



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA RESTAURADORA  
DEPARTAMENTO PATOLOGÍA

**Evaluación de la Técnica de Cubeta como un método para el aislamiento y recuento de *Streptococcus mutans* a partir de muestras de placa dental en restauraciones de Resina Compuesta y Amalgama.**

**Paula Andrea Zúñiga Saavedra**

**TRABAJO DE INVESTIGACION  
REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE  
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL  
Prof. Dr. Gustavo Moncada Cortés**

**TUTORES ASOCIADOS  
Dra. Patricia Palma Fluxá  
Dr. Patricio Vildósola Grez**

**Santiago - Chile  
2010.**

**A MIS PADRES:**

*Quienes no escatimaron esfuerzos ni desvelos, brindándome su apoyo y comprensión necesarios para alcanzar una de mis más anheladas metas*

**A MIS ABUELOS:**

*Martina y Rigoberto que siempre han estado conmigo.  
Leo y Ramón que me acompañan desde el cielo.*

## **AGRADECIMIENTOS**

- A mis padres, Angélica y Claudio, a mi hermana Claudia, por su apoyo incondicional, por animarme cuando las cosas no salían bien y por celebrar cuando alcanzaba mis objetivos.
- A mis tías Verónica, Luisa y Olga por el apoyo y cariño brindado durante todos estos años.
- A mis tutores, Prof. Dr. Gustavo Moncada, Dra. Patricia Palma y Dr. Patricio Vildósola, por haber confiado en mí para desarrollar esta investigación, por guiarme en este proceso, por la paciencia y la disposición para escuchar y aclarar mis dudas.
- A los docentes de microbiología y operatoria que siempre estuvieron dispuestos ayudarme y a compartir sus conocimientos y experiencia.
- Al Prof. Waldo Aranda por su importante aporte en el análisis estadístico.
- A mis amigos Natalia, Caro, Maca, Javi, Marcia, Vilma, Valentina, Sergio, Edgardo, Nicolás y Eduardo por estar siempre conmigo, darme ánimo y hacer de esta etapa de mi vida algo tan agradable, con tantas anécdotas y recuerdos.
- Por último a Dios por llenar mi vida de dichas y bendiciones.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>1. Caries Dental</b>	<b>5</b>
1.1 Etiología de la Caries Dental	7
1.2 Microbiología de la Caries Dental	9
1.2.1 Biofilm	12
1.2.2 Grupo <i>Streptococci mutans</i>	14
1.2.2.1 <i>Streptococcus mutans</i>	15
1.2.2.2 <i>Streptococcus sobrinus</i>	18
1.2.3 <i>Lactobacilli spp.</i>	19
<b>2. Riesgo Cariogénico</b>	<b>21</b>
2.1 Métodos de aislamiento y recuento de <i>Streptococcus mutans</i>	23
2.1.1 Aislamiento y recuento de <i>Streptococcus mutans</i> a partir de muestras de saliva	23
2.1.2 Aislamiento y recuento de <i>Streptococcus mutans</i> a partir de muestras de placa bacteriana dental	25
2.2 Métodos de aislamiento y recuento de <i>Lactobacilli spp.</i>	27
<b>3. Materiales Dentales y su relación con microbiología</b>	<b>29</b>
3.1 Amalgama	29
3.2 Resinas Compuestas	30
<b>4. Caries Secundaria</b>	<b>32</b>
<b>PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA</b>	<b>34</b>
<b>HIPOTESIS</b>	<b>36</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>36</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODO</b>	<b>38</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>48</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>59</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>64</b>
<b>SUGERENCIAS</b>	<b>65</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>67</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>76</b>

## **RESUMEN**

**Introducción:** La caries secundaria es la principal causa de fracaso de restauraciones. No sólo se relaciona con algún defecto marginal, sino que también requiere de la formación de placa bacteriana con potencial cariogénico, siendo *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) la especie bacteriana con mayor poder patogénico. Identificarlo y cuantificarlo directamente de placa bacteriana dental es fundamental para evitar futuras lesiones. Así surgen métodos para medir presencia de *S. mutans* en placa dental, siendo el más utilizado el Método de “Mondadientes o Toothpick”, el cual es un método simple, económico y viable de realizar en la consulta dental, con la desventaja de requerir conocimiento y tiempo de procesamiento de laboratorio alejando al clínico de realizar este importante examen complementario. Esta investigación tiene por objetivo principal, evaluar un método para la aislación y recuento de *S. mutans* denominado “Técnica de Cubeta”, y correlacionarlo con el Método del Mondadientes.

**Material y Método:** Se seleccionaron 40 pacientes de la clínica de Operatoria 4to año de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. En cada uno de ellos se tomó una muestra de placa bacteriana dental de un molar restaurado con Amalgama o Resina Compuesta, con el Método del Mondadientes y en su homólogo restaurado con el mismo material con la Técnica de Cubeta. Este método consiste en una impresión directa sobre las superficies oclusales de restauraciones, mediante una cubetilla de flúor cargada con agar TYCSB. Además se tomó muestras de saliva no estimulada como control de presencia de *S. mutans* en la boca de cada paciente. Las muestras de saliva y mondadientes fueron sembradas en agar TYCSB. Las cubetas y las placas sembradas se incubaron a 37°C por 48 horas, para posteriormente proceder al recuento bacteriano.

**Resultados:** La Técnica de Cubeta aisló Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/cm<sup>2</sup> de *S.mutans* en el 87,5% de las superficies obturadas. Posee una correlación positiva y significativa ( $r = 0,95$ ) con el Método del Mondadientes. Se observó una diferencia significativa entre el recuento de *S.mutans* en restauraciones de Resina Compuesta y Amalgama mediante la Técnica de Cubeta y el Método del Mondadientes.

**Conclusiones:** La Técnica de Cubeta es efectiva en aislamiento y recuento de *S.mutans* a partir de muestras de placa bacteriana dental en restauraciones de Amalgama y Resina Compuesta.

## **INTRODUCCIÓN**

Durante la vida del ser humano este se ve afectado por diferentes enfermedades, siendo consideradas más importantes aquellas que afectan grandes órganos y que podrían eventualmente causar la muerte del individuo. Sin embargo, existe una enfermedad que mayoritariamente no es reconocida como tal por las personas, por su desarrollo silencioso y lento, a veces, considerándose como un estado normal dentro de la salud <sup>(1)</sup>. Esta enfermedad es la caries dental, la cual puede progresar, comprometiendo estructuras, funciones, la estética y la autoestima del individuo que la padezca <sup>(2)</sup>.

La caries dental se define como una enfermedad crónica, bacteriana, infectocontagiosa y multifactorial que afecta a la mayoría de la población mundial <sup>(1)</sup>. Es producida por bacterias específicas presentes en la placa bacteriana dental, las cuales por sus factores de virulencia, se adhieren a la superficie del diente, produciendo ácidos, los que provocan la pérdida de minerales de su estructura <sup>(2)</sup>, siendo el *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), uno de los principales agentes etiológicos <sup>(3)</sup>.

Cuando ya se ha perdido parte de la estructura dentaria es necesario reconstruirla. Para ello se han creado una gran variedad de materiales con el fin de restaurar los dientes afectados por caries <sup>(1)</sup>.

Dentro de los materiales más usados se encuentran la amalgama dental y las resinas compuestas <sup>(4)</sup>. Sin embargo, estos no aseguran que la caries no vuelva afectar las estructuras dentarias restauradas, ya que se puede formar una nueva lesión de caries en los márgenes de restauraciones existentes, conocida como caries secundaria o recurrente, siendo ésta una de las razones más frecuentes de fracasos de tratamientos rehabilitadores <sup>(5)</sup>.

Por ello se debe realizar el tratamiento de la caries dental como una enfermedad infecciosa, a través del control de los factores etiológicos involucrados en el proceso, además de un adecuado tratamiento de restaurador.

Al ser la caries secundaria la razón más común para el recambio de restauraciones, esta investigación propone un nuevo método para evaluar el crecimiento y la colonización del microorganismo principal implicado en la aparición de caries dental, sobre restauraciones de amalgama y resina compuesta.

El método a proponer se denomina Técnica de Cubeta, y consiste en una impresión directa sobre restauraciones de tipo Clase I, mediante una cubetilla que contiene un medio de cultivo, el cual es capaz de aislar y permitir el crecimiento de *S. mutans*. Tomada la impresión, se mantiene en una estufa de cultivo a 37°C por 48 horas y posteriormente se procede al recuento bacteriano.

La Técnica de Cubeta pretende ser un método, para la aislación y recuento de *S. mutans*, simple, rápido, bajo costo, de mayor precisión y que no necesita de gran conocimiento microbiológico para llevarlo a cabo de modo de acercar al clínico a esta importante herramienta diagnóstica y utilizarlo como un método para evaluar riesgo de caries secundaria.



