonizados con microorganismos, dependiendo de sus condiciones de almacenamiento, actuando como reservorio para la reintroducción de agentes potencialmente patógenos como los *Streptococcus* (Bunetel et al., 2001; citado en Fuentes y López, 2009).

Algunos de estos microorganismos pueden mantenerse con vida incluso varios días luego de ser utilizado el cepillo dental (Filho et al., 2000; Wetzel et al., 2005).

En 1997, Dayoub y colaboradores detectaron microorganismos en cepillos que habían sido mantenidos secos por cinco días después de su uso (Dayoub et al., 1977; citado en Wetzel et al., 2005).

No fue sino hasta 1978 que Svanberg investigó cepillos de dientes usados por personas que estaban severamente contaminadas con *Str. mutans*. Los cepillos estaban contaminados con concentraciones de *Streptococcus mutans* de 10^4 unidades formadoras de colonia (UFC) aun después de haber sido guardados en aire seco por 24 horas después de su uso, comprobando que existe una severa contaminación de los cepillos dentales por *Streptococcus mutans* luego de utilizarlos (Svanberg, 1978; citado en Wetzel et al., 2005).

En 1989, Karsuyuki Kozai realizó un estudio sobre la contaminación de los cepillos utilizados sin pasta dental en niños, concluyendo que la mayor cantidad de microorganismo es el *Streptococcus mutans*, el cual se encontraba presente incluso después del lavado del cepillo sólo con agua. (Kozai et al., 1978; citado en Fuentes y López, 2009).

4. Identificación y cuantificación de Microorganismos

4.1 Identificación y cuantificación de *Str. mutans*

Con el reconocimiento del *Str. mutans* como principal agente etiológico de la caries dental, se ha hecho necesario contar con medios de cultivo que garanticen el crecimiento y la recuperación del patógeno causal de manera altamente selectiva, por lo que a través del tiempo, investigadores han desarrollado variados agares con el fin de establecer el medio más adecuado para su identificación y cuantificación (Medina et al., 2005).

Existen en la actualidad varios medios para el cultivo de *Str. mutans*, entre ellos los más utilizados son:

- **Agar sangre de carnero:** La hemólisis en agar sangre de carnero es el método más empleado para la diferenciación primaria de *Streptococcus*, como lo propuso originalmente Brown en 1919. Los *Streptococcus* son alfa y gama hemolíticos, con excepción de algunas cepas que son beta hemolíticos, pero se trata de un medio muy poco selectivo.
- **MSA (mitis salivarius agar):** uno de los primeros medios de cultivo desarrollado para la recuperación y aislamiento de *S. mutans*, obtenido comercialmente Difco®; base para la elaboración de MSB, MSKB y MSMUT; y utilizado en otros estudios. Se trata de un medio poco selectivo, contiene 5% de sacarosa y telurito potásico, azul tripán y cristal violeta como sustancias inhibitorias.
- **MSB (mitis salivarius bacitracina):** es MSA más 0.2 u/ml de bacitracina y 15% más de sacarosa que MSA, lo que lo hace más selectivo. Ha sido utilizado y comparado en un mayor número de estudios de recuperación y aislamiento de *S. mutans*.
- **TYCSB (tripsina, extracto de levadura, cisteína, sacarosa y bacitracina):** medio de cultivo que ha dado óptimos resultados tanto en recuperación como en selectividad en algunos estudios comparativos recientes. Además, es fácil de preparar y relativamente económico. Se desarrolló porque algunos autores señalaban que el medio MSB era inhibidor del serotipo A del *S. mutans*.

El TYCSB es actualmente el medio de cultivo de elección para el recuento cuantitativo de *Streptococcus mutans*, respaldado por numerosas investigaciones que han comparado su eficacia (Wan et al., 2002; Linossier et al., 2003; Medina et al., 2005; Hildebrandt y Bretz, 2006).

La óptima recuperación lograda con este medio se debe al aporte de nutrientes obtenidos del caldo tripticasa soya y del extracto de levadura, componentes utilizados

para el crecimiento y recuperación de microorganismos exigentes, y del 20% de sucrosa.

Es importante resaltar como ventaja la selectividad que tiene este medio comparado por la adición de bacitracina y la presencia de sucrosa que interfiere con el crecimiento de otros microorganismos. Sin embargo, esta última característica hace necesario tomar precauciones en el manejo de su concentración debido a que altas concentraciones de sucrosa interfieren con la glicólisis del *Str. mutans* (Medina et al., 2005).

Su utilización se recomienda previa a los 7 días desde su realización, ya que la bacitracina en suspensión tiene una duración limitada, y posterior a los días recomendados, ésta se inactiva (Medina et al., 2005).

Las placas se incuban en un medio de microanaerobiosis a 37°C por 48 a 72 hrs. Las colonias de *Str. mutans* desarrolladas, tienen un aspecto blanco grisáceo, con superficie rugosa, apariencia de vidrio esmerilado y consistencia dura, que no pueden ser disgregadas cuando se manipulan con un asa suavemente, lo cual es una característica que presentan las colonias de *S. mutans* que se desarrollan en un medio TYCSB. Para el recuento deben considerarse sólo aquellas adherentes (Medina et al., 2005).

4.2 Identificación y cuantificación de *Lactobacillus* spp.

Rogosa y colaboradores desarrollaron en 1951 un medio semi-definido parcialmente selectivo para el aislamiento y recuento de lactobacilos a partir de alimentos y flora intestinal, vaginal y dental (Rogosa et al., 1951). Se trata del Agar Rogosa, que permite el desarrollo casi exclusivo de estos microorganismos, evitando el crecimiento excesivo de mohos, *Streptococcus* y proliferación de organismos. Posee un pH ácido de 5.4, y su temperatura óptima del cultivo es de 35-37°C, durante 48-72 horas.

En este agar, la peptona de caseína, el extracto de levadura y la sal de amonio proporcionan nitrógeno. El polisorbato 80 suministra ácidos grasos necesarios para el crecimiento de lactobacilos. El manganeso y el magnesio son factores de crecimiento. La glucosa es una fuente universal de energía y carbono. El citrato de amonio, el acetato de sodio, el ácido acético y el sulfato ferroso, actúan como inhibidores de los *Streptococcus* y otros organismos contaminantes y suministran el bajo pH que es tolerado por los lactobacilos, pero no por muchos otros organismos. El fosfato, junto con acetato y ácido acético, estabiliza el pH (Anexo 11.3)

A las 48 horas de cultivo se pueden observar un crecimiento bueno a excelente de colonias blancas, de tamaño mediano-grande, convexas, lisas, circulares y con bordes regulares.

Los cultivos desprenden un olor típico a leche fermentada.

II. OBJETIVOS

1. Objetivo general:

- Relacionar microorganismos identificados y cuantificados en cepillos dentales de pacientes pediátricos con distinta actividad cariogénica.

2. Objetivos específicos:

- Determinar actividad cariogénica de pacientes en estudio, según género.
- Identificar *Streptococcus mutans* en el cepillo dental.
- Identificar *Lactobacillus spp.* en el cepillo dental.
- Determinar cantidad de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) de *Streptococcus mutans* según género del paciente.
- Determinar cantidad de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) de *Lactobacillus spp.* según género del paciente.
- Relacionar UFC/ml de *Streptococcus mutans*, con el nivel de actividad cariogénica de cada paciente en estudio.
- Relacionar UFC/ml de *Lactobacillus spp.*, con el nivel de actividad cariogénica de cada paciente en estudio.
- Relacionar las UFC/ml de *Streptococcus mutans*, con el grado de severidad de caries de los pacientes examinados.
- Relacionar las UFC/ml de *Lactobacillus spp.*, con el grado de severidad de caries de los pacientes examinados

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Tipo de estudio:

Descriptivo Transversal Prospectivo Correlacional.

2. Área de estudio:

Clínica de Pregrado de Odontología Integral Infantil I y II, Escuela de Odontología, Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Quinta región, Chile.

3. Universo:

Pacientes de 6 a 8 años al momento del estudio (Abril del 2010), con dentición mixta ingresados al sistema de atención de las clínicas de Odontología Integral Infantil de la Universidad de Valparaíso, en 4° y 5° años, el año 2008. El paciente debe tener un apoderado que deberá aceptar participar del estudio previa firma del consentimiento informado (Anexo 2).

4. Muestra:

Se trabajó con el Universo, que tras considerar los criterios de exclusión de la investigación, se llegó al número de 27 pacientes.

5. Unidad de estudio:

Cepillo dental.

6. Variables: (Tabla III)

- Género del paciente.
- Presencia de *Streptococcus mutans*.
- Presencia de *Lactobacillus spp.*
- Número de UFC/ml de *Streptococcus mutans* presentes en cepillos dentales de pacientes del estudio.
- Número de UFC/ml de *Lactobacillus spp.* presentes en cepillos dentales de pacientes del estudio.
- Actividad cariogénica medida con índices COPD-ceod.
- Severidad de caries

Tabla III: Variables del estudio

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable
Presencia de <i>Streptococcus mutans</i> .	Microorganismo anaerobio facultativo, considerado el mayor agente etiológico en el desarrollo de la caries dental en humanos.	Presencia de microorganismo al momento del análisis de cultivo: - Sí - No	Cualitativa Dicotómica
Presencia de <i>Lactobacillus spp.</i>	Bacilo anaerobio facultativo gram positivo. Se encuentran formando parte de la flora microbiana de la cavidad oral. Altas concentraciones de estas bacterias reflejan actividad de caries y existencia de una dieta cariogénica.	Presencia de microorganismo al momento del análisis de cultivo: - Sí - No	Cualitativa Dicotómica
Número de unidades formadoras de colonias (UFC) de <i>Streptococcus mutans</i> presentes en cepillos dentales de pacientes del estudio.	Unidades formadoras de colonias: población bacteriana macroscópicamente visible procedente de una sola célula madre. El cultivo de <i>Str. mutans</i> se realizó en el medio TYCSB. Tras 48 hrs. de incubación a una temperatura de 37°C en microanaerobiosis, las colonias presentan aspecto blanco grisáceo, con superficie rugosa, apariencia de vidrio esmerilado y consistencia dura, que no pueden ser disgregadas cuando se manipulan con un asa suavemente.	Conteo de UFC macroscópicamente: UFC/ml= N * 1/D* 1/ml de siembra. N: número de colonias que se contó. D: dilución en la que se está contando. ml: ml que se uso para sembrar.	Cuantitativa Continua
Número de unidades formadoras de colonias (UFC) de <i>Lactobacillus spp.</i> presentes en cepillos dentales de pacientes del estudio.	Unidades formadoras de colonias: población bacteriana macroscópicamente visible procedente de una sola célula madre. El cultivo de <i>Lactobacillus spp.</i> se realizó en el medio Agar SL Rogosa. Tras 48 hrs. de cultivo a una temperatura de 37°C en microanaerobiosis, las colonias se observan blancas, de tamaño mediano-grande, convexas, lisas, circulares y con bordes regulares.	Conteo de UFC macroscópicamente: UFC/ml= N * 1/D* 1/ml de siembra. N: número de colonias que se contó. D: dilución en la que se está contando. ml: ml que se uso para sembrar.	Cuantitativa Continua

