



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**“IDENTIFICACIÓN, TRANSMISIÓN Y HOMOLOGÍA DE  
STREPTOCOCCUS MUTANS DE LA MADRE DURANTE LA  
GESTACIÓN Y EL NIÑO EN EL PERÍODO POST NATAL”**

TESISTA:

**OD. FABIANA PÍA MARIANA CARLETTO KÖRBER**

DIRECTOR:

**PROF. DRA. LILA SUSANA CORNEJO**

**CÓRDOBA, 2006**



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-  
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**Trabajo de Tesis para optar por al Título de Doctor en Odontología**

**“IDENTIFICACIÓN, TRANSMISIÓN Y HOMOLOGÍA DE  
*STREPTOCOCCUS MUTANS* DE LA MADRE DURANTE LA  
GESTACIÓN Y EL NIÑO EN EL PERÍODO POST NATAL”**

**Director de Tesis: Prof. Dra. Lila Susana Cornejo**

**Doctorando: Od. Fabiana Pía Mariana Carletto Körber**

**2006**

[Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page]

[Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page]

[Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page]

[Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page]

[Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page]

**Dedicado a la memoria de mi padre,  
Dr. Bonifacio Nicolás Carletto**



## AGRADECIMIENTOS

Este estudio se llevó a cabo en la Facultad de Odontología, el Hospital Universitario de Maternidad y Neonatología y la Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, dependientes de la Universidad Nacional de Córdoba.

Quiero agradecer al Sr. Decano de la Facultad de Odontología, Prof. Dr Nazario Kuyumllian; y a la Secretaría de la Escuela de Graduados de la Facultad de Odontología, que facilitaron llevar a cabo este estudio de investigación.

Agradecer al Prof. Consulto de la 1ra Cátedra de Obstetricia y Perinatología de la Facultad de Ciencias Medicas, Dr José Sabino Trezza y a la Directora del Servicio de Odontología del H.U.M.y N., Dra Graciela Quiroga; que autorizaron realizar este trabajo en dicha institución.

Estoy muy agradecida a mi directora de tesis, Prof. Dra Lila Susana Cornejo, por impulsarme a la investigación científica y de ese modo introducirme en el fascinante mundo de la ciencia.

Deseo expresar mi gratitud al tribunal de tesis, Prof. Dra Zunilda Minetti de Mendez, Prof. Dra Perla Krupnik de Hidalgo y Prof. Dr Jorge Paván, por sus valiosos comentarios y críticas constructivas de esta tesis.

Agradezco a la Prof. Titular de la Cátedra Integral Niños y Adolescentes, área Odontopediatría "A", Dra. Alfonsina Lescano de Ferrer por permitirme disponer del tiempo necesario para realizar este trabajo; y a los colegas, amigas y compañeras de cátedra por acompañarme durante estos años.

Agradecer a la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Córdoba, por haberme otorgado la Beca de Doctorado para la realización de esta investigación.

Agradecer a todos los profesionales que colaboraron en el desarrollo experimental de este trabajo, Dra Graciela Jiménez del Laboratorio de Neonatología del Hospital Universitario de Maternidad y Neonatología; ex Prof Dr Hugo Luján del Laboratorio de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Médicas; Prof. Dra Noemí Gardenal y Dr Raul González Ittig del Laboratorio de Genética de Poblaciones de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales; que compartieron desinteresadamente conmigo su inagotable caudal de saberes.

Al Profesor del Departamento de Cariología Dr Claes-Göran Emilson, de la Facultad de Odontología, Universidad de Göteborg, Suecia, por brindarme su asesoramiento científico.

A la Dra. en Ciencias de la Salud, Magíster Mabel Brunotto por la realización del procesamiento estadístico de los datos.

También deseo agradecer a la Prof. Martha Iris Körber, mi madre, por ayudarme a revisar el inglés de esta tesis.

A todas las embarazadas, madres y niños atendidos en este estudio, quienes hicieron posible esta investigación.

Al Laboratorio Bernabó por suministrar generosamente el material de prevención utilizado con las embarazadas.

Finalmente agradezco a mi familia, parientes y amigos por la paciencia, apoyo y amor que me brindaron.

**ÍNDICE**

<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	4
<b>INTRODUCCIÓN</b>	7
<b>MARCO TEÓRICO</b>	11
Características de las afecciones buco-dentales durante el embarazo	11
Aspectos bacteriológicos generales de <i>Streptococcus mutans</i>	13
Reseña histórica	13
Taxonomía	14
Características morfológicas de <i>Streptococcus</i> del grupo <i>mutans</i>	17
Métodos de cultivo y tipificación de especies bacterianas	18
Tipificación de <i>Streptococcus mutans</i>	20
Fenotipificación	20
Genotipificación	21
Transmisión y adquisición inicial de <i>Streptococcus mutans</i>	24
<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO</b>	27
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	27
Objetivos Específicos	27
<b>DISEÑO METODOLÓGICO</b>	28
<b>MATERIAL Y MÉTODO</b>	30
Población de estudio	30
Embarazadas en el último trimestre de gestación	
Hábitos de higiene oral y de consumo de bebidas azucaradas	30
Examen clínico-odontológico	32
Estudio de saliva	33
Diagnóstico de riesgo cariogénico	37
Binomios madre-niño	
Examen clínico-odontológico de los niños	38
Estudio microbiológico de saliva y placa dental	

Aislamiento y tipificación de <i>Streptococcus mutans</i>	38
Estudio genotípico de <i>Streptococcus mutans</i>	40
Preparación de ADN	41
Técnica de AP-PCR	41
Análisis de homología	42
Evaluación estadística	42
	43
<b>RESULTADOS</b>	
Embarazadas en el último trimestre de gestación	44
Hábitos de higiene oral	
Hábitos de consumo de bebidas azucaradas	44
Examen clínico-odontológico	44
Estudio de saliva	45
Diagnóstico de riesgo cariogénico	45
Binomios madre-niño	50
Examen clínico-odontológico de los niños	
Estudio microbiológico de saliva y placa dental	50
Estudio genotípico de <i>Streptococcus mutans</i>	51
Técnica de AP-PCR	54
Análisis de homología	54
Evaluación estadística	56
<b>DISCUSIÓN</b>	59
<b>CONCLUSIÓN</b>	70
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	72
<b>ANEXO 1</b>	82
<b>ANEXO 2</b>	83
<b>ANEXO 3</b>	84





## RESUMEN

Existen evidencias de que en la infección oral temprana la principal vía de transmisión de *Streptococcus mutans* es a través del contacto salival madre-niño y que la adquisición inicial tiene lugar durante un período específico de tiempo denominado "Ventana de Infectividad"; que transcurre entre los 6 y 30 meses de vida del niño, existiendo mayor riesgo entre los 18 y 30 meses de edad. En cuanto a la fuente y forma de transmisión se señala que el número de *Streptococcus mutans* en saliva materna puede ser un factor de riesgo para la salud del niño.

En esta investigación se evaluó la situación de los factores de riesgo cariogénico en mujeres embarazadas durante el último trimestre de gestación y su relación con la transmisión y homología de las cepas de *Streptococcus mutans* en los binomios madre-niño, en pacientes que asisten al Hospital Universitario de Maternidad y Neonatología.

Se analizó la situación de los factores de riesgo cariogénico en 53 embarazadas entre los 20 – 30 años de edad sin antecedentes de enfermedad sistémica. Las madres dieron su consentimiento informado por escrito para la participación del binomio madre-niño en esta investigación. En el transcurso del tiempo de estudio, la muestra inicial sufrió un desgranamiento; por razones personales, cambio de domicilio, fallecimiento, etc.; completando el estudio 24 binomios madre-niño.

En las mujeres embarazadas durante el último trimestre de gestación se realizó una entrevista por cuestionario para relevar información respecto a la frecuencia y momentos de cepillado y de consumo de bebidas azucaradas. Se realizó además, el examen clínico en el consultorio del Servicio de Odontología, siguiendo el procedimiento de rutina tacto visual, registrándose la cantidad de piezas dentarias, superficies sanas, cariadas, con extracción indicada o perdida y obturadas en dentición permanente. A partir de estos datos se calcularon los índices de CPOD y CPOS. Se confeccionaron los índices de Higiene Oral (IHO) y de Salud Gingival (ISG) en base a los criterios de Løe y Silness. En muestras de saliva estimulada se determinó Vol/min, capacidad

amortiguadora, recuento de UFC de *Streptococcus mutans* (SM) y de *Lactobacillus spp* (LB), a los fines de determinar el riesgo cariogénico.

Una vez producido el nacimiento del niño, se procedió a tomar muestras de saliva total y de placa dental de la madre y el niño a los 6 y 18 meses, las que fueron sembradas en el medio selectivo Agar Mitis Salivarius Bacitracin (0,28 mg/ml) durante 48 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> para el crecimiento de *Streptococcus* del grupo *mutans*, las colonias se identificaron morfológica y bioquímicamente.

A los fines de evaluar el grado de homología de *Streptococcus mutans* en los binomios madre-niño, se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con primers arbitrarios (AP-PCR). Las colonias bacterianas se recuperaron en 5 ml de caldo cerebro corazón e incubaron a 37°C durante 48 hs. La extracción de ADN se llevó a cabo según el método de Bollet. La AP-PCR se realizó con los primers OPA 05 y OPA 02, en termociclador Biometra uno II Thermoblock, con 50 ciclos. Los productos de AP-PCR se observaron por electroforesis en gel de agarosa 1% (0,5µg/ml de bromuro de etidio)

El grado de similitud entre las muestras se analizó visualmente banda por banda, asignándose a cada banda amplificada 1 (presente) ó 0 (ausente).

Los valores medios de los indicadores de salud en las embarazadas, resultaron para CPOD 16±5, CPOS 22±11, TD 28±3, IHO 1,10±0,58 e ISG 1,03±0,61. El 54,7% de la muestra presenta  $\geq 10^5$  UFC/mL SM, el 52,8%  $\geq 10^5$  UFC/mL LB, el 18,9% capacidad amortiguadora media-baja y el 13,2% volumen de saliva <1mL/min.

Se observó una correlación significativa entre ISG - IHO (R=0,90; p<0,0001), y entre la prevalencia de niveles de UFC/mL  $\geq 10^5$  de SM con categorías de CPOS (Eta=0,32; p<0,05). Además, se observó una correlación significativa entre la cantidad de superficies dentarias cariadas y la frecuencia de ingesta de bebidas azucaradas (r=0,63; p<0,05) y los momentos de cepillado (r=0,64; p<0,05)

A los 6 meses del nacimiento del niño: el 58,33% de las muestras de saliva de la madre resultaron positivas, mientras que en el 100% de las muestras de saliva del infante no se detectó la presencia del

microorganismo. A los 18 meses del nacimiento del niño: el 79,16% de las muestras de saliva y el 100% de las muestras de placa dental de las madres fueron positivas, en tanto que las muestras de saliva y placa dental del infante resultaron positivas para *Streptococcus mutans* en un 20,83% y 70,83% respectivamente.

La técnica de AP-PCR utilizando los primers OPA-02 y OPA-05 puso en evidencia elevado polimorfismo genético en las cepas de *Streptococcus mutans* aisladas. Del análisis de homología de *Streptococcus mutans* en los binomios, el 64,7% de las cepas de las madres presentaron similitud genética con la de sus niños

La colonización inicial por *Streptococcus* del grupo *mutans* en los binomios estudiados, se observó en el 20,83% de los infantes a los 18 meses edad. La adquisición de *Streptococcus mutans* ocurrió en mayor proporción en hijos de madres de bajo riesgo de UFC de SM, lo que sugiere la posibilidad de la incidencia de otros factores que favorecen la colonización temprana.

Si bien reconocemos a la madre como la fuente más importante de infección para el niño, consideramos que también se deben tener en cuenta otros factores biológicos y socio-culturales en la transmisión y adquisición inicial de *Streptococcus mutans* en la edad temprana.

## ABSTRACT

Existing evidence reveals that in early oral infection the main route of transmission of *Streptococcus mutans* in mother-child saliva contacts and that the initial acquisition takes place during a specific period of time denominated "Window of Infectivity"; that lapses between 6 and 30 months of the child's life a higher risk between 18 and 30 months of age. In relation to the source and transmission form is pointed to that the number of *Streptococcus mutans* in maternal saliva can be a factor of risk for the child's health.

In this investigation the situation of factors of risk cariogénico was evaluated in pregnant women during the last gestation trimester and its relationship with the transmission and homology of the stains of *Streptococcus mutans* in the binomials mother-child, in patients that attended the University Hospital of Maternity and Neonatology.

The situation of the factors of risk cariogenic was analyzed in 53 pregnant among the 20-30 years of age without records of systemic illness. The mothers gave their informed consent in writing for the participation of the binomial mother-child in this investigation. In the course of the time of study, the initial sample suffered a drop; for personal reasons, home change, death, et.; completing the study 24 binomials mother-child.

In the pregnant women during the last gestation trimester was an interview for questionnaire to raise information regarding the frequency and moments brushing and consumption of sugary drinks. Also, was clinical exam in the clinic the Service of Dentistry, following the procedure of routine visual tact, registering the quantity of teeth, surfaces healthy, decay, with extraction indicated or lost and filled in permanent teething. Starting from these data were calculated the indexes of DMFT and DMFS. The indexes of Oral Hygiene (OH) and of Health Gingival (HG) was made based on the criterial of Løe and Silness. In samples of stimulated saliva was determined Vol/min, capacity buffer, recount of UFC *Streptococcus mutans* (SM) and *Lactobacillus spp.* (LB), for determining the risk cariogenic.

The childbirth, proceeded to take samples of total saliva and dental plaque the mother's and the child to 6 and 18 months, those that were sowed in the selective means Agar Mitis Salivarius Bacitracin (0,28 mg/ml) during 48 hours to 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for the growth of *Streptococcus mutans*, the colonies were identified morphological and biochemically.

In order to evaluate the grade of homology of *Streptococcus mutans* in the binomials mother-child, was used the technique arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). The bacterial cells were harvested from a 5 ml brain heart infusion broth and they incubated at 37°C during 48 hs. The DNA extraction was according by Bollet method. AP-PCR amplification was performed with primers OPA 05 and OPA 02, in termociclador Biometra one II Thermoblock, with 50 cycles. The products of AP-PCR were observed by electrophoresis in gel of agarosa 1% (0,5µg/ml ethidium bromide)

The grade of similarity among the samples was analyzed by side-by-side visual comparison, assigned to each amplified band 1 (presents) or 0 (absent).

The mean values of DMFT 16±5, DMFS 22±11, TD 28±3, IHO 1,10±0,58 and ISG 1,03±0,61. The 54,7% of sample presents  $\geq 10^5$  UFC/mL SM, 52,8%  $\geq 10^5$  UFC/mL LB, 18,9% capacity buffer medium-low and 13,2% volume of saliva <1mL/min.

A significant correlation was observed among ISG - IHO (R=0,90; p < 0,0001), and among the prevalencia of levels of UFC/mL  $\geq 10^5$  SM with categories of DMFS (Eta=0,32; p < 0,05). Also, a significant correlation was observed among the quantity of surfaces rotten with the frequency of consumption sugary drinks and brushing moments (r=0,63, r=0,64; p < 0,05)

At 6 months after childbirth: 58,33% of the samples of the mother's saliva were positive, while the presence of the microorganism was not detected in 100% of the samples of the infants saliva. At 18 months of after childbirth: 79,16% of the samples of saliva and 100% of the samples of the mothers dental plaque were positive, whereas the samples of saliva and

dental plaque of the infants were positive for *Streptococcus mutans* in 20,83% and 70,83% of the cases respectively.

The technique of AP-PCR using the primers OPA-02 and OPA-05 put in evidence elevated genetic polymorphism among *Streptococcus mutans* isolated. After binomials mother-child analyzed, the 64,7% of the strains isolated in the mothers presented genetic similarity with those children.

The initial colonization of *Streptococcus mutans* in the binomials studied, occurred in 20,8% of the infants at the age of 18 months. The acquisition of *Streptococcus mutans* happened in more proportion in childs of mothers with low risk of UFC SM what suggests the possibility of the incidence of other factors that favor the early colonization.

Although we recognize to the mother the most important infection source for children, we consider that also there are other biological and socio-cultural factors in the transmission and initial acquisition of *Streptococcus mutans* in the early age.

## INTRODUCCIÓN

La caries dental es considerada una enfermedad infecto-contagiosa que se caracteriza por la destrucción de los tejidos dentarios, ocasionada por la acción de los ácidos orgánicos resultantes de la actividad metabólica de los microorganismos acidogénicos adheridos en forma organizada sobre las superficies dentarias. (1) En la actualidad se considera a la caries dental una patología en cuya causalidad participan múltiples factores relacionados entre sí, directa ó indirectamente. March (2) señala que cualquier variación en alguno de los factores del ambiente bucal es capaz de producir una modificación ecológica que puede favorecer el desarrollo de la enfermedad.

Durante la gestación se producen cambios fisiológicos y psicológicos complejos, que se manifiestan a través de alteraciones en distintos sistemas orgánicos, entre los que se incluye el sistema estomatognático. El aumento de la incidencia de caries y de enfermedad periodontal que se observa durante el embarazo y posparto constituyen una importante evidencia clínica del deterioro de la salud bucal. Dicho incremento de enfermedad ha sido relacionado con un notable aumento en los niveles de microorganismos odontopatogénicos en saliva y placa dentogingival. (3) Las causas de ello podrían estar relacionadas con diferentes fenómenos, entre los que se destacan: cambios en los hábitos alimentarios (incremento en el consumo de dulces), tendencia al abandono de la higiene oral (frente a la necesidad de dar respuesta a las múltiples exigencias que surgen en el embarazo) y la erosión de las superficies linguales de los dientes producida por el carácter ácido del ambiente bucal en las mujeres con náuseas y vómitos. (4-6)

Por otra parte, la carga bacteriana de la madre juega un papel decisivo en la transmisión de la microbiota odontopática y odontopatológica a sus hijos. Con relación a ello Gunay y cols. (7), sostienen que la implementación de estrategias preventivas antes y después del parto podrían contribuir a mejorar considerablemente la salud oral de la madre y su futuro hijo. La regulación de la carga bacteriana está estrechamente relacionada con otros factores de orden biológico y socio-culturales, que



inciden en las condiciones del ambiente bucal. (2) Numerosas investigaciones *in vitro* e *in vivo*, permiten señalar, junto con los niveles de *Streptococcus mutans* en saliva y placa dental, los hábitos de higiene bucal y la frecuencia de ingesta de azúcares como importantes factores de riesgo de caries dental. (8)

El nacimiento es el primero de los acontecimientos ambientales que afectan a la sucesión alogénica de la cavidad oral. En el útero, el feto se encuentra libre de microorganismos y hasta las 8 horas del nacimiento la boca permanece estéril. La colonización oral se inicia en el paso a través del canal del parto y por las relaciones con el exterior. En las primeras etapas de la colonización pueden detectarse estafilococos, enterobacterias, neisserias, levaduras, y *Streptococcus* sobre todo del grupo viridans, en particular las especies de *Streptococcus mitis* y *salivarius* que colonizan fundamentalmente la mucosa oral. El crecimiento y desarrollo de la microbiota bucal del infante sigue un patrón de sucesión ecológica bacteriana, análogo al de otros ecosistemas. Con la erupción de los dientes, se producen importantes cambios ecológicos en la cavidad bucal, este hecho fisiológico genera condiciones apropiadas para el desarrollo de nuevas especies de microorganismos que para colonizar necesitan adherirse a superficies duras. Entre ellos, los *Streptococcus* del grupo *mutans*, *Streptococcus mutans* (SM) y *Streptococcus sobrinus* (SS), cuya presencia es reconocida como necesaria aunque no suficiente para el desarrollo de la caries dental. (9, 10)

El hábitat primario de SM y SS es la dentición humana; además, después que los SM han colonizado la dentición, ellos pueden descubrirse en la saliva, en la lengua, en las membranas mucosas orales. (11)

En los últimos años se han realizado numerosas investigaciones tendientes a esclarecer, "desde quién", "cuándo" y "cómo" se produce la colonización inicial de *Streptococcus mutans*.

Respecto a la caries de la infancia temprana, Berkowitz (12) sostiene que la evidencia científica demostró que es una enfermedad infecciosa y transmisible, caracterizada por un "modelo de tres etapas": la primera tiene lugar con la infección por *Streptococcus mutans*, la segunda se produce en relación a la acumulación o aumento de la población bacteriana en el

biofilm, como consecuencia de una prolongada exposición de la cavidad bucal a un sustrato cariogénico y la tercera corresponde a la rápida desmineralización y cavitación del esmalte dentario.

En cuanto a la fuente y forma de transmisión, Slavkin (13) señala que resulta una paradoja interesante el que sea la madre quien puede transmitir al infante microorganismos infecciosos a través del contacto íntimo y que sea también ella quien le pueda transferir por medio de su leche, anticuerpos que le otorguen inmunidad contra diferentes microorganismos. Considera además el mismo autor, que la salud bucal de la madre puede ser un factor de riesgo para la salud del feto en desarrollo o del recién nacido.

En el mismo sentido, Caufield, Cutter y Dasanayake (14) sugieren una correlación directa entre los niveles de *Streptococcus mutans* de las madres y sus niños, señalando además que la prevalencia de adquisición de SM aumenta con la edad del niño y con el número de elementos dentarios erupcionados.

Existen evidencias de que en la infección oral temprana, la principal vía de transmisión de SM es a través del contacto salival madre-niño y que la adquisición inicial tiene lugar durante un período específico de tiempo denominado, "Ventana de Infectividad", que coincide con la erupción de los dientes y transcurre entre los 6 y 30 meses de vida del niño, existiendo mayor riesgo entre los 18 y 30 meses de edad. (14,15, 16)

Durante la última década se han realizado estudios de transmisión en el binomio madre-niño utilizando métodos de alto poder discriminatorio para determinar el genotipo bacteriano. Entre ellos se destacan aquellos que evaluaron la fiabilidad, reproducibilidad y aplicabilidad de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Primers Arbitrarios (AP-PCR) en estudios epidemiológicos (17, 18)

En una investigación realizada por Saarela, los resultados indican que AP-PCR tiene buena capacidad para diferenciar especies de SM y SS, y que la técnica es apropiada para estudios epidemiológicos sobre *Streptococcus mutans*. (19)

Grönroos y Alaluusua (20) estudiaron la diversidad clonal y los modelos de colonización de *Streptococcus mutans* dentro de un individuo utilizando AP-PCR.