## MARCO TEÓRICO

### 1. Caries Dental

La caries dental actualmente se define como una enfermedad infecciosa, compleja, transmisible y multifactorial, en la que un amplio grupo de factores biológicos, socioeconómicos y culturales interactúan, directa o indirectamente en el establecimiento y desarrollo de microorganismos cariogénicos incluidos en la comunidad microbiana del biofilm dental. Afecta a la estructura dura de las piezas dentarias y se caracteriza por la desintegración molecular, localizada y progresiva que lleva, y en caso de no detener su avance natural, pasa a ser una lesión irreversible <sup>(6)</sup>.

Es considerada un proceso, que resulta de un desbalance del equilibrio fisiológico entre los minerales que componen la estructura dentaria y los productos bacterianos presentes en el biofilm de placa supragingival <sup>(7)</sup>.

Para que se genere una lesión cariosa debe depositarse sobre la superficie dentaria, lo que se conoce como placa dental, la cual es un biofilm adherente y bacteriano que se forma sobre tejidos duros y blandos <sup>(2)</sup>. Los microorganismos con potencial cariogénico que forman el biofilm son capaces de fermentar carbohidratos y producir ácidos, los cuales provocan dos efectos: **(a) un efecto directo** sobre el diente, provocando desmineralización de los tejidos inorgánicos de esmalte y la dentina; **(b) efecto indirecto**, que activa las metaloproteinasas propias de la dentina, las cuales provocan la destrucción de la matriz orgánica del diente <sup>(8)</sup>. La suma de ambos efectos lleva a la cavitación del esmalte, y a la formación de la lesión de caries (FIGURA N° 1) <sup>(1)</sup>.

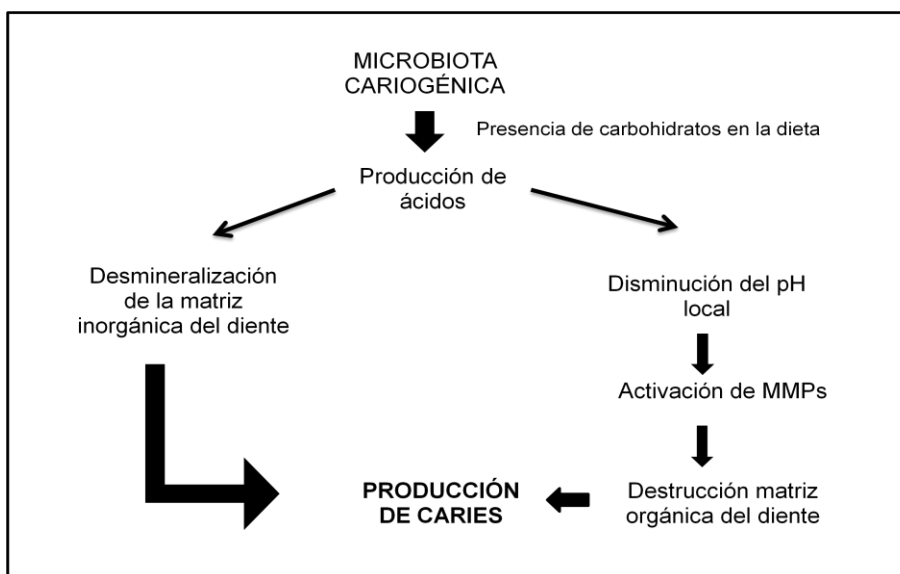


FIGURA N°1: Proceso de producción de caries

Las primeras bacterias adheridas a la placa dental proveen el sustrato para que otros microorganismos también se adhieran a ella <sup>(9)</sup>. A medida que la placa dental va madurando las especies que forman parte de ella cambian, con el paso del tiempo, dependiendo de la presencia o ausencia de oxígeno (potencial redox), nutrientes y productos metabólicos. De esta forma, el daño que la placa dental produzca se relacionará con las bacterias que en ella habiten <sup>(2)</sup>.

La caries dental puede clasificarse, con respecto al sitio de la lesión, en caries de fosas y fisuras, caries de superficies lisas, caries radicular y caries secundaria o recurrente <sup>(1)</sup>.

La posibilidad de detener un proceso carioso, está relacionado con un diagnóstico temprano y el factor de riesgo cariogénico individual que posea cada paciente. Si la enfermedad puede ser detectada antes que se produzca la cavitación, una terapia preventiva puede revertir el proceso y se puede eliminar la necesidad de un tratamiento restaurador, cuyo objetivo principal es restaurar la integridad de la superficie dental. El tipo de lesión primaria justifica el tipo de intervención a realizar <sup>(10)</sup>.

## 1.1 Etiología de la Caries Dental.

La etiología de la caries dental fue propuesta por Miller en 1882, planteando que el factor más importante en el desarrollo de la enfermedad era la capacidad de un gran número de bacterias bucales capaces de producir ácidos a partir de hidratos de carbono de la dieta, hipótesis que sustentó experimentalmente al aislar varios grupos de microorganismos cariogénicos <sup>(11)</sup>.

Keyes en 1960 desarrolló un esquema para explicar el origen de la caries dental, basándose en la interacción simultánea de tres factores principales: un factor “microorganismos”, que en presencia de un factor “sustrato” (dieta) logra afectar al factor “hospedero” (diente), lo que se conoce como tríada de Keyes <sup>(12)</sup>. Posteriormente Newbrun modificó el esquema de Keyes (FIGURA N° 2) y agregó el tiempo, el cual debe ser suficiente para que se desarrolle la enfermedad <sup>(13)</sup>.



**FIGURA N°2:** Diagrama de Keyes modificado, que describe los factores que se interrelacionan en la producción de la caries dental.

En la actualidad, al cambiar el enfoque del tratamiento dental de uno curativo a uno preventivo, se han agregado factores ambientales y socioeconómicos que influenciarían el desarrollo de la caries dental, como la clase social, nivel educacional, edad, actitudes y conocimiento que tenga el hospedero. Este nuevo enfoque puede verse representado en la FIGURA N°3 <sup>(6)</sup>.

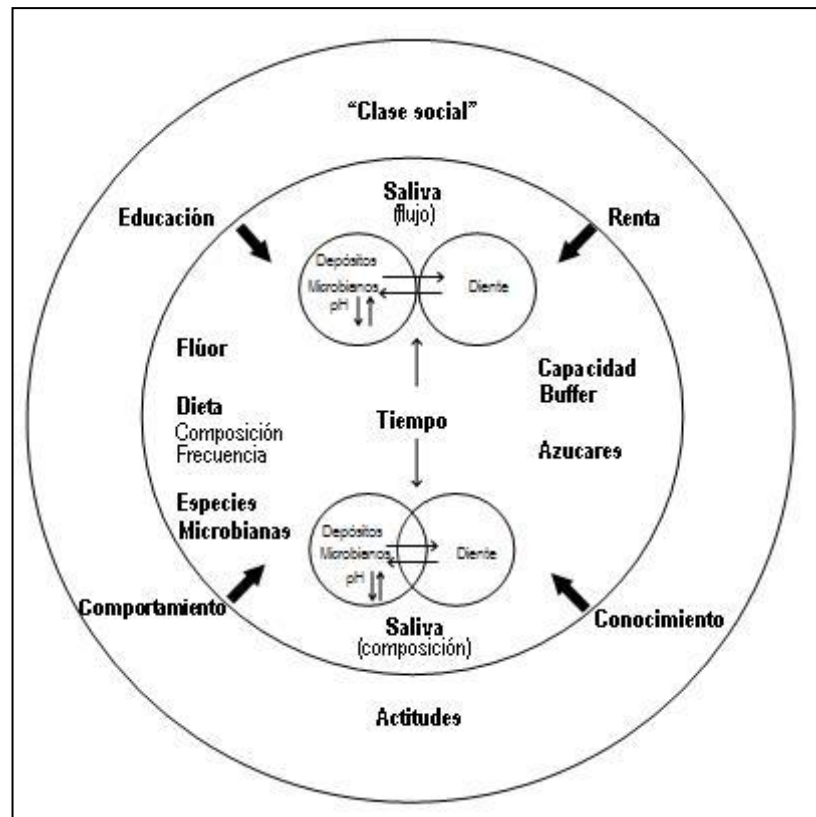


FIGURA N°3: Esquema del concepto actual de caries dental (6).

## 1.2 Microbiología de la Caries Dental.

En el siglo XVI, Antonie Van Leeuwenhoek, sugirió la posibilidad de que hubiera microorganismos involucrados en la producción de caries, debido a que observó bajo el microscopio la placa bacteriana. A partir de esta observación, otros investigadores sugirieron la posible asociación causal entre bacterias y caries <sup>(13)</sup>.

Miller, en siglo XIX, propuso la “Teoría Quimioparasitaria” de la caries dental, según la cual esta enfermedad sería el resultado de la degradación de carbohidratos de la dieta debido a la acción de enzimas bacterianas productoras de ácidos conducentes a la desmineralización del diente <sup>(13)</sup>.