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable
-----------------	------------------------------	-------------------------------	-------------------------

<p>Actividad cariogénica medida con índices COPD-ceod.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Índice COPD: Total de dientes con caries, obturados o perdidos por caries en dentición definitiva. - Índice ceod: Total de dientes con caries, obturados o extraídos por caries en dentición temporal. <p>Caries:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lesión activa: mancha blanca, rugosa, opaca. - Cavitación activa: A la exploración en las zonas necróticas el tejido está blando y se puede retirar por capas con cuchareta para caries. Generalmente la dentina se tiñe de color amarillo. - Lesión y cavitación detenida: se caracteriza por presentar una superficie dura y más o menos lisa, teñida de color café o negruzca. - Suma total de caries activas presentes en boca, sin tratamiento y que hayan sido diagnosticadas clínicamente, sin exámenes complementarios. - Todos aquellos dientes que al momento del examen presenten recubrimientos pulpares directos e indirectos, pulpotomías terapéuticas y pulpectomías se consideran como cariadas. <p>Obturado:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Obturación: restauración presente en boca de material definitivo que intente devolver función y estética en diente que sufrió alguna alteración por caries. <p>Perdido/exfoliado:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Perdido: Diente definitivo extraído por caries. - Exfoliado: Diente temporal extraído por caries. 	<p>Se utilizará el total de la suma entre COPD y ceod del paciente para establecer su actividad cariogénica.</p> <p>COPD+ceod = Actividad cariogénica.</p>	<p>Cuantitativa Continua</p>
<p>Severidad de caries</p>	<p>Estado de avance de caries en las estructuras duras del diente:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Diente sano: sin lesión ni cavitación. - Lesión activa: mancha blanca, rugosa, opaca. - Cavitación activa: A la exploración en las zonas necróticas el tejido está blando y se puede retirar por capas con cuchareta para caries. Generalmente la dentina se tiñe de color amarillo. - Lesión y cavitación detenida: se caracteriza por presentar una superficie dura y más o menos lisa, teñida de color café o negruzca. 	<p>Total de dientes con caries, clasificados según severidad:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Diente sano - Lesión de esmalte - Cavitación 	<p>Cuantitativa Continua</p>

- Índices COPD y ceod:

Los resultados se expresan utilizando el índice COPD, y ceod que describe numéricamente los resultados del ataque de caries en los dientes del grupo de estudio. El símbolo «D» ó «d» significa que la unidad de medida establecida es el diente afectado y no la superficie ni las lesiones de caries. El valor individual del índice corresponde a la suma de los dientes cariados, obturados y perdidos. Terceros molares y agenesias no entran en este índice, ni tampoco dientes extraídos por ortodoncia. Todos aquellos dientes que al momento del examen presenten obturaciones temporales, tales como recubrimientos directos e indirectos, pulpotomías terapéuticas y pulpectomías, serán consideradas como cariados.

- *Clasificación de OMS para COPD y ceod* (citado en: Ministerio de Educación – Chile, 2004):
 - 0 a 1,1 = muy bajo
 - 1,2 a 2,6 = bajo
 - 2,7 a 4,4 = moderado
 - 4,5 a 6,5 = alto
 - 6,6 ó más = muy alto

A partir de esta clasificación de la OMS, se realizará una adaptación de los valores para COPD y ceod, quedando de la siguiente manera:

- 0 a 2 = Bajo
- 3 a 4 = Moderado
- 5 ó más = Alto

- Problemas prácticos con los índices COP y ceo:

En niños la pérdida de dientes temporales puede haber sido causado por exfoliación natural, y éstos deben ser diferenciados de los dientes perdidos por caries. Los dientes definitivos son perdidos por razones distintas a caries, como trauma, exodoncia por indicación ortodóncica o protésica, y enfermedad periodontal. Por esta razón, los dientes perdidos pueden ser omitidos de los índices y sólo incluir superficies cariadas y obturadas (Kidd, 2005).

7. Criterios de exclusión:

- Apoderado no quiere que paciente participe en el estudio.
- Paciente inubicable telefónicamente o fuera del territorio nacional.
- Paciente con enfermedades sistémicas o discapacidad mental.
- Uso de antibióticos 3 meses previo a estudio. El paciente deberá abandonar el estudio si llegase a utilizar antibióticos durante el transcurso de la investigación.

8. Metodología de Trabajo:

8.1 Examen clínico e instrucciones:

El universo correspondió a los pacientes ingresados de UCEOT (Unidad Clínica de Examen y Orientación de Tratamiento) de la Escuela de Odontología de la Universidad de Valparaíso, la cual registra el ingreso de pacientes a las clínicas de Odontología Integral Infantil (OII) de cuarto y quinto año del año 2008, realizando una pre-selección de pacientes nacidos entre Abril del año 2002 y Abril del año 2004.

El universo se contactó telefónicamente. Se les citó a la Escuela de Odontología, informándole del estudio al apoderado del paciente y firmando un consentimiento informado aceptando su participación (Anexo 11.4). Se excluyeron del universo a dos pacientes cuyos apoderados no desearon que su pupilo participara en el estudio, llegando a un total de 27 pacientes, de los cuales 10 eran mujeres y 17 hombres.

Se solicitó, al momento del contacto telefónico, que el paciente asistiese al examen con su cepillo dental actual, que fue retirado para evitar su uso durante el estudio.

Fue realizado un examen clínico, llevado a cabo por 1 examinador elegido entre los investigadores, calibrado de acuerdo a los parámetros establecidos por la OMS (WHO Oral Health, 1997), llenando una Ficha Odontológica Simplificada (Anexo 11.5) confeccionada con este fin, utilizando los índices COPD y ceod, determinando así la actividad cariogénica y severidad de caries de cada paciente.

El examen clínico donde se determinó el COPD-ceod y severidad de caries fue llevado a cabo en la Clínica A de la Escuela de Odontología de la Universidad de Valparaíso, donde se utilizaron por paciente un par de guantes desechables de látex y una bandeja de examen con espejo plano N° 5. Se utilizó el aire de la jeringa triple para secar las superficies dentales y se procedió a realizar el examen en el sillón dental bajo iluminación artificial, otorgada por una lámpara marca Midmark, modelo 153673-001, en su máxima potencia lumínica.

No fue necesario la atención de urgencia por parte de los examinadores a ningún paciente, ya que no presentaron dolor, fiebre, aumento de volumen producto de infección odontológica.

Fue entregado al paciente un cepillo dental marca Colgate, modelo Extra Clean Professional (Figura I), que fue el "cepillo de uso" del paciente. No se realizó en ese momento instrucción de higiene bucal. Se les solicitó a los pacientes que realizasen el cepillado dental de acuerdo a su rutina diaria, siendo la única especificación que sea sin el uso de dentífrico ni otro tipo de control químico de remoción de biofilm para lograr una mejor estandarización. Se les solicitó al apoderado y al paciente que el cepillo de uso permaneciera en el lugar donde mantenía su cepillo habitual.



Figura I: Cepillo Colgate, modelo Extra Clean Professional

Tras un mes de uso del cepillo, se realizó la visita domiciliaria para obtener la muestra, para no contaminar el cepillo con otra cepa bacteriana. Se le enseñó al paciente la técnica de cepillado de Stillman o Rotatoria, de acuerdo a su edad y motricidad. Se le dejó un cepillo dental nuevo, de igual marca y características que el cepillo en estudio.

Se derivó a 22 pacientes, a quienes se les determinó en el examen clínico inicial la necesidad de tratamiento, a las clínicas de Odontología Infantil Integral de la Escuela de Odontología de la Universidad de Valparaíso. A los pacientes que presentaron el total ceod-COPD = 0, se les recomendó control en 6 meses más.

8.2 Elaboración del medio de cultivo Agar SL Rogosa (Biomark®):

Para las instrucciones específicas del Agar SL Rogosa marca Biomark, ver Anexo 11.6

Se esterilizaron 1100 ml. agua destilada por 15 minutos en envase de vidrio esterilizable (Shirai, 2005) graduados hasta 1000 ml con tapa rosca (Figura II). Además se esterilizaron por separado 100 placas petri de vidrio de 10cms. de diámetro.



Figura II: Agua destilada estéril y agar deshidratado.

La preparación propiamente tal del medio de cultivo se realizó en dependencias del Laboratorio de la Escuela de Nutrición y Alimentos de la Facultad de Recursos Naturales de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, ubicada en Waddington 716, Playa Ancha, Valparaíso, a cargo de la Sra. Cecilia Carvajal. La supervisión en la preparación de los medios de cultivos estuvo a cargo de la Sra. Olaya Leiva y su equipo.

Todos los procesos que requirieron esterilidad se realizaron dentro de una cámara de flujo marca CYTAIR, modelo 125, propiedad de la PUCV. Se desinfectó en cada paso con alcohol al 70% en aerosol (Figura III).



Figura III: Cámara de flujo.

Fueron pesados 500 ml. de agua en un envase de vidrio con tapa rosca, estéril. Se vertieron 37,5 gramos de polvo de Agar SL Rogosa (Biomark) con una cuchara estéril dentro del envase que contenía los 500 ml. de agua, ubicado sobre la tara electrónica (Figura IV).



Figura IV: Tara electrónica.

El envase fue cerrado y calentado a baño maría, agitando el envase las veces que fuese necesario, hasta alcanzar la disolución total del agar. Una vez disuelto, se agregaron 66 ml. de ácido acético con una pipeta estéril. Se calentó el envase a baño maría por 3 minutos entre 90 y 100°C (Figura V; Figura VI).



Figura V: Disolución a baño maría.



Figura VI: Disolución siendo agitada.

Se procedió a plaquear el agar, agregando aproximadamente 10 ml. de solución a cada placa petri, previamente identificadas con el nombre del medio de cultivo, su fecha de elaboración y su fecha de vencimiento (Figura VII; Figura VIII).



Figura VII: Rotulado de placas petri.



Figura VIII: Agar Rogosa siendo plaqueado.

Se secaron los medios de cultivo en la cámara de flujo, para evitar que se humedecieran.

Se apilaron y embalaron en paquetes de 5 placas, cubriéndolos con una capa de papel film (Figura IX).



Figura IX: Agar SL Rogosa embalado.