En la presente investigación se evalúa el estado de salud bucal en mujeres embarazadas durante el último trimestre de gestación, los niveles de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* en el binomio madre-niño a los 6 y 18 meses del nacimiento; y el genotipo de las cepas de *Streptococcus* del grupo *mutans* del binomio madre-niño aplicando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Primers Arbitrarios (AP-PCR).

## MARCO TEÓRICO

### Características de las afecciones buco-dentales durante el embarazo

Durante la gestación, se producen complejos cambios psicológicos y fisiológicos que pueden dar lugar al desarrollo de patologías, que afectan diferentes sistemas orgánicos. En el sistema estomatognático se producen alteraciones patológicas tales como gingivitis, tumor del embarazo, movilidad dentaria generalizada y caries dental. (21, 22)

La incidencia de la “gingivitis del embarazo” y su evolución dependen de factores etiológicos locales y hormonales. Los informes respecto a cambios gingivales durante el embarazo datan de 1877 (22). La inflamación gingival es mayor durante el embarazo que en el posparto. Dichos efectos de inflamación gingival se observan durante el segundo mes de gestación y alcanzan su máxima expresión en el octavo mes, coincidiendo con el aumento de las concentraciones circulantes de estrógeno y progesterona, lo que evidencia relación entre la concentración hormonal y la respuesta gingival observada. (21,22)

Existen evidencias que las hormonas sexuales femeninas son capaces de alterar el sistema vascular gingival, el sistema inmunitario y la flora subgingival normal. (22)

Los mecanismos inmunitarios tienen una función importante en el comienzo y desarrollo de gingivitis crónica y periodontitis. O’Neil, confirmó que la inflamación gingival se incrementa entre las semanas 14 y 30 de embarazo a pesar de la reducción en la cantidad de placa dentogingival. Otros estudios sugieren que la inflamación gingival durante el embarazo resulta de una transformación de la flora subgingival a un estado más anaerobio; Kornman y Loesche encontraron que la proporción de bacterias anaerobias-aerobias se incrementa de manera significativa durante las semanas 13 y 16 de gestación y permanece hasta el tercer trimestre. (22)

Estudios realizados en mujeres embarazadas, han demostrado que a diferencia de lo que ocurre en el sistema óseo, no hay desmineralización de los dientes durante este período fisiológico; (4, 21) sin embargo, es una

evidencia clínica que tanto durante el embarazo como en el posparto hay incremento en el número de caries, especialmente de las localizadas en el tercio gingival de las coronas dentarias; dicho incremento ha sido relacionado con el notable aumento de los niveles de *Streptococcus mutans* (3, 22)

La caries dental es una enfermedad compleja, causada por una ruptura en el equilibrio entre los minerales del diente y el fluido del biofilm (23). Durante más de medio siglo, se la consideró como un proceso infeccioso multifactorial transmisible causado por bacterias que colonizan las superficies dentales (24). La hipótesis del equilibrio ecológico de la placa, introducida por March (2), propone que los agentes microbianos (patógenos) asociados con la enfermedad, están presentes aún en sitios que se mantienen sanos, un cambio en los factores del medio puede producir una alteración en el balance de la flora residente, predisponiendo el terreno para la proliferación de dichos microorganismos y el inicio de la enfermedad.

Siendo entonces la caries el resultado de una alteración del equilibrio de la microbiota oral indígena y los patógenos exógenos en la que los factores ambientales, los hábitos higiénicos y alimentarios y la susceptibilidad genética del individuo ejercen una función decisiva.

En la actualidad, se sabe que la relación de *Streptococcus mutans* y caries dental no es absoluta, los SM son parte de la microbiota residente en la cavidad bucal de los individuos. (24) Dichas bacterias viven en microcolonias encapsuladas rodeadas por una matriz constituida por polímeros extracelulares, formando biofilms sobre los dientes; no existen como entidades independientes sino que funcionan en una comunidad espacialmente organizada y metabólicamente integrada. (25) Las últimas investigaciones sobre la fisiología del biofilm, determinaron que su formación y composición estaría relacionada con los factores genéticos y ambientales de cada individuo que determinan el tipo de colonización bacteriana. (26)

La saliva es uno de los componentes que intervienen en la protección del huésped contra algunos patógenos o sustancias nocivas de la boca. Además, influye en el proceso de sucesión microbiana y es parte de los

mecanismos de autoclisis en la cavidad bucal, pues contribuye a la remoción de residuos y bacterias. (27) Por otra parte, en la actualidad se dispone de abundantes evidencias científicas acerca del rol de la secreción salival en la protección del ambiente bucal. En tal sentido desde hace más de 40 años se ha demostrado asociación entre el flujo salival y la capacidad amortiguadora de la saliva con el estado de salud buco-dental. (22, 28) Tanto el pH de la saliva como la producción de ésta al parecer no varían durante el embarazo, aunque hay autores que informan lo contrario. El pialismo (exceso de salivación) mencionado en los textos, se describe como una rara complicación del embarazo y casi siempre acompañando a la presencia de náuseas. (21)

En relación a los hábitos alimentarios y la caries dental, puede considerarse a la caries como una infección condicionada por la dieta, estudios epidemiológicos han demostrado una relación directa entre la caries dental y el consumo de hidratos de carbono, (29) siendo la sacarosa el azúcar más cariogénico. Por otra parte, a partir de éste azúcar pueden determinadas bacterias orales, como *Streptococcus* del grupo *mutans*, sintetizar polisacáridos extracelulares solubles e insolubles. Además de la cantidad ingerida y tipo de azúcar, para evaluar el papel cariogénico de la dieta deben tenerse en cuenta otros factores como frecuencia de consumo, consistencia de los alimentos y momento de la ingesta. (9)

## **Aspectos bacteriológicos generales de *Streptococcus mutans***

### **Reseña histórica**

Los *Streptococcus mutans* fueron descritos por primera vez por J. Kilian Clarke en 1924, quien estudiando la microbiología de la enfermedad de caries dental en las lesiones de dentina profunda, encontró coccobacillus pequeños, encadenados y de forma más oval que esférica; sugirió entonces que estos microorganismos serían estreptococos mutantes y los llamó *Streptococcus mutans* (30). Clarke continuó investigando la asociación de estos estreptococcus con la enfermedad caries dental, pero

recién en los años sesenta el método de investigación gnatobiótica animal estimuló los estudios de microbiología para la enfermedad caries dental, y *Streptococcus mutans* fue relacionado a la enfermedad caries dental (31)

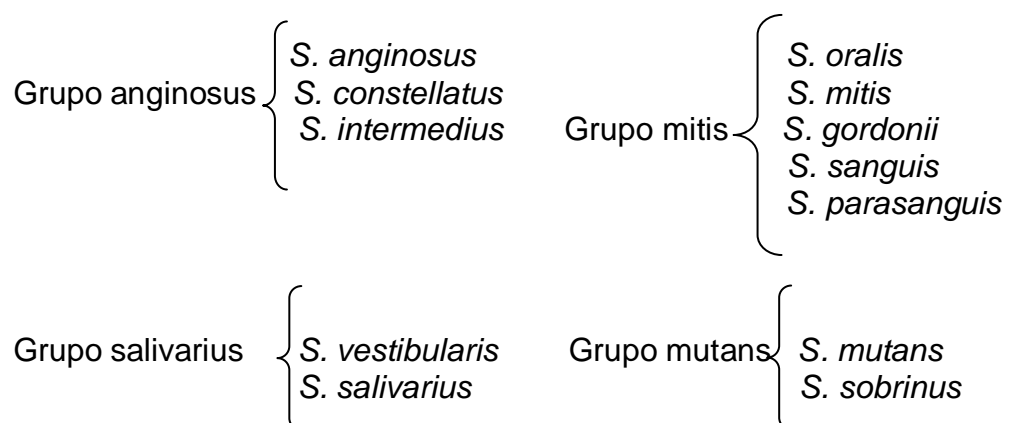
## Taxonomía

Bajo la denominación de *viridans* se agrupa un amplio número de estreptococos cuya clasificación es muy compleja, lo que ha motivado una importante confusión taxonómica. Actualmente, basándose en criterios fisiológicos, quimiogenéticos y nutricionales se admiten los siguientes grupos: *mutans*, *oralis*, *salivarius*, *milleri* y sus variantes nutricionales. (9)

Estos estreptococos tienen su hábitat principal en la cavidad oral, y están claramente implicados en la colonización de superficies duras y blandas de la misma. En la cavidad oral, los factores de virulencia más destacados de los *Streptococcus* del grupo *mutans* son: la síntesis de polisacáridos extracelulares solubles e insolubles, la síntesis de polisacáridos intracelulares y su capacidad para disminuir el pH a 5.

La clasificación actual de los estreptococos orales basada en la quimiotaxonomía y datos genotípicos, especialmente pares de base de ADN y análisis de la secuencia del gen 16S rRNA (32), permite diferenciar cuatro grupos: *anginosus*, *mitis*, *salivarius* y *mutans*. (Cuadro 1) (33)

### Cuadro 1: *Streptococcus* encontrados en la boca humana; relaciones filogenéticas entre los grupos



El grupo de *Streptococcus mutans* está constituido por las especies: *S. mutans*, *S. rattus*, *S. cricetus*, *S. sobrinus*, *S. downei* y *S. macacae* de las cuáles sólo SM y SS se encuentran en humanos. Aunque la posición filogenética del *S. ferus* tiene que ser determinada por la secuencia de 16S rRNA, otros datos indican que pertenece al grupo mutans (32)

En la pared de los *Streptococcus mutans* se destacan las proteínas dotadas de diversas funciones y polisacáridos en cuya composición participan glucosa, ramnosa y galactosa. Estos polisacáridos muestran distintas especificidades antigénicas, lo que permite distinguir ocho serotipos a, b, c, d, e, f, g y h. (Tabla 1) (32, 34)

La diferenciación de los *Streptococcus mutans* está basada en las diferentes reacciones bioquímicas (Tabla 2)

**Tabla 1: Características serotípicas del grupo *Streptococcus mutans*<sup>a</sup>**

	mol% G+C	Serotipo	Polisacaridos de pared celular <sup>b</sup>
<i>S. mutans</i>	36-38	c, e, f	Rha, Glc
<i>S. rattus</i>	41-43	b	Rha, Gal, Gro
<i>S. sobrinus</i>	44-46	d, g	Rha, Glc, Gal
<i>S. cricetus</i>	42-44	a	Rha, Glc, Gal
<i>S. downei</i>	41-42	h	ND
<i>S. macacae</i>	35-36	c	ND
<i>S. ferus</i>	43-45	c	Rha, Glc <sup>c</sup>

Referencias:

<sup>a</sup> Información de Maiden et al., 1992 (34); Whiley y Beighton, 1998 (32).

<sup>b</sup> Abreviaturas: Rha, ramnosa; Glc, glucosa; Gro, glicerol; ND, no determinado.

<sup>c</sup> *S. ferus* incluido en el grupo mutans por hibridación ADN-ADN, pero no por electroforesis enzima multilocus.



**Tabla 2: Características diferenciales de los *Streptococcus* del grupo *mutans*<sup>a</sup>**

Características	Especies						
	S mutans	S rattus	S sobrinus	S cricetus	S downei	S macacae	S ferus
Crecimiento en aire	Δ	Δ	Δ	Δ	+	W	Δ
Crecimiento a: 10°C	-	-	-	-	ND	ND	-
45°C	Δ	Δ	Δ	Δ	-	-	-
Crecimiento con 6,5% NaCl	-	-	Δ	Δ	-	-	-
Hemólisis	γ	ND	γ ó α	γ	ND	α	ND
Fermentación con:							
Manitol	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	Δ	+	-	+	+
Rafinosa	+	+	Δ	+	-	+	-
Inulina	+	+	Δ	Δ	+	-	+
Melibiosa	Δ	+	-	ND	ND	ND	ND
Salicin	+	+	-	+	+	ND	-
Trialosa	+	+	Δ	+	+	+	ND
Hidrólisis con:							
Arginina	-	+	-	-	-	-	-
Esculina	+	+	Δ	Δ	-	+	+
Producción de:							
Peróxido de hidrógeno	-	-	+	-	-	-	-
α-galactosidasa	Δ <sup>b</sup>	ND	-	ND	ND	ND	ND
β-glucosidasa	+	ND	-	ND	ND	ND	ND
Test Voges Proskauer	+	+	+	+	+	ND	Δ
Resistencia a bacitracina	+	+	+	-	-	-	-
Huésped primario	human o	rata human o	humano	hamster humano rata sivistre	Mono	mono	rata sivistre

Referencias:

Δ: 11-89% de las cepas son positivas

+: 90% o más de las cepas son positivas

-: 90% o más de las cepas son negativas

W: crecimiento débil

ND: no determinado

α-alpha hemólisis coloración verde sobre agar sangre

γ-gamma hemólisis no claro

<sup>a</sup> Información de Beighton et al., 1991 (35); Maiden et al., 1992 (34); Holt et al., 1994 (36); Whiley y Beighton, 1998 (32).

<sup>b</sup> Acordando con Beighton et al., 1991 (35); las cepas de *Streptococcus mutans* que no fermentan en melibiosa no producen α-galactosidasa

### **Características morfológicas de *Streptococcus* del grupo *mutans***

Son cocos gram positivos que se asocian en parejas y cadenas cortas o largas, de aproximadamente 0.5-7.5mm de diámetro (37) dependiendo del medio de cultivo. Desde el punto de vista estructural, pueden distinguirse el núcleo, el citoplasma, la membrana citoplasmática y la pared de mureína.

Los serotipos c, e y f de *Streptococcus mutans* forma colonias en agar sangre  $\alpha$  ó  $\gamma$  hemolíticas y excepcionalmente  $\beta$  hemolíticas. Poseen las enzimas glucosiltransferasas insoluble y soluble (GTF-I), (GTF-S) y fructosiltransferasas (FTF), capaces de sintetizar fructanos y glucanos solubles e insolubles; además de polisacáridos intracelulares de reserva que pueden ser degradados por dextranasas, fructanasas y glucógeno fosforilasas. En su pared celular presenta proteínas fijadoras de glucanos, que intervendrían en la adhesión a la película adquirida, cuando en ella existen glucanos adsorbidos, y en los procesos de agregación bacteriana. También posee proteínas parietales superficiales, que pueden liberarse al medio durante el crecimiento bacteriano, y se comportan como adhesinas. Dichas proteínas conocidas como antígenos I/II (sinónimos de Pac, IF, B, P1) (38 - 40) mediarían en la adhesión a la película adquirida en ausencia de glucanos en su superficie y en la coagregación con otras bacterias.

El papel que desempeñan sus fimbrias y ácido lipoteicoico en los procesos de adhesión a los tejidos del hospedador y en los de agregación bacteriana es controvertido.

Entre el 50% y 70% de las cepas son bacteriocinógenas, estas bacteriocinas muestran un espectro de acción que se extiende a otras bacterias gram positivas, tanto cocos como bacilos, e incluso a *Nocardia* spp. y *Mycobacterium phlei*; aunque su importancia ecológica no está clara, si pueden tener interés para la tipificación de cepas, con el objeto de demostrar los mecanismos de transmisión intrahumana. (9)

Los *Streptococcus sobrinus*, contienen los polisacáridos del grupo *mutans* d y g (Tabla 1), aunque hay cepas sin estos antígenos. Sus colonias en agar

sangre son habitualmente  $\alpha$  hemolíticos y en raras ocasiones no producen hemólisis; las colonias son más lisas que las de *S. mutans* en cualquier medio; es la única especie del grupo que elabora peróxido de hidrógeno. Produce glucanos solubles e insolubles, pero no fructanos y posee dextranasa para hidrolizar los glucanos; no sintetiza polisacáridos intracelulares, pero es más acidúrico que *S. mutans*. Posee proteínas superficiales fijadoras de glucanos, y otras con carácter de adhesinas (Spa A y Pag) relacionadas serológicamente con las de *S. mutans*, que median procesos de adhesión y agregación que se modifican en presencia de la saliva. El porcentaje de las cepas bacteriocinógenas es del 20% al 30%. Aunque también coloniza las superficies duras, se encuentra en cantidades inferiores a *S. mutans*, sin embargo es capaz de provocar cualquier tipo de caries en superficies lisas, fosas, fisuras, caras proximales y cemento e intervenir en la progresión de las lesiones cariosas. (9)

### **Métodos de cultivo y tipificación de especies bacterianas**

Los *Streptococcus mutans* son organismos anaerobios facultativos y la temperatura óptima para su desarrollo es de 37°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). (41). Para su recuperación el medio selectivo más usado habitualmente es el MSB (mitis-salivarius-bacitracina), (42) el cual está compuesto por agar mitis salivarius con sacarosa, bacitracina y telurito de potasio. Agar MSB es un medio selectivo para *S. mutans*, *S. sobrinus* y *S. rattus*. Este medio está considerado por algunos autores, como un inhibidor del **serotipo a** (*S. cricetus*), aunque ésta especie es muy poco frecuente en la cavidad oral humana. Se han desarrollado otros medios de cultivo, como es el agar TYCSB (con tripticasa, extracto de levadura, cisteína, sacarosa y bacitracina). Las diferencias en la respuesta de comportamiento en la recuperación y en el crecimiento fueron demostrados por Little (43), Jordan (44), Schaeken (45), Dasanayake (46). Little et al., (43) encontró que usando el medio de sangre-sacarosa se producen recuperaciones más

altas de estreptococos mutans comparado con los medios selectivos MSB y el medio de Carlsson. Schaeken et al., (45) también informó que el medio agar MSB es tan selectivo que inhibe el crecimiento de los *Streptococcus mutans*, especialmente *S. sobrinus*, encontrando recuperaciones superiores en el agar TYCSB. Dasanayake et al., (46) encontró recuentos superiores en agar MSB con respecto al agar GSTB.

Las colonias en MSB aparecen elevadas, convexas, onduladas, opacas, de color azul oscuro, con márgenes irregulares, superficie granular, mas o menos adheridas y con una burbuja de color brillante rodeándolas cuando producen polisacáridos extracelulares. (37)

Desde principios de la década del 70 se cuenta con los tests “chair-side”, los cuales permiten determinar semicuantitativamente los *Streptococcus mutans* y los *Lactobacillus spp* en la saliva (47 - 49). Entre los sistemas de Tests ya establecidos se cuentan: Dentocult<sup>®</sup> SM y Dentocult<sup>®</sup> LB / Orion Diagnóstica, Cariescreen SM / APO Diagnostics, CariesCheck<sup>®</sup> SM y CariesCheck<sup>®</sup> LB / Hain Diagnostika. Ellos tienen en común que se basan en medios de cultivo selectivos.

El test de riesgo de caries CRT<sup>®</sup> *bacteria* / Vivadent, representa un avance en estos sistemas, permitiendo la determinación simultánea del número de *Streptococcus mutans* y de *Lactobacillus* en la saliva por medio de agares selectivos, el agar Mitis Salivarius para los SM y el agar de Rogosa para los LB. La comparación entre CRT<sup>®</sup> *bacteria* y los métodos de laboratorio, muestra una convincente correlación (50, 51) lo mismo que con respecto al sistema Dentocult / Orion Diagnostica, el método de “chair-side” estándar más utilizado hasta el presente (52, 53). La evaluación del riesgo de caries basada en los hallazgos de *Streptococcus mutans* y de *Lactobacillus* de ambos sistemas muestran una coincidencia muy buena. El 54% y el 30% respectivamente, de los niños analizados por los dos test mostraron igual riesgo de caries (bajo o alto) (52), CRT<sup>®</sup> *bacteria* reacciona de forma más selectiva que el agar MSB habitual, rara vez registra una flora contaminante (50, 51). El recuento de los *Streptococcus mutans* es incluso relativamente más alta en CRT<sup>®</sup> *bacteria* debido a una modificación del agar, el que reacciona de una forma más sensible y registra incluso

recuentos bajos, lo que permite reconocer precozmente los *Streptococcus mutans* (51).

### **Tipificación de *Streptococcus mutans***

La identificación de *Streptococcus mutans* esta basada en la morfología colonial en el agar selectivo y no selectivo, la tinción de GRAM, la forma de la célula en microscopía, las características de crecimiento específicas, la fermentación de azúcar y los sistemas enzimáticos. Los *Streptococcus mutans* aislados también pueden identificarse por el sistema de prueba bioquímica comercial API 20 Strep (Bio Mérieux)

La tipificación de las cepas aisladas es aplicada en estudios epidemiológicos para conocer modelos de colonización bacteriana, modos de transmisión, evaluar los niveles del microorganismo asociados con las condiciones clínicas específicas de la enfermedad. Caracterizar la heterogeneidad de la infección, es decir, si los individuos son colonizados por uno o multiples tipos de microorganismos. El criterio de evaluación de los métodos de tipificación incluye: tipeabilidad (habilidad de dar un resultado por cada cepas aislada), reproductibilidad (habilidad de dar el mismo resultado al repetir el análisis) y poder discriminante (habilidad de diferenciar las cepas no relacionadas) (18).

La tipificación epidemiológica puede realizarse en base al conocimiento del fenotipo y genotipo del microorganismo.

### **Fenotipificación**

Los métodos tradicionales de caracterización bacteriana han sido diseñados en base a las características expresadas por los microorganismos tales como producción de bacteriocina y sensibilidad a bacteriocina, serotipo, propiedades bioquímicas, resistencia antibiótica y tipo bacteriófago.

### Tipificación de bacteriocina

Uno de los primeros sistemas de tipificación epidemiológica para los estreptococos orales fue realizado en base a las bacteriocinas (54). Las bacteriocinas son sustancias proteinasas producidas por las bacterias que inhiben el crecimiento de otras. La tipificación se realiza midiendo su efecto inhibitorio en el crecimiento bacteriano y la sensibilidad de las bacterias a la bacteriocina (55). La heterogeneidad entre las cepas de estreptococos mutans dentro de un mismo huésped se mostró inicialmente por la tipificación de bacteriocina (54).