Es así como nace la “Hipótesis de Placa Inespecífica”, la que propone que la caries, como enfermedad, es producto de la interacción de todos los grupos bacterianos que están dentro de la placa dental <sup>(14)</sup>.

Loesche, en 1976, desplazó la “Hipótesis de Placa Inespecífica” y postuló la “Hipótesis de Placa Específica”. Esta teoría plantea que para el desarrollo de caries debían estar presentes en la placa dental bacterias específicas, que producían esta enfermedad, siendo sólo un número limitado de especies <sup>(14)</sup>. Además definió que un biofilm con potencial cariogénico debería estar formado por un predominio de bacterias Gram positivo, acidogénicos y acidúricos.

El primer microorganismo identificado como agente etiológico de la caries fue el *Lactobacillus acidophilus*. Sin embargo, los estudios de la microbiota de la placa bacteriana dental, mostraron que las bacterias de éste género componen un fracción reducida del total de microorganismos presentes en ella, siendo imposible responsabilizarlas por todas las lesiones de caries encontradas. Por otra parte, esta bacteria posee una baja capacidad de adherencia a la película salival <sup>(13)</sup>.

El análisis posterior permitió identificar otras bacterias que se encontraban en la placa bacteriana dental. Una que aparecía con alta frecuencia fue

denominada *S. mutans*, la cual fue responsabilizada como causante de esta enfermedad, dado que cumplía con los postulados de Koch, que se aplicaban para establecer las enfermedades infecciosas, los cuales se resumen a continuación <sup>(15)</sup>:

- a) Los microorganismos deben estar presente en la lesión (éste microorganismo está presente en la lesión de dientes con caries).
- b) Estos deben poder aislarse y obtenerse en forma pura.
- c) Al ser inoculados en forma pura a un animal, debe aparecer enfermedad. (la infección de *S. mutans* en ratas libre de gérmenes produce caries)
- d) Puede ser aislado de lesiones cariosas, y vuelto a desarrollar cultivos.
- e) Los anticuerpos contra este microorganismo están aumentado en pacientes con caries.

A pesar de que *S. mutans* está fuertemente implicado en el desarrollo de la caries, esta asociación no es única. Se puede producir caries incluso en la aparente ausencia de esta especie, así como puede existir *S. mutans* sin evidencia detectable de desmineralización de los dientes <sup>(16)</sup>.

A partir de los argumentos mencionados anteriormente, en 1997, Marsh propone la “Hipótesis Ecológica”, en la cual postula que el balance entre las condiciones que brinda el hospedero con los microorganismos de la cavidad bucal y aquellos que constituyen el biofilm dental condiciona la enfermedad <sup>(17)</sup>. Por lo tanto, considera la regulación de biofilm como un proceso dinámico, donde factores externos pueden producir alteraciones en la expresión de genes requeridos para su formación, otorgando mayor o menor grado de virulencia o patogenicidad (FIGURA N°4) <sup>(11)</sup>.

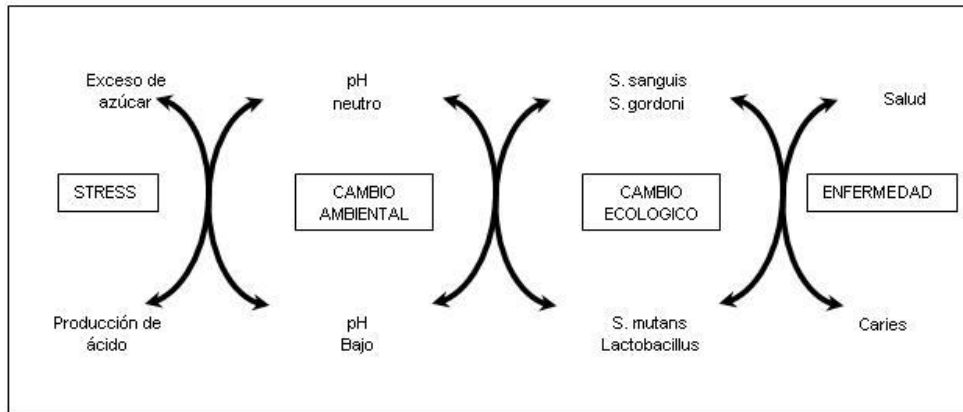


FIGURA N°4: Representación de la "Hipótesis de Placa Ecológica" <sup>(16)</sup>

Las características claves de la "Hipótesis Ecológica" son: **(a)** la selección de bacterias patógenas esta directamente asociada a cambios ambientales; y **(b)** la enfermedad no necesita una etiología específica: cualquier especie con características relevantes puede contribuir al proceso de enfermedad. Sin embargo, *S. mutans* es quizás el organismo mejor adaptado para el ambiente cariogénico, por sus altos niveles de azúcar y bajo pH, y es por tanto, el agente etiológico principal de la caries dental <sup>(15)</sup>. Sin olvidar que especies como, *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacilli spp.* también están involucrados en el desarrollo de esta patología <sup>(18)</sup>.

### 1.2.1 Biofilm.

La placa es una película adherente y predominantemente bacteriana. Se define como: “una comunidad bacteriana inmersa en un medio líquido, caracterizada por bacterias que se encuentran unidas al diente o unas con otras, embebidas en una matriz extracelular producidas por ellas mismas, y muestran un fenotipo alterado en cuanto al grado de multiplicación celular o expresión de sus genes” <sup>(11)</sup>.

La expresión de bacterias en un biofilm es muy importante, dado que en esta condición exponen propiedades que no son expresadas en cultivo planctónicos. Las propiedades de la placa bacteriana no constituyen la suma de expresión de cada microorganismo constituyente, sino más bien, establece una comunidad microbiana organizada que crece sobre cualquier superficie o sustrato orgánico e inorgánico <sup>(19)</sup>.

El desarrollo de biofilm dental puede ocurrir desde supragingival del diente y extenderse hacia la zona subgingival. Siguiendo la formación de la película dental adquirida, ciertos microorganismos se adhieren a ella, proliferan y forman colonias <sup>(2)</sup>. Estos colonizadores primarios son de gran importancia en las etapas siguientes, ya que les proveen el sustrato necesario para que nuevas especies se coagreguen <sup>(9)</sup>.

Una vez que se fijan, los microorganismos pioneros, éstos proliferan y se extienden lateralmente formando una cubierta similar a una alfombra sobre dicha superficie. El crecimiento bacteriano posterior es en volumen, vertical sobre la superficie del diente, hacia el exterior. La cubierta mixta estreptocócica resultante permita que se adhieran otros microorganismos como bacterias fusiformes y espiroquetales, la que sería una etapa más de la formación del biofilm <sup>(2)</sup>.

Entre los 4 y 10 días ya se puede observar una placa bacteriana madura <sup>(20)</sup>.



La composición de la placa bacteriana varía entre las distintas superficies anatómicas del diente, por ejemplo en surcos y fisuras, superficies proximales, superficies libres y el crévice gingival, debido a las propiedades físicas y biológicas que prevalecen en cada sitio, desarrollándose preferentemente en sitios retentivos que ofrecen protección a fuerzas físicas de la boca <sup>(16)</sup>.

Solamente algunas especies bacterianas, por ejemplo el *S. mutans*, son capaces de adherirse a las superficies bucales y dentales. Estas bacterias adherentes disponen de receptores especiales y producen, además una matriz extracelular pegajosa, el dextrán, que les permite cohesionarse fuertemente entre sí <sup>(20)</sup>.

Dentro de las especies identificadas que se relacionan con mayores capacidades de iniciar el proceso de formación de caries destaca las propiedades del grupo *Streptococci mutans* <sup>(21)</sup>.

### 1.2.2 Grupo *Streptococci mutans*.

Especies del grupo *streptococci mutans* se encuentran en la placa bacteriana dental, y se consideran los patógenos más asociados con la formación de caries. Son anaerobios facultativos, capaces de fermentar hidratos de carbono, de cuyo metabolismo deriva la producción de ácidos y la síntesis de polisacáridos extra e intracelulares <sup>(22)</sup>.

Son un grupo de bacterias genéticamente heterogéneo, en el que se reconocen ocho serotipos distintos (a, b, c, d, e, f, g y h) y se han dividido en siete especies distintas; *Streptococcus mutans*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus ferus*, *Streptococcus macacae* y *Streptococcus downei* <sup>(23)</sup>. Estas especies son diferenciables mediante pruebas serológicas y bioquímicas, cuyas características se detallan en la TABLA N°1:

TABLA N°1: Características de los miembros del grupo *streptococci mutans* <sup>(23)</sup>

Especie	Serotipo	Hidrólisis de Arginina	Fermentación		Producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Crecimiento aeróbico	Susceptibilidad a la bacitracina	Hidrólisis de Esculina
			Rafinosa	Melobiosa				
<b><i>S.mutans</i></b>	c,e,f	-	+	+	-	+	-	+
<b><i>S. rattus</i></b>	b	+	+	+	-	+	-	-
<b><i>S. cricetus</i></b>	a	-	+	+	-	-	+	+
<b><i>S.sobrinus</i></b>	d,g	-	-	-	+	+	-	-
<b><i>S.ferus</i></b>	c	-	-	-	-	-	+	+
<b><i>S.macacae</i></b>	c	-	+	-	-	-	+	+
<b><i>S.downei</i></b>	h	-	-	-	-	-	+	-

Dentro de este grupo el *S. mutans* y *S. sobrinus* son los microorganismos más fuertemente asociados a la generación de caries dental <sup>(16)</sup>.