Con 500 ml. de solución se pueden preparar 50 medios de cultivo, por lo que se repitió el procedimiento 3 veces, hasta obtener los 150 medios de cultivo requeridos para la investigación.

Los medios de cultivo fueron refrigerados y almacenados a una temperatura constante de 4°C, en el refrigerador marca Fenza, No Frost, modelo Advantage 7205, del Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Odontología de la Universidad de Valparaíso.

8.3 Elaboración del medio de cultivo TYCSB:

La confección de los medios de cultivo TYCSB para *Streptococcus mutans* fue realizada en el Departamento de Microbiología de la Escuela de Odontología de la

Universidad de Chile, Santiago, bajo la supervisión de la Dra. Leila Gómez. Esta elaboración fue remunerada por parte de los investigadores.

Los medios de cultivo fueron refrigerados y almacenados a una temperatura constante de 4°C, en el refrigerador marca Fenza, No Frost, modelo Advantage 7205, del Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Odontología de la Universidad de Valparaíso.

8.4 Método de toma de muestra del cepillo de uso:

Se desarrolló el proceso de muestreo en un ambiente que buscaba reducir la contaminación de las unidades de estudio utilizando dos mecheros de alcohol, trabajando dentro de este perímetro. Se suspendió el cepillo de uso en un tubo de ensayo marca Pyrex® de 25 mm. de diámetro con tapa rosca, el cual contenía 10 ml. de suero fisiológico, previamente esterilizado (Figura X).



Figura X: Toma de muestra basal en tubo de ensayo Pyrex® de 25 mm. de diámetro, con suero estéril.

Se realizaron movimientos rotatorios con el cepillo en suspensión por 120 segundos, desechando luego el cepillo y cerrando el tubo con su correspondiente tapa para mantener la muestra basal. Los tubos fueron rotulados con el número de ficha y fecha de toma de muestra. Las muestras fueron trasladadas a la Escuela de Odontología y, una vez localizadas en el Laboratorio de Microbiología, se procedió a la

cultivo fue rotulado individualmente con el número de ficha del paciente, fecha de siembra y su respectiva dilución. Se homogenizó la muestra realizando movimientos circulares en los medios de cultivo utilizando un rastrillo de siembra estéril, confeccionado previamente por los investigadores con micropipetas de vidrio marca Socorex, moldeadas con la llama del un mechero Bunsen. (Figura XII).

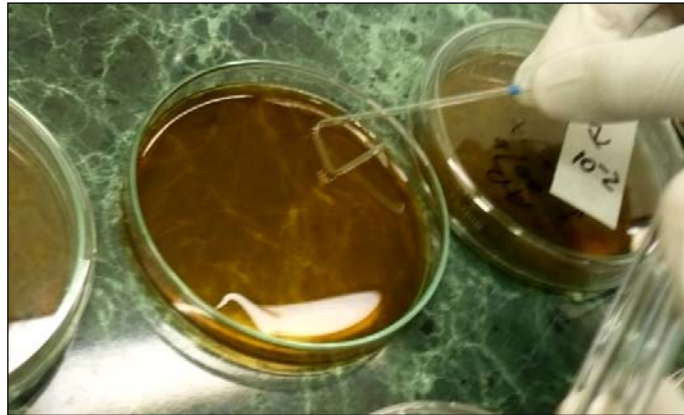


Figura XII: Rastrillo homogenizando muestra.

Se procedió a incubar los medios de cultivo a 37° C por 48 hrs. en una estufa marca Heraeus, modelo RB360, en un ambiente de micro-anaerobiosis, logrado con el método de la Vela (Obando et al., 1999; Gamazo, 2005) (Anexo 11.7).

Luego de transcurridas las 48 hrs. necesarias para el cultivo, se realizó el conteo de colonias adherentes presentes en las placas, utilizando un contador de colonias marca Fisherbrand, modelo 08-757-11A (Figura XIII), siguiendo las reglas del conteo de colonias (Anexo 11.8).



Figura XIII: Contador de colonias Fisherbrand 08-757-11A.

Las colonias eran idénticas entre sí, presentando las mismas características macroscópicas, considerándose sólo aquellas adherentes, blanco grisáceas, con superficie rugosa, apariencia de vidrio esmerilado y consistencia dura, que no pueden ser disgregadas cuando se manipulan con un asa, las cuales son características que presentan las colonias de *Streptococcus mutans* que se desarrollan en un medio TYCSB (Figura XIV). En el caso de los lactobacilos, presentaron colonias blancas, de tamaño mediano-grande, convexas, lisas, circulares y con bordes regulares, características de su desarrollo en Agar SL Rogosa (Figura XV).



Figura XIV: Cultivo exitoso de TYCSB.

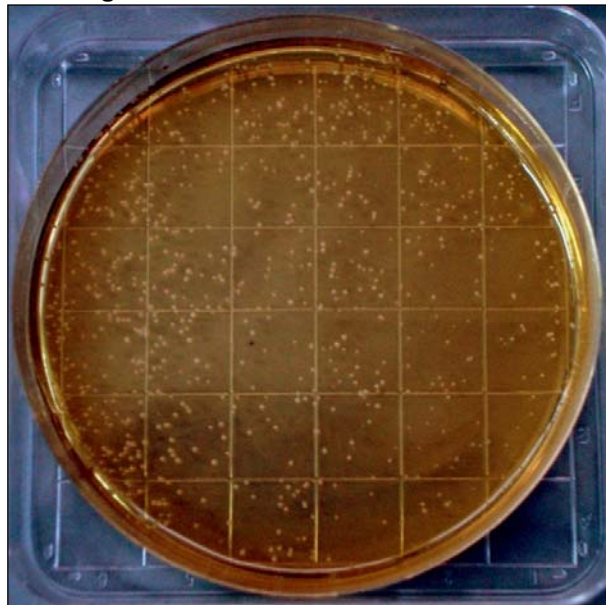


Figura XV: Cultivo exitoso de Agar SL Rogosa.

Se seleccionaron como representativos los medios de TYCSB y Agar SL Rogosa cultivados con la dilución 10^{-2} por presentar un desarrollo de UFC idóneo.

Los procedimientos de siembra, cultivo y conteo de colonias de los medios fueron realizados bajo la supervisión y guía del Dr. Jorge Torres Maldonado, profesor auxiliar de la asignatura de Microbiología de Escuela de Odontología.

8.6 Calibración:

Este estudio considera un examinador que deberá realizar un examen odontológico simple a un paciente con dentición mixta, contabilizando su actividad cariogénica mediante los índices ceod-COPD.

El Gold-Standard fue la Dra. Alexandra Guerrero Devlahovic, Docente Adjunto de la Cátedra de Odontopediatría. Se realizaron exámenes a 10 pacientes de la Cátedra de Odontopediatría durante dos semanas. La primera semana, los 10 pacientes fueron examinados tanto por el examinador como por la doctora, anotando en el dentograma de la Ficha Única Simple de la Escuela de Odontología de la Universidad de Valparaíso el COPD-ceod del paciente y la severidad de la caries. La semana siguiente, el examinador volvió a repetir los exámenes a los mismos 10 pacientes. Con los resultados obtenidos, se determinó el índice Kappa de Cohen con el programa SPSS 15.0 para Windows, tanto en el caso intra como interoperador (Tabla IV).

	Operador 2					
Operador 1	Caries	Obturado	Exf/perdido	Sano	Lesión	Cavitación
Caries						
Obturado						
Exf/perdido						
Sano						
Lesión						
Cavitación						

Tabla IV: Tabla de datos para calibración.

Los resultados de este análisis fueron los siguientes:

- Índice Kappa Gold-Standard v/s Investigador: $k = 0,902$
- Índice Kappa intraoperador: $k = 0,884$

De acuerdo al índice Kappa, si existiese concordancia total, k será 1; si el valor da entre 1 y 0,8, la concordancia es muy buena; si el resultado es entre 0,6 y 0,8, es buena; si es entre 0,4 y 0,6 es moderada; entre 0,2 y 0,4 es baja; y entre 0 y 0,2 es insignificante. Por lo tanto, se puede concluir que la concordancia en ambos casos fue muy buena.

8.7 Petitorios:

Fueron enviadas las cartas correspondientes al Comité de Ética de la Escuela de Odontología para que apruebe el estudio, a la Cátedra de Odontopediatría para que

autorice trabajar con sus pacientes, y al jefe de clínicas para que facilitase los espacios necesarios para realizar los exámenes y utilizar la estufa de cultivos.

9 Análisis de datos

Fue utilizada una estadística del tipo descriptiva. Para las correlaciones, se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson, considerándose los valores entre -1 y 1 como existencia de correlación, mientras que valor 0 indica la ausencia de ésta. Los datos fueron tabulados usando el programa Microsoft Excel versión 2007, y analizados por medio del programa SPSS 15.0 para Windows. El nivel de significancia aceptado para la obtención de las conclusiones fue $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

- **Actividad cariogénica:** De los 27 pacientes examinados, se obtuvo un promedio de ceod-COPD de 6 dientes (Tabla V)

Total ceod-COPD			
Mínimo	Máximo	Media	Moda
0	14	6	0

Tabla V: Valores de total de índice ceod-COPD de pacientes examinados para el estudio.

De acuerdo al género, la muestra se separa en 10 mujeres y 17 hombres. Estos últimos (promedio de 6,6 dientes afectados), presentan un mayor promedio de dientes afectados que las mujeres (con 5,2). Además la moda en mujeres fue tener un total de 0 dientes afectados, mientras que en hombres fue 9 dientes (Tabla VI).

	Género							
	Femenino				Masculino			
	Mínimo	Máximo	Media	Moda	Mínimo	Máximo	Media	Moda
Σ COPD-ceod	0	14	5,2	0	0	13	6,59	9

Tabla VI: Valores de ceod-COPD según género.

- **Presencia de UFC/ml de *Streptococcus mutans* según género:** Todos presentaron un cultivo positivo de *Streptococcus mutans* en la muestra basal del medio de cultivo. Se obtuvo un mayor promedio de UFC/ml de *Streptococcus mutans* en los cepillos dentales de hombres, con un valor de 27.000 UFC/ml, siendo también mayor la moda y los valores máximos encontrados en estos últimos, con valores de 1.500 UFC/ml y 110.000 UFC/ml (Tabla VII).

	Género							
	Femenino				Masculino			
	Mínimo	Máximo	Media	Moda	Mínimo	Máximo	Media	Moda
UFC/ml <i>Str. Mutans</i>	100	50.000	17.160	100	200	110.000	20.700	1.500

Tabla VII: Conteo de UFC/ml de *Str. mutans* según género.