### Determinación del serotipo

La clasificación serotípica está basada en la actividad antigénica del polisacárido de pared (Tabla 1). La determinación del serotipo por inmunodifusión, inmunofluorescencia o inmunoelectroforesis han sido extensamente aplicados para tipificar los *Streptococcus mutans*. Bratthal usando inmunodifusión de Ouchterlony, demostró cinco grupos serológicos de *Streptococcus mutans* (56). Posteriormente se reconocieron ocho serotipos (57, 58).

### Biotipificación

Shklair y Keene en 1974 (59), dividieron los *Streptococcus mutans* en cinco biotipos (a-e) en base a las características de fermentación, hidrólisis de arginina y sensibilidad a bacteriocina; mas tarde su esquema de clasificación también incluye los serotipos f y g (Tabla 2) (60).

## **Genotipificación**

Los métodos de tipificación molecular no examinan la expresión del gen sino que estudian el ADN de los microorganismos. (18, 61). Estos métodos tienen mayor reproductibilidad y capacidad discriminatoria. Entre estos métodos se encuentran: análisis de plásmidos (62), análisis de restricción de endonucleasa (REA) (63,64), restricción de polimorfismos de fragmentos

longitudinales (RFLP) incluyendo ribotyping (65-67), electroforesis de gel en campo pulsado (PFGE) (18,61) y reacción en cadena de la polimerasa con primers arbitrarios (AP-PCR) (17 - 19).

#### Análisis de plásmidos

El análisis de plásmidos fue la primera técnica de ADN aplicada en los estudios epidemiológicos de *Streptococcus mutans* (9). Los plásmidos son círculos de ADN extracromosomal que codifica la resistencia antimicrobiana, rasgos de virulencia y metabolismo de hidratos de carbono (68). Los plásmidos se descubren en sólo un 5% de las cepas de *Streptococcus mutans* (69) por lo que no es aplicable para tipificar estas bacterias.

#### Análisis de restricción de endonucleasa (REA)

Este método es un instrumento útil en el análisis taxonómico, que también se emplea en el diagnóstico y la epidemiología de las enfermedades infecciosas. Una enzima de restricción es una endonucleasa que corta el ADN en un sitio específico, estas enzimas van leyendo la cadena de ADN hasta encontrar la secuencia que reconocen, y si está presente la rompen originando lo que se conoce como fragmentos de restricción (9).

#### Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

El análisis de los sitios de restricción del ADN compara el número y el tamaño de fragmentos producidos por la acción de una enzima de restricción. La digestión completa del ADN proporciona un orden reproducible de fragmentos que pueden separarse por medio de electroforesis, y es conocido como *fingerprinting*. Las variaciones en el orden de los fragmentos generados por una enzima de restricción específica se denominan polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). El análisis de RLFP puede realizarse sobre ADN genómico, también se puede efectuar sobre el producto amplificado de ADN por PCR, en este caso aumenta notablemente la sensibilidad del método.

Cuando el análisis de los RLFP se hace sobre los ARN ribosómicos (ARNr) recibe el nombre de ribotipificación (9). El término ribotipificación se introduce en 1988 (65), y la ribotipificación de *Streptococcus mutans* ha sido aplicada desde 1993 (66), principalmente en estudios de transmisión de *Streptococcus mutans* y estabilidad de la infección (67).

Reacción en cadena de la polimerasa con primers arbitrarios (AP-PCR)  
De los métodos de genotipificación hasta aquí aplicados a los *Streptococcus mutans*, AP-PCR es el método menos laborioso (61), y puede realizarse con un volumen de muestra muy pequeño. La reacción en cadena de la polimerasa, se basa en una amplificación que emplea cebadores cortos inespecíficos (9-10bp) para obtener una amplificación al azar de una serie de fragmentos de ADN (RAPD), que se observan por electroforesis. AP-PCR no requiere conocimientos previos del ADN para ser analizada (70, 71). Una limitación del método es que es muy sensible a variaciones menores de la técnica, como la temperatura, concentración de Mg y fuente de la polimerasa. No obstante, AP-PCR ha mostrado ser un método eficaz para tipificar *Streptococcus mutans* (17, 19).

#### Primers ó Cebadores

En la actualidad, comercialmente hay disponibles cuarenta cebadores, 10-mer oligonucleótido cebadores (Kit A y Kit B, Operon Technologies Inc., Alameda CA). Li y Caufield (17) evaluaron el modelo de amplificación por los 40 primers y pudieron observar que OPA 02 discriminó bien los modelos de 8 a 12 bandas amplificadas para cada una de las cepas de *Streptococcus mutans*. Usaron una matriz de combinación descrita por Welsh y McClelland (72). Inicialmente, se buscaron los cebadores que podrían generar múltiples fragmentos de ADN con longitudes entre 50 y 2200 pares de base. Todos los cebadores tenían G+C y contenían entre 60% y 70%. Se prepararon soluciones de provisión de cebadores a 20 pmole/ $\mu$ l.

Para establecer las condiciones iniciales de PCR, Li y Caufield (17) adoptaron y después modificaron las condiciones de AP-PCR



recomendadas por Taylor (73) y Williams et al (71). Para determinar las condiciones óptimas de AP-PCR utilizaron un volumen de 50µl que contenían: 5µl de buffer 10X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,3); 200 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP; y 2,5 unidades de Taq polimerasa; modificaron la concentración del MgCl<sub>2</sub> (1-12mM), del ADN (1-100ng), y del cebador (5-100pmole). Los productos de AP-PCR se obtuvieron utilizando el termociclador de Perkin-Elmer.

Los resultados mostraron el modelo de amplificación generado por cuatro de los 40 cebadores diferentes que usan ADN de distintas cepas GS5, UA96, y V310. Los cebadores OPA 01 y OPA 04 produjeron pocas amplificaciones; esto era típico para la mayoría de los 40 cebadores, el cebador OPA 03 produjo 8 a 10 bandas del fragmento pero no diferenció bien las cepas. Finalmente, seleccionaron el cebador OPA 02 (5'-TGCCGAGCTG) porque encontraron que discriminó bien los modelos comprendidos entre 8 a 12 bandas para cada uno de las tres cepas del prototipo de *Streptococcus mutans*.

En otra investigación realizada por Saarela y col., (19) también probaron 10 cebadores para amplificar *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*: OPA-01, OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-05, OPA-06, OPA-07, OPA-08, OPA-13 y OPA-17 (Operon Technologies, Alameda, CA). De éstos, OPA-05 (5'AGGGGTCTTG) y OPA-13 (5'CAGCACCCAC) demostraron ser los mas convenientes para diferenciar *Streptococcus mutans* de *Streptococcus sobrinus*.

### **Transmisión y adquisición inicial de *Streptococcus mutans***

El nacimiento es el primero de los acontecimientos ambientales que afectan a la sucesión alogénica de la cavidad oral. En el útero, el feto se encuentra libre de microorganismos y hasta varias horas después del nacimiento la boca permanece estéril.

La colonización oral se inicia en el paso a través del canal del parto y por las relaciones con el exterior. En estas primeras etapas de la colonización pueden detectarse estafilococos, enterobacterias, neisserias, levaduras y

*Streptococcus* sobre todo del grupo viridans, en particular las especies de *Streptococcus mitis* y *salivarius* que colonizan fundamentalmente la mucosa oral. El crecimiento y desarrollo de la microbiota bucal del infante sigue un patrón de sucesión ecológica bacteriana, análogo al de otros ecosistemas. Con la erupción de los dientes, se producen importantes cambios ecológicos en la cavidad bucal. Este hecho fisiológico genera condiciones apropiadas para el desarrollo de nuevas especies de microorganismos que para colonizar necesitan adherirse a superficies duras. Entre ellos, los *Streptococcus* del grupo *mutans*, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, cuya presencia es reconocida como necesaria pero no suficiente para el desarrollo de la caries dental. (9, 10)

En los últimos años se han realizado numerosas investigaciones tendientes a esclarecer, “desde quien”, “cuándo” y “cómo” se produce la colonización inicial de *Streptococcus mutans*.

En la transmisión de los *Streptococcus mutans* al niño a través de la saliva, se señala como principal reservorio a la madre. (74) El hecho de que en el seno de la familia sea la madre la que actúa como principal transmisora, se debe a que en los primeros años de vida existe una relación estrecha y constante entre ella y el niño. Se sugiere además, que la transmisión puede ser vehiculizada por el chupete o la cuchara que la madre pone en su boca antes de dárselo a su niño. (75)

En cuanto a la fuente y forma de transmisión, Slavkin (13) señala que resulta una paradoja interesante que sea la madre quien pueda transmitir al infante microorganismos infecciosos a través del contacto íntimo y que sea también ella quien le puede transferir anticuerpos, por medio de su leche, que le otorga inmunidad contra diferentes microorganismos. Considera además el mismo autor, que la salud bucal de la madre puede ser un factor de riesgo para la salud del feto en desarrollo o del recién nacido

En el mismo sentido, Caufield, Cutter y Dasanayake (14) sugieren una correlación directa entre los niveles de *Streptococcus mutans* en las madres y sus niños, señalando además que la prevalencia de adquisición de SM aumenta con la edad del niño y con el número de elementos dentarios erupcionados. Existen evidencias de que en la infección oral temprana, la principal vía de transmisión de SM es a través del contacto

salival madre-niño y que la adquisición inicial tiene lugar durante un período específico de tiempo denominado, "Ventana de Infectividad", que coincide con la erupción de los dientes y transcurre entre los 6 y 30 meses de vida del niño, existiendo mayor riesgo entre los 18 y 30 meses de edad (14 - 16). Respecto a la caries de la infancia temprana, Berkowitz (12) sostiene que la evidencia científica demostró que es una enfermedad infecciosa y transmisible, caracterizada por un "modelo de tres etapas": la primera tiene lugar con la infección por *Streptococcus* del grupo *mutans*, la segunda se produce en relación a la acumulación o aumento de la población en el biofilm como consecuencia de una prolongada exposición de la cavidad bucal a un sustrato cariogénico y la tercera corresponde a la rápida desmineralización y cavitación del esmalte dentario.

En nuestro país son escasos los datos epidemiológicos en embarazadas con relación a la afección más prevalente en la humanidad: caries dental. Además, desde el punto de vista microbiológico interesa saber la historia natural de los *Streptococcus mutans* en binomios madre-niño: ¿cuándo, de quién y qué *Streptococcus mutans* son adquiridos?

Por lo expuesto anteriormente resulta de especial interés, conocer la situación de los factores de riesgo cariogénico en las embarazadas durante el último trimestre de gestación y su relación entre los niveles y genotipos de *Streptococcus* del grupo *mutans* en el binomio madre-niño durante los primeros dieciocho meses de edad, en pacientes asistan al Servicio de Obstetricia y Perinatología del Hospital Universitario de Maternidad y Neonatología.

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

La situación de los factores de riesgo cariogénico de la madre durante el último trimestre de gestación influyen la colonización inicial y adquisición de genotipos de *Streptococcus mutans* en los niños.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar la situación de los factores de riesgo cariogénico en mujeres embarazadas durante el último trimestre de gestación y su relación con la transmisión y homología de las cepas de *Streptococcus* del grupo *mutans* en los binomios madre-niño, en pacientes que asisten al Servicio de Obstetricia y Perinatología del Hospital Universitario de Maternidad y Neonatología.

### Objetivos específicos

- Determinar el nivel de *Streptococcus mutans* al final de la gestación, aplicando pruebas bacteriológicas.
- Analizar el nivel de riesgo cariogénico de la madre antes del parto.
- Relacionar el grado de colonización de SM del infante a los seis y dieciocho meses de edad, con la situación de diferentes factores de riesgo cariogénico de la madre.
- Tipificar las colonias de SM del binomio madre-niño, mediante microscopía óptica (MO) y pruebas bioquímicas.
- Evaluar el grado de homología de las cepas de *Streptococcus* del grupo *mutans* de la madre y el niño, aplicando pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Primers Arbitrarios (AP-PCR)

## DISEÑO METODOLÓGICO

- **Lugares de Trabajo**

- Facultad de Odontología (Foto 1)

Laboratorio de Área de Biología Oral

- Hospital Universitario de Maternidad y Neonatología (Foto 2)

Primera Cátedra de Clínica Obstétrica y Perinatología

Servicio de Odontología

- Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales (Foto 3)

Laboratorio de Genética de Poblaciones

**Foto 1**



**Foto 2**



**Foto 3**



- **Población de estudio**

- Embarazadas en el último trimestre de gestación

- Binomios madres-niños a los 6 y 18 meses del infante

## **Embarazadas en el último trimestre de gestación**

### **- Hábitos de higiene oral y de consumo de bebidas azucaradas**

Se aplicaron encuestas por cuestionario de estructura cerrada.

### **- Examen clínico-odontológico**

Se realizó el examen clínico buco dental a las pacientes embarazadas que integraron la muestra.

### **- Estudio de saliva. Determinación de riesgo cariogénico**

Test Bacteriológico CRT bacteria y CRT buffer intro package de Vivament y cultura.

## **Binomios madre-niño**

### **- Examen clínico-odontológico**

Se examinaron los niños a los 6 y 18 meses después del nacimiento.

### **- Estudio microbiológico de saliva y placa dental**

Se tomaron muestras de saliva total sin estimular del binomio a los 6 meses del niño, y muestras de saliva y placa dental tanto de la madre como del niño a los 18 meses del infante.

### **- Estudio genotípico de *Streptococcus mutans***

Se realizó en cepas de *Streptococcus mutans* recuperadas de muestras de saliva y placa dental tanto de la madre como del niño a los 18 meses del infante.

Preparación de ADN, extracción y cuantificación.

## **Evaluación estadística**

Los datos fueron evaluados estadísticamente conforme a la naturaleza y comportamiento de las variables.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

- **Población de estudio**

Se estudiaron 53 pacientes embarazadas durante el último trimestre de gestación, concurrentes al servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario de Maternidad y Neonatología; del que fueron derivadas al Servicio de Odontología de la misma institución. Por razones operativas y considerando al Hospital Universitario como unidad de análisis, se seleccionaron las pacientes entre los 20 – 30 años de edad sin antecedentes de enfermedades sistémica.

A lo largo del tiempo de estudio, la muestra inicial de 53 embarazadas sufrió un desgranamiento de 31 pacientes; por razones personales, cambio de domicilio, fallecimiento, etc.; el grupo de estudio quedó conformado por 24 binomios madre-niño, a los que se procedió a analizar muestras de saliva a los 6 meses del niño (ó cuando tiene dos elementos dentarios primarios erupcionados) y posteriormente muestras de saliva y placa dental a los 18 meses de edad del niño (ó cuando tiene los primeros molares temporarios erupcionados).

Las madres dieron su consentimiento informado por escrito para la participación del binomio madre-niño en esta investigación. (76) (Anexo1)

- **Embarazadas en el último trimestre de gestación**

### **Hábitos de higiene oral y de consumo de bebidas azucaradas**

Para el estudio de los hábitos de higiene oral y de la frecuencia de ingesta de bebidas azucaradas se aplicó una encuesta por cuestionario de estructura cerrada, que es una adaptación del cuestionario dietético para el control de la placa en el tratamiento periodontal. (77) (Anexo 2)

El análisis de las respuestas permitió reconocer las variables “frecuencia de cepillado dentario” y “momentos de ingesta de bebidas

azucaradas”, las que se valoraron y categorizaron para el riesgo cariogénico de la siguiente manera:

**Cepillado dentario (78, 79, 87)**

- \* Al levantarse y al acostarse = 2 veces diarias
- \* Al levantarse, después de comer y antes de acostarse = 3 veces diarias
- \* Sólo al levantarse = 1 vez diaria
- \* Sólo antes de acostarse = 1 vez diaria
- \* Sólo después de las comidas (almuerzo y cena) = 2 veces diarias

**Frecuencia de cepillado**

- 0: se cepilla más de 2 veces al día
- 1: se cepilla 2 veces al día
- 2: se cepilla menos de 2 veces al día

**Categorías de riesgo cariogénico**

- ALTO = 1 vez diaria
- BAJO = 2 o más veces diarias

**Ingesta de bebidas azucaradas (80, 81, 82, 83, 87)**

- \*con las comidas + entre comidas = 4 ó más veces diarias
- \*con las comidas = menos de 4 veces diarias
- \*no consume

**Frecuencia de ingesta de bebidas azucaradas**

- 0: consume menos de 4 veces diarias
- 1: consume más de 4 veces diarias
- 2: no consume

**Categorías de riesgo cariogénico**

- ALTO = 4 ó más de cuatro veces diarias
- BAJO = menos de 4 veces diarias



## Examen clínico-odontológico

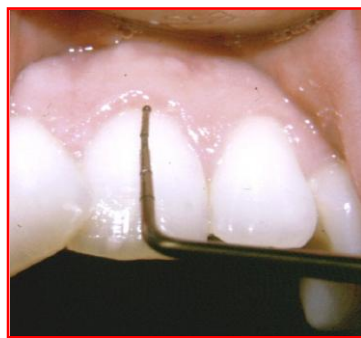
Completada la encuesta, se realizó el examen clínico buco dental a las pacientes, siguiendo el procedimiento de rutina tacto-visual; utilizando espejo, explorador, zonda periodontal y luz artificial (del equipo dental) (84) (Figura 1)

En cada paciente se efectuó el registro de elementos y superficies dentarias cariadas, con extracción indicada o perdida y obturadas en dentición permanente, en el odontograma de una ficha odontológica (Anexo 3). A partir de los datos obtenidos se elaboraron los correspondientes índices CPOD y CPOS (85).

**Figura 1: Examen clínico-odontológico**



Los índices de Higiene Oral (IHO) y de Salud Gingival (ISG) se confeccionaron en base a los criterios de Løe y Silness (86) (Figuras 2 y 3)

**Figura 2: Índice de Higiene Oral (Løe Y Silness)**

6)- Índice de Higiene Oral

	DERECHO	ANTERIOR	IZQUIERDO
SUPERIOR	16	21	24
		1 0 2	
		3	
INFERIOR	44	41	36
TOTAL			

- 0: No hay placa  
 1: Hay placa cuando se realiza el pasaje de la sonda por el área dentogingival  
 2: Hay placa bacteriana a simple vista  
 3: Hay placa a simple vista rodeando el diente, incluso puede haber cálculo

**Figura 3: Índice de Salud Gingival (Løe Y Silness)**

7)- Índice de Salud Gingival

	DERECHO	ANTERIOR	IZQUIERDO
SUPERIOR	16	21	24
INFERIOR	44	41	36
			1 2 3
			0
TOTAL			

- 0: Ausencia de inflamación  
 1: Inflamación leve  
 2: Inflamación moderada  
 3: Inflamación severa

## Estudio de saliva

Completado el examen clínico y aproximadamente 2 horas después del desayuno, se tomaron muestras de saliva estimulada de las pacientes utilizando el Test Bacteriológico CRT bacteria y CRT buffer intro package de

Vivanent y cultura (Figura 4), con el que se registraron el flujo salival, la capacidad amortiguadora de la saliva y las UFC/mL de SM y de LB, siguiendo las indicaciones del fabricante.