### 1.2.2.1 *Streptococcus mutans*

Fitzgerald y Keyes, en 1960, realizaron una serie de experimentos <sup>(13)</sup> e identificaron a *Streptococcus mutans*, como la especie con mayor poder patogénico para producir caries, en relación a otras especies acidogénicas de la placa supragingival. Después de cincuenta años, esta especie sigue siendo considerada el microorganismo con mayor potencial cariogénico <sup>(24-26)</sup> jugando un rol activo en el desarrollo de lesiones de caries, especialmente en las primeras etapas <sup>(27)</sup>.

*S. mutans* es una especie cocácea, Gram positiva, que se agrupa en cadenas, para crecer y desarrollarse necesita medios enriquecidos, y ambientes de microaerofilia o anaerobiosis, con una tensión de CO<sub>2</sub> al 10% <sup>(28,29)</sup>. Posee los polisacáridos antigénicos definidos para los serotipos c, e y f, siendo la cepa c la mas predominante de la cavidad oral en humanos <sup>(30)</sup>.

Se puede aislar en medios enriquecidos como, agar Mitis Salivarius con bacitracina (MSB) y el agar Trypticase Yeast-extract Cystine Saccharose con bacitracina (TYCSB) <sup>(31)</sup>. Estos medios son selectivos para esta especie por la presencia de sacarosa y bacitracina en concentraciones críticas las cuales son toleradas por *S. mutans*, pero no por el resto de microorganismos orales <sup>(32)</sup>.

A diferencia del resto de los *streptococos* orales, *S. mutans* es capaz de fermentar diversos azúcares, particularmente el manitol y sorbitol. Si la cantidad de hidratos de carbonos disponibles es limitada, los productos de la fermentación son formato, acetato y etanol. En medios ricos en carbohidratos se genera ácido láctico, el que más se ha asociado con el origen de caries. Esta propiedad es conocida como **acidogénia** <sup>(33)</sup>. La velocidad con que *S. mutans* produce ácidos, testeada en rangos de pH entre 7.0 a 5.0, excede a la de los *streptococos* orales en la mayoría de las ocasiones, produciendo cambios en la ecología de la microbiota bucal; estos incluyen el aumento en la proporción de *S. mutans* y de otras bacterias acidógenas y acidúricas. Esta microbiota cariogénica reduce el pH

a niveles bajos, con lo que se aumenta el tiempo de recuperación del pH neutro, luego de la ingestión de carbohidratos, manteniendo los valores de pH en la placa dental bajo 5.4, lo cual favorece la desmineralización del esmalte y la producción de caries <sup>(33)</sup>.

Otra propiedad que posee esta especie, es la de aciduria o tolerancia al ácido, permitiéndole mantener capacidad glicolíticas a niveles de pH donde el crecimiento esta inhibido (bajo pH 4.4). Esto se debe a dos mecanismos: **(a)** la capacidad de mantener su pH intracelular, ya que posee un gran número de moléculas ATPasa, que impulsan los protones hacia el exterior de la célula, los cuales son capaces de penetrar la membrana cuando el medio externo esta acidificado; **(b)** inducción de la reparación del DNA, se ha observado que ocurren varios cambios en proteínas y genes debido a la adaptación al medio ácido como respuesta al shock ácido, para esto el *S. mutans* mediante la ATP sintetasa, modera el pH intracelular, además de expresar chaperones que permiten la reparación de las funciones del DNA <sup>(33)</sup>.

A partir de la fermentación de hidratos de carbono, principalmente de la sacarosa, el *S. mutans*, puede sintetizar **polisacáridos extra celulares** (EPS) como glucanos (dextrán y leván) y fructanos, que promueven la adherencia selectiva y la acumulación de un amplio número de *streptococos* cariogénicos en los dientes, además de aumentar la porosidad y dimensión de la matriz de la placa dental, permitiendo una mayor difusión de sustrato a través de la superficie del esmalte, produciendo descenso de los valores de pH en capas más profundas de la placa, favoreciendo un incremento en el desarrollo de caries <sup>(34,35)</sup>. Estas sustancias se observan como gotitas de un líquido alrededor de una colonia <sup>(20)</sup>. Por otro lado, también sintetiza **polisacáridos intracelulares** (IPS) de reserva que pueden ser degradados por dextranasas, fructanasas, y glucógeno fosforilasas, los cuales utilizan cuando no disponen de alimentos <sup>(6,35)</sup>.

Sus cualidades tan extraordinarias para adherirse a la película adquirida radican en dos mecanismos: **(a) adherencia sacarosa dependiente**, que corresponde a su capacidad de sintetizar polisacáridos extracelulares a partir de

hidratos de carbono de la dieta, los cuales actúan como verdaderos adhesivos extracelulares; **(b) adherencia sacarosa independiente**, la cual consiste en la adhesión de esta especie a componentes salivales de la película adquirida del esmalte <sup>(33)</sup>.

Por lo tanto, *S.mutans* sintetiza su propia sustancia adhesiva que actuará para unir las bacterias entre sí y a la superficie del diente <sup>(20)</sup>.

Las características fisiológicas, que califican a esta especie como el agente principal de la caries dental son <sup>(21)</sup>:

1. Es acidogénico, puede producir ácidos
2. Es acidófilo, se desarrolla en medio ácido
3. Es acidúrico, es capaz de sobrevivir y seguir produciendo ácidos a pH bajo.
4. Utiliza la sacarosa a velocidades más rápidas que cualquier otro microorganismo.
5. Almacena polisacáridos intracelularmente.
6. Sintetiza complejos fructanos y glucanos (polímeros extracelulares), los que le otorgan excelente adhesión a la superficie dentaria.
7. Es capnófilico, viven en un medio con 10% CO<sub>2</sub>.
8. Fermentan lentamente el manitol y el sorbitol.

El *S. mutans* coloniza especialmente las superficies duras del diente (esmalte y cemento), induciendo lesiones cariosas tanto en superficies lisas, fosas y fisuras, como de zonas interproximales y del cemento radicular <sup>(6)</sup>.

### 1.2.2.2 *Streptococcus sobrinus*.

El *Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*) es una especie cocácea, Gram positivo, agrupada en cadena y que crece en ambientes capnófilicos <sup>(28)</sup>. Contiene los polisacáridos definidos con los serotipos d y g <sup>(30)</sup>.

Produce glucanos solubles e insolubles, pero no fructanos y posee dextranasa para hidrolizarlos <sup>(28)</sup>. Sintetiza menos polisacáridos intracelulares que *S. mutans*, por eso toda la glucosa disponible es usada para producir ácidos, siendo más acidúrico que el *S. mutans* <sup>(26)</sup>. Al igual que esta última especie, posee proteínas superficiales fijadoras de glucanos y otras con carácter de adhesinas que median procesos de adhesión y agregación bacteriana <sup>(28)</sup>.

Se ha visto que el *S. sobrinus* produce ácidos a partir de glucosa más rápidos que el *S. mutans*, especialmente en valores de pH más bajos, por lo que una diferencia en el potencial cariogénico entre ambas bacterias es probable, aunque algunos estudios señalan que no existiría diferencias <sup>(26,36)</sup>.

Aunque también coloniza superficies duras, se encuentra en cantidades inferiores a *S. mutans* en localizaciones supragingivales, encontrándose en un 9% en placa dental en comparación al *S. mutans*, el cual se encuentra en un 43% <sup>(30)</sup>. Sin embargo, el *S. sobrinus* puede inducir cualquier tipo de caries en superficies lisas, fosas y fisuras, interproximales y cemento, e intervenir en la progresión de la lesión cariosa <sup>(6)</sup>. Incluso estudios epidemiológicos han mostrado que la prevalencia de *S. sobrinus* se asocia más cercanamente con una alta actividad de caries <sup>(37)</sup>.

### 1.2.3 Grupo *Lactobacilli*

*Lactobacilli* es una especie bacteriana de micromorfología bacilar, Gram positivo, pleomorfo, no esporulado e inmóvil. Su principal característica recae en que puede desarrollarse en medios de cultivos corrientes, a un pH bajo, con lo que quedan aislados del resto de la microbiota que no puede desarrollarse a dicho pH<sup>(20)</sup>.

Se desarrollan en medios sólidos como el agar LBS, agar jugo de Tomate, agar Rogosa, cuya principal característica es la de tener un pH ácido entre 5.1-6.1. En estos dan colonias pequeñas, blanquecinas, redondas, solevantadas y de bordes lisos, se desarrollan en aerobiosis a pesar de ser microaerófilos. En medios de cultivo líquidos, como el caldo jay, enturbia el medio en forma homogénea dando un sedimento ligero<sup>(20)</sup>.