- **Presencia en UFC/ml de *Lactobacillus* según género:** Todos presentaron un cultivo positivo de *Lactobacillus* en la muestra basal del medio de cultivo. En lo que respecta al conteo de UFC/ml de *Lactobacillus*, el promedio en mujeres de 21.610 UFC/ml fue mayor que en hombres, al igual que el máximo conteo de 78.000 UFC/ml, pero la moda fue mayor en hombres, obteniendo un número de 2.800 UFC/ml (Tabla VIII; Anexo 11.9).

UFC/ml <i>Lactobacillus</i>	Género							
	Femenino				Masculino			
	Mínimo	Máximo	Media	Moda	Mínimo	Máximo	Media	Moda
	1.500	78.000	21.610	1.500	1.800	55.000	15.600	2.800

Tabla VIII: Conteo de UFC/ml de *Lactobacillus* según género.

- **Correlación entre sumatoria COPD-ceod con cantidad de UFC/ml de *Streptococcus mutans* en cepillos dentales:** La correlación de Pearson obtenida ($r=-0,364$) arrojó la existencia de una correlación, la cual fue negativa, indicando proporcionalidad inversa (Tabla IX; Anexo 11.10).

		COPD-ceod
UFC/ml <i>Str. mutans</i>	Correlación de Pearson	-0,364
	Sig.	0,061
	N	27

Tabla IX: Correlación de Pearson entre UFC/ml de *Str. mutans* y el total del índice ceod-COPD del paciente.

- **Correlación entre sumatoria COPD-ceod con cantidad de UFC/ml de *Lactobacillus* en cepillos dentales:** La Tabla X muestra la correlación de Pearson obtenida para ambas variables, la cual arrojó un valor de $r=-0,146$, expresando la existencia de una correlación, negativa, indicando proporcionalidad inversa (Anexo 11.11).

		ceod-COPD
UFC/ml <i>Lactobacillus</i>	Correlación de Pearson	-0,146
	Sig.	0,467
	N	27

Tabla X: Correlación de Pearson entre UFC/ml de *Lactobacillus* y Total ceod-COPD del paciente.

- **Correlación entre severidad de caries y tipo de microorganismos:** Según el examen inicial, el número de dientes con lesiones y/o cavitaciones presentes en boca de los pacientes, tanto en dentición temporal como definitiva, se resumen en la Tabla XI.

Severidad							
Lesiones				Cavitaciones			
Mínimo	Máximo	Media	Moda	Mínimo	Máximo	Media	Moda
0	6	1,5	0	0	11	2,4	0

Tabla XI: Severidad de caries según número de lesiones y cavitaciones de pacientes en estudio.

En base a estos resultados, se calculó la correlación de Pearson que tendrían las lesiones y cavitaciones con cada microorganismo (Tabla XII), obteniéndose un valor de correlación de $r=-0,233$ para el cruce Número de UFC/ml de *Streptococcus mutans* de la muestra y Número de lesiones del paciente, existiendo correlación, inversamente proporcional (Anexo 11.12).

		UFC/ml <i>Str. mutans</i>
N° de Lesiones	Correlación de Pearson	-0,233
	Sig.	0,241
	N	27

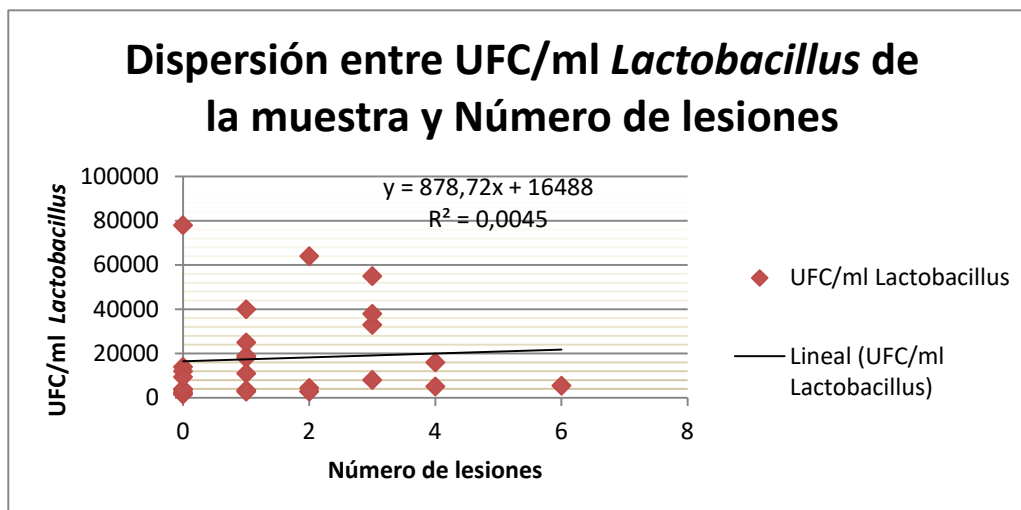
Tabla XII: Correlación de Pearson entre UFC/ml de *Str. mutans* y Número de lesiones.

En la Tabla XIII, para el cruce de variables Número de UFC/ml de *Streptococcus mutans* de la muestra y Número de cavitaciones del paciente, el valor de correlación de Pearson fue de $r=-0,188$; demostrando correlación, con valor negativo (Anexo 11.13).

		UFC/ml <i>Str. mutans</i>
N° de Cavitaciones	Correlación de Pearson	-0,188
	Sig.	0,347
	N	27

Tabla XIII: Correlación de Pearson entre UFC/ml de *Str. mutans* y Número de cavitaciones.

Al correlacionar el Número de UFC/ml de *Lactobacillus* de la muestra y número de lesiones del paciente, se obtuvo un valor de correlación de Pearson de $r=0,067$ (Anexo 11.14), siendo éste un valor positivo de correlación, es decir, directamente proporcional (Gráfico I)



Y, finalmente, cuando se realizó el cruce de variable Número de cavitaciones con UFC/ml de *Lactobacillus* de la muestra, se obtuvo una correlación de Pearson $r=-0,233$; lo que implica una correlación inversamente proporcional (Tabla XIV; Anexo 11.15).

		UFC/ml <i>Lactobacillus</i>
N° de Cavitaciones	Correlación de Pearson	-0,233
	Sig.	0,24
	N	27

Tabla XIV: Correlación de Pearson entre UFC/ml de *Lactobacillus* y Número de cavitaciones.

V.DISCUSIONES

El presente estudio tuvo por objetivo determinar la relación entre microorganismos (*Streptococcus mutans* y *Lactobacillus spp.*) presentes en el cepillo dental de pacientes pediátricos con distinta actividad cariogénica.

En el Universo estudiado, fue hallada evidencia de relación entre las variables mencionadas. Se encontró proporcionalidad inversa con valores negativos en la correlación de Pearson, y sólo una correlación de variables otorgó un valor directamente proporcional (UFC/ml de *Lactobacillus* y número de lesiones del paciente), siendo todas no significativas.

En nuestra investigación se trabajó con los índices COPD y ceod, para categorizar la actividad cariogénica de los pacientes en estudio

Debemos tener como referencia que la caries dental en niños chilenos de entre 6 y 8 años es de 0,93 dientes permanentes afectados (COPD), y 4,19 dientes temporales afectados (ceod), y en la V región, donde se realizó el estudio, el índice COPD y ceod alcanza los valores de 0,42 y 2,24, respectivamente (Ministerio De Salud - Chile, 2005).

El estudio determinó, como se observa en la Tabla V, que nuestro universo obtuvo un promedio de 6 dientes afectados, tanto permanentes como temporales (a partir de la suma de COPD y ceod), por lo tanto, se encuentran por sobre la media nacional (5,12 dientes), lo que refleja actividad cariogénica alta. Esto se puede explicar si consideramos que los pacientes examinados consultaron en forma espontánea a UCEOT de la Escuela de Odontología.

De acuerdo a los resultados obtenidos, expresados en la Tabla VI, la media de dientes afectados al realizar segregación por género determina que los hombres presentan una media mayor a la media de las mujeres (6,59 y 5,2, respectivamente), y asimismo, la relación que se establece en la presencia de UFC de *Streptococcus mutans* por ml. de muestra según género, determina igualmente que los hombres presentan una media relativamente mayor a la media de las mujeres en el conteo de las UFC de *Str. mutans* de la muestra basal, como se observa en la Tabla VII.

Por otra parte, en la Tabla VIII, que expresa la presencia de UFC/ml de *Lactobacillus* de la muestra basal de nuestra unidad de estudio (cepillo dental), según género, refleja un valor mayor en la media de las mujeres versus la media de la muestra basal en hombres, que determinó un valor menor.

Regularmente existe una fuerte asociación entre la acumulación de placa dental y la presencia de caries (Aguilera et al., 2004). Y asimismo, existe una variación considerable en la destreza manual de cada individuo para desarrollar la remoción mecánica de la placa. No obstante, a la mayoría de los individuos sanos se les puede enseñar a limpiar sus dientes efectivamente, mediante el uso de un cepillo convencional (Kidd, 2005).

En nuestro estudio, la correlación entre sumatoria COPD-ceod con cantidad de UFC/ml de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus* en cepillos dentales arrojó un valor negativo de correlación, como se observa en las Tablas IX y X, lo que refleja una relación inversamente proporcional entre la actividad cariogénica expresada por el paciente y la cantidad de UFC de *Str. mutans* y la cantidad de UFC de *Lactobacillus* que se desarrollan en el medio de cultivo a partir de la muestra.

Considerando los estudios que encuentran conteos de *Str. mutans* negativos en saliva de individuos con caries coronal o en superficie radicular, aunque en proporciones bajas (Walsh y Tsang, 2008), se considera dentro de los parámetros esperados que el paciente que presenta más actividad cariogénica no necesariamente presente mayor conteo de *Str. mutans*, teniendo siempre presente que nuestra investigación utiliza al cepillo dental como unidad de estudio y no se basa en cultivos de saliva o directos desde la boca del paciente. Además, a pesar de la evidencia que soporta la fuerte asociación de *S. mutans* con caries inicial y caries avanzada, Loesche y Straffon, en 1979, señalaron que la caries dental puede ocurrir en ausencia de *Streptococcus mutans*; asimismo, Kleinberg, en 2002, observó que individuos con altos contajes de *S. mutans* no necesariamente desarrollan lesiones de caries (Figueroa-Gordon et al., 2009).