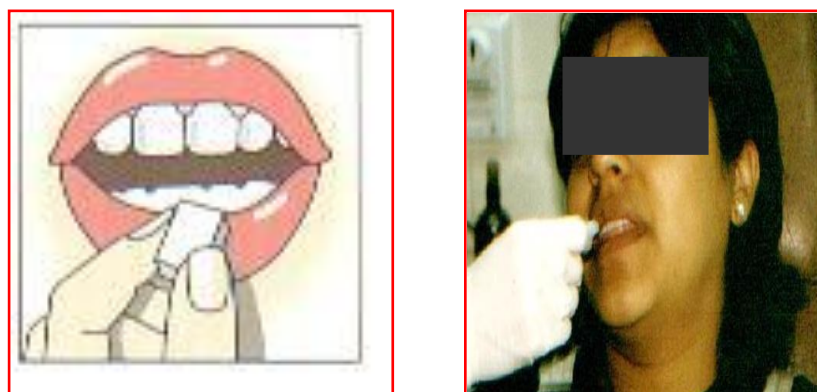
**Figura 4: Test Bacteriológico**



#### Modo de uso

Se dió a la paciente una pastilla de parafina, durante 5 minutos, para estimular la producción de saliva y así transferir las bacterias de los distintos nichos ecológicos a la saliva. (Figura 5)

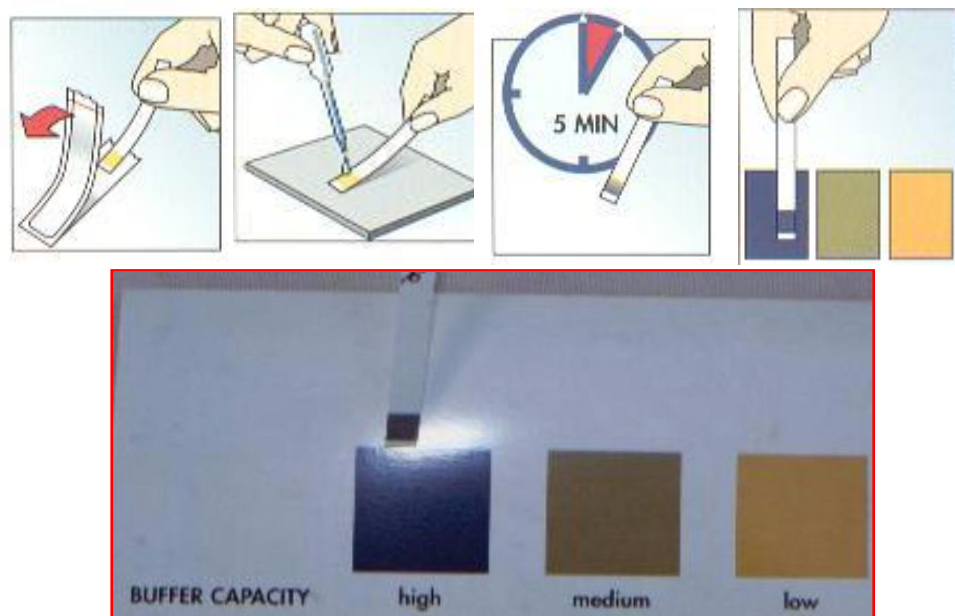
**Figura 5: Estimulación de producción de saliva**



Se recogió la saliva en un recipiente calibrado, durante 5 minutos, y así se determinó el flujo salival de la paciente, el que se expresó en mL/min. (Figura 6)

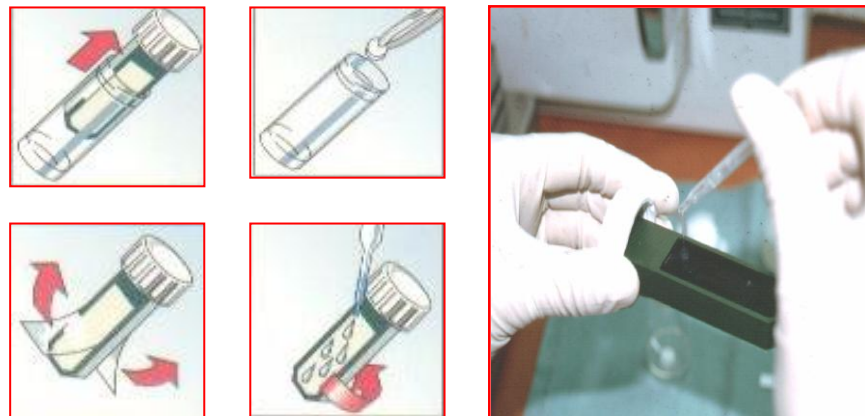
**Figura 6: Recolección de saliva**

Se extrajo la tira de prueba del envase, sin tocar el campo activo y se lo humectó con la saliva de la paciente con ayuda de una pipeta, y al cabo de 5 minutos de tiempo de actuación se comparó el color del campo activo con la muestra de colores, así se determinó la capacidad amortiguadora de la saliva. (Figura 7)

**Figura 7: Capacidad Amortiguadora de la saliva**

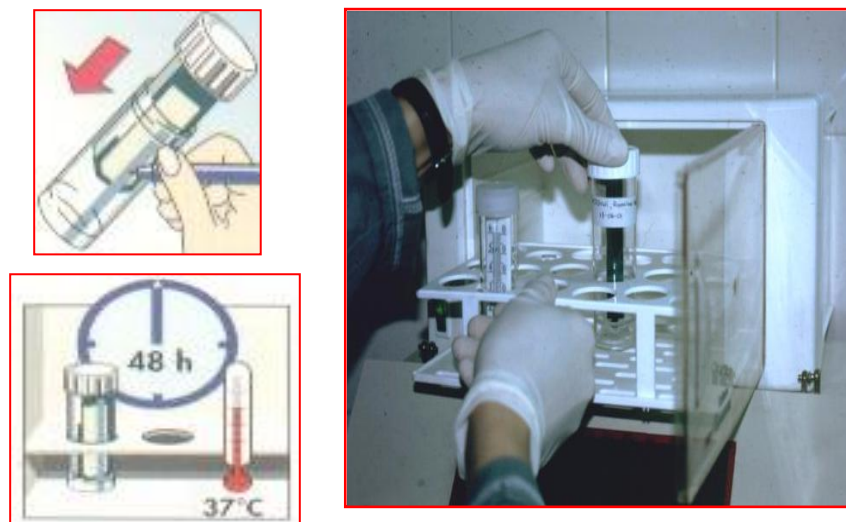
Luego se extrajo el porta agar del tubo de prueba y se colocó una pastilla de hidrogenocarbonato sódico en el fondo del recipiente, que libera anhídrido carbónico en contacto con la humedad, lo cual crea una atmósfera favorable para el crecimiento de las bacterias. Una vez retirada la lámina protectora, se humedeció el agar por completo con la saliva de la paciente. (Figura 8)

**Figura 8: Humectación del agar con saliva**



Se colocó el porta agar en el tubo de prueba, se rotuló con el nombre de la paciente y la fecha. Se incubó durante 48 horas a 37°C, para que las bacterias se desarrollen. (Figura 9)

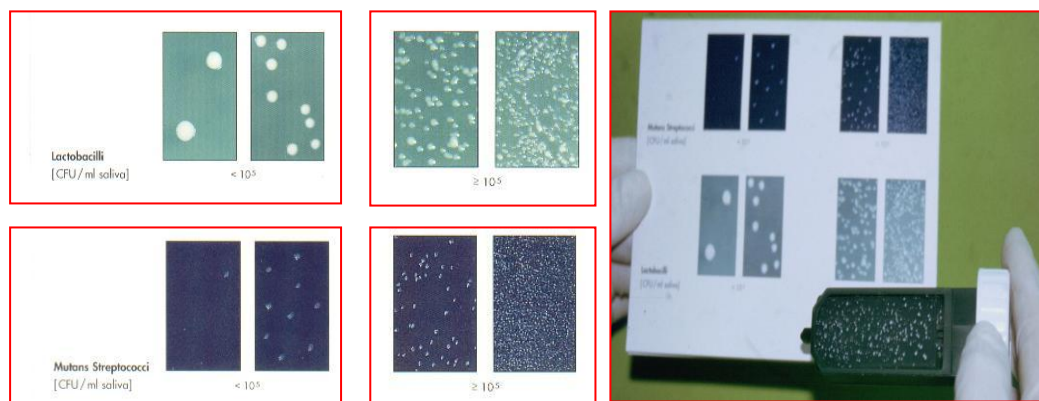
**Figura 9: Aislamiento bacteriano**



## Interpretación de los resultados

Las colonias de SM, aparecen en el agar azul como pequeñas colonias azules, de menos de 1mm de diámetro. Para la evaluación semicuantitativa de las UFC, se compararon los resultados obtenidos con las imágenes aportadas por el Kit comercial CRT. (Figura 10)

**Figura 10: Evaluación semicuantitativa de UFC**



## Diagnóstico de riesgo cariogénico

Para la determinación del riesgo se tuvo en cuenta el diagnóstico de placa clínico y de laboratorio, el examen dentario, el volumen de saliva estimulada por minuto y la dieta de la paciente. (Cuadro 2) (87)

**Cuadro 2: Interpretación diagnóstica de riesgo cariogénico**

Diagnóstico	Criterio	Riesgo	Actividad
Placa clínico	Löe y Silness	> 1	--
Placa Laboratorio	UFC/mL SM	$\geq 10^5$	>20000 col/mm <sup>3</sup>
	UFC/mL LB	$\geq 10^5$	--
Dentario clínico	MB	si	si
	SP	si	--
	CA	si	si
Saliva estimulada	vol/min	< 1 mL/min	--
Dieta	H de C	> 4 v / d	--

(Adaptado de: Odontología integral para niños I. Atención integral de la salud bucal Segunda edición. Preconc. Paltex /OPS/OMS 1993)

Se considera:

**Riesgo:** a la probabilidad de que una determinada respuesta pueda ocurrir, como resultado de la presencia de específicos factores de riesgo, o a partir de la exposición de una acción.

**Factores de riesgo:** a todo factor ambiental, biológico o de conducta del individuo, que estando presente aumenta directamente la probabilidad de que ocurra la enfermedad.

**Enfermedad en actividad:** sin lesión clínica o con lesión clínica, existen los factores suficientes para que se produzca enfermedad.

- **Binomios madre-niño**

### **Examen clínico odontológico de los niños**

Los niños fueron examinados clínicamente a los 6 y 18 meses en sus domicilios, en ambientes bien iluminados con luz natural. Se registró la cantidad de dientes erupcionados y con la anamnesis realizada a la madre se obtuvieron datos acerca de la cronología de erupción dentaria del niño. (Anexo 4) (76, 84)

### **Estudio microbiológico de saliva y placa dental**

#### ***Obtención de la muestra***

⇒ Las muestras de saliva total sin estimular del binomio a los 6 y 18 meses del niño se obtuvo:

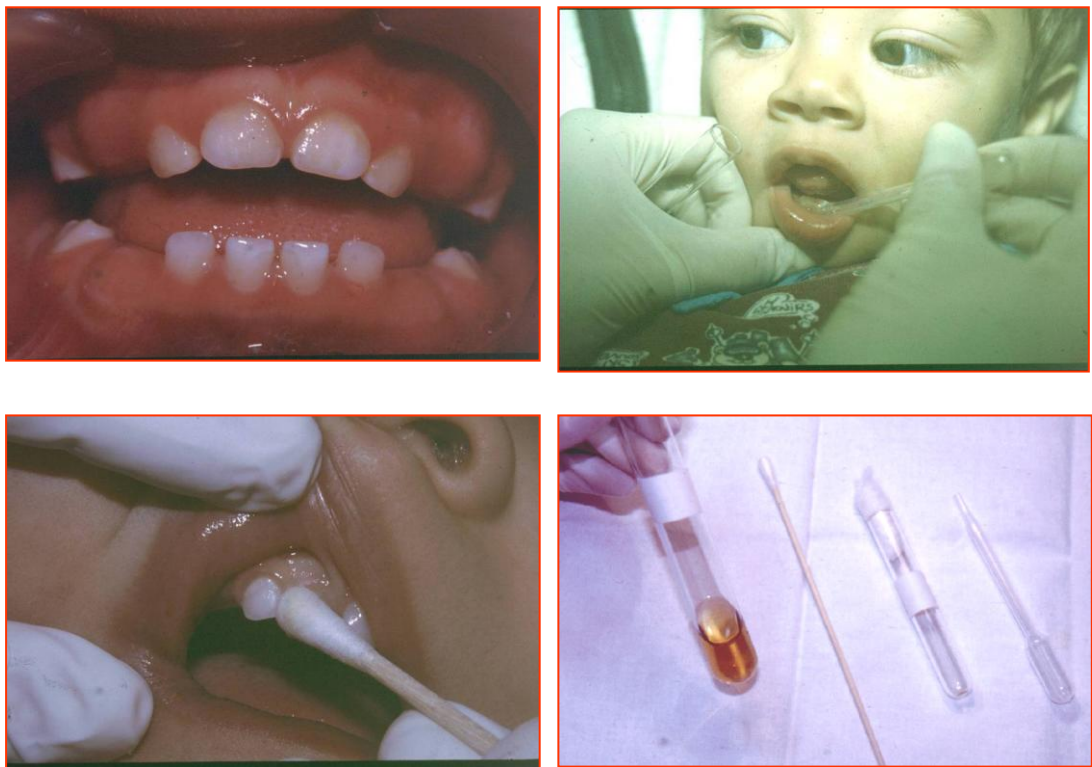
- De la madre: por salivación directa
- Del niño: con la ayuda de una pipeta del piso de boca, media hora después de la última ingesta. (Figura 11)

⇒ La recolección de placa dental de la madre y del niño se realizó a los 18 meses del infante, pasando un hisopo estéril por las superficies dentales vestibulares, oclusales y linguales o palatinas de los elementos dentarios, media hora después de la última ingesta. (Figura 12)

**Figura 11: Obtención de saliva del binomio, a los 6 meses del niño**



**Figura 12: Obtención de saliva y placa dental del binomio, a los 18 meses del niño**



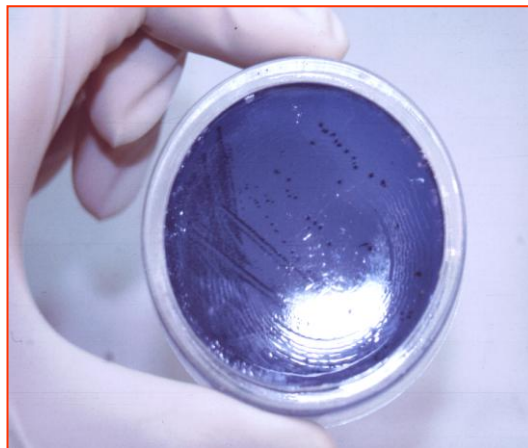


## Aislamiento y Tipificación de *Streptococcus mutans*

### **Estudio morfológico y bioquímico**

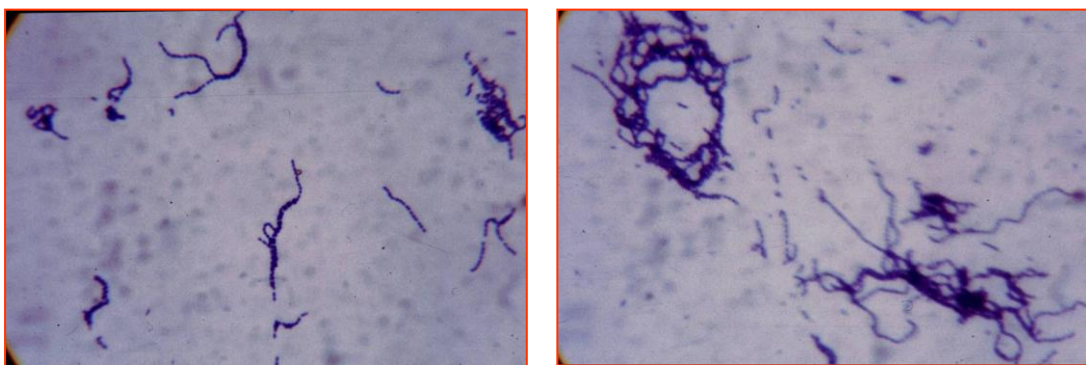
Para el crecimiento y recuento bacteriano de *Streptococcus mutans*, (ATCC 25175) las muestras de saliva y placa dental del binomio madre-niño, se sembraron en Agar Mitis Salivarius (DIFCO), con el agregado de 0,281 mg/mL de Bacitracin (ICN Biomedicals, 71% de actividad) y se incubaron a 37°C en microaerofilia durante 48 hs. (Figura 13) (51, 88, 89)

**Figura 13: Aislamiento de *Streptococcus mutans* del binomio madre-niño**



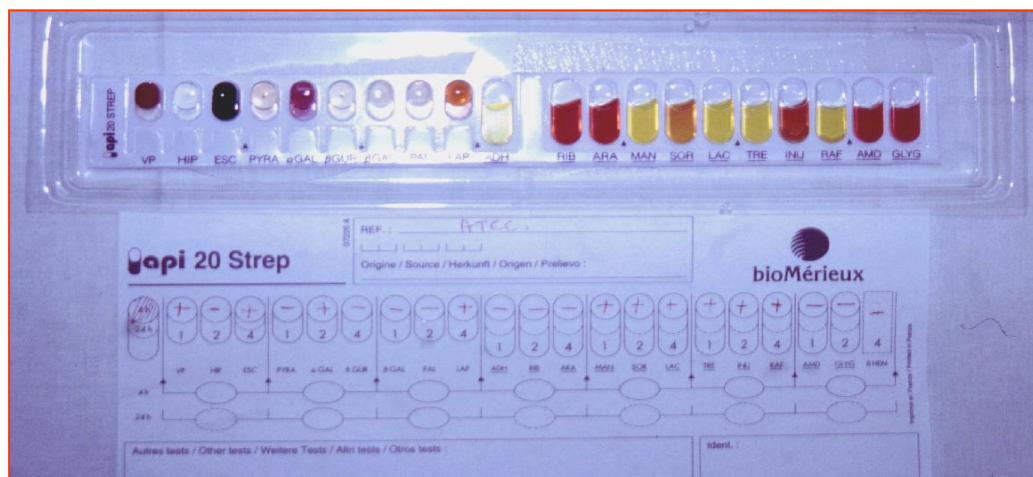
El análisis morfológico de las colonias se realizó por microscopía óptica, con la tinción de GRAM. (Figura 14) (88, 89)

**Figura 14: Análisis morfológico de colonias de *Streptococcus mutans***



La tipificación se llevó a cabo mediante pruebas bioquímicas, utilizando el Kit comercial Api 20 Strep de bioMérieux (siguiendo las instrucciones del fabricante), permitiendo diferenciar *Streptococcus mutans* de los *Streptococcus sobrinus*. (Figura 15) (88, 89)

**Figura 15: Tipificación de *Streptococcus mutans***



## Estudio genotípico de *Streptococcus mutans*

### **Preparación de ADN**

**Extracción:** Las colonias bacterianas se recuperaron en 5 ml de caldo cerebro corazón e incubaron a 37°C durante 48 hs, posteriormente se realizó la extracción de ADN según el método de Bollet (90) purificado con fenol cloroformo isoamílico.

**Cuantificación:** se determinó con análisis electroforético y espectrofotométrico. (ependorf Bio photometer 8,5 mm)

### **Selección de los primers**

La selección de los primers OPA-02 5'TGCCGAGCTG y OPA-05 5'AGGGGTCTTG , se hizo teniendo en cuenta los artículos publicados por Li y Caufield (17); Saarela y col (19); Grönroos y Alaluusua (91).

### **Técnica de AP-PCR**

Se utilizó 25 µl de una mezcla de reacción que contenía:

Buffer * <sup>1</sup> (Amersham Biosciences).....	2,5µl
MgCl <sub>2</sub> .....	1µl
Primer* <sup>2</sup> .....	1µl
dNTPs .....	0,25µl
Taq Polymerasa* <sup>3</sup> (Amersham Biosciences) .....	0,15µl
agua bidestilada .....	19,1µl
ADN .....	1µl.

\*<sup>1</sup>Buffer: 1.5ml/tubo. 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris-HCl (pH 9.0 a temperatura ambiente)

\*<sup>2</sup>OPA 02 / OPA 05

\*<sup>3</sup>Taq ADN polimerasa: 50 mM Tris- HCl, pH 7.5; 5 mM dithiothreitol (DTT), 0.1 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 50% glycerol.

Se empleó un termociclador Biometra uno II Thermoblock con las siguientes condiciones de amplificación:

desnaturalización inicial a 92°C, durante 5 min; 50 ciclos de: desnaturalización 92°C (1 min), templado 35°C (1 min), extensión 72°C (2 min) y extensión final a 72°C durante 10 min.

Los productos de AP-PCR se observaron a través de electroforesis en geles de agarosa 1% (0,5µg/ml de bromuro de etidio). Los geles fueron fotografiados bajo luz UV. El marcador de peso molecular utilizado fue el 1kbp ADN ladder.

### **Análisis de homología**

El grado de similitud entre las cepas de *Streptococcus mutans* fue analizado visualmente, asignándose para cada banda amplificada el número 1 cuando está presente y 0 cuando está ausente. De esta manera al comparar dos perfiles moleculares individuales, existen cuatro eventos posibles: a (1-1), b (1-0), c (0-1) y d (0-0) (92).

Se aplicaron distintos índices de similitud los que varían en la importancia relativa que se asigna a cada uno de los cuatro eventos. Índice Dice  $2a/(2a+b+c)$ ; Índice Jaccard  $a/(a+b+c)$  e Índice de Emparejamiento Simple (Simple Matching)  $(a+d)/(a+b+c+d)$  (92).

## **Evaluación estadística**

Los resultados fueron procesados y analizados estadísticamente mediante el programa estadístico SPSS versión 9.0 para P.C. Para la descripción de variables cuantitativas se utilizaron medidas de posición (media) y desviación (error estándar), mientras que las variables cualitativas se expresaron en porcentajes.

A los fines de analizar la correlación bivariada existente entre las distintas variables presentadas en el análisis descriptivo inicial, se escogió Coeficiente de Correlación de Pearson ( $r$ ) cuando ambas variables estaban en escala numérica y tenían distribución próxima a lo normal, en el caso del IHO que mostró distribución asimétrica, la variable fue transformada a su raíz cuadrada y en tal caso se calculó su Coeficiente de Regresión Lineal ( $R$ ).

Cuando se analizó grado de correlación entre dos variables ordinales se optó por el Coeficiente Tau-b de Kendall, en tanto que si una o ambas variables están en escala ordinal o numérica pero de distribución no normal se aplicó Coeficiente de Correlación no Paramétrica de Spearman ( $r$  Spearman).

Mientras que para correlacionar la frecuencia relativa (%) de una variable nominal en relación a otra ordinal se utilizó Coeficiente Eta y significación estadística ( $p < 0,05$ ) con Chi cuadrado de tendencia lineal de proporciones.

Para la evaluación estadística de identidad de los perfiles de ADN se aplicaron los índices de similitud Jaccard, Dice y Simple Matching, (92) utilizando para el procesamiento de los datos el programa Infostat P 1.5.

## RESULTADOS

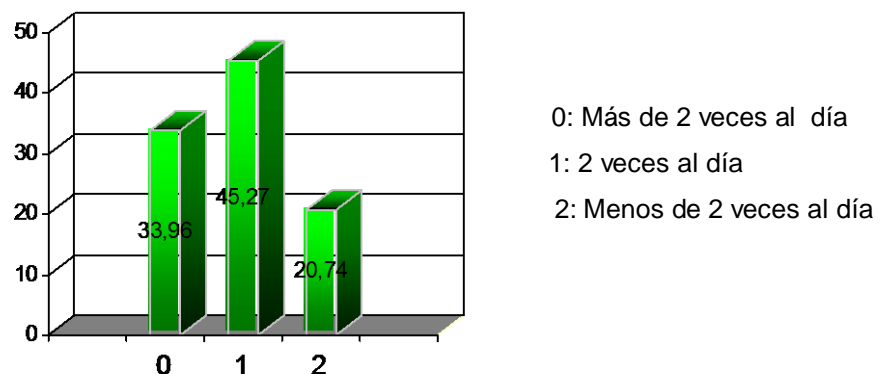
- **Embarazadas en el último trimestre de gestación**

### Hábitos de Higiene Oral

En relación a la higiene oral, cuando a las pacientes se les formuló la pregunta si se cepillaban los dientes, el 100% respondió que sí, de las cuales el 94,4% refiere que lo realiza una, dos ó más veces al día; y el 5,65% restante respondió que sólo lo hacía ocasionalmente.