Se clasifica de acuerdo a su capacidad fermentadora de azúcares con producción de ácido láctico en: **(a) cepa homofermentativa**, las cuales son capaces de producir ácido láctico a pH bajo (2-5), además de sintetizar otros productos como ácido butírico, ácido acético y etanol. A este grupo pertenecen *Lactobacillus acidophilus*, *casei*, *lactis*, *helveticus*, *bifidus* y *bulgáricus*. ; **(b) cepa héterofermentativa**, las cuales solo producen ácido láctico a pH altos (6-7) y otros productos tales como ácido butírico, ácido acético, ácido fórmico, etanol y CO<sub>2</sub>. Los representantes de este grupo son *Lactobacillus fermentum* y *casei*.<sup>(20)</sup>

Al igual que el *S. mutans* es acidogénico, acidófilo y acidúrico<sup>(21)</sup>.

Las especies de *Lactobacillus* más asociadas al desarrollo de caries dental son: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus fermentum*.<sup>(38)</sup>

El *Lactobacilli spp.* no es muy hábil colonizador de las superficies del diente. Se encuentra preferentemente colonizando en el dorso de la lengua <sup>(39)</sup>. La cuantificación del número de colonias de esta especie en saliva es un fiel reflejo del consumo de hidratos de carbono por parte del hospedero <sup>(40)</sup>, su presencia está más relacionada con la actividad de caries que como predictor de futuras lesiones <sup>(41)</sup> y generalmente son aislados de lesiones de caries ya establecidas <sup>(42)</sup>.



## 2. Riesgo cariogénico

Riesgo se define como la probabilidad de que un evento en particular ocurra, en un periodo de tiempo determinado <sup>(21)</sup>. En epidemiología, el riesgo se entiende como la expresión de la probabilidad que un desenlace ocurra luego de una exposición a un factor definido <sup>(43)</sup>.

Factor de riesgo se define como un factor medioambiental, conductual o biológico que al estar presente directamente incrementa la probabilidad de que una enfermedad ocurra, y si está ausente o se remueve esta probabilidad disminuye <sup>(44)</sup>.

Tradicionalmente se consideran el recuento de *S. mutans*, el consumo de azúcares y la higiene oral como los principales factores de riesgo de la caries dental <sup>(45)</sup>. Sin embargo, esta enfermedad es un proceso complejo y no se puede esperar que un solo factor de riesgo sea útil como un agudo y seguro predictor de futuras lesiones.

Los factores que inciden en la producción de caries pueden clasificarse en primarios, secundarios y terciarios <sup>(29)</sup>.

Los factores primarios son el hospedero, los microorganismos de la cavidad oral con potencial cariogénico, la dieta consumida y el tiempo en que los tres factores anteriores interactúan <sup>(29)</sup>.

Como factores secundarios puede mencionarse la saliva, la exposición a fluoruros, la higiene oral y la condición sistémica del individuo, entre otros <sup>(6,29)</sup>.

Los factores terciarios se relacionan con la clase social, la educación, ingresos económicos, conocimiento, actitudes y conductas <sup>(29)</sup>.

Es así como los pacientes se clasifican según riesgo de caries, para poder realizar un tratamiento dirigido según la necesidad del paciente.

Diferentes características clínicas y condiciones medioambientales determinan que un paciente sea de alto riesgo como por ejemplo <sup>(6,29)</sup>:

- Presentar lesiones de caries en los últimos doce meses
- Desarrollar caries en caras libres
- Presentar fosas y fisuras profundas
- Inadecuada exposición al flúor
- Mala higiene oral
- Caries de esmalte visibles radiográficamente
- Experiencia pasada de caries radicular
- Frecuente ingesta de sacarosa
- Nivel socioeconómico cultural bajo
- Visitas dentales irregulares
- Alteraciones de la capacidad buffer de la saliva por alteraciones sistémicas o consumo regular de fármacos que produzcan hiposaliva y xerostomía
- Elevado recuento de *S. mutans* y *Lactobacilli spp.* en boca.

Muchos de estos factores pueden ser reconocidos mediante un examen clínico minucioso y una anamnesis exhaustiva. Sin embargo, el recuento de *S. mutans* y *Lactobacilli spp.* es considerado como un factor crítico, ya sea, por su significancia clínica como por su dificultad diagnóstica <sup>(45)</sup>.

## 2.1 Métodos de aislamiento y recuento de *S. mutans*

### 2.1.1 Aislamiento y recuento de *S. mutans* de muestras de saliva

Uno de los métodos más utilizados para el recuento de *S. mutans* es a partir de una muestra de saliva <sup>(46)</sup>, el cual a su vez puede ser un recuento cuantitativo o semicuantitativo <sup>(18)</sup>.

El método cuantitativo consiste en determinar el número de UFC *S. mutans* por mililitro (ml) de saliva. Es importante conocer este valor ya que se ha determinado que una persona con alta proporción de este microorganismo en saliva, es más susceptible de tener caries a corto plazo. Se ha determinado que el número crítico para que esto ocurra es de 3 a 4 x 10<sup>5</sup> UFC por ml de saliva. El procedimiento consiste en obtener y depositar en un tubo estéril muestras de saliva estimulada, ya sea mediante la masticación de un trozo de "Parafilm" o parafina sólida. Luego en el laboratorio de microbiología, se realiza la técnica de dilución de la muestra <sup>(20,21)</sup>. Las diluciones seleccionadas son sembradas en medios de cultivos selectivos para *S. mutans* como Mitis Salivarius con bacitracina (MSB) y el agar Trypticase Yeast-extract Cystine Saccharose con bacitracina (TYCSB) <sup>(31)</sup>. Posteriormente, las placas sembradas se incuban durante 48 hrs en jarra con vela, para lograr un ambiente de microaerofilia. Después de este periodo, se efectúa el recuento de colonias bajo lupa y se aplica el índice de dilución para obtener el número de colonias por ml de saliva <sup>(20)</sup>.

El método semicuantitativo para el recuento de *S. mutans*, es un método menos exacto que el cuantitativo, pero es más barato, fácil y rápido <sup>(21)</sup>. Se realiza pasando una paleta de plástico sobre la superficie de la lengua, un número determinado de veces, para posteriormente sumergir la paleta, en su parte activa, en un tubo con caldo de cultivo que contiene sacarosa y bacitracina. Las bacterias que quedaron en la superficie de la paleta, son las que darán origen a UFC que se van a desarrollar cuando la paleta está sumergida en el caldo. Este examen se basa en las características adherentes del *S. mutans*, lo que permite comparar el número de colonias de la paleta en una tabla de valoración que indica el número

aproximado de colonias obtenidas. La tabla de valoración permite clasificar a los pacientes en cuatro clases, clase 0, 1, 2 y 3, dependiendo de la cantidad UFC encontradas, en donde la clase 0 corresponde a bajo riesgo de caries, clase 1 de bajo a moderado riesgo de caries y las clases 3 y 4, alto riesgo de caries <sup>(20)</sup>.

Actualmente en nuestro país, el método CRT<sup>®</sup> Bacterias (Ivoclar-Vivadent), es el de mayor uso. Se realiza con muestras de saliva estimulada, luego se deposita la saliva no diluida en un recipiente y con una pipeta, se moja completamente la superficie de una lámina que contiene el medio de cultivo, la cual se deposita en otro tubo, al cual se le agrega una pastilla generadora de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se lleva a una incubadora por 48 horas a 37°C. La estimación de la densidad de las colonias crecidas es determinada por comparación con un diagrama suministrado por el fabricante, clasificando al paciente en alto o bajo riesgo de caries. Este método permite cuantificar de la misma forma UFC *L. acidophyllus*, debido a que por el reverso de la lámina se encuentra un medio selectivo para esta especie <sup>(21)</sup>.

Existen otros métodos en el mercado, conocidos como test *chair side*, para el recuento semicuantitativo de *S. mutans* como Dentocult<sup>®</sup> (Orion Diagnostica), Cariescreen<sup>®</sup> (APO Diagnostics) y CariesCheck<sup>®</sup> (Hain DiagnostiKa), los cuales, se realizan en forma muy similar al CRT<sup>®</sup> Bacterias. Éstos poseen la ventaja de que pueden ser realizados en el sillón dental, pero estudios señalan que poseen poca selectividad para identificar microorganismos y son de alto costo, por lo que no son realizados en forma rutinaria por los dentistas <sup>(32,47)</sup>.