Que el conteo de UFC/ml de muestra sea menor en pacientes con alta actividad cariogénica y mayor en los con baja actividad, también se puede relacionar con el modo y frecuencia de uso del cepillo dental por parte de los pacientes. Aquellos que presentan mayor actividad cariogénica pueden presentar una deficiente remoción de biofilm, por lo que los niveles de bacterias adheridas al cepillo dental (unidad de estudio) serían menores. E inversamente, pacientes que tienen un menor índice COPD pueden tener una mejor higiene y, en consecuencia, una mejor remoción mecánica, por lo que el biofilm arrastrado por el cepillo dental será mayor, y por lo tanto, nuestra unidad de estudio se verá más colonizada por microorganismos. De acuerdo a estudios de Marinho y colaboradores, donde comparó el cepillado dental dos veces al día versus una vez al día, demostró que los niños que cepillaban sus dientes dos veces al día tenían un 14% menos de riesgo de caries versus quienes lo hacían sólo una vez al día (Marinho et al, 2003; citado en: Aránguiz y Rojas, 2006). Por lo tanto, podemos considerar que la remoción mecánica de biofilm (cepillado dental) es un factor indispensable en la prevención del desarrollo de la caries dental (Aránguiz y Rojas, 2006), de acuerdo a la técnica y frecuencia con que se realice.

Mientras más sea utilizado el cepillo dental, mayor es el número de microorganismos que permanecerá en él (Wetzel et al., 2005). Este mismo autor explica que la cavidad bucal puede sufrir una recontaminación a causa de la retención y supervivencia de los microorganismos cariogénicos presentes en los cepillos de dientes. El uso regular de los cepillos dentales advierte una contaminación de éstos con microorganismos, que luego colonizarán la cavidad bucal.

Además debemos considerar la contaminación cruzada como un factor externo que altera la concentración de microorganismos presentes en los cepillos dentales en

estudio (Fuentes y López, 2009). Esto podría facilitar la translocación en un mismo paciente desde tejidos infectados a tejidos no infectados y/o la transmisión entre individuos. (Rodríguez, 2009)

Bunetel y colaboradores, en el 2001, comprobaron que los cepillos dentales de uso regular pueden ser altamente contaminados con microorganismos, dependiendo de sus condiciones de almacenamiento (Bunetel et al., 2001; citado en: Fuentes y López, 2009).

Rodríguez, en el 2009, mencionó que los filamentos de los cepillos dentales son un medio idóneo para el desarrollo de microorganismos que se localizan en el medio ambiente, los que provienen del medio ambiente, o de portadores o enfermos que pudieran transmitirlos a través de su uso.

Al realizar el análisis de correlación entre los microorganismos y la severidad de las lesiones presentes en boca al momento del examen, se determinó relación inversamente proporcional para todos los análisis correlacionales (Lesión/*Str. mutans* en Tabla XII; Cavitación/*Str. mutans* en Tabla XIII, y Cavitación/*Lactobacillus* en Tabla XIV), a excepción de la correlación de Pearson con los datos de lesión/*Lactobacillus*, que dio un valor directamente proporcional, observado también en el Gráfico 1, pero aun así, el resultado no es significativo para el análisis que se realizó. Todos estos resultados se respaldan con lo explicado anteriormente: el simple hecho de que el paciente utilice con mayor frecuencia el cepillo dental con una técnica correcta, determinará que el arrastre bacteriano y retención de estos en el cepillo sea mayor, provocando una mayor colonización del cepillo en el tiempo (Wetzel et al., 2005).

Es importante que consideremos, para estos resultados, que el *Lactobacillus spp.*, a pesar de que se encuentra preferentemente en la superficie del dorso de la lengua y no en la superficie dental, generalmente se asocia con la prevalencia e incremento de caries, reflejando la acidez del medio ambiente bucal ocasionada por la ingesta frecuente de azúcares y la presencia de nichos ecológicos (Crossner, 1981; citado en: Sánchez et al., 2005).

VI. CONCLUSIONES

- La realización de este estudio, permitió relacionar microorganismos identificados y cuantificados en cepillos dentales de pacientes pediátricos con distinta actividad cariogénica, estableciendo correlaciones no significativas.
- Se estableció un nivel de Actividad cariogénica con un promedio de ceod-COPD de 6 dientes en los 27 pacientes examinados, pertenecientes a la base de datos de UCEOT de la Escuela de Odontología de la Universidad de Valparaíso. Este promedio fue considerado Alto.
- Por género, se observó que las mujeres presentan un promedio en el índice COPD-ceod de 5,2 y los hombres tienen un promedio de 6,6.
- Con el examen inicial se estableció la severidad de caries de los pacientes, tanto en dentición temporal como definitiva, teniendo como promedio 1,5 lesiones y 2,4 cavitaciones.
- Se logró identificar *Streptococcus mutans* en el cepillo dental, encontrando un promedio de 17.610 UFC/ml en mujeres y de 110.000 UFC/ml en hombres.
- Se logró identificar *Lactobacillus spp.* en el cepillo dental, determinando un promedio de 21.610 UFC/ml en mujeres y de 15.600 UFC/ml en hombres.
- Se relacionaron las UFC/ml de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus spp.* con la actividad cariogénica de cada paciente en estudio (sumatoria de COPD-ceod), determinando resultados de correlación negativa en ambos. Con las UFC/ml de los *Str. mutan*, el valor de correlación de Pearson fue $r=-0,364$, estableciendo una relación inversamente proporcional entre las variables. Para las UFC/ml de *Lactobacillus spp.*, la correlación que se estableció arrojó como resultado $r=-0,146$.
- Al establecer una correlación entre las UFC/ml de *Streptococcus mutans* y el grado de severidad de la caries (lesión o cavitación) se lograron resultados negativos para ambas variables: $r=-0,233$ para lesión; y $r=-0,188$ para cavitación, estableciendo una relación inversamente proporcional. Al establecer la correlación con las UFC/ml de *Lactobacillus spp.*, se obtienen resultados distintos, ya que la correlación con lesiones arrojó un valor positivo ($r=0,067$), por lo tanto, es directamente proporcional mientras que para la correlación con cavitaciones dio nuevamente una relación inversamente proporcional ($r=-0,233$).
- La realización de este estudio instaura una línea investigativa en relación al tema tratado, que permitirá la evaluación y análisis del estado de los cepillos dentales en cuanto a contaminación microbiana, almacenamiento u otros, con el objetivo de establecer pautas para la manipulación adecuada, y en consecuencia, disminuir los niveles de infección de ellos, no sólo de *Lactobacillus spp.* y *Streptococcus mutans spp.*, sino que también de otros microorganismos estudiados en el futuro.

VII. SUGERENCIAS

- Utilizar una muestra mayor permitirá obtener correlaciones significativas.
- Se trata de una investigación de alto costo para los investigadores por lo que se recomienda buscar financiamiento externo o auspicio.
- Este estudio se ha establecido como base para el desarrollo de una línea investigativa. Para futuras trabajos en el área sugerimos lo siguiente:
 - Evaluar la técnica de cepillado en los pacientes al inicio del estudio con el objetivo de clasificarla, según parámetros previamente establecidos.
 - Considerar como variable la habilidad motriz del paciente.
 - Observar manipulación de cepillo dental posterior al cepillado, la que podría tener influencia en la colonización y desarrollo bacteriano. (lavado, secado y almacenamiento).
 - Evaluar dieta cariogénica para establecer relaciones con actividad cariogénica y severidad de caries.
 - Evaluar de flujo salival y pH al inicio y final del estudio.
 - Incorporar cepillo control para evaluar la contaminación cruzada del cepillo en estudio.
 - Evaluar contaminación ambiental de cepillo dental con bacterias comúnmente halladas en aerosoles del cuarto de baño.
 - Estudiar otros microorganismos frecuentemente asociados al desarrollo y progresión de la caries dental u otras patologías de base microbiana.
 - Realizar cultivo bacteriano en boca para comparar con cultivo de cepillos dentales.

VIII. RESUMEN

Identificación y Cuantificación de microorganismos en cepillos dentales de pacientes con variada actividad cariogénica.

Resumen

Se realizó un estudio descriptivo en pacientes de 6-8 años ingresados al sistema de atención Odontopediátrica de la Universidad de Valparaíso, donde se cuantificaron UFC (unidades formadoras de colonias) de *Streptococcus mutans* spp. y *Lactobacillus* spp. presentes en cepillos dentales, utilizando agares selectivos TYCSB y Rogosa, respectivamente.

El objetivo de este estudio fue determinar UFC/ml de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus* spp. en cepillos dentales de pacientes pediátricos y relacionarlas con género, nivel de actividad cariogénica y grado de severidad de caries.

Se inició el estudio con un examen odontológico general a cada paciente, donde se determinó su actividad cariogénica. Se observó, entre los pacientes examinados, un promedio ceod-COPD de 6 dientes, con una severidad de 1,5 lesiones y 2,4 cavitaciones en promedio.

Se entregó un cepillo dental nuevo a cada paciente que fue utilizado durante 30 días, desde el día del examen. Posteriormente éstos fueron retirados en el domicilio de cada uno de ellos, donde se tomó la muestra en suero fisiológico estéril para evitar contaminación ambiental, la que fue trasladada al laboratorio donde se cultivaron exitosamente en los agares mencionados.

Se determinaron resultados de correlación negativa. Al relacionar las UFC/ml con la actividad cariogénica, el valor de correlación de Pearson fue $r=-0,364$ para *S. mutans*, y $r=-0,146$ para *Lactobacillus* spp., estableciendo una relación inversamente proporcional entre las variables. La correlación entre UFC/ml de *Streptococcus mutans* y grado de severidad arrojó resultados negativos para ambas variables: $r=-0,233$ para lesión; y $r=-0,188$ para cavitación, estableciendo una relación inversamente proporcional. Para *Lactobacillus* spp., la correlación con lesiones arrojó un valor positivo ($r=0,067$), por lo tanto, es directamente proporcional, mientras que la correlación con cavitaciones dio nuevamente una relación inversamente proporcional ($r=-0,233$).

Identification and Quantification of microorganisms in toothbrushes of patients with varied cariogenic activity.

Abstract

A descriptive study was realized in 6-8 years old patients recruited in the system of Pediatric Dental Attention of the University of Valparaiso, where were quantified CFU (Colony-Forming Unit) of *Streptococcus mutans* spp. and *Lactobacillus* spp. present in toothbrushes, using selective agar TYCSB and Rogosa, respectively.

The objective of this study was determine the CFU/ml of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. in toothbrushes of pediatric patients and relate them with gender, cariogenic activity level and caries severity degree.

The study began with a general dental examination to every patient, where it was established their cariogenic activity. Among the examined patients was observed a mean number of deft-DMFT of 6 teeth, with a mean severity of 1.5 carious injuries and 2.4 cavitations.

It was given a new toothbrush to every patient, which was used for 30 days from the day of the examination. Later these were withdrawn in each one domicile, and in there the sample was taken to avoid environmental contamination. After that, the samples were transported to the laboratory and were successfully cultivated in their respective agar.