Respecto a la pregunta ¿Cuántas veces realiza el cepillado dentario?, el 45,27% de las pacientes respondió que higienizaba sus dientes dos veces al día, el 35,87% que lo hace al levantarse y antes de acostarse y sólo el 9,4% después de las comidas (almuerzo y cena); mientras que el 20,74% dice realizarlo menos de dos veces diarias, el 11,3% lo hace al levantarse y el 9,4% antes de acostarse. (Gráfico 1)

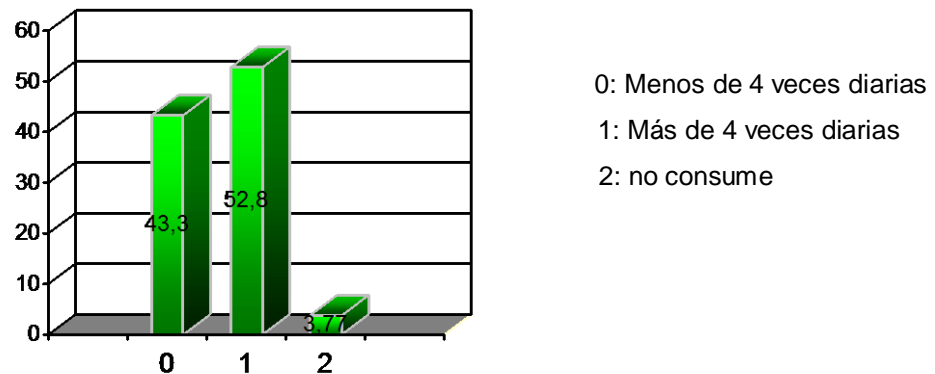
**Gráfico 1: Frecuencia de cepillado de pacientes en el último trimestre de gestación**



### Hábitos de consumo de bebidas azucaradas

Con relación a la ingesta de bebidas azucaradas, sólo el 3,77% de las pacientes que integraron la muestra refirieron no consumir bebidas azucaradas, en tanto que el 52,8% lo hace, con las comidas y entre comidas, lo que equivale a más de 4 veces diarias. (Gráfico 2)

**Gráfico 2: Frecuencia de consumo de bebidas azucaradas de pacientes en último trimestre de gestación**



### Examen clínico-odontológico

En la población de embarazadas estudiada, la prevalencia de caries activa fue del 100%, con un promedio de ocho caries por paciente y un valor medio del total de dientes presentes en boca de  $28 \pm 3$ . En la tabla 3 se muestran los resultados de los valores de la media aritmética  $\pm$  la desviación estándar de los valores medios de los indicadores de salud.

**Tabla 3: Indicadores de la salud bucal de pacientes en el último trimestre de gestación**

Variable	Media	$\pm$	DS
CPOD	16		5
CPOS	22		11
Total de elementos dentarios	28		3
IHO	1.10		0.58
ISG	1.03		0.61

### Estudio de saliva

El estudio de UFC/mL de SM tal como se muestra en la Tabla 4 reveló que el 45,3% de las mujeres embarazadas analizadas presentaron  $<10^5$  UFC/mL, mientras que el 54,7% evidenciaron  $\geq 10^5$  UFC/mL. Por su

parte, el estudio de los niveles de LB, mostró que el 52,8% de las pacientes tiene un nivel de  $\geq 10^5$  UFC/mL (Tabla 5)

**Tabla 4: Distribución de UFC/mL de *Streptococcus mutans* de pacientes en el último trimestre de gestación**

UFC/mL SM	n	%
$\geq 10^5$	29	54.7
$< 10^5$	24	45.3
<b>Total</b>	<b>53</b>	<b>100</b>

**Tabla 5: Distribución de UFC/mL de *Lactobacillus spp* de pacientes en el último trimestre de gestación**

UFC/mL LB	n	%
$10^3$	10	18.9
$10^4$	15	28.3
$10^5$	22	41.5
$10^6$	6	11.3
<b>Total</b>	<b>53</b>	<b>100</b>

En cuanto a la capacidad buffer de la saliva se observó que el 81.3% de los casos analizados presenta una capacidad amortiguadora alta (pH de saliva = 6.7). (Tabla 6)

**Tabla 6: Distribución de la capacidad amortiguadora de la saliva de pacientes en el último trimestre de gestación**

Capacidad Buffer	n	%
<b>Alta</b>	<b>43</b>	<b>81.1</b>
<b>Media</b>	<b>9</b>	<b>17.0</b>
<b>Baja</b>	<b>1</b>	<b>1.9</b>
<b>Total</b>	<b>53</b>	<b>100</b>

Así mismo, un 86.8% de la muestra presenta un flujo salival dentro de lo aceptable ( $\geq 1$  mL/sal/min). (Tabla 7)

**Tabla 7: Distribución del flujo salival de pacientes en el último trimestre de gestación**

Flujo salival (mL/min)	n	%
<1mL/min	7	13.2
$\geq 1$ mL/min	46	86.8
Total	53	100

El estudio de correlación entre el índice de CPOD con las otras variables no mostró correlación directa significativas. En tanto que, el índice CPOS guardó correlación significativa ( $r=0.29$ ;  $p<0.05$ ), con la densidad de colonias de *Streptococcus mutans*. El análisis de la correlación entre los índices IHO e ISG y las UFC de *Streptococcus mutans* sólo mostró correlación directa significativa entre IHO e ISG ( $R=0.90$ ;  $p<0.0001$ ) (Tabla 8)

**Tabla 8: Correlación de factores de riesgo de pacientes en el último trimestre de gestación**

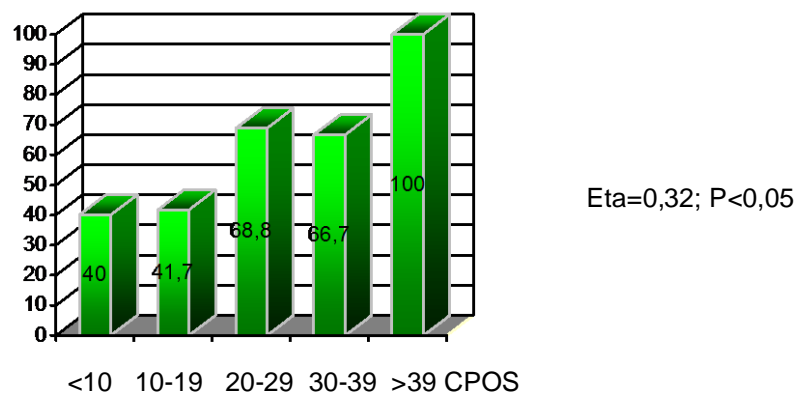
Variables	Indice de correlación	P
CPOD/CPOS	R=0.82	<0.0001
CPOD/ISG	r=0.08	0.57
CPOD/IHO	r=0.05	0.74
CPOD/UFC/mL SM	r=0.14	0.34
CPOD/UFC/mL LB	r=0.16	0.24
CPOS/UFC/mL SM	r=0.29	<0.05*
CPOS/UFC/mL LB	r=0.15	0.28
IHO/ISG	R=0.90	<0.0001*
IHO/UFC/mL SM	r=0.9	0.55
ISG/UFC/mL SM (cant)	r=0.09	0.54
ISG/UFC/mL SM (frec)	Eta=0.20	0.15

R= Análisis de Regresión Lineal  
 r= Coeficiente de Correlación de Pearson  
 r= Coeficiente de correlación de Spearman  
 Eta= Coeficiente de Correlación Eta



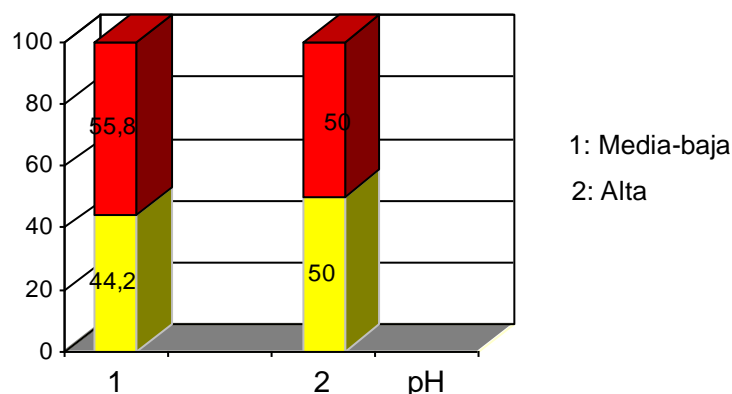
Se observó que la frecuencia de UFC de SM  $\geq 10^5$ , incrementa progresiva y significativamente con categorías de CPOS, (Coeficiente de correlación  $\text{Eta}=0,32$ ;  $P<0,05$ ); partiendo de una prevalencia de 40% cuando CPOS es  $<10$ , hasta llegar a 100% cuando CPOS es  $> 39$  superficies afectadas. (Gráfico 3)

**Gráfico 3: Frecuencia de UFC/mL SM  $\geq 10^5$  en saliva según categorías de CPOS**



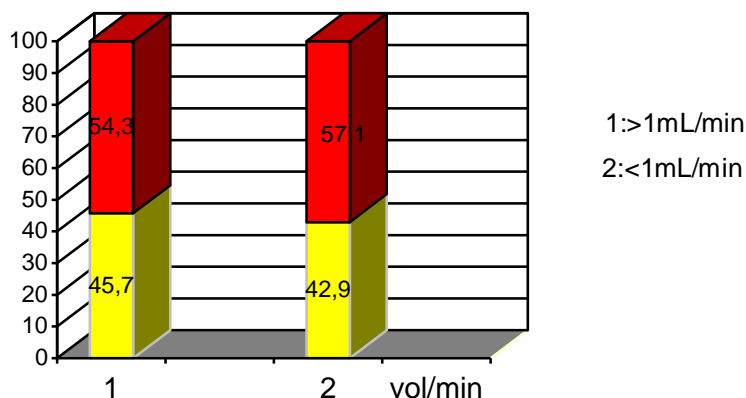
En tanto que la frecuencia de la densidad de colonias de SM de alto riesgo (UFC/mL SM  $\geq 10^5$ ), resultó muy próxima entre pacientes con capacidad amortiguadora alta o media y baja. (Gráfico 4)

**Gráfico 4: Frecuencia de UFC/mL SM  $\geq 10^5$  en saliva según la capacidad amortiguadora**



De manera similar, ocurre con la frecuencia de SM de alto riesgo en relación con el flujo salival, resultó muy próximo cuando tenemos  $>1\text{mL/min}$  y  $<1\text{ mL/min}$ . (Gráfico 5)

**Gráfico 5: Frecuencia de UFC/mL SM  $\geq 10^5$  en saliva según el flujo salival**



El estudio de correlación entre la frecuencia de cepillado y frecuencia de ingesta de bebidas azucaradas con el IHO mostró correlación directa significativa, 0,88 y 0,82 respectivamente. No se observó correlación cuando se analizaron estas variables con el índice de CPOD. En tanto que la correlación fue de 0,54 cuando se analizó el índice de CPOS con la frecuencia de ingesta de bebidas azucaradas y la frecuencia del cepillado dentario con superficies dentarias cariadas (SDC). (Tabla 9)

**Tabla 9: Correlación de variables de pacientes en el último trimestre de gestación**

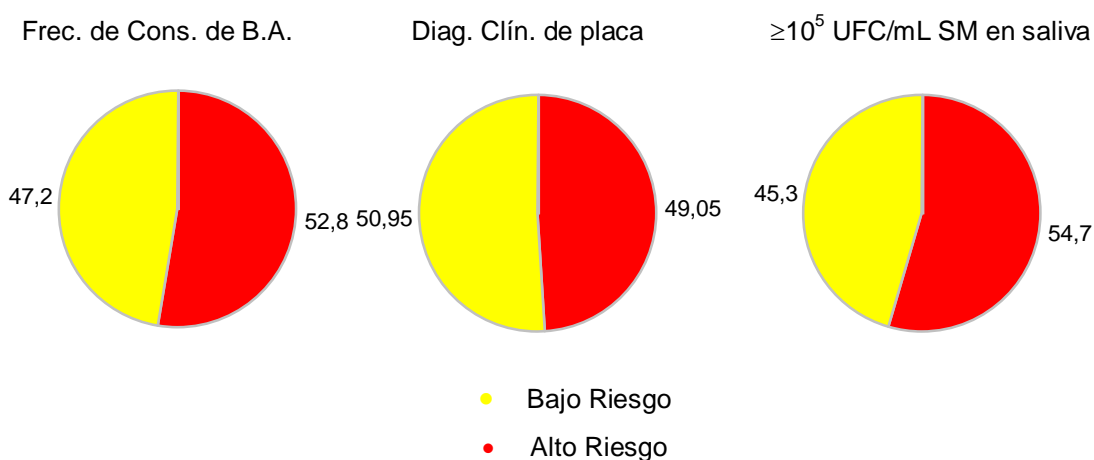
Variabes	Correlación de Pearson
Frecuencia de cep./IHO	<b>0,88*</b>
Frec. de ing de beb. az./IHO	<b>0,82*</b>
Frec. de cep./ CPOD	0,26
Frec. de ing de beb. az/CPOD	0,15
Frec. de ing de beb. az/CPOS	<b>0,54*</b>
Frecuencia de cep./SDC	<b>0,64*</b>
Frec. de ing de beb. az/SDC	<b>0,63*</b>

**p<0,05**

## Diagnóstico de riesgo cariogénico

La condición de riesgo resultó diferente para los factores analizados, destacándose la frecuencia de consumo de bebidas azucaradas, el diagnóstico clínico de placa dental y las UFC/mL  $\geq 10^5$  de SM en saliva como factores de riesgo ALTO detectados en el 52,8%, el 54,7% y 49,05% respectivamente en las embarazadas bajo estudio. (Gráfico 6)

**Gráfico 6: Factores de riesgo de pacientes en el último trimestre de gestación**



Del análisis de manera conjunta de los factores ambientales, biológicos y de conductas individuales, resultó que el 1,88% de las pacientes embarazadas presentaba condición de ALTO riesgo cariogénico.

- **Binomios madre-niño**

### Examen clínico-odontológico del niño

De la información registrada en la anamnesis realizada a la madre durante las visitas domiciliarias, a los 6 y 18 meses del nacimiento del niño; se pudo determinar la fecha de erupción de los elementos dentarios, siendo

la edad promedio de erupción de los incisivos inferiores a los  $7,6 \pm 2$  meses del niño.

### **Estudio microbiológico de la saliva y la placa dental**

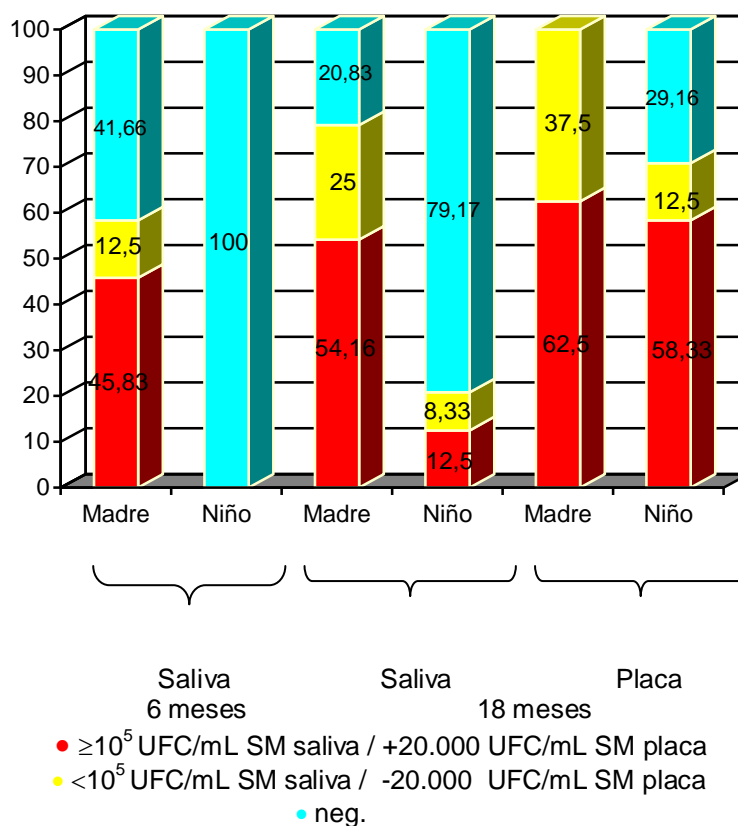
A los 6 meses del nacimiento del niño, el 58,33% de las muestras de saliva de las madres resultaron positivas para SM, el 45,83% con  $\geq 10^5$  UFC/mL SM (nivel de alto riesgo) y un 12,5% con  $< 10^5$  UFC/mL SM (nivel de bajo riesgo).

En el 100% de los infantes no se detectó la presencia del microorganismo en la saliva. (Gráfico 7)

A los 18 meses del nacimiento del niño, el 79,16% de las muestras de saliva de las madres fueron positivas para SM, el 54,16% de ellas presentaron un recuento de alto riesgo y 25% de bajo riesgo. De las muestras de placa dental el 100% de las madres resultaron positivas. El 37,5% con  $< 20.000$  UFC/mL (bajo riesgo) y el 62,5% con  $\geq 20.000$  UFC/mL (alto riesgo) siendo 54,16% positiva para SM y 8,33% para SS.

Las muestras de saliva del niño a los 18 meses, resultaron positivas para SM en un 20,83% de los niños, de los cuales el 12,5% con  $\geq 10^5$  UFC/mL. En cuanto a las muestras de placa dental resultaron positivas el 70,83%; para SM el 50% y para SS el 8,33% con  $\geq 20.000$  UFC/mL. (Gráfico 7)

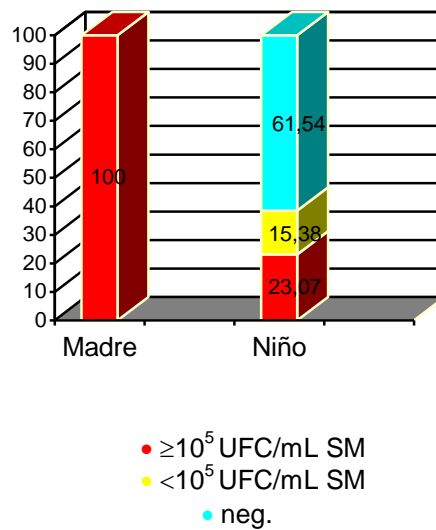
**Gráfico 7: *Streptococcus mutans* en saliva y placa dental del binomio a los 6 y 18 meses del niño.**



A los 6 meses del nacimiento, la saliva de los niños del total de madres positivas para SM, resultaron negativos.

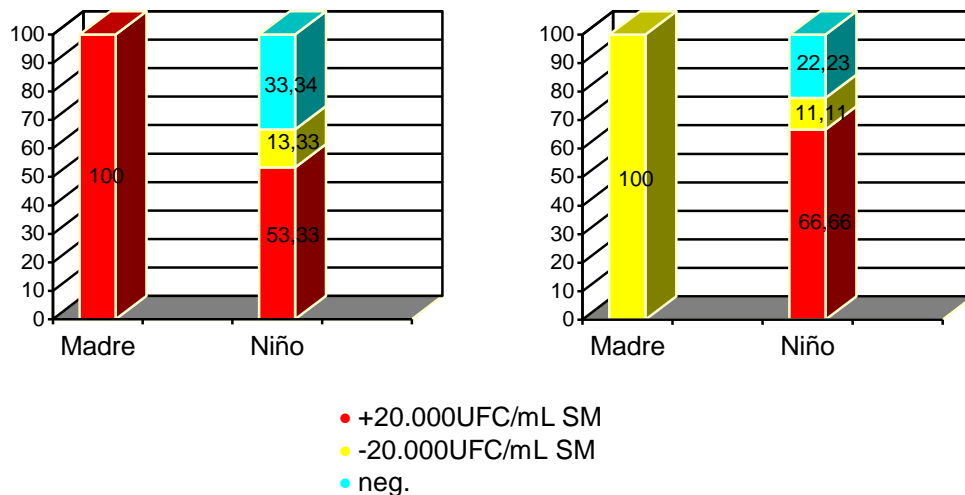
En el gráfico 8, se muestran las UFC/mL de SM en saliva de las madres y sus niños a los 18 meses del nacimiento. De las madres de alto riesgo, resultaron positivos el 38,46% de los niños, en tanto que en el caso de las madres con recuento  $< 10^5$  UFC/mL SM todos sus hijos resultaron negativos.

**Gráfico 8: Relación de *Streptococcus mutans* en saliva del binomio a los 18 meses del niño.**



El análisis del nivel de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* en la placa dental del binomio a los 18 meses del niño, muestra el 62,5% de las madres con un recuento de +20.000 UFC/mL (alto riesgo) y el 37,5% con un recuento de -20.000 UFC/mL (bajo riesgo). Los hijos de las madres de alto riesgo fueron positivos el 66,66%, de los cuales el 53,33% presentaron alto riesgo y el 13,33% bajo riesgo. De las madres de bajo riesgo, el 66,66% de sus niños resultaron de alto riesgo y el 11,11% de bajo riesgo. (Gráfico 9)

**Gráfico 9: Relación de *Streptococcus mutans* en placa dental del binomio a los 18 meses del niño.**



## **Estudio genotípico de *Streptococcus mutans***

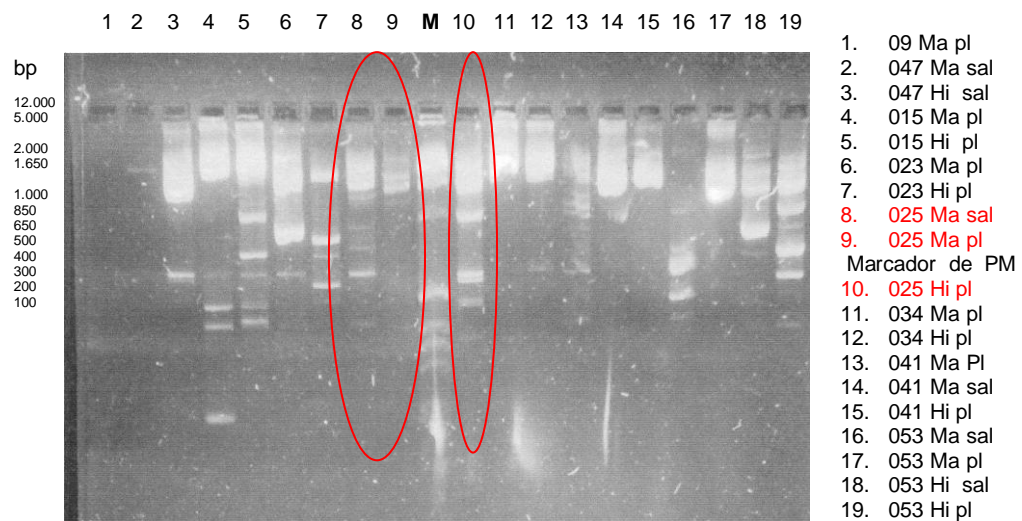
### ***Técnica de AP-PCR***

Las colonias bacterianas aisladas de las muestras de saliva y placa dental, se identificaron morfológica y bioquímicamente y se aplicó la técnica de AP-PCR.