El recuento de *S. mutans* en saliva es un método fácil, de bajo costo y que permite clasificar a los pacientes según riesgo cariogénico <sup>(40,47,48)</sup>, pero presenta ciertas limitaciones, ya que estudios señalan que una persona con bajos recuentos en muestras de saliva puede tener altos recuentos de este microorganismo en una pieza dentaria o no poseer ninguno <sup>(45)</sup>. Por lo que se sugiere identificar directamente la colonización de *S. mutans* de piezas dentarias sanas o de restauraciones permitiendo así la mejor evaluación de los riesgos de fracasos de

tratamientos dentales. Además de requerir de largo tiempo de procesamiento y de conocimientos de laboratorio para llevarse en práctica <sup>(46)</sup> y ser un método difícil de realizar en niños y en individuos con desordenes salivales como la xerostomía <sup>(49)</sup>.

### **2.1.2 Aislamiento y recuento de *S. mutans* en muestras de placa bacteriana dental.**

Para monitorear *S. mutans* mediante muestra de placa bacteriana dental el método más utilizado con propósitos de investigación y seguimientos clínicos es el Método de Mondadientes, el cual consiste en recolectar placa bacteriana de piezas dentales o restauraciones utilizando un instrumento de madera afilado llamado “mondadientes”. Las muestras obtenidas son transportadas al laboratorio en un medio de transporte, llamado RTF (reduced transport fluid) <sup>(50)</sup>. Luego se realiza la técnica de diluciones. Las diluciones seleccionadas son sembradas en placas con medios selectivos para este microorganismo, TYCSB y MSB <sup>(31)</sup>. Después de 48 horas de incubación a 37°C en jarra vela con 95% de N<sub>2</sub> y 5%CO<sub>2</sub>. *S. mutans* fueron identificados de acuerdo a su típica morfología colonial, bajo lupa con aumento 10-20x <sup>(51,52)</sup>.

En 1993, Wallman y Krasse proponen un método para monitorear los niveles de *S. mutans* en márgenes de restauraciones, basados en el Método del Mondadientes, con la diferencia que las muestras eran sembradas a lo largo de una tira plástica de un kit comercial llamado Strip mutans<sup>®</sup> (Orion Diagnostica), originalmente descrito por Jensen y Brathall <sup>(53)</sup>. Con la punta del mondadientes, y posterior a la recolección de la placa dental de la restauración, se hace una rayado en la tira plástica, la cual es incubada en un medio líquido similar a MSB. Después de 48 horas las tiras son observadas bajo microscopía y las colonias son identificadas según su morfología. El número de colonias son contadas y los resultados obtenidos son divididos en tres clases: 0-10, 11-100 y más de 100 colonias por muestras <sup>(52)</sup>. La desventaja de este método fue que al comparar los resultados con los obtenidos con el Método de Mondadientes tradicional, se producía una subestimación de colonias y el costo era considerablemente

mayor<sup>(52)</sup>.

Diferentes instrumentos también han sido usados para la recolección de placa dental como sondas dentales, cuchareta de caries, talladores, agujas y seda dental<sup>(54)</sup>, esta última utilizada principalmente para obtener muestras de superficies proximales. Sin embargo, el mondadientes es el más usado mostrando una buena reproductibilidad en diferentes estudios<sup>(55)</sup>.

Es un método simple, económico y viable de realizar en la consulta dental, pero el gran inconveniente es que produce una subestimación del microorganismo en las zonas retentivas, las cuales pueden no ser alcanzadas por el instrumento ya que debido a su forma y tamaño, la placa bacteriana de aquellas zonas no puede ser recolectada<sup>(52,55,56)</sup>. Otra de sus desventajas es la dificultad en la toma de muestra de placa dental pura<sup>(57)</sup> y al igual que el método de saliva requiere de un largo procesamiento en laboratorio y de conocimientos en microbiología para ser realizado.

Hoy en día han aparecido nuevas alternativas más exactas para la toma de muestra de placa bacteriana dental, como la publicada por Coogan<sup>(58)</sup> y colaboradores en el año 2008 basado en impresiones microbiológicas, utilizando como medio de cultivo agar MSB. Este tipo de impresiones se realiza directamente sobre las superficies oclusales de las restauraciones, lo cual podría dar una mayor exactitud del recuento de microorganismos cariogénico, con el beneficio de no ser invasivo para el seguimiento de caries en lesiones que radiográficamente son de difícil diagnóstico y además podría ser usado para monitorear restauraciones y lesiones de caries recurrente<sup>(58)</sup>. El gran inconveniente de esta publicación es que aspectos de la metodología y de los resultados no son explicados con la claridad necesaria para poder reproducirlo en su totalidad.

## 2.2 Métodos para el aislamiento y recuento de *Lactobacilli spp.*

El test de Snyder o Prueba de Susceptibilidad a caries dentaria, se basa en la producción de ácidos en un medio con hidratos de carbonos por parte de microorganismos acidogénicos de la microbiota bucal, principalmente el *Lactobacilli spp.*, produciendo un viraje en el indicador de pH <sup>(11)</sup>. Se utiliza el medio de Snyder, en cual, el indicador es el verde de bromocresol, que en presencia de ácido vira hacia un color amarillo; mientras más rápido sea el viraje, más capacidad acidogénica tiene la microbiota bucal. La muestra usada es saliva estimulada, de la cual y mediante una pipeta, se siembran dos gotas en el medio Snyder previamente fundido y enfriado a 45°C. Posteriormente se incuban en estufa de cultivo a 37°C por 72 horas. Paralelamente se prepara un tubo control con medio de cultivo sin sembrar para comparar color. El test es positivo si el color cambia de modo que el verde ya no es dominante, y el color amarillo es el más predominante. Es negativo cuando no cambia el color o solo se produce una pequeña desviación. Cuando el tubo cambia completamente a color amarillo en las primeras 24 horas, corresponde a un paciente con alta susceptibilidad a caries dentarias. Si es positivo a 48 horas indica una mediana actividad de caries y si vira a las 72 horas indica baja actividad de caries del individuo <sup>(11,20)</sup>.

Existe una gran correlación entre el Test de Snyder y el Recuento de *Lactobacilli spp.*, el cual se realiza obteniendo muestras de saliva estimulada, a las cuales se les aplica la técnica de dilución, hasta obtener una de 1:1000, la que se siembra en placas de Agar LBS o Agar Tomate, se incuban a 37°C en jarra con vela, durante 4 días. Posteriormente, se procede al recuento bajo lupa 10x según las características de morfología colonial propias para esta especie. Si el paciente no posee colonias de *Lactobacilli spp.* se considera inmune la caries, entre 1 a 1.000 indica un ataque de caries negativa a ligera, de 1.000 a 5.000 tiene riesgo de ataque de caries ligera, de 5.000 a 10.000 ataque de caries de ligero a moderado y sobre 50.000 tiene riesgo de ataque de caries acentuado en los próximos seis meses <sup>(20)</sup>.

Dentro de los test *chair side*, que se disponen en el mercado, Dentocult<sup>®</sup> (Orion Diagnostica), Cariescreen<sup>®</sup> (APO Diagnostics) y CariesCheck<sup>®</sup> (Hain Diagnostika) y CRT<sup>®</sup> Bacteria (Ivoclar-Vivadente), poseen su modalidad para el recuento semicuantitativo de *Lactobacilli spp.*, los cuales se realizan de forma similar al recuento de *S. mutans*, modificando solo medio de cultivo, siendo el Agar Rogosa, el más usados en estos kits comercial <sup>(32,47)</sup>.

Es importante recordar que el número de *Lactobacilli spp.* no mide el riesgo cariogénico pero si es un buen indicador de la progresión de las lesiones, cantidad de azúcar ingerida y la cantidad de zonas retentivas de la boca <sup>(21)</sup>.



### **3. Materiales dentales y su relación con microbiología.**

Cuando se ha perdido parte de estructuras dentarias es necesario reconstruirlas. Para ello se han creado una gran variedad de materiales con el fin de restaurar los dientes afectados por caries <sup>(1)</sup>.

Amalgamas, resinas compuestas, vidrios ionómeros son sólo algunos ejemplos de materiales dentales y corresponden a los más usados en la actualidad <sup>(19,24)</sup>.

La interacción biológica entre los materiales de restauración y la microbiota oral es uno de los determinantes en el pronóstico del tratamiento restaurador <sup>(58)</sup>. Las propiedades de la superficie de los materiales de restauración son determinantes en la adhesión bacteriana y en la colonización de las obturaciones <sup>(58)</sup>, ya que la absorción de película salival y la formación del biofilm son influenciadas por características tales como, rugosidad, carga eléctrica y composición química que presentan estas superficies <sup>(24, 60-64)</sup>.

Esto permite asumir que los diferentes materiales de restauración tienen distinta influencia en la adhesión del biofilm de placa bacteriana ya que sus propiedades químicas como físicas son determinantes en la interacción biológica entre la superficie de éste y la bacteria cariogénica que lo colonice <sup>(65)</sup>.

#### **3.1 Amalgama.**

La amalgama dental es un tipo especial de aleación de mercurio, plata, cobre y estaño, puede contener paladio, zinc y otros elementos para mejorar sus características clínicas de manejo <sup>(66)</sup>.