Negative correlation results were obtained. When CFU/ml with cariogenic activity were related, the Pearson correlation value was $r=-0.364$ for *S. mutans*, and $r=-0.146$ for *Lactobacillus* spp., establishing an inversely proportional relationship between the variables. The correlation between CFU/ml of *Streptococcus mutans* and the severity level gave negatives results for both variables: $r=-0.233$ for lesion; and $r=-0.188$ for cavity, establishing an inversely proportional relationship. For *Lactobacillus* spp., the correlation with lesions gave a positive value ($r=0.067$), therefore, is directly proportional, while the correlation with cavities gave an inversely proportional relationship ($r=-0.233$)

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguilera, GLA. y colaboradores (2004): Niveles de *Streptococcus mutans* y prevalencia de caries dental en una población de escolares de la zona urbana de la ciudad de Zacatecas. Rev ADM, volumen: 61: 3: 85-91.
2. Al-Ahmad, A. y colaboradores (2009): Endodontic and salivary isolates of *Enterococcus faecalis* integrate into biofilm from human salivary bacteria cultivated In Vitro. J Endod, volumen: 35: 986–991.
3. Aránguiz, C.; Rojas, P. (2006): Higiene dental infantil, ¿Cómo, cuándo y con qué?. <http://www.uc.cl/medicina/medicinafamiliar/html/articulos/107.html>
4. Babaahmady, K.G.; Challacombe, S.J.; Marsh, P.D.; Newman, H.N. (1998): Ecological study of *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus spp.* at sub-sites from approximal dental plaque from children. Caries Res, volumen: 32: 51-58.
5. Baca, P. (2002): Microbiología de la caries. En: Microbiología Oral. Editores: Liébana J. y colaboradores. Segunda edición, Editorial McGraw-Hill - Interamericana de España, Madrid - España, pp: 567.
6. Badet, C.; Thebaud, N.B. (2008): Ecology of lactobacilli in the oral cavity: A review of literature. The Open Microbiology Journal, volumen: 2: 38-48.
7. Barrancos, J.; Rodríguez G. (2006): Cariología. En: Operatoria dental. Integración clínica. Editor: Barrancos J. Cuarta edición, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires - Argentina, pp: 302, 308.
8. Biomark Laboratories (2007): Dehydrated Cultural Media. <http://www.biomarklabs.com/products/b379.htm>
9. Borgström, M.; Sullivan, Å.; Granath, L.; Nilsson, G (1997): On the pH-lowering potential of lactobacilli and mutans streptococci from dental plaque related to the prevalence of caries. Community Dent Oral Epidemiol, volumen: 25: 165-169.
10. Brown, P.; Nicolini, S.; Onetto, J.E. (1991): Caries de dentina. En: Caries. Editores: Brown P. y colaboradores. Primera edición, Ediciones de la Universidad de Viña del Mar, Valparaíso - Chile, pp: 63, 69.
11. Brown, P.; Nicolini, S.; Onetto, J.E. (1991): Etiopatogenia. En: Caries. Editores: Brown P. y colaboradores. Primera edición, Ediciones de la Universidad de Viña del Mar, Valparaíso - Chile, pp: 18.
12. Caudry, S.; Klitorinos, A.; Chan, E. (1995): Contaminated toothbrushes and their disinfection. J. Can Dent Assoc, volumen: Jun 61: 6: 511-516.

13. Donlan, R.; Costerton, W. (2002): Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, volumen: 15: 167-93
14. Escobar, F. (2004): Prevención en odontología pediátrica. En: *Odontología Pediátrica*. Editor: Escobar F. Segunda edición, Editorial Actualidades Médico Odontológicas Latinoamérica, Caracas - Venezuela, pp: 117.
15. Figueroa-Gordon, M.; Acevedo, AM.; Alonso, G. (2009): Microorganismos presentes en las diferentes etapas de la progresión de la lesión de Caries dental. *Acta odontol. venez.*, volumen: 47: 1: 227-240
16. Filho, P.; Macari, S.; Faria, G.; Assed, S.; Ito, I. (2000): Microbial contamination of toothbrushes and their decontamination. *Pediatric Dentistry*, volumen: 22: 5: 381-385.
17. Fuentes, P.; López, S. (2009): Contaminación cruzada de cepillos dentales por bacterias aerobias.
http://odontologia.iztacala.unam.mx/instrum_y_lab1/otros/ColoquioXVIII/contenido/cartel/1307/contaminacioncruz.htm
18. Gamazo, C. (2005): Cultivos en anaerobiosis. En: *Manual Práctico de Microbiología*. Editores: Gamazo C. y colaboradores. Tercera edición, Editorial Masson, Barcelona - España, pp: 221.
19. García-Godoy, F.; Hicks, J. (2008): Maintaining the integrity of the enamel surface. *J Am Dent Assoc*, volumen: 139: 25S-34S.
20. Hamda, S.; Slade, H. (1980): Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiological Reviews*, volumen: 44: 2: 331-384.
21. Henostroza, G. (2007): Concepto, teorías y factores etiológicos de la caries dental. En: *Caries dental: principios y procedimientos para el diagnóstico*. Editores: Henostroza G. y colaboradores. Primera edición, Editorial Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima - Perú, pp: 17, 20, 24-26.
22. Hildebrandt, G.; Bretz, W. (2006): Comparison of culture media and chairside assays for enumerating mutans streptococci. *J Appl Microbiol*, volumen: 100: 6: 1339-1347.
23. Keyes, P.H.; Jordan, H.V. (1963). Factors influencing the initiation, transmission and inhibition of dental caries. *Am Assoc Adv Sci*, volumen: 75: 261-283.
24. Kidd, E.A.M. (2005): Introduction. En: *Essentials of dental caries: The disease and its management*. Editor: Kidd E.A.M. Tercera edición, Editorial Oxford University Press, Oxford - Inglaterra, pp: 4, 12-13.

25. Kidd, E.A.M. (2005): Prevention of caries by plaque control. En: Essentials of dental caries: The disease and its management. Editor: Kidd E.A.M. Tercera edición, Editorial Oxford University Press, Oxford - Inglaterra, pp: 72.
26. Klinke, T. y colaboradores. (2009): Acid production by oral strains of *Candida albicans* and lactobacilli. *Caries Res*, volumen: 43: 83-91.
27. Koga-Ito, C.Y.; Unterkircher, C.S.; Watanabe, H.; Martins, C.A.P.; Vidotto, V.; Jorge, A.O.C. (2003): Caries risk tests and salivary levels of immunoglobulins to *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* in mouthbreathing syndrome patients. *Caries Res*, volumen: 37: 38-43.
28. Labranque, R.; Vidal, H. (2001): Estudio comparativo de salud oral, en una población escolar rural de la VI región. *Revista Dental de Chile*, volumen: 92: 1: 13-16.
29. Levy, S.M.; Warren, J.J.; Broffitt, B.; Hillis, S.L.; Kanellis, M.J. (2003): Fluoride, beverages and dental caries in the primary dentition. *Caries Res*, volumen: 37: 157-165.
30. Li, Y.; Caufield, P.W. (1995): The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. *J Dent Res*, volumen: 74: 2: 681-685.
31. Liébana, J. (2002): Bacilos grampositivos anaerobios facultativos de interés oral. En: *Microbiología Oral*. Editores: Liébana J. y colaboradores. Segunda edición, Editorial McGraw-Hill - Interamericana de España, Madrid - España, pp: 349-351.
32. Liébana, J. (2002): Composición y ecología de la microbiota oral. En: *Microbiología Oral*. Editores: Liébana J. y colaboradores. Segunda edición, Editorial McGraw-Hill - Interamericana de España, Madrid - España, pp: 524.
33. Liébana, J. (2002): Género *Streptococcus* y bacterias relacionadas. En: *Microbiología Oral*. Editores: Liébana J. y colaboradores. Segunda edición, Editorial McGraw-Hill - Interamericana de España, Madrid - España, pp: 328-334.
34. Linossier, A. y colaboradores (2003): Streptococci mutans: a semi-quantitative method to assess the risk to oral infection in preschool Chilean children. *Rev Med Chil*, volumen: 131: 4: 412-418.
35. Medina, R.; Moreno, L.; Velasco, M.; Gutierrez, S. (2005): Estudio comparativo de medios de cultivo para crecimiento y recuperación del *Streptococcus mutans* ATCC 25175 "in vitro". http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/ARTORIG2_3.pdf
36. Ministerio de Educación (2004): Informe final de evaluación. Programa de salud bucal. http://www.dipres.cl/574/articles-14909_doc_pdf.pdf , pp. 18.

37. Ministerio de Salud (2005): Anexo 1. En: Guía Clínica Salud Oral Integral en Niños de 6 años. Primera edición, Santiago - Chile, pp: 42-43.
38. Ministerio de Salud (2009): Glosario de términos. En: Guía clínica salud oral integral para niños y niñas de 6 años. Editor: Ministerio de Salud, Santiago - Chile, pp: 66.
39. Nishikawara F. y colaboradores (2006): Correlation of cariogenic bacteria and dental caries in adults. J Oral Sci, volumen: 48:4: 245-251.
40. Nishimura, M.; Oda, T.; Kariya, N.; Matsumura, S.; Shimono, T. (2008): Using a Caries Activity Test to Predict Caries Risk in Early Childhood. J Am Dent Assoc, volumen: 139: 63-71.
41. Obando, S.; Barrantes, M.; Hernández F. (1999): Construcción y evaluación de una jarra económica para anaerobiosis. Rev. costarric. cienc. méd., volumen: 20: 3-4: 175-181.
42. Padilla, C.; Lobos, O.; Villagra, C.; Padilla, A. (2007): Susceptibilidad de cepas de *Streptococcus mutans* productores y no productores de biofilm, frente a clorhexidina, triclosán y fluoruro de sodio utilizadas en colutorios orales. Rev. Latinoam. actual. bioméd., volumen: 1: 2: 23-28.
43. Palomer, L. (2006): Caries dental en el niño: una enfermedad contagiosa. Rev Chil Pediatr, volumen: 77: 1: 56-60.
44. Poeta, P. y colaboradores. (2009): Influence of oral hygiene in patients with fixed appliances in the oral carriage of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and *Enterococcus* isolates. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, volumen: 108: 557-564.
45. Quindós, G.(2002): Hongos de interés oral. En: Microbiología Oral. Editores: Liébana J. y colaboradores. Segunda edición, Editorial McGraw-Hill - Interamericana de España, Madrid - España, pp: 487.
46. Rodríguez, I. (2009): Evaluación de la contaminación microbiana en cepillos dentales ubicados en dos diferentes ambientes: cuarto de baño y en el estuche del mismo cepillo.
http://odontologia.iztacala.unam.mx/instrum_y_lab1/otros/ColoquioXVIII/contenido/cartel/1305/evaluacioncontam.htm
47. Rogosa, M. y colaboradores (1951): A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. J. Bacteriol, volumen: 62: 132.
48. Sánchez, L. y colaboradores (2005): Línea basal de factores de riesgo a caries en escolares. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex., volumen: 62: 1.