La figura 16 muestra los productos de AP-PCR de los binomios 047, 015, 023, 025, 034, 041 y 053 obtenidos con el primer OPA 05. El marcador de peso molecular está sembrado en el carril M.

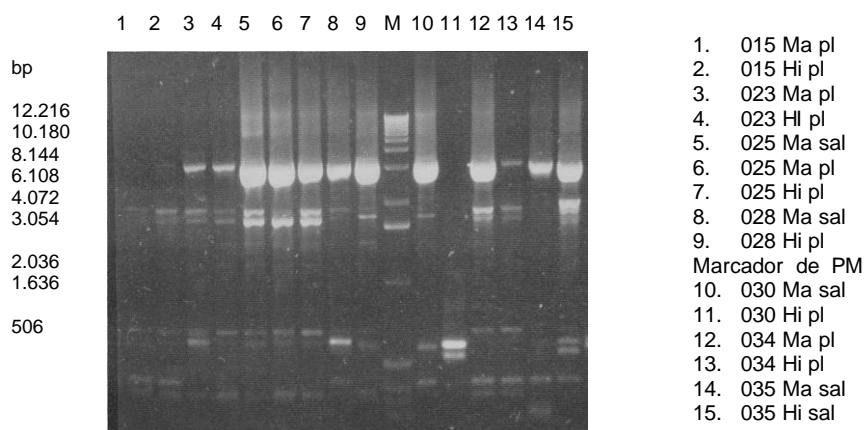
A modo de ejemplo se describe en el binomio 025 como se realizó el análisis visual de banda por banda en todos los binomios de la muestra utilizando ambos primers OPA 05 y OPA 02.

Al analizar las bandas amplificadas del binomio 025 sembradas en los carriles 8, 9 y 10 del gel de agarosa, se observaron en la muestra de saliva de la madre (carril 8) dos bandas fuertes pesadas + tres bandas tenues + una nítida; en la muestra de placa de la madre (carril 9) dos bandas nítidas que coinciden con las dos bandas fuertes pesadas de la saliva de la madre + una banda tenue que coincide con una de las tres bandas tenues de la saliva de la madre; y en la muestra de placa del hijo (carril 10) se observaron tres bandas fuertes pesadas de las cuales dos coinciden con las muestras de saliva y placa de la madre + dos bandas nítidas que coinciden con la banda nítida de la muestra de saliva de la madre + una banda tenue + una sub-banda mas tenue.

**Figura 16: Productos AP-PCR obtenidos con OPA-05**

La figura 17 muestra los perfiles de AP-PCR obtenidos con el primer OPA 02, el perfil de las bandas del binomio 025 sembrado en los carriles 5, 6 y 7 del gel de agarosa, muestra concordancia en las bandas amplificadas de la muestra de saliva de la madre y la muestra de placa del niño.

Una vez que se analizaron los perfiles de las bandas del binomio 025 con los dos primers, cómo lo sugerido por Li y Caufield (17), se aplicaron los índices de identidad Dice, Jaccard y Simple Matching para establecer o no la similitud genética de las cepas bacterianas aislada en la madre y el infante y el modelo de colonización del binomio.

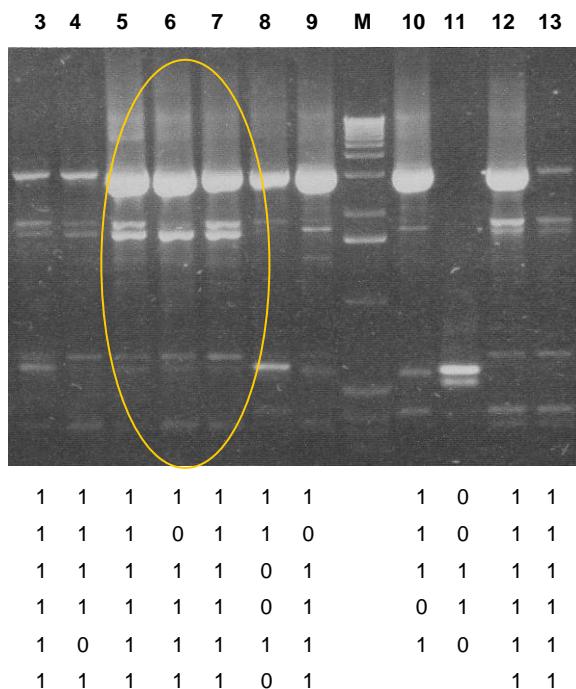
**Figura 17: Productos AP-PCR obtenidos con OPA-02**



## Análisis de homología

En la figura 18, se muestra como se realizó el análisis visual de banda por banda de los perfiles de ADN en los binomios madre-niño.

**Figura 18: Productos AP-PCR obtenidos con OPA-02**



3: 023 Ma pl, 4:023 Hi pl, 5:025 Ma sal, 6:025 Ma pl, 7: 025 Hi pl, 8: 028 Ma sal, 9: 028 Hi pl, Marcador de PM 10: 030 Ma sal, 11: 030 Hi pl, 12: 034 Ma pl, 13: 034 Hi pl.

## Evaluación estadística

Los perfiles moleculares individuales obtenidos con los primers OPA 02 y OPA 05 se usaron conjuntamente para calcular los índices de similitud, se determinó el número total de bandas producidas por cada primer, esta información se dispuso en una matriz donde cada fila representa una banda y cada columna un individuo, los valores registrados en cada fila conforma el perfil molecular individual observado.

La información generada por estos datos binarios fueron procesados en el programa Infostat P 1.5, aplicando los índices de identidad Simple

Matching, Jaccard y Dice. A modo de ejemplo se presenta en la tabla 10 el análisis estadístico del binomio 025.

**Tabla 10: Análisis estadístico de identidad**

**Binomio 025**

**Simple Matching (Identidad)**

	025 Hi Pla	025 Ma Pla	025 Ma Sal
025 Hi Pla	1,00		
025 Ma Pla	0,55	1,00	
025 Ma Sal	0,91	0,64	1,00

**Jaccard (Identidad)**

	025 Hi Pla	025 Ma Pla	025 Ma Sal
025 Hi Pla	1,00		
025 Ma Pla	0,55	1,00	
025 Ma Sal	0,91	0,60	1,00

**Dice (Identidad)**

	025 Hi Pla	025 Ma Pla	025 Ma Sal
025 Hi Pla	1,00		
025 Ma Pla	0,71	1,00	
025 Ma Sal	0,95	0,75	1,00

En la tabla 11, se muestran los valores obtenidos de los distintos índices de similitud, Simple Matching, Jaccard y Dice aplicados a los dos primers de forma conjunta para la evaluación estadística de identidad de los perfiles RAPD de las cepas bacterianas de los binomios madre-niño

**Tabla 11: Índices de similitud**

Índices Nº binomio	Simple Matching	Jaccard	Dice
02	<b>0,83</b>	<b>0,75</b>	<b>0,86</b>
09	<b>0,11</b>	<b>0,11</b>	<b>0,20</b>
011	<b>0,50</b>	<b>0,50</b>	<b>0,67</b>
012	<b>0,33</b>	<b>0,33</b>	<b>0,50</b>
015	<b>0,69</b>	<b>0,69</b>	<b>0,82</b>
019	<b>0,55</b>	<b>0,55</b>	<b>0,71</b>
023	<b>0,64</b>	<b>0,64</b>	<b>0,78</b>
025	<b>0,91</b>	<b>0,91</b>	<b>0,95</b>
028	<b>0,17</b>	<b>0,17</b>	<b>0,29</b>
030	<b>0,13</b>	<b>0,13</b>	<b>0,22</b>
033	<b>0,17</b>	<b>0,17</b>	<b>0,29</b>
034	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>
035	<b>0,20</b>	<b>0,20</b>	<b>0,33</b>

041	<b>0,80</b>	<b>0,57</b>	<b>0,73</b>
042	<b>0,45</b>	<b>0,45</b>	<b>0,63</b>
047	<b>0,44</b>	<b>0,44</b>	<b>0,62</b>
053	<b>0,41</b>	<b>0,17</b>	<b>0,29</b>

El **índice Simple Matching**, mostró valores del coeficiente de similitud que variaron entre 0,11 y 1, distribuidos de la siguiente forma:

9 binomios con coeficiente de similitud entre 0,11 y 0,45; 4 binomios con coeficiente de similitud entre 0,50 y 0,69 y 4 binomios con coeficiente de similitud entre 0,80 y 1.

El **índice Jaccard**, presentó valores del coeficiente de similitud, que variaron entre 0,11 y 1; distribuidas de la siguiente manera:

9 binomios con coeficiente de similitud entre 0,11 y 0,45; 5 binomios con coeficiente de similitud entre 0,50 y 0,69 y 3 binomios con coeficiente de similitud entre 0,75 y 1.

El **índice Dice**, señaló valores del coeficiente de similitud, que variaron entre 0,20 y 1 en el grupo de estudio, distribuidas de la siguiente manera:

6 binomios con coeficiente de similitud entre 0,20 y 0,35; 4 binomios con coeficiente de similitud entre 0,50 y 0,67 y 7 binomios con coeficiente de similitud entre 0,71 y 1.

Nosotros tomamos el índice Dice para considerar la identidad genética de *Streptococcus mutans* en los binomios madre-niño, cuando presentaban un coeficiente de similitud entre 0,50 y 1.

De los 24 binomios estudiados, se recuperaron 17 positivos para *Streptococcus* del grupo *mutans*, de los cuales 11 binomios presentaron identidad genética con un coeficiente similitud entre 0,50 a 1 de las cepas bacterianas de las madres y sus hijos.

Del análisis de homología de las cepas de *Streptococcus mutans* aisladas en los binomios estudiados:

- El 64,7% de las cepas de las madres presentaron similitud genética con la de sus niños
- El 35,3% de las cepas de las madres no presentaron similitud genética con la de sus hijos.

## DISCUSIÓN

Considerando la naturaleza multifactorial de la enfermedad caries, en la determinación del riesgo cariogénico en el grupo de embarazadas asistentes al Hospital Universitario de Maternidad y Neonatología participantes en el estudio, es importante identificar como indicadores de riesgo no sólo aspectos clínicos, microbiológicos y moleculares (tipificación y cuantificación de la microbiota bucal) sino también pautas culturales en relación a la salud general y bucal, tales como la higiene dental y el consumo de bebidas azucaradas.

En cuanto a la higiene oral, el cepillado dental es fundamental en la eliminación mecánica del biofilm de los elementos dentarios. La edad de la placa es muy significativa en la producción ácida, las placas maduras (más viejas) en base a su mayor densidad de población tienen mayor capacidad acidogénica. Un medio de esta naturaleza, si bien en sí mismo no necesariamente resulta cariogénico, (79) favorece el desarrollo de microorganismos acidófilos y acidogénicos como *Streptococcus mutans* entre otros. En la actualidad existen varios métodos con los que se puede controlar la placa dental, sin embargo, lo más efectivo es su remoción mecánica por medio del cepillo de dientes e hilo dental. El control mediante agentes químicos coadyuvan en la reducción de la placa-dento-bacteriana pero no sustituyen el efecto del cepillado dentario. (93, 94)

En nuestro estudio observamos que si bien la totalidad de las pacientes estudiadas refieren cepillarse los dientes, muy pocas lo hacen con la frecuencia necesaria y en los momentos adecuados, detectamos que el 20,7% de las embarazadas se encuentra en situación de riesgo para este indicador. Es ampliamente reconocida la importancia del cepillado dentario después de las comidas (4 veces diarias) y que el momento de higiene bucal más importante para afectar el desarrollo de los microorganismos cariogénicos es el que se realiza previo al descanso nocturno (7, 8, 87, 93, 94)

Si bien desde hace varias décadas numerosas investigaciones dan cuenta de la asociación entre la prevalencia de caries y la introducción de la sacarosa en la vida moderna (8, 29, 80), la relación entre la caries dental y

los hábitos alimentarios es muy compleja y aún no está bien dilucidada. Recientemente se han descrito efectos del consumo de bebidas carbonatadas y jugos comerciales en el desarrollo de la caries. (81, 82, 83)

Estudios realizados en nuestro país muestran que la mayoría de las bebidas carbonatadas y jugos comerciales de consumo frecuente, son ácidas y contienen sacarosa como endulcorante, constituyendo un factor de riesgo de caries y erosión dental (82, 83). En relación a ello, la caracterización de las bebidas "diet" nacionales, realizada por Sánchez y Preliasco (83) reveló que las mismas presentan igual carácter ácido que sus equivalentes "no diet", lo que explicaría su incidencia en la erosión dental. Si bien la ausencia de sacarosa como endulcorante podría tener menor incidencia en el desarrollo de la caries, el potencial cariogénico de este tipo de bebidas de carácter ácido, dependerá de la frecuencia de ingesta, flujo y capacidad neutralizante de la saliva y de la madurez del biofilm en sitios individuales.

En nuestro estudio, la denominación de bebidas azucaradas incluye las bebidas carbonatadas y jugos comerciales en sus variedades no "diet", y en relación a ello el 52,8% de las pacientes participantes en el estudio ingiere este tipo de bebidas, con las comidas y entre comidas, lo que equivale a más de 4 veces diarias por lo que se las considera en situación de alto riesgo para este indicador.

El examen clínico buco-dental realizado a las embarazadas bajo estudio reveló una muy elevada prevalencia de caries. La elevada correlación encontrada entre los índices de CPOD y CPOS ( $16\pm 5$  y  $22\pm 11$ ) respectivamente, ponen en evidencia que en muchos casos las lesiones de caries en las pacientes involucran más de un superficie, lo que muestra la extensión de la lesión. Este aspecto explicaría por que frecuentemente no se encuentra correlación significativa entre los valores de CPOD con la frecuencia de cepillado, ingesta de bebidas azucaradas y el nivel de *Streptococcus mutans* mientras, que si se demuestra correlación significativa cuando se considera el número de dientes o superficies cariadas con el hallazgo de *Streptococcus mutans* en saliva total. (95, 96)

El análisis individual de los componentes de los índices muestra al número de elementos obturados como el componente de mayor incidencia

en la conformación del índice junto con la cantidad de elementos cariados. La presencia de elementos o superficies obturadas da cuenta de la experiencia de caries pasada, lo que no estaría necesariamente en relación directa con el nivel de *Streptococcus mutans* en saliva, registrado en el presente. Un elevado recuento de *Streptococcus mutans* o de *Lactobacillus spp.*, ya sea por si solos o en conjunto implica un alto riesgo de caries (97). Estos microorganismos se destacan entre los principales gérmenes odontopatogénicos de la cavidad bucal, por cuanto la determinación de los niveles salivales de dichos microorganismos es de gran importancia al momento del diagnóstico y tratamiento de la caries dental.

En la población de estudio los altos niveles de UFC/mL SM salivales registrados en correlación positiva con el índice CPOS, sugiere que de los factores considerados el que tendría mayor incidencia sobre el riesgo de caries sería la cantidad de dicho microorganismo. De acuerdo a los niveles de *Streptococcus mutans* detectados en saliva total, podemos separar las pacientes en dos grupos: EAR (embarazadas de alto riesgo) incluye pacientes con niveles de  $\geq 10^5$  UFC/mL *Streptococcus mutans* y EBR (embarazadas de bajo riesgo) conformado por pacientes con niveles de  $< 10^5$  UFC/mL *Streptococcus mutans*.

Los niveles de correlación encontrados entre la ingesta de bebidas azucaradas y superficies dentarias cariadas (SDC); y entre la frecuencia de cepillado y SDC sugieren una importante influencia de los hábitos de higiene oral y de consumo de bebidas azucaradas en la actividad de caries presente en estas pacientes.

Por otra parte una disminución en alguno de los factores salivales protectores de la cavidad bucal frente a un elevado número de microorganismos cariogénicos, aumenta notablemente la probabilidad de desarrollar nuevas lesiones cariosas. Existen numerosas evidencias acerca de la destacada función que desempeña la saliva en la protección del ambiente bucal. (3) Entre los factores responsables de la actividad protectora de la saliva se destacan el flujo salival y la capacidad buffer.

En nuestro grupo de embarazadas, el flujo salival no constituiría un factor de riesgo dado que sólo el 0.04 % de las pacientes presentó flujo salival inferior a 1mL/min. Lo mismo se podría decir sobre la capacidad amortiguadora, ya

que al analizar la valoración de esta propiedad salival, pudimos determinar que las embarazadas estudiadas presentaban una capacidad amortiguadora alta.

Por su parte, el IHO es un indicador clínico de la presencia y distribución de la placa bacteriana, constituyendo uno de los criterios utilizados para la determinación de la fase de salud, riesgo o actividad referido a la caries dental. (77) En nuestro estudio, el alto grado de correlación encontrado tanto para ingesta de bebidas azucaradas/IHO, como para frecuencia de cepillado/IHO, pone de manifiesto la incidencia de las variables conductuales analizadas, en el desarrollo de la placa dento-bacteriana. Lo que adquiere mayor importancia al considerar que en el mismo grupo de pacientes se registró un IHO medio superior al umbral de riesgo para caries (IHO >1) (86)

Dada la naturaleza multifactorial de la caries dental no se puede realizar un diagnóstico de riesgo certero a partir de la evaluación de un solo factor etiológico. Del análisis de manera conjunta de los factores ambientales, biológicos y de conductas individuales, resultó que el 1,88% de las pacientes embarazadas presentaban condición de ALTO riesgo carigénico. Si bien, es importante destacar que el 54,7% de las pacientes presentaba condición de alto riesgo para los niveles de UFC/mL SM y el 19% presentaba condición de riesgo para al menos un marcador salival del riesgo de caries.

En base a lo expuesto, a las pacientes incluidas en el grupo EAR se les brindó asesoramiento dietético indicándoles tratamiento preventivo y/o terapéutico.

Slavkin, (13) señala que el estado de salud oral de la madre se constituye en el principal factor de riesgo de la salud oral de su niño. Las interacciones que se establecen entre los microorganismos y el organismo humano durante el embarazo crean una interesante paradoja. La madre a través de la lactancia trasmite a su bebe numerosos anticuerpos, que le confieren al niño inmunidad contra algunos microorganismos, con los que la madre ha tenido contacto durante el embarazo. Es la madre también la que a través de su íntimo contacto expone al niño frente a microorganismos potencialmente patógenos.

Si bien la colonización de *Streptococcus mutans* sólo se produce después de la erupción de los dientes, se ha demostrado que la infección temprana con *Streptococcus mutans* aumenta el desarrollo de caries en la dentición temporaria. Así mismo, se ha reconocido que el estado de salud de la dentición temporaria es de gran incidencia en el desarrollo de la dentición permanente. Es por ello que la reducción de bacterias cariogénicas en el ambiente bucal de las madres no sólo reducirá el riesgo de caries de la madre, sino que al mismo tiempo podría interferir la transmisión de los microorganismos potencialmente patógenos de los elementos dentarios y en consecuencia disminuir el riesgo de caries en la dentición temporaria de los niños, base de la prevención de la salud de la dentición permanente. (93, 94, 98)

En este sentido Brambilla y cols, reportan la reducción de los niveles salivales de *Streptococcus mutans* en embarazadas y el menor grado de colonización bacteriana en sus niños. (99)

Numerosos estudios señalan que en la reducción de la placa bacteriana los mejores resultados se han logrado usando una combinación de fluoruro y clorhexidina (7, 93, 94, 100). El fluoruro es el agente anticaries más ampliamente reconocido tanto por su rol en el proceso de remineralización como por su acción antibacteriana. Por su parte la clorhexidina es un conocido inhibidor de la placa odontopática. Si bien estos agentes antimicrobianos tienen mecanismos de acción completamente diferentes, su administración combinada produce un efecto sinérgico contra los *Streptococcus mutans*.

La adquisición de microorganismos por el cuerpo humano, se efectúa por transmisión directa desde un hospedero a otro, ó indirectamente por medio de otro agente viviente. Los patógenos también pueden ser transmitidos por objetos inanimados, comida y agua. (101)

Se considera a la saliva como el vehículo más importante de la transmisión de SM por vía del contacto físico (17, 102). La madre es considerada la fuente más importante de infección para el niño, y el lapso de tiempo cuando la mayoría de los niños ganan SM en su flora oral es cuando erupcionan los dientes primarios, es decir entre 8 meses y 3 años de edad (14).



En nuestro estudio, pudimos establecer que la erupción del primer diente tuvo lugar aproximadamente a los 8 meses de edad, lo que concuerda con el trabajo de Kreiborg. (103)

El hábitat primario de SM y SS es la dentición humana, posteriormente que los SM han colonizado la dentición, ellos pueden descubrirse en la saliva, en la lengua, en las membranas mucosas orales. (11)

El biofilm según Costerton y Lewandowski, (104) forma un vínculo dinámico entre la flora microbiana, las superficies dentarias y los diferentes compuestos de la saliva con los microorganismos que viven en simbiosis y antibiosis entre sí.

En relación a las especies del grupo mutans que participan en la constitución del biofilm, la prevalencia de infección por SM observada en los binomios fue marcadamente superior que para SS (97,66% - 8,33% respectivamente), siendo destacable que no se detectó presencia de SS en la saliva de los binomios a los 6 y 18 meses del nacimiento; en tanto que sí se aisló SS de la placa del binomio a los 18 meses del nacimiento.