A pesar de la masificación de uso y los avances en la tecnología de las resinas compuestas, la restauración de amalgama, es una opción de tratamiento siempre presente. El relativo bajo costo y el costo beneficio a largo plazo, apoya su uso en la práctica odontológica, principalmente en la restauración del sector

posterior <sup>(67)</sup>.

Dentro de sus ventajas se encuentra ser un material de restauración menos sensible a la técnica y más durable, si comparamos con resinas compuestas. Mediante la corrosión, la amalgama muestra un mecanismo propio para resistir la microfiltración y la invasión bacteriana <sup>(66)</sup>.

Se ha visto que la amalgama acumula menor cantidad de placa bacteriana que las resinas compuestas <sup>(68)</sup> y que las bacterias presentes en ella no se encuentran viables <sup>(60)</sup>, además de poseer menos UFC de *S. mutans* en los márgenes estas restauraciones <sup>(4)</sup>. También se ha asociado una actividad antibacteriana por liberar iones metálicos <sup>(69-71)</sup> como plata, elemento que tiene una actividad antimicrobiana reconocida <sup>(72)</sup>. Hoy, se ha reconocido el poder antibacteriano de otros iones metálicos como el cobre y el zinc, también presentes este material de restauración <sup>(73)</sup>.

### 3.2 Resina Compuesta.

Las resinas compuestas, son por definición un material de restauración formado por cuatro componentes básicos: una *matriz de resina* en base a una partícula monomérica, denominada bis-GMA, un *agente de unión* de las partículas de la matriz conocido como silano, *partículas de relleno inorgánico* que mejoran sus propiedades mecánicas y un *iniciador* que es el responsable de la reacción de polimerización <sup>(74)</sup>.

Su uso, principalmente en el sector posterior, ha aumentado considerablemente en los últimos años debido a la creciente demanda de estética, además de ser un material insoluble, insensible a la deshidratación y con buenas propiedades mecánicas <sup>(66,75)</sup>.

Estudios señalan que las resinas compuestas acumulan más bacterias y placa bacteriana que la superficie del esmalte, "*in vitro*" e "*in vivo*" <sup>(33, 68)</sup>, la superficie cubierta por placa es mayor que en amalgama <sup>(4,68)</sup>, las bacterias

presentes en ella se encuentran vivas <sup>(60)</sup> y no poseen actividad antibacteriana <sup>(60)</sup>. Además se han encontrado específicamente *S. mutans* y *Lactobacilli spp.* en placa obtenida de márgenes de restauraciones de resina compuesta <sup>(4)</sup>.

Se ha indicado que comonómeros liberados de materiales de resina pueden estimular el crecimiento bacteriano y contribuir a la irritación pulpar bajo las obturaciones de resina compuesta, así como también incrementar la formación de placa sobre la superficie o en desajustes marginales, común en este tipo de material por la contracción de polimerización, permitiendo la creación de nichos ecológicos que favorecen la acumulación de microorganismos <sup>(76)</sup>.

#### 4. Caries Secundaria

La caries secundaria o recurrente, es aquella caries que se detecta en los márgenes de una restauración existente <sup>(5, 77,78)</sup>, siendo la razón más frecuente para reemplazar restauraciones <sup>(5, 59, 60, 77-79)</sup>. Se ha estimado, que la remoción y reemplazo de restauraciones por caries secundarias, ocupa mucho más tiempo clínico de odontólogos que el tratamiento de una caries primaria <sup>(80)</sup>. En un estudio de prevalencia se mostró que este tipo de lesiones es más común en adultos que la caries primaria <sup>(81)</sup> y es la responsable de la falla del 50% de amalgamas y 40% de resinas compuestas <sup>(5, 78,82)</sup>.

Histológicamente la lesión de caries secundaria es igual a la caries primaria pero adyacente a una restauración con la diferencia que se distinguen dos sitios específicos, uno denominado “*wall lesion*” o lesión de pared, afectando el esmalte y/o dentina de la cavidad de la restauración y otro conocido como “*outer lesion*” o lesión externa, que involucra esmalte y/o cemento del diente, con una histología similar a la caries primaria <sup>(78,79)</sup>.

Es una entidad clínica de difícil diagnóstico, debido que necesita una cantidad de desmineralización suficientemente avanzada o la formación de una cavidad adyacente a la restauración. Los métodos diagnósticos más usados son la exploración clínica y las radiografías de aleta mordida <sup>(78)</sup>.

En relación a su etiología, no se han encontrado diferencias en la composición de la microbiota bacteriana en muestras de placa bacteriana tomadas desde caries primarias versus la encontrada en caries secundaria <sup>(82)</sup>. Por otro lado, varios estudios han demostrado que es común la infiltración bacteriana después de la inserción de restauraciones <sup>(63)</sup> y que existe un predominio de bacterias aeróbicas facultativas, cocáceas y Gram positivo en espacios entre restauraciones y paredes de cavidad <sup>(79)</sup>, por lo que se sugiere que *S. mutans* es el principal agente etiológico de la caries secundaria <sup>(5,84)</sup>.

Se ha descrito la presencia de bacterias anaeróbicas en la caries

secundarias como *Actinomyces*, *Peptoestreptococcus*, *Fusobacterium* y *Porphyromonas gingivalis*, encontrándose en un porcentaje muchos menor que especies anaeróbicas facultativas <sup>(83)</sup>.

No obstante, la presencia de caries secundaria no solo se relaciona con algún defecto marginal, sino que requiere de la formación de placa con potencial cariogénico <sup>(78)</sup>. De esta manera, la caries secundaria aumenta frente a grandes cantidades de placa sobre los materiales de restauración <sup>(18)</sup>.

Actualmente el concepto de caries secundaria se encuentra en discusión debido a que corresponde a la misma entidad clínica e histológica que la caries primaria, por lo que hoy se sugiere denominarla “caries adyacentes a una restauración” <sup>(19,85)</sup>.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La cantidad de microorganismos en la placa dental, es uno de los factores más importantes en el riesgo de desarrollar caries dental. Si además, agregamos la presencia de restauraciones dentarias es aún más crítico, siendo la caries secundaria la principal causa de fracaso de éstas <sup>(5, 59, 60, 77-79)</sup>.

Se ha identificado a *S. mutans* como la especie bacteriana con mayor poder patogénico para desarrollar caries <sup>(15,16)</sup>, es por esto que identificarlo y cuantificarlo es fundamental para predecir el éxito de los tratamientos restauradores y evitar futuras lesiones.

Uno de los métodos más usado para la cuantificación de *S. mutans* es el recuento en Saliva, el cual tiene la ventaja de ser de fácil aplicación, bajo costo , y ser el único método que permite evaluar riesgo cariogénico general de cada paciente <sup>(40,47,48)</sup>, pero con la desventaja de ser un método incapaz de evaluar susceptibilidad individual de caries para cada pieza dentaria <sup>(46)</sup>, lo cual es un factor importante para la selección del mejor material para rehabilitar dicho diente, prediciendo el éxito del tratamiento y evitando la posibilidad de caries secundarias, como también para efectuar medidas preventivas sobre piezas ya tratadas.

Así surgen otros métodos para medir presencia de *S. mutans* en placa dental, siendo el más utilizado el Método de “Mondadientes o Toothpick”, propuesto por Wallman y Krasse en 1993. Es un método simple, económico y viable de realizar en la consulta dental pero posee la desventaja de producir una subestimación del recuento bacteriano en zonas que no pueden ser alcanzadas por el mondadientes, depende de la forma como el operador realice la toma de muestra sobre la superficie, y requiere conocimiento y tiempo de procesamiento en laboratorio lo cual aleja al clínico de realizar este importante examen complementario.

En base a los antecedentes recién expuestos surge la necesidad de encontrar un método que nos permita establecer la presencia y a su vez cuantificar los niveles de *S. mutans* directamente de piezas sanas y/o restauradas. Además de ser simple, reproducible, que tenga la capacidad de anticipar futuras caries y sea aplicable en cualquier tipo de clínica.

Este trabajo propone un nuevo método para el aislamiento y recuento de UFC de *S. mutans* de muestras obtenidas de placa dental sobre las superficies de piezas dentarias restauradas, el cual se ha denominado Técnica de Cubeta.

La Técnica de Cubeta pretende ser una herramienta de diagnóstico microbiológico que permita la asociación entre el estado de las restauraciones, el grado de colonización bacteriana de éstas y la posibilidad de desarrollar caries secundaria a lo largo del tiempo. Al ser una impresión, permitiría la ubicación topográfica de las especies bacterianas en estudio en las obturaciones, facilitando la aplicación de medidas preventivas ajustadas al riesgo individual de cada pieza dentaria restaurada. Además de ser un método simple y de fácil aplicación clínica.