49. Seif, T. (1997): Placa dental y microbiología de la caries dental. En: Cariología: Prevención, Diagnóstico y Tratamiento Contemporáneo de la caries dental. Editores: Seif T. y colaboradores. Editorial Actualidades Médico Odontológicas Latinoamérica, Bogotá - Colombia, pp: 35-57.

50. Shirai, K. (2005): Laboratorio de Microbiología General, Práctica No.4: "Aislamiento de bacterias por el método de dilución en placa".
<http://docencia.izt.uam.mx/smk/233155/practicas/Practica%204.pdf>, pp: 3-4.

51. Sosa, M. (2002): Indicadores epidemiológicos. En: Guías prácticas de estomatología. Editor: Sosa M. Ministerio de Salud Pública, La Habana - Cuba, pp: 336.

52. Svensäter, G.; Borgström, M.; Bowden, G.H.W.; Edwardsson, S. (2003): The acid-tolerant microbiota associated with plaque from initial caries and healthy tooth surfaces. *Caries Res*, volumen: 37: 395-403.

53. Tagliaferro, E.; Ambrosano, G.; Meneghim, M.; Pereira, A. (2008): Risk indicators and risk predictors of dental caries in schoolchildren. *J. Appl. Oral Sci*, volumen: 16: 6: 408-413.

54. Tanzer, J.; Livingston, J.; Thompson, A. (2001): The microbiology of primary dental caries in humans. *Journal of Dental Education*, volumen: 65: 10: 1028-1037.

55. van Houte, J. (1994): Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res*, volumen: 73: 3: 672-681.

56. Wan, AK.; Seow, WK.; Walsh, LJ.; Bird, PS. (2002): Comparison of five selective media for the growth and enumeration of *Streptococcus mutans*. *Aust Dent J*, volumen: 47: 1: 21-26.

57. Walsh, LJ.; Tsang, AK. (2008): Pruebas de bacteria cariogénica en el consultorio: conceptos y estrategias clínicas actuales. *J Minim Interv Dent*, volumen: 1: 2: 128-154.

58. Wetzel, W.; Schaumburg, C.; Ansari, F.; Kroeger, T.; Sziegoleit, A. (2005): Microbial contamination of toothbrushes with different principles of filament anchoring. *J Am Dent Assoc*, volumen: 136: 758-765.

59. WHO Oral Health (1997): Dentition status and Criteria for diagnosis and coding (Caries). En: *Oral Health Surveys - Basic methods*. Cuarta edición, Ginebra - Suiza, pp. 39-44. <http://www.whocollab.od.mah.se/expl/orhsurvey97.html>

60. Wolff, M.S.; Larson, C. (2009): The cariogenic dental biofilm: good, bad or just something to control?. *Braz Oral Res*, volumen: 23: Spec Iss 1: 31-38.

61. World Health Organization (2003): The World Oral Health Report 2003.
http://www.who.int/oral_health/media/en/orh_report03_en.pdf

X. ANEXOS

11.1 Tabla XV: Tabla de distribución del COPD y ceod por región. Índice ceod en Niños de 6 a 8 Años por Regiones: Chile 1996 - 1997 – 1999.

REGION	c	e	o	ceod
I	1.84	0.90	0.58	3.32
II	2.18	0.60	0.60	3.38
III	1.87	0.88	0.35	3.10
IV	2.13	0.79	0.97	3.89
V	1.10	0.46	0.68	2.24
VI	2.26	0.93	0.83	4.02
VII	2.52	1.02	1.20	4.74
VIII	2.88	1.38	0.54	4.80
IX	3.55	1.72	0.71	5.98
X	2.88	1.48	1.22	5.58
XI	2.24	2.00	1.00	5.24
XII	1.78	1.01	1.13	3.92
RM	2.06	1.07	1.16	4.29
País	2.25	1.10	0.84	4.19

(Ministerio de Salud – Chile, 2005)

11.2 Tabla XVI: Tabla de distribución del COPD y ceod por región. Índice COPD en Niños de 6 a 8 años, por Regiones: Chile 1996 - 1997 – 1999.

Región	C	O	P	COPD
I	0.47	0.09	0.02	0.58
II	0.50	0.07	0.03	0.60
III	0.46	0.01	0.02	0.49
IV	0.63	0.10	0.04	0.77
V	0.32	0.08	0.02	0.42
VI	0.93	0.13	0.01	1.07
VII	0.79	0.24	0.08	1.11
VIII	0.92	0.13	0.06	1.11
IX	1.00	0.09	0.11	1.20
X	1.26	0.15	0.07	1.48
XI	0.99	0.13	0.11	1.23
XII	0.69	0.12	0.03	0.84
RM	0.95	0.15	0.07	1.17
Pais	0.76	0.11	0.05	0.93

(Ministerio de Salud – Chile, 2005)

11.3 Tabla XVII: Reactivos BD LBS Agar (Lactobacillus Selection Agar)

Fórmula* por litro de agua purificada

Digerido pancreático de caseína	10,0 g	Hidrato acetato de sodio	25,0 g
Extracto de levadura	5,0	Acido acético	1,3 mL
Fosfato monopotásico	6,0	Sulfato magnésico	0,575 g
Citrato de amonio	2,0	Sulfato de manganeso	0,12
Glucosa	20,0	Sulfato ferroso	0,034
Polisorbato 80	1,0	Agar	15,0

pH 5,5 ± 0,2

*Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Certifico haber recibido la información necesaria para permitir que mi pupilo participe de la investigación de seminario de tesis: "Identificación de microorganismos presentes en cepillos dentales de pacientes con variada actividad cariogénica", la cual tiene como objetivo encontrar una relación entre los microorganismos encontrados en los cepillos dentales de distintos niños y la presencia de caries dental, siendo mi pupilo seleccionado de manera aleatoria de entre la base de datos de la Escuela de Odontología de la Universidad de Valparaíso.

Estoy consciente de que la investigación está a cargo de tres alumnos tesistas de la Escuela de Pre-grado de Odontología de la Universidad de Valparaíso, bajo supervisión docente, quienes serán los encargados de realizar los exámenes bucales, la entrega de cepillos dentales y el retiro de estos en sus respectivos domicilios un mes después del examen bucal.

El registro de la información obtenida será confidencial y conservado por el equipo de investigación con fines académicos.

Esta investigación no tiene ningún costo para mí ni mi pupilo, salvo la movilización, de ser necesaria, para el primer y único examen bucal, que será realizando en las clínicas de la Escuela de Odontología de la Universidad de Valparaíso.

De ser necesario algún tipo de tratamiento posterior, mi pupilo será derivado a las clínicas de Odontología Integral Infantil de la Escuela de Pre-grado de Odontología de la Universidad de Valparaíso, ingresando al Sistema de Atención de la Facultad. En caso de que mi pupilo presente algún tipo de urgencia odontológica (dolor, fiebre, aumento de volumen por infección odontológica) al momento del examen bucal, será tratada por parte de los investigadores.

Autorizo que mi pupilo participe de este estudio, retirándolo del mismo en cualquier momento si lo estimo conveniente.

He recibido conforme una copia de este documento para una futura referencia.

Yo, _____ RUT _____
(Nombre y Apellidos)

Apoderado de _____ RUT _____
(Nombre y Apellidos)

Valparaíso, ____ de _____, 2010.

(Reverso FICHA ODONTOLÓGICA SIMPLIFICADA)

EXAMEN EXTRAORAL: (ATM, Tejidos Blandos y Anexos)

EXAMEN INTRAORAL: (Tejidos blandos, lengua, piso de boca)

OBSERVACIONES:

DERIVACIÓN:

11.6 Tabla XVIII: Fórmula e instrucciones para preparación Agar SL Rogosa, marca Biomark® (Biomark Laboratories, 2007).

B379	ROGOSA SL AGAR
Formula	B379
Ingredients	gms/lit.
Tryptose	10.00
Yeast extract	5.00
Dextrose	10.00
Arabinose	5.00
Saccharose	5.00
Sodium acetate	15.00
Ammonium citrate	2.00
Monopotassium phosphate	6.00
Magnesium sulphate	0.57
Manganese sulphate	0.12
Ferrous sulphate	0.03
Polysorbate 80	1.00
Agar	15.00
Final pH (at 25°C) : 5.4 + 0.2	

Directions

Suspend 75 gms. of B379 in 1000ml. distilled water. Boil to dissolve the medium completely. Add 1.32 ml glacial acetic acid. Mix thoroughly, distribute into culture tubes or flasks. Heat to 90-100°C for 2-3 minutes. Cool to 45°C for direct inoculation. DO NOT AUTOCLAVE.

11.7 Métodos de cultivo en anaerobiosis (Gamazo, 2005):

Para realizar un cultivo en anaerobiosis se pueden seguir los siguientes métodos:

1. Siembra en profundidad: Doble capa. No es muy eficaz porque el O₂ difunde pronto.
2. Siembra en tubo con medio sólido: Transferir el inóculo con pipeta o asa de siembra a un tubo con el medio de cultivo fundido a 45-50 °C (no agitar el tubo durante la siembra para evitar la oxigenación del medio). Dejar solidificar el agar antes de poner los tubos a incubar.
3. Siembra en tubo con medio líquido: Transferir el inóculo a un tubo con caldo y añadir una capa de vaselina estéril, de forma que la superficie del caldo quede totalmente cubierta para impedir la difusión del O₂ al medio. Antes de inocular es conveniente hervir el medio durante 10 min para liberar el O₂.
4. Utilización de jarras de anaerobios (Jarras GasPack): Se consiguen condiciones de anaerobiosis más estrictas que con los métodos anteriores. Son jarras con cierre hermético que disponen de un generador de hidrógeno ($H_2 + O_2 \rightarrow H_2O$) o de CO₂, y un indicador de anaerobiosis REDOX (papel de filtro impregnado con un compuesto, por ejemplo azul de metileno, que se vuelve blanco cuando se reduce).
- 5. Método de la vela:** Si en el laboratorio no se dispone de jarras de anaerobiosis, se puede utilizar un método más sencillo y económico. Colocar las placas y los tubos sembrados junto con una vela encendida en el interior de un frasco con tapón de rosca. Cerrar el frasco herméticamente. Cuando la vela consume todo el O₂ del frasco, se apaga consiguiendo de esta manera una atmósfera anaerobia. Éste fue el método utilizado en este estudio.