En la investigación realizada por Lindquist, (105) los SM y SS muestran un modelo de colonización algo similar en la dentición, pero SS es más frecuentemente aislado en la cara posterior de los dientes. En sujetos que albergan ambas especies, SM y SS, colonizan las superficies bucales en números comparables, pero en todas las otras superficies SM es el predominante.

En relación a la adquisición inicial, informes de veinticinco años atrás de Masuda y Berkowitz (106, 107), detectaron colonias de SM en el 40% de niños de 24 meses y un 29% entre los 8 y 18 meses de edad respectivamente.

En nuestro trabajo, monitoreamos a 24 binomios madre-niño desde los 6 meses hasta los 31 meses de edad del infante y pudimos determinar que la adquisición inicial se produjo en un 20% de los infantes a los 18 meses de edad, 68% a los 24 meses de edad y hasta un 73% a los 31 meses de edad. (Gráfico 10) Estos resultados son similares a lo reportado por Caufield (14) quien sobre 46 binomios madre-niño monitoreados desde el nacimiento hasta los 5 años de edad, determinó que la edad de adquisición

inicial de SM se producía en un 25% de los niños a los 19 meses y en un 75% a los 31 meses.

En coincidencia, Karn y col., (108) también han demostrado la presencia de SM a edades tempranas; en un 25% de niños menores de un año y en un 60% de niños de 15 meses.

Sin embargo, Milgrom et al., (109) sobre 199 niños de 6 a 36 meses, detectaron la presencia de SM en el 25% de infantes aun antes de la erupción dentaria y en un 53% de niños entre los 6 y 12 meses.

A partir de los estudios mencionados y otros similares, la adquisición inicial temprana ha ganado especial relevancia, al punto que se la postula como un factor predictivo de la actividad de caries futura en las denticiones primaria y permanente.

Ya en la década del 80, Köhler y col. (94) entre otros, demostraron que cuanto más temprana es la detección de SM, mayor es la experiencia de caries.

Nosotros observamos a los 18 meses del niño que del total de las madres con nivel de alto riesgo de UFC/mL de SM en saliva ( $\geq 10^5$ ), el 38,46% de la saliva de sus hijos resultó positiva. En relación a la placa dental de las madres consideradas de alto riesgo ( $+20.000$  UFC/mL de SM), el 66,66% de los niños resultaron positivos; mientras que de las madres con placa dental de bajo riesgo ( $-20.000$  UFC/mL), el 77,77% de sus infantes fueron positivos. Se destaca así la mayor proporción de hijos de madres de bajo riesgo de UFC de SM que de las madres de alto riesgo adquirieron *Streptococcus mutans*, lo que sugiere por un lado la ausencia de asociación directa y única entre el nivel de riesgo para este indicador y la adquisición temprana de SM por los infantes; y por otro lado la necesidad de valorar la incidencia de otros factores biológicos y socio-culturales en la adquisición inicial.

Klemonsks y col., (110) al analizar las variables de riesgo biológico, estilo de vida y medio ambiente social de binomios madre-niño, en dos comunidades, una de un centro asistencial de la Provincia de Buenos Aires y otra de un comedor de Capital Federal, observaron a los 15 meses del niño, que las madres de ambos grupos no presentaban diferencias significativas en su nivel de infección por *Streptococcus* del grupo *mutans*,

mientras que sí resultó significativa la diferencia del nivel de infección de sus niños. Estas observaciones contribuyen a sostener la idea de que diferentes factores en interacción determinan la adquisición inicial de *Streptococcus mutans*.

La extensión de la ventana de infectividad podría estar en relación con los patrones alimentarios familiares. Los hábitos dietéticos de los hijos se asocian a los de sus madres y las conductas alimentarias apropiadas tempranamente son determinantes del comportamiento alimentario posterior. Señala Alaluusua (75), que otro requisito previo para la colonización temprana es que la dieta del niño incluye la ingesta frecuente de hidratos de carbono refinados.

En el mismo sentido en el estudio realizado por Mohan y col., (111) se observó un 20% de niños menores de 14 meses de edad infectados con SM. Los mismos autores señalan que el riesgo de colonización con SM parece mas bajo entre infantes que consumen principalmente leche en lugar de bebidas azucaradas en biberón.

De acuerdo a los datos referidos al consumo de bebidas azucaradas por los niños obtenidos en la entrevista, encontramos que a los 6 meses de edad del niño el consumo de leche endulzada con azúcar u otra bebida azucarada en biberón era de un 77,27% y a los 18 meses de edad del niño era de un 75%.

Las investigaciones mencionadas anteriormente y otras similares, sugieren que los infantes adquieren SM desde sus madres después de la erupción dentaria y en relación con los hábitos dietéticos; la mayoría de dichos estudios se basaron en la determinación de la presencia de *Streptococcus mutans* en el binomio. En el análisis del rol de la madre en la adquisición temprana, determinar la similitud o diferencia entre las cepas del binomio madre-niño en base al fenotipo y/o genotipo de las mismas es fundamental. En este sentido los estudios del genotipo de *Streptococcus mutans* en el binomio en el momento de la adquisición inicial ha ampliado las posibilidades de dilucidar la fuente de la primera infección.

Para el estudio del genotipo en las últimas décadas se han dispuesto de diferentes métodos como análisis de plásmidos (62), análisis de restricción de endonucleasa (63, 64) y restricción de polimorfismos de

fragmentos longitudinales incluyendo la ribotipificación de *Streptococcus mutans* (65 - 67) desestimados en muchos casos por su complejidad. Más recientemente, AP-PCR (17, 19, 61, 70, 71) se ha impuesto ampliamente en la caracterización genotípica de diversas especies de bacterias, en virtud de que se trata de una técnica que se desarrolla en poco tiempo y en forma relativamente sencilla. La principal ventaja que presenta dicha técnica es que para su aplicación no es necesario conocer previamente la secuencia del ADN de las bacterias a estudiar. Li y Caufield (17) compararon la técnica de AP-PCR y ADN cromosómico para el estudio de los genotipos de las cepas de SM en binomios madre-niño y determinaron la validez de AP-PCR en este tipo de estudio.

En el presente trabajo de investigación, para analizar los genotipos de *Streptococcus mutans* de saliva y placa dental de los binomios madre-niño, se cultivaron las bacterias en caldo cerebro corazón durante 48 hs. y se extrajo el ADN utilizando la técnica propuesta por Bollet (19, 91), purificado con fenol cloroformo isoamílico. Se aplicó la técnica de AP-PCR con los primer OPA 02, sugerido por Li y Caufield (17); OPA 05, propuesto por Saarela (19) y Grönroos (20) en sus estudios. Dado que los cebadores son relativamente cortos la temperatura de “annealing” se vuelve una variable crítica, cuando se utilizó un programa de 35 ciclos (94°C, 1 min; 36°C, 2 min; 72°C, 2 min), se observó bajo rendimiento en la amplificación de las bandas; a los fines de lograr una temperatura de “annealing” que permitiera observar múltiples bandas reproducibles, se probaron temperaturas con diferentes gradientes que iban de 31,7°C, 33,7°C, 36°C, 38,2°C y 40,2°C sin obtener resultados deseables. Finalmente, se utilizó un programa con 50 ciclos de temperatura de templado (92°C, 1 min; 35°C, 1 min; 72°C, 2 min) obteniendo así la amplificación de las secuencias del ADN.

Otro factor que se mostró crítico para el desarrollo de la técnica fue la concentración de  $MgCl^{++}$ . La presunta función del  $MgCl_2$  en la técnica de AP-PCR es reforzar la estabilidad entre el primer y el ADN templado. (72) Aparentemente, de la concentración final de  $MgCl_2$  depende la fidelidad de la síntesis de ADN en presencia de la enzima Taq polimerasa, cuya concentración debe determinarse empíricamente para cualquier especie

estudiada. (17) Respecto a la concentración de  $MgCl^{++}$  en la mezcla de reacción de AP-PCR, Li y Caufield (17) determinan que una concentración de 7.0mM de  $MgCl_2$  producía modelos óptimos del ADN de SM.

Nosotros determinamos que una concentración de 2,5mM de  $MgCl_2$  producía modelos óptimos del ADN de los *Streptococcus mutans*, pudiendo atribuirse esto a que el buffer de la enzima en su composición tiene una concentración de 15 mM  $MgCl_2$ .

Una vez que se establecieron las condiciones para el desarrollo de la técnica de AP-PCR, los modelos de bandas amplificadas producidos, se observaron en geles de agarosa bajo luz UV, siendo así comparables los perfiles de bandas. Las pruebas se hicieron por duplicado para confirmar los resultados. Cuando se presentaron resultados dudosos en la comparación de los perfiles de ADN, se triplicó ó cuadruplicó la experiencia.

Al igual que Kulkarni (66) y que Li y Caufield (17), que señalan que AP-PCR resulta ser una técnica muy eficiente para detectar polimorfismo genético y un método apropiado para estudiar la epidemiología de SM en la transmisión intrafamiliar, nosotros pudimos detectar elevado polimorfismo, con los primer OPA 02 y OPA 05. Se observaron 29 y 35 perfiles moleculares de ADN con OPA 02 y OPA 05 respectivamente, en los binomios estudiados.

Bruno y col., (92) después de analizar diferentes medidas de estimación de distancia entre genotipos visualizados utilizando perfiles RAPD como marcadores, recomiendan “especialmente” el uso de índices Dice y Jaccard que no consideran las coincidencias por falta de banda a la vez que ponderan diferencialmente las coincidencias respecto a las diferencias. En base a esas estimaciones, nosotros elegimos el índice de identidad Dice porque cuando observa en los perfiles moleculares individuales la presencia de banda, considera ese evento dos veces.

En este tipo de índices la ausencia simultánea de bandas no necesariamente corresponde a similitud genética. Si bien podemos reconocer que en las muestras de estudio ha habido imposibilidad de lectura del primer para el copiado y la amplificación de las secuencias de ADN, no estamos en condiciones de atribuir el evento en forma inequívoca a pequeños cambios en la secuencia del ADN en estudio o a la presencia

de una secuencia de ADN totalmente diferente. En contraposición a esta indefinición la presencia de banda en las secuencias de muestras de ADN pone en evidencia homología a nivel de esa región genómica.

Los mismos autores (92), recomiendan en segundo lugar el índice Simple Matching (Emparejamiento Simple) en el que la similitud se estima teniendo en cuenta tanto la presencia como la ausencia simultánea de las bandas resultantes de la amplificación de las muestras de ADN. A pesar de que en estos coeficientes se asume la ausencia simultánea del evento de amplificación como un cambio evolutivo común, cuando puede no serlo, el emparejamiento simple ha sido ampliamente utilizado para evaluar distancias genéticas en estudios de poblaciones (112) y en los estudios de fidelidad genética de SM entre madre e hijo (113)

El uso de AP-PCR, no solo permite la detección del grado de polimorfismo entre las cepas de SM aisladas, sino que también facilita establecer el nivel de similitud de las cepas entre los binomios madre-niños, proporcionando un profundo conocimiento de esta relación. En la población estudiada se observó que el 64,7% de las cepas de las madres presentaron similitud genética con la de sus niños. Estos resultados son similares a los informados por Palomari Spolidorio y col. (113) que señalan que el 50% de los binomios estudiados presentaron igualdad genética, en dicho estudio los datos fueron procesados estadísticamente utilizando el coeficiente Simple Matching. También nuestros resultados son semejantes al estudio de Li y Caufield (114), quienes registraron un 71% de homología entre las cepas bacterianas de las madres y sus niños; cuando los datos fueron analizados estadísticamente con odds ratio con un intervalo de confianza de 95%.

El 35,3% de las cepas de las madres no presentaron similitud genética con la de sus hijos. Ello puede atribuirse a mutaciones espontáneas de las cepas bacterianas, a otras fuentes de contagio intrafamiliares y/o a la participación de otros determinantes de la colonización, principalmente los relacionados con los hábitos familiares alimentarios y de higiene bucal, como lo sugieren Redmo Emanuelsson y Wang (115), Berkowitz y Jones (116), y Davey y Rogers (117)

## CONCLUSIÓN

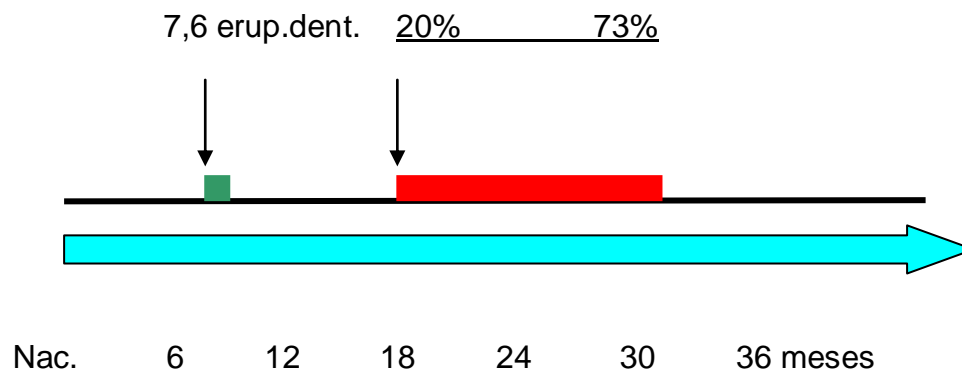
⇒ Reconociendo la importancia de la salud oral de las madres durante el embarazo en la conservación de la salud oral de sus hijos, surge la necesidad de realizar acciones preventivas en madres con altos y bajos niveles de *Streptococcus mutans* salivales, y evitar así la transmisión y colonización de dicho microorganismo en sus hijos.

Además, el frecuente consumo de bebidas azucaradas y cepillado dentario insuficiente y/o en momentos inadecuados, son factores de riesgo para el desarrollo de caries por parte de las pacientes, lo que evidencia la necesidad de brindar asesoramiento dietético e instrucciones de higiene oral a las futuras madres.

⇒ Al analizar los resultados clínicos, microbiológicos y moleculares de los binomios de este grupo de estudio, pudimos establecer que:

- La erupción de los primeros elementos dentarios tuvo lugar a una edad promedio de  $7,6 \pm$  dos meses del niño.
- La colonización inicial de SM ocurrió en el 68% de los infantes a una edad media de 24 meses, con un promedio de 16 elementos dentarios erupcionados. (Gráfico 10)
- La adquisición de *Streptococcus mutans* ocurrió en mayor proporción en hijos de madres de bajo riesgo de UFC de SM, lo que sugiere por un lado la ausencia de asociación directa y única entre el nivel de riesgo para este indicador y la adquisición temprana de SM por los infantes; y por otro lado la necesidad de valorar otras fuentes de contagio intrafamiliares y/o la participación de otros determinantes de la colonización, principalmente los relacionados con los hábitos familiares alimentarios y de higiene bucal.

Gráfico 10: Ventana de Infectividad



⇒ En base a los resultados obtenidos, podemos decir que la técnica de AP-PCR, utilizando los primers OPA 02 y OPA 05 puso en evidencia:

- Elevado polimorfismo genético en las cepas de *Streptococcus mutans* aislados.
- Alta eficiencia para detectar la heterogeneidad genética de *Streptococcus mutans* de los binomios madre-niño.

Dentro de las cepas bacterianas identificadas en los binomios analizados por la técnica de AP-PCR:

- El 64,7% presentó similitud genética.
- El 35,3% no presentó similitud genética

⇒ A partir de la similitud genética observada en los binomios madre niño estudiados, reconocemos a la madre como la fuente más importante de infección para el niño. Consideramos que se deben tener en cuenta otros factores biológicos y socio-culturales en la transmisión y adquisición inicial de *Streptococcus mutans* en la edad temprana.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1)- **Cabrini RL.** Anatomía Patológica Bucal. 1ra. edición. Editorial Mundi. 1980; cap. 4: 68-107
- 2)- **March PD.** Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. Adv. Dent Res. 1994; 8 (2): 263-271
- 3)- **Aaltonen AS, Tenovuo J, Lehtonen PO.** Antibodies to the oral bacterium *Streptococcus mutans* and the development of caries in children in relation to maternal dental treatment during pregnancy. Archs Oral Biol. 1988; 33: 33-39
- 4)- **Garcia Pereiro MA.** Cuidados Odontológicos durante el embarazo. ABS Apenins Montigala. Barcelona. 1999; 56:1283-1245
- 5)- **Brambilla E, Felloni A., Gagliani M, Malerba A., Garcia Godoy F. Strohmenger L.** Caries prevention during pregnancy. Results of a 30 months study. J. Am Dent Assoc. 1998; 129: 871-877
- 6) **Silverstone LM, Jhonson NW, Hardie JM, Williams RAD.** Caries dental: Etiología, Patología y Prevención. México, Ed. El Manual Moderno, 1985
- 7)- **Gunay H, Dmoch Bckhorn K, Gunay Y, Geurtsen W.** Effect on caries experience of a long term preventive program for mothers and children starting during pregnancy. Clin Oral Investig. 1998; 2: 137-142
- 8)- **Burt BA.** Diet and dental health, a study relationships. National Center for Health Statistics, Sañas II, N° 225, Washington, DC. United States Government Printing Office. 1983
- 9)- **Liébana Ureña, José.** Microbiología Oral. 2da. Edición. Editorial McGraw Hill Interamericana. 2002; cap. 51: 515-525; cap 11: 103-113
- 10)- **Chaouat G.** (ed.) The inmunology of the fetus CRC Press Inc. 1990
- 11)- **Grönroos L** Quantitative and qualitative characterization of mutans streptococci in saliva and in dentition. University of Helsinki. 2000. <http://ethesis.helsinki.fi>. ISBN 952-9152382-5
- 12)- **Berkowitz R** Etiology of nursing caries: a microbiologic perspective. J Public Health Dent 1996; 56: 51-54

- 13)- **Slavkin H** First encounters: transmission of infect oral diseases from mother to child. JADA 1997; 128: 773-778
- 14)- **Caufield PW, Cutter GR, Dasanayake AP** Initial acquisition of mutans streptococci by infants: Evidence for a discrete window of infectivity. J. Dent. Res. 1993; 72: 37-45
- 15)- **Aaltonen A.S., Tenuovo J.** Association between mother-infant salivary contacts and caries resistance in children: cohort study. Pediatric Dent. 1994; 16: 110-116
- 16)- **American Academy of Pediatrics.** Early childhood caries. Reference Manual 2000-2001
- 17)- **Li Y, Caufield PW** Arbitrarily primed polymerase chain reaction fingerprinting for the genotypic identification of mutans streptococci from humans. Oral Microbiol Immunol 1998; 13: 17-22
- 18)- **Arbeit RD** Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: Manual of clinical microbiology. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. 7<sup>th</sup> ed. ASM Press: Washington, D.C. 1999; 116-137
- 19)- **Saarela M, Hannula J, Mätto J, Asikainen S, Alaluusua S** Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction. Arch Oral Biol 1996; 41: 821-826
- 20)- **Grönroos L, Alaluusua S** Site-Specific oral colonization of mutans Streptococci detected by Arbitrarily Primed PCR Fingerprinting. Caries Res 2000; 34: 474-480
- 21)- **Perez Sánchez A, Donoso Siña E** Obstetricia. 2da Edición. Editorial Mediterraneo. 1992; cap. 9: 119-130
- 22)- **Genco. Goldman. Cohen.** Periodoncia Interamericana. McGraw-Hill. 1990; Cap. 17: 233-36
- 23)- **Fejerskov O, Nyvad B, Kidd EAM** Clinical and histological manifestation of dental caries. En: Dental Caries: the disease and its clinical management. Edited by Fejerskov O and Kidd E. Blackwell Munksgaard. Cap. 5: 71-97
- 24)- **Caufield PW, Li Y, Dasanayake A** Dental Caries: An Infectious and Transmissible Disease. A Supplement to Compendium of Continuing Education in Dentistry. Oral Health For Children. 2005

- 25)- **March PD** Dental plaque as a Microbial Biofilm. *Caries Res* 2004; 38:204-211
- 26)- **Nyvad B, Fejerskov O** Structure of dental plaque and the plaque-enamel interface in human experimental caries. *Caries Res* 1989; 23: 151-158
- 27)- **Roitt IM, Lehner T** Immunology of oral diseases: Blackwell Scientific Publication, Oxford, London, Edinburgh. 1981; 30: 4 -340
- 28)- **Ericsson Y, Hellström Y, Jared B y col** Investigations into the relationship between saliva and dental caries. *Acta Odont. Scand.* 1954; 11: 179 - 194.
- 29)- **Gustafsson BE, Quensel CE, Lanke LS, Lindquist C, Grahnen H, Bonow BE, Krasse B** The Vipeholm caries study. The effect of different levels of carbohydrate intake on caries activity in 436 individuals observed for five years. *Acta Odont Scand.* 1954; 11: 232 - 364
- 30). **Clarke JK** On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *British J Exp Pathol.* 1924; 5: 141-147
- 31)- **Hamada S** Overview of the biology of *Streptococcus mutans*. En: *Molecular microbiology and immunology of Streptococcus mutans*. Hamada S, Michalek S, Kiyono H, Menaker L, McGhee J. Eds. Elsevier Science Publishing Inc.: New York. 1986; 7-20
- 32)- **Whiley RA, Beighton D** Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol.* 1998; 13: 195-216
- 33)- **Russell RRB** Pathogenesis of oral streptococci. En: *Gram-positive pathogens*. Fishetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI. Eds. ASM Press: Washington DC. 2000; 272-279
- 34)- **Maiden MFJ, Lai C-H, Tanner A** Characteristics of oral gram-positive bacteria. En: *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*. Slots J, Taubman MA, eds. Mosby: St Louis; MI 1992; 342-372
- 35)- **Beighton D, Russell RRB, Whiley RA** A simple biochemical scheme for the differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Caries Res* 1991; 25: 174-178
- 36)- **Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST** eds. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9<sup>th</sup> ed. Williams & Wilkins: Baltimore, Maryland 1994; 20: 527-558

- 37)- **Hardie JM** Oral Streptococci. En: Bergey's manual of systematic bacteriology. Volumen 2. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG ed. Williams & Wilkins: Baltimore, Maryland 1986; 1059-1063
- 38)- **Lee SF, Progulske-Fox A, Bleiweis AS** Molecular cloning and expression of a *Streptococcus mutans* major surface protein antigen, P1 (I/II) in Escherichia coli. Infect Immun 1988; 56: 2114-2119
- 39)- **Okahashi N, Sasakawa C, Yoshikawa M, Hamada S, Koga T** Molecular characterization of a surface protein antigen gene from serotype c *Streptococcus mutans* implicated in dental caries. Mol Microbiol 1989; 3: 673- 678
- 40)- **Russell MW, Zanders ED, Mergmeier L, Lehner T** Affinity purification and characterization of protease-susceptible antigen I of *Streptococcus mutans*. Infect Immun 1980; 29: 999-1006
- 41)- **Ma Y, Marquis RE** Thermophysiology of *Streptococcus mutans* and related lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 1997; 72: 91-100
- 42)- **Gold OG, Jordan HV, van Houte J** A selective medium for *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol 1973; 18: 1357-1364
- 43)- **Little WA, Korts DC, Thomson LA, Bowen WH** Comparative recovery of *Streptococcus mutans* on ten isolation media. J Clin Microbiol 1977; 5: 578- 58
- 44)- **Jordan HV** Cultural methods for the identification and quantitation of *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli* in oral samples. Oral Microbiol Immunol 1986; 1: 23-27
- 45)- **Schaeken MJM, van der Hoeven JS, Franken HCM** Comparative recovery of *Streptococcus mutans* on five isolation media, including a new simple selective medium. J Dent Res 1986; 65: 906-908
- 46)- **Dasanayake AP, Caufield PW, Cutter GR, Roseman JM, Köhler B** Differences in the detection and enumeration of mutans streptococci due to differences in methods. Arch Oral Biol 1995; 40: 345-351
- 47)- **Larmas M** A new dip-slide technique for counting of salivary lactobacilli. Proc Finn Dent Soc 1975; 71: 31-35
- 48)- **Jordan HV, Laraway R, Snirch R, Marmel M** A simplified diagnostic system for cultural detection and enumeration of *Streptococcus mutans*. J Dent Res 1987; 66: 57-61

- 49)- **Jensen B, Bratthall D** A new method for estimation of mutans streptococci in human saliva. J Dent Res 1987; 66: 468-472
- 50)- **Brailsford SR, Byrne RW, Beighton D** Evaluation of new dip slide test for the quantification of mutans streptococci from saliva. Bericht 1998
- 51)- **Kneist S** Begleitphänomene in der mikrobiologischen Speicheldiagnostik. Oralprophylaxe 1998; 20: 208-217
- 52)- **Kneist S, Heinrich-Weltzien R, Fischer T, Klein C, Rupf S, Eschrich K** Handelsübliche Speicheltests zum mutans Nachweis Uebersicht und Effizienzbewertung. Quintessenz 1999; 50: 33-43
- 53)- **Steinberg D** Evaluation of caries screening tests. Bericht, Hadassah Universität Jerusalem 1998
- 54)- **Kelstrup J, Richmond S, West C, Gibbons RJ** Fingerprinting human oral streptococci by bacteriocin production and sensitivity. Arch Oral Biol 1970; 15: 1109-1116
- 55)- **Jack RW, Tagg JR, Ray B** Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiol Rev 1995; 59: 171-200
- 56)- **Bratthall D** Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling *Streptococcus mutans*. Odontol Revy 1970; 21: 143-152
- 57)- **Perch B, Kjems E, Ravn T** Biochemical and serological properties of *Streptococcus mutans* from various human and animal sources. Acta Path Microbiol Scand Section B 1974; 82: 357-370
- 58)- **Beighton D, Russell RR, Hayday H** The isolation and characterization of *Streptococcus mutans* serotype h from dental plaque of monkeys (*Macaca fascicularis*). J Gen Microbiol 1981; 124: 271-279
- 59)- **Shklair IL, Keene HJ** A biochemical scheme for the separation of the five varieties of *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol 1974; 19: 1079-1081
- 60)- **Shklair IL, Keene HJ** Biochemical characterization and distribution of *Streptococcus mutans* in three diverse populations. En: Microbial aspects of dental caries. Stile HM, Loesche WJ, O'Brien TC ed. Information Retrieval Inc: Washington DC 1976; 201-210
- 61)- **Olive DM, Bean P** Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. J Clin Microbiol 1999; 37: 1661-1669

- 62)- **Caufield PW, Wannemuehler Y, Hansen HB** Familial clustering of the *Streptococcus mutans* cryptic plasmid strain in a dental clinic population. Infect Immun 1982; 38: 785-787
- 63)- **Caufield PW, Walker TM** Genetic diversity within *Streptococcus mutans* evident from chromosomal DNA restriction fragment polymorphism. J Clin Microbiol 1989; 27: 274-278
- 64)- **Kulkarni GV, Chan KH, Sandham HJ** An investigation into the use of restriction endonuclease analysis for the study of transmission of mutans streptococci. J Dent Res 1989; 68: 1155-1161
- 65)- **Stull TL, LiPuma JJ, Edlind TD** A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. J Infect Dis 1988; 157: 280-286
- 66)- **Saarela M, Alaluusua S, Takei T, Asikainen S** Genetic diversity within isolates of mutans streptococci recognized by an rRNA gene probe. J Clin Microbiol 1993; 31: 584-587
- 67)- **Alaluusua S, Alaluusua SJ, Karjalainen J, Saarela M, Holttinen T, Kallio M, Hölttä P, Torkko H, Relander P, Asikainen S** The demonstration by ribotyping of the stability of oral *Streptococcus mutans* infection over 5 to 7 years in children. Arch Oral Biol 1994; 39: 467-471
- 68)- **Madigan MT, Martinko JM, Parker J** Plasmids. En: Brock biology of microorganisms. Madigan MT, Martinko JM, Parker J ed. Prentice Hall: Englewood Cliffs, NJ 1997; 328-333
- 69)- **Hamada S, Slade HD** Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev 1980; 44: 331-384
- 70)- **Welsh J, McClelland M** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res 1990; 18: 7213-7218
- 71)- **Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res 1990; 18: 6531-6535
- 72)- **Welsh J, McClelland M** Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. Nucleic Acids Res 1991; 19: 5275-5279
- 73)- **Taylor GR** Polymerase chain reaction: basic principles and automation. En: McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR ed. PCR A practical approach. New York: Oxford University Press 1991; 1-13

- 74)- **Li Y, Caufield PW** The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. *J Dent Res* 1995; 74: 681-685
- 75)- **Alaluusua S** Transmission of mutans streptococci. *Proc Finn Dent Soc* 1991; 87: 443-447
- 76)- **Códigos Internacionales de Ética de la Investigación** Declaración de Helsinki
- 77)- **Hoag Philip M, Pawlak Elizabeth A** Fundamentos de Periodoncia. 4ta edición. Mosby Year Book de Espana S.A. 1992; cap. 12:174-179
- 78)- **Bordoni N** Diagnóstico etiológico en la clínica preventiva (monografía). Buenos Aires, FOUBA. 1982
- 79)- **Kats, Mc Donald, Stookey** Odontología Preventiva en acción. 3ra Edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires. 1990; cap. 9: 151-155
- 80)- **Screenby LM** Sugar and human dental caries. *World Rev Nutr Diet* 1982 40:19-65
- 81)- **Sánchez G** Determinación del pH de bebidas carbonatadas y jugos comerciales nacionales de consumo frecuente en niños. *Boletín de la Asociación Argentina de Odontología para Niños*. 1999. 28(3): 8-10
- 82)- **Lissera RG, Yankilevich ERLM de, Battellino LJ** In vitro erosive capacity of some fruit juices and soft or low alcoholic strength beverages on human teeth. *Acta Odontológica Latinoamericana* 1998; 11:55-71
- 83)- **Sánchez G, Preliasco V** Implicancia del efecto buffer de bebidas nacionales de consumo frecuente en los procesos de caries y erosión dental en niños. *Boletín de la Asociación Argentina de Odontología para Niños*. 2000. 29(1):16-19
- 84)- **World Health Organization**. Oral health surveys, basic methods. 2<sup>nd</sup> ed. Geneva, 1997
- 85)- **Klein H, Palmer CE, Kunutson JW** Studies on dental caries, dental status and dental needs of elementary school children. *Public Health Rep* 1938; 53: 751-765
- 86)- **Løe H. Y Silness J**. Periodontal diseases in pregnancy. Prevalence and Severity. *Acta Odontolog Scandinavica* 1963; 21: 533-51
- 87)- **Odontología integral para niños I. Atención integral de la salud bucal** Segunda edición. Preconc. Paltex /OPS/OMS 1993

- 88)- **Ruoff, LK** Streptococcus en Murray, P Manual de Clínica Microbiológica 6ª Edición. 1995; 299 - 307
- 89)- **Emilson, CG** Prevalence of Streptococcus mutans with different colonial morphologies in human plaque and saliva. Scand J Dent Res. 1983; 91: 26 - 32
- 90)- **Bollet C, Gevaudan MJ, Lamballerie X.de, Zandotti C, Micco P.de** A simple method for the isolation of chromosomal DNA from Gram positive or acid fast bacteria. Nucleic acids Research 1991; 19 (8): 1955
- 91)- **Grönroos L, Alaluusua S** Site-Specific oral colonization of Mutans Streptococci detected by Arbitrarily Primed PCR Fingerprinting. Caries Res 2000; 34: 474-480
- 92)- **Bruno C, Balsarini M, Di Rienzo J** Comparación de medidas de distancias entre perfiles RAPD. Journal of Basic and Applied Genetics 2003; 15 (2): 69-78
- 93)- **Köhler B, Andreen I.** Influence of caries-preventive measures in mothers on cariogenic bacteria and caries experience in their children. Archs Oral Biol 1994; 39: 907-11
- 94)- **Köhler B., Bratthall D., Krasse B.** Preventive measures in mothers influence the establishment of the bacterium *Streptococcus mutans* in their infants. Arch Oral Biol. 1983; 28: 225-31
- 95)- **Loesche WJ** Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol Rev 1986; 50: 353-380
- 96)- **Babaahmady KG, Challacombe SJ, Marsh PD, Newman HN** Ecological study of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus spp.* at sub-sites from approximal dental plaque from children. Caries Res 1998; 32: 51-56
- 97)- **Kristoffersson K, Gröndahl HG, Bratthall D** The more *Streptococcus mutans* the more caries on approximal surfaces. J Dent Res 1985; 64: 58-61
- 98)- **Mc Donald R E., Avery D R.** Odontología para el Niño y el Adolescente. Editorial Mundi SAIC y F. Argentina 1987; cap. 7:149-161
- 99)- **Brambilla E., Felloni A., Gagliani M., Malerba A., Garcia Godoy F., Strohmenger L.** Caries prevention during pregnancy. Results of a 30 months study. J Am Dent Assoc 1998; 129: 871-77



- 100)- **Anderson M. H., Bratthall D., Einwag J., Elderton R. J., Ernst C. P., Levin R. P., Tynelius-Bratthall G., Willershausen Zönnchen B.** Professional Prevention in Dentistry. Williams & Williams. Germany. 1994
- 101)- **Madigan MT, Martinko JM, Parker J** Host parasite relationships. In: Brock biology of microorganisms. Madigan MT, Martinko JM, Parker J, eds. Prentice Hall: Englewood Cliffs, NJ 1997; 785-812
- 102)- **Duchin S, van Houte J**, Colonization of teeth in humans by *Streptococcus mutans* as related to its concentration in saliva and host age. Infect Immun 1978; 20: 120-125
- 103)- **Kreiborg S, Rasmussen P, Thesleff I** Normal dental and occlusal development. En: Pedodontics – A clinical approach. Koch G., Modéer T., Poulsen S., Rasmussen P., eds. Munksgaard: Copenhagen 1991 ; pp 48
- 104)- **Costerton JW, Lewandowski Z** The biofilm lifestyle. Adv Dent Res 1997; 11: 192 -195
- 105)- **Lindquist B** Mutans streptococci in human dentition. Thesis, Göteborg: University of Göteborg, 1991
- 106)- **Masuda N, Tsutsumi N, Sobue S, Hamada S** Longitudinal survey of the distribution of various serotypes of *Streptococcus mutans* in infants. J Clin Microbiol.1979; 10 (4): 497-502
- 107)- **Berkowitz RJ, Jordan HV** The early establishment of *Streptococcus mutans* in the mouths of infants. Arch Oral Biol. 1980; 20: 171-74
- 108)- **Karn T et al** Colonization of mutans streptococci in 8 to 15 months-old children. J Public Health Dent. 1998; 58: 248-249
- 109)- **Milgrom P et al** Dental caries and its relationship to bacterial infection, hypoplasia, diet and oral hygiene in 6 to 36 months old children. Community Dent Oral Epidemiol. 2000; 28: 295-310
- 110)- **Klemonsks G, González A, Gómez Gutierrez N, Vigide A, Beccio M, Piovano S** Estudio comparativo del estado de salud enfermedad dentaria en el binomio madre-niño. Sociedad Argentina de Investigación Odontológica. División Argentina de la International Association for Dental Research. XXXVI Reunión Anual. 2003. Resumen N° 94
- 111)- **Mohan A, Morse DE, O'Sullivan DM, Tinanoff N** The relationship between bottle usage content, age, and number of teeth with mutans

streptococci colonization in 6-24 month old children. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1998; 26(1): 12-20

112)- **Apostol BL, Black IVWC, Miller BR, Reiter P, Beaty BJ** Estimation of the number of full sibling families at an oviposition site using RAPD PCR markers: applications to the mosquito *Aedes aegypti*. *Theoretical and Applied Genetic* 1993; 86: 991-1000

113)- **Palomari Spolidorio DM, Höfling JF, Pizzolitto AC, Rosa EA, Negrini TC, Spolidorio LC** Genetic polymorphism of *Streptococcus mutans* in Brazilian family members. *Brazilian Journal of Microbiology* 2003; 34: 213-217

114)- **Li Y, Caufield PW** The fidelity of initial acquisition of *mutans* streptococci by infants from their mothers. *J Dent Res* 1995; 74(2): 681-685

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

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

117)- **Davey AL, Rogers AH** Multiple types of the bacterium *Streptococcus mutans* in the human mouth and their intra-family transmission. *Arch Oral Biol* 1984; 29: 453-460

## ANEXO 1

## ANEXO 2

## ANEXO 3

**ANEXO 1**

Córdoba, ... de ..... de 2000.-

La Sra. ...., de .... años de edad, DNI ..... y demás datos que obran en anexos que se acompañan, da su consentimiento expreso a los fines de que preste su colaboración y la de su hijo/a en forma voluntaria y gratuita ante profesionales dependientes de la Universidad Nacional de Córdoba - Facultad de Odontología -, en lo atinente a suministrar datos que se le requieran referidos a sus condiciones personales, socioculturales y económicas, además de permitir la toma de muestras de saliva y placa dental para estudios microbiológicos, moleculares y los correspondientes exámenes buco dental. Dichos estudios no influyen en el feto ni en el niño.

La entrevista es motivada para desarrollar el conocimiento de la materia en post del bienestar de la humanidad toda, datos que a su culminación serán publicados con reserva de identidad.-

.....  
firma de la entrevistada

## ANEXO 2



## “ENTREVISTA PERSONAL”

Nombre de la Paciente: .....  
Edad: ..... Fecha de Nacimiento: .....  
Estado Civil: .....  
Domicilio: ..... Barrio: .....  
Teléfono: .....  
Cambio de Domicilio: .....  
  
Fecha de la Encuesta: .....

### ATENCIÓN de la SALUD

- 1)- ¿Tiene cobertura social?
  - 1- Sólo la Madre
  - 2- Sólo el Niño/a
  - 3- Madre y Niño/a
  - 4- Ninguno
  - 12- NS/NR
  
- 2)- ¿Dónde recibe la atención habitual de salud? (Marcar el lugar más frecuente)
  - 1- Centro de Salud Municipal
  - 2- Hospital Público
  - 3- Institución o Consultorio Médico Privado
  - 4- Consultorio o Sanatorio de la Obra Social
  - 5- Otros
  - 12- NS/NR
  
- 3)- ¿Recibe o recibió alguna vez atención odontológica?
  - 1- Si
  - 2- No (Pasar a la pregunta N° 6)
  - 12- NS/NR
  
- 4)- (Nombre de la paciente) fue al dentista para:
  - 1- Control
  - 2- Tratamiento ¿Cuál?
  - 3- Ambas cosas
  - 12- NS/NR
  
- 5)- ¿Dónde recibe/recibió la atención Odontológica?
  - 1- Centro de Salud Municipal
  - 2- Institución o Consultorio Privado
  - 3- Facultad de Odontología. U.N.C.
  - 4- Instituto de la Obra Social
  - 5- Otros
  - 12- NS/NR

6)- ¿Se cepilla los dientes?. ¿Con qué frecuencia?

- 1- No se cepilla (Pasar a pregunta N° 9)
- 2- Ocasionalmente
- 3- Días a la Semana. ....días
- 12- NS/NR

7)- ¿En qué momento del día se cepilla los dientes?

- 1- Sólo al levantarse
- 2- Sólo antes de acostarse
- 3- Al levantarse y al acostarse
- 4- Sólo después de las comidas
- 5- Al levantarse, después de comer y antes de acostarse
- 12- NS/NR

8)- ¿Usa dentífrico?

- 1- Si
- 2- No
- 12- NS/NR

9)- ¿Cuántas comidas hace al día?.....  
¿Puede especificar las horas de comidas?.....

10)- ¿Con qué frecuencia toma alimentos entre comidas?

- 1- Nunca
- 2- Ocasionalmente
- 3- A menudo
- 12- NS/NR

¿Qué alimentos suele ingerir entre comidas?.....

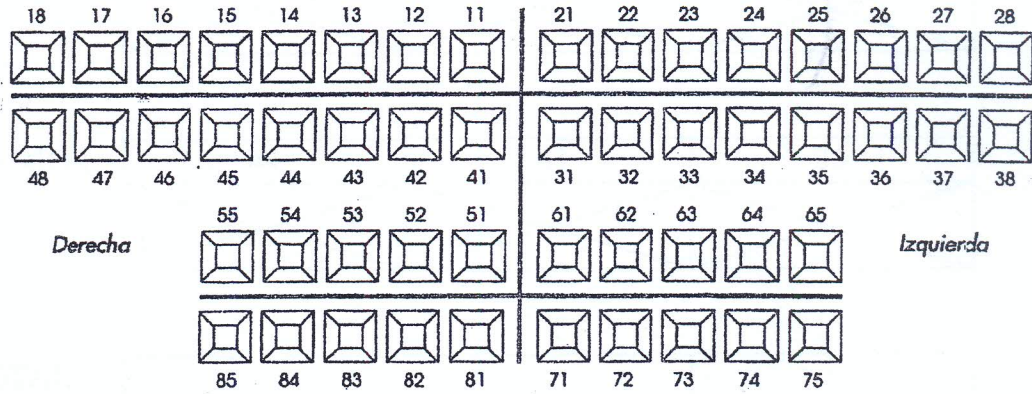
11)- ¿Con qué frecuencia bebe zumos de frutas, gaseosas u otra bebida azucarada?

- 1- Nunca
- 2- Ocasionalmente
- 3- A menudo.....veces al día
- 12- NS/NR

12)- ¿En qué momentos efectúa la ingesta de estas bebidas?

- 1- Con las comidas
- 2- Entre comidas
- 3- En ambas ocasiones
- 12- NS/NR

## EXÁMEN BUCO-DENTAL



- 1)- Total de Dientes en Boca:.....
- 2)- CPOD
- 3)- CPOS
- 4)- Índice de Higiene Oral

	DERECHO	ANTERIOR	IZQUIERDO
SUPERIOR	16	21	24
INFERIOR	44	41	36
TOTAL	<input style="width: 100%; height: 20px;" type="text"/>	<input style="width: 100%; height: 20px;" type="text"/>	<input style="width: 100%; height: 20px;" type="text"/>

5)- Índice de Salud Gingival

	DERECHO	ANTERIOR	IZQUIERDO
SUPERIOR	16	21	24
INFERIOR	44	41	36
TOTAL			

Muchas gracias por su colaboración

### ANEXO 3

Contenido  
Índice  
Índice de Tablas  
Índice de Figuras  
Índice de Anexos

Índice

#### CONTENIDO

1. Introducción  
2. Objetivos  
3. Metodología  
4. Resultados  
5. Conclusiones

#### ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de la muestra  
Tabla 2. Características de la muestra

#### ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo del estudio  
Figura 2. Gráfico de barras de la distribución de la muestra  
Figura 3. Gráfico de líneas de la evolución de los datos

#### ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Formulario de consentimiento informado  
Anexo 2. Hoja de datos de la encuesta  
Anexo 3. Resultados de las pruebas estadísticas



### DATOS REFERIDOS AL NIÑO

Código:.....  
Nombre del niño.....  
Edad.....Fecha de Nacimiento.....  
Nombre de la madre:.....  
Domicilio:.....Barrio:.....  
Teléfono:.....  
  
Fecha de la primera entrevista:.....

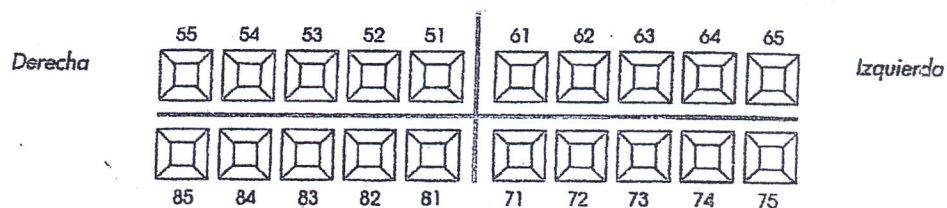
### CUIDADO DEL NIÑO

- 1)- ¿Quién es la persona encargada del cuidado de (nombrar al niño/a)?
- 1- Madre
  - 2- Padre
  - 3- Abuela
  - 4- Hermanos
  - 5- Otras

### DATOS ODONTOLÓGICOS

- 1)- Total de Dientes Erupcionados:.....  
2)- Edad y Primer elemento erupcionado:.....

#### ERUPCIÓN DENTARIA



Fecha de la segunda entrevista:.....

#### ERUPCIÓN DENTARIA