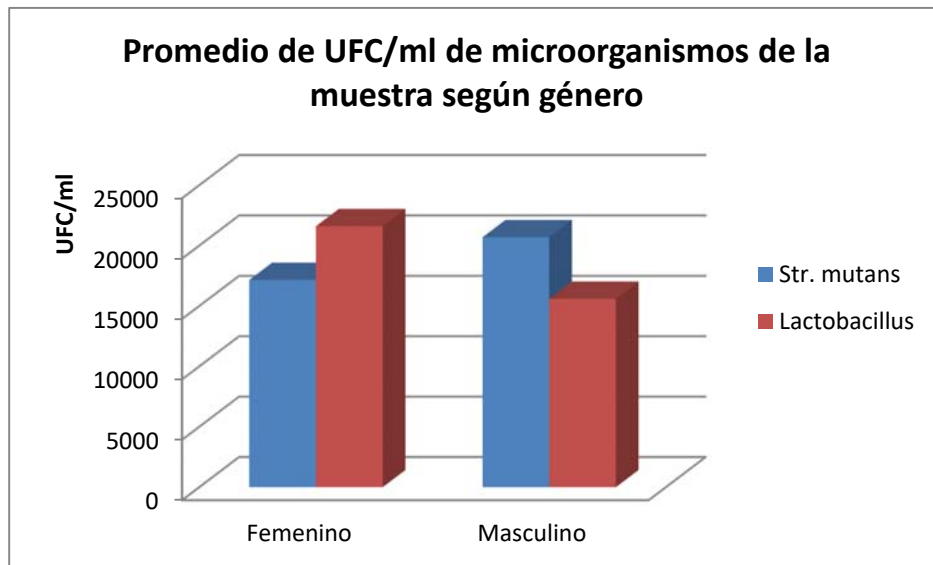
11.8 Reglas para conteo de colonias en placa: (Shirai, 2005)

Seleccionar aquellas placas donde aparezcan de 30 a 300 colonias, pues hay menor error en el conteo.

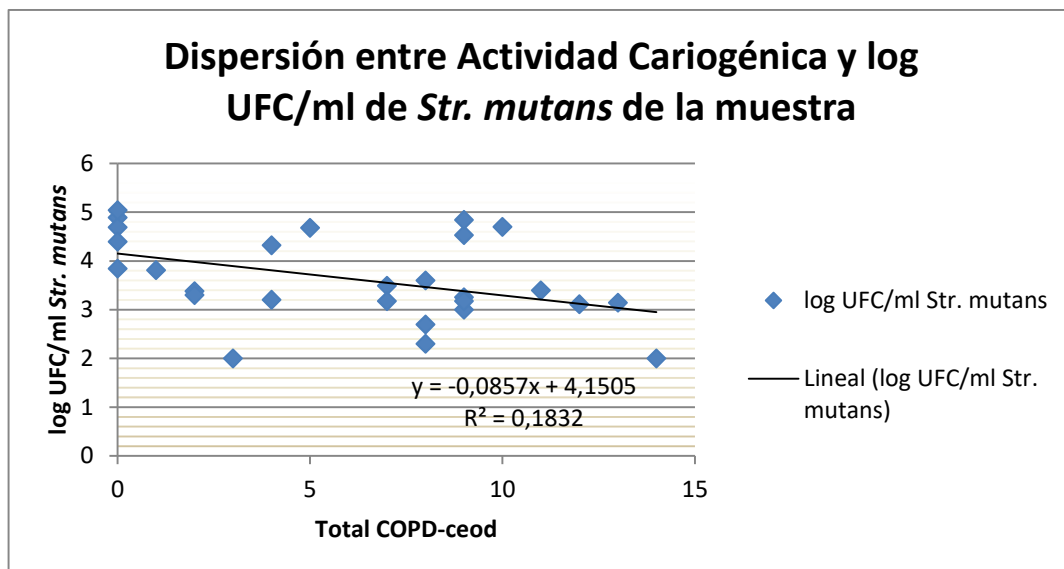
Contar todas las colonias de la placa. Si el número se estima mayor de 300 y no hay diluciones subsecuentes:

- 301-500 colonias se divide en dos partes y el número de colonias contadas se multiplica por 2.
- 501-800 colonias se divide en cuatro partes y el número de colonias contadas se multiplica por 4.
- >800 colonias se cuentan de 10 a 20 cuadros se promedia y se multiplica por el número de cuadros que ocupa la caja.
- El número de colonias contadas deberá ser multiplicada por el inverso de la dilución y considerar si la técnica fue por vertido o por superficie (debido al volumen de la muestra).
- Redondear la cifra obtenida en el recuento de tal forma que haya dos dígitos al inicio de la cifra por ejemplo:
 - 129 se reporta 130
 - 2,417 se reporta 2400
 - 49 se reporta 49.

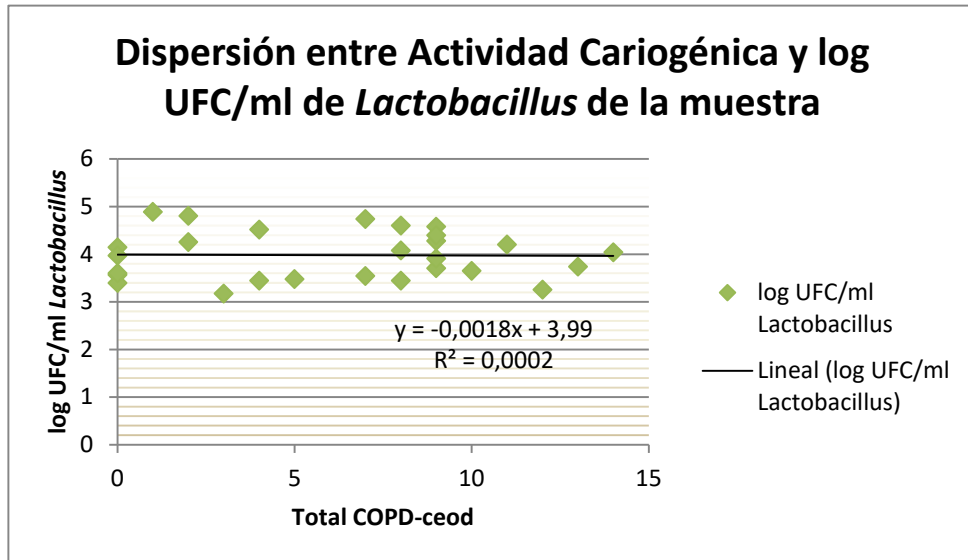
11.9 Gráfico 2: Promedio de UFC/ml de ambos microorganismos según género.



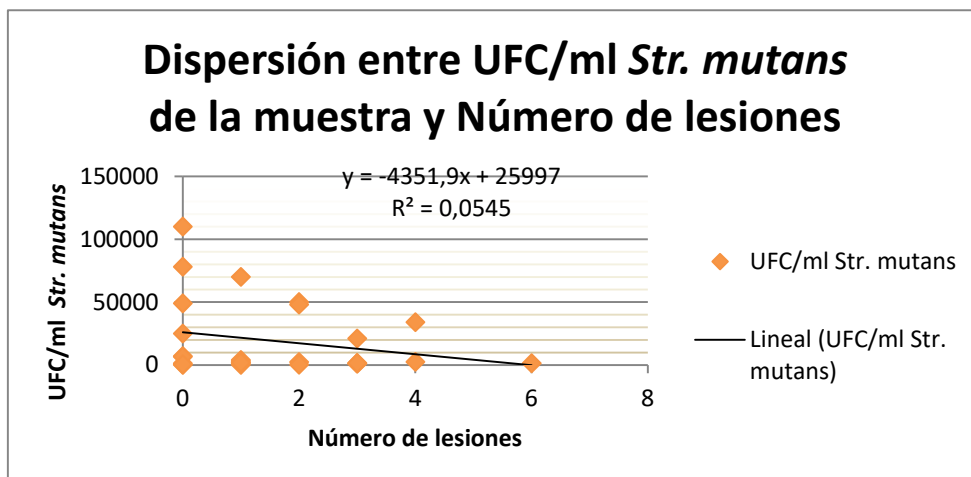
11.10 Gráfico 3: Relación entre Valor logarítmico del número total de UFC/ml de *Str. mutans* y el valor total del índice ceod-COPD del paciente.



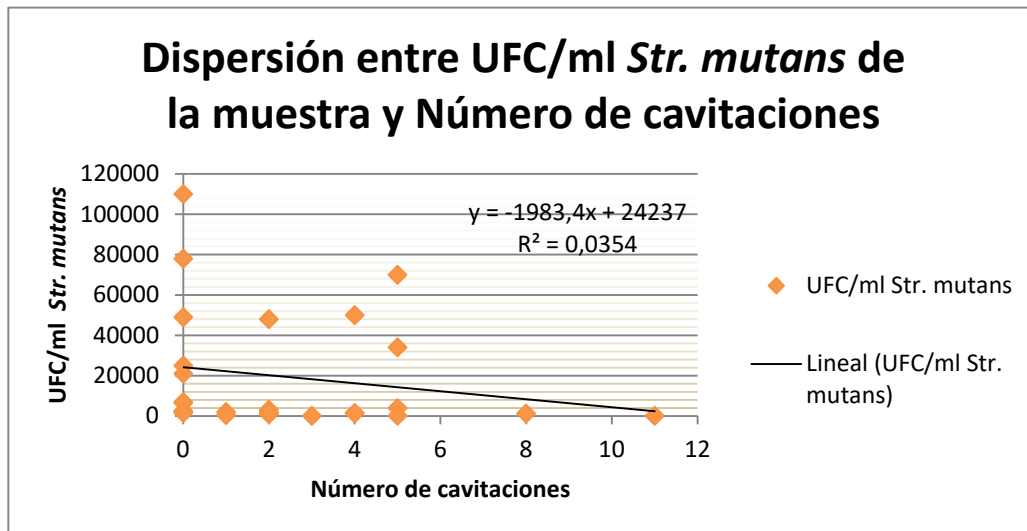
11.11 Gráfico 4: Relación entre Valor logarítmico del número total de UFC/ml de *Lactobacillus* y el valor total del índice ceod-COPD del paciente.



11.12 Gráfico 5: Relación entre UFC/ml de *Str. mutans* y el Número de lesiones del paciente.



11.13 Gráfico 6: Relación entre UFC/ml de *Str. mutans* y el Número de cavitaciones del paciente.



11.14 Tabla XIX: Correlación de Pearson entre UFC/ml de *Lactobacillus* y Número de lesiones.

		UFC/ml <i>Lactobacillus</i>
Nº de Lesiones	Correlación de Pearson	0,067
	Sig.	0,739
	N	27

11.15 Gráfico 7: Relación entre UFC/ml de *Lactobacillus* y el Número de cavitaciones del paciente.