## **HIPÓTESIS**

La Técnica de Cubeta permite el aislamiento y recuento de UFC de *Streptococcus mutans* a partir de muestras de placa dental de restauraciones de Resina Compuesta y Amalgama, y posee una correlación significativa ( $r \geq 0,65$ ) con el Método del Mondadientes.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la Técnica de Cubeta para el aislamiento y recuento de *Streptococcus mutans* a partir de muestras de placa dental de restauraciones de Resina Compuesta y Amalgama, junto con establecer la correlación que existe entre esta técnica y el Método del Mondadientes.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Obtener muestras de placa dental en restauraciones de Amalgama y Resina Compuesta mediante Técnica de Cubeta y determinar la cantidad de UFC/cm<sup>2</sup> de *S. mutans* de las muestras obtenidas.
2. Obtener muestras de placa dental en restauraciones de Amalgama y Resinas Compuesta mediante Método de Mondadientes y determinar la cantidad de UFC/ml de *S. mutans* de las muestras obtenidas.
3. Obtener muestras de saliva no estimulada y determinar la cantidad de UFC/ml de *S. mutans*.
4. Establecer que correlación existe entre cantidad UFC de *S. mutans* de muestras obtenidas mediante Técnica de Cubeta versus Método de Mondadientes.



5. Establecer que correlación existe entre cantidad UFC de *S. mutans* de muestras obtenidas mediante Técnica de Cubeta versus las obtenidas en muestras de saliva no estimulada
  
6. Comparar el recuento de *S.mutans* entre restauraciones de Amalgama y Resinas Compuesta obtenidos mediante la Técnica de Cubeta y mediante el Método del Mondadientes

## MATERIAL Y MÉTODO

La muestra consistió en 40 pacientes seleccionados en forma aleatoria, que asistieron a la clínica de Operatoria 4to año de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, durante los meses de Octubre a Noviembre de 2010.

Para un tipo de estudio de tipo transversal, el tamaño de la muestra se calculó de la siguiente manera:

- 1) Con un nivel de confianza del 95% ( $\alpha=0,05$  y  $z=1,96$ )
- 2) Con un poder estadístico o riesgo de cometer un error tipo II ( $1-\beta$ ), del 90%, con  $\beta=0,1$ .
- 3) Basándose en una dócima bilateral
- 4) La fórmula del tamaño de muestra para calcular con un determinado valor de coeficiente de correlación de lineal a utilizar fue <sup>(86)</sup>:

$$H_0: r = 0,65$$

$$H_1: r \neq 0,65$$

$$n \geq \left( \frac{Z_{(1-\alpha/2)} + Z_{(1-\beta)}}{\frac{1}{2} \ln \left( \frac{1+r}{1-r} \right)} \right)^2 + 3$$

Se reemplazaron los datos:

$$n \geq \left( \frac{1,96 + 1,645}{\frac{1}{2} \ln \left( \frac{1,65}{0,35} \right)} \right)^2 + 3$$

Se obtuvo:

<b><math>n \geq 25</math></b>
-------------------------------

Se aumentó el tamaño muestral a 40 pacientes con el objetivo de disminuir la probabilidad de encontrar valores extremos, que pudiesen distorsionar los resultados esperados.

Además se confeccionó una lista de todos los pacientes atendidos durante el periodo de tiempo señalado, cuyos datos fueron ingresados a una planilla en Microsoft Office Excel (Versión 2007), el cual mediante su función aleatoria, seleccionó de la lista 40 pacientes más un margen de error del 20%.

#### **Criterios de Inclusión:**

- Pacientes mayores de edad, de ambos sexos, entre 18 a 65 años y que posean piezas dentarias homólogas restauradas con un mismo material.
- Los materiales de restauración que se incluyeron en la muestra son: Amalgamas y Resinas Compuestas
- Restauraciones que cumplan las condiciones Alfa según los Criterios Ryge modificados <sup>(87,88)</sup> (ver anexo 3) evaluadas por un operador calibrado con Índice Kappa de Cohen (0,85).
- Las restauraciones plásticas deben haber sido realizadas en la Clínica de Operatoria 4to año, de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, confeccionadas hasta el año 2008, asegurando una longevidad de 2 años como mínimo.
- Las restauraciones a estudiar fueron caras oclusales de molares, del tipo Clase I, que no excedan más de un tercio de la distancia intercuspídea.

#### **Criterios de Exclusión:**

- Restauraciones que se clasifiquen como Bravo o Charlie según los Criterios Ryge modificados <sup>(87,88)</sup> (ver anexo 3).
- Pacientes que consuman fármacos que probadamente produzcan alteraciones en el flujo salival, como antidepresivos, narcóticos, diuréticos, antihistamínicos, antihipertensivos, antieméticos y diuréticos <sup>(21)</sup>.
- Pacientes bajo tratamiento con colutorios y/o geles de clorhexidina u otro antiséptico bucal (cuyo compuesto activo sea cloruro de cetilpiridino, triclosán,

hexetidina, xilitol y sales de zinc como cloruro de zinc, citrato de zinc y sulfato de zinc) y/o pastas dentales con concentraciones de flúor mayor o igual a 2500 ppm de ión flúor durante los últimos tres meses.

- Pacientes bajo terapia antibiótica en los últimos tres meses.
- Pacientes en tratamiento de fármacos inmunosupresores (corticoides)
- Pacientes clasificados según la American Society of Anesthesiologic como ASA III, los cuales son pacientes con enfermedad sistémica grave, pero no incapacitante, como por ejemplo cardiopatía severa, diabetes mellitus no compensada acompañada de alteraciones orgánicas vasculares sistémicas, insuficiencia respiratoria de moderada a severa , angor pectoris, infarto agudo al miocardio antiguo, etc.
- Pacientes portadores de aparatos protésicos removibles o fijos.
- Pacientes portadores de aparatos ortodóncicos fijos o removibles, planos de relajación o de cualquier artefacto acrílico.
- Pacientes que consuman goma de mascar cuatro o más días a la semana <sup>(89)</sup>.
- Pacientes con dificultades motrices que les impida realizar su propia higiene dental.

## **Procedimiento**

El procedimiento fue realizado por dos operadores. Un Operador N°1 que selecciona a los pacientes, enseña la técnica de higiene y toma las muestras, y Operador N°2 que realiza procesamiento microbiológico.

### **1) Selección de Pacientes**

Se seleccionaron pacientes de la clínica de Operatoria Dental de 4ª años, de ambos sexos, de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, que cumplan con los criterios definidos.

Fueron incluidos aquellos pacientes que posean un mismo tipo de restauración oclusal en molares homólogos en la misma arcada.

A los pacientes seleccionados se les realizó un examen bucal después de las 11 AM, para dar tiempo a la reorganización del biofilm después del cepillado matutino, en la clínica de Operatoria, y además se les enseñó una técnica de cepillado común para todos. Esta técnica se reevaluó la semana siguiente previo a la toma de muestra.

La técnica enseñada fue la técnica de Bass modificada, la cual es considerada la más efectiva <sup>(90)</sup> y consiste en situar el cepillo con una inclinación de 45° y realizar movimientos vibratorios anteroposteriores, pero sin desplazar el cepillo de su punto de apoyo. Los movimientos son muy cortos para que las cerdas se flexionen sobre sus propios ejes y las puntas no se desplacen de los puntos de apoyo <sup>(90)</sup>.

Tanto la selección de las restauraciones como la enseñanza de la técnica de higiene fue realizado por el Operador N°1, previamente calibrado bajo los criterios Ryge y con un mínimo obtenido de 0.85 de Cohen's Kappa.

## **2) Proceso de Consentimiento Informado**

A cada paciente seleccionado, una semana antes de la toma de muestra, se le hizo lectura del Consentimiento Informado (ver anexo 2), en cual se explicó el propósito del estudio, el procedimiento a realizar, duración del mismo, los riesgos y beneficios de participar en el proyecto, dejando en claro que su participación es voluntaria, que puede rehusar o retirarse en cualquier momento sin perjuicio alguno.

### *Pasos en la toma de Consentimiento Informado*

- I. Se invitó a los pacientes seleccionados a ser parte de la investigación clínica.
- II. Se les explicó lo que involucra la investigación.
- III. Se leyó y explicó en forma detallada el formulario de Consentimiento Informado
- IV. Se entregó una copia en forma escrita para que el paciente pueda revisarla y pensar en su decisión.
- V. En caso de aceptar se firmó el documento por todas las partes involucradas.

### 3) Toma de muestras

En un molar restaurado con Resina Compuesta o Amalgama se tomó muestras de placa dental utilizando la Técnica de Cubeta y en su homólogo restaurado con el mismo material, se tomó muestras de placa dental con el Método de Mondadientes. Todo esto en una misma sesión.

#### *Técnica de Cubeta*

La placa dental depositada sobre la superficie de las restauraciones seleccionadas fue recogida mediante cubetas usadas para la aplicación de flúor gel, las cuales se esterilizaron en campana de Bioseguridad tipo II con luz UV por 20 minutos, y se llenaron con agar TYCSB (L-cistina 0,2 g/L, Bacto-Casitona 15 g/L, Extracto de levadura 5 g/L, Sulfito de sodio 0,1 g/L, Cloruro de sodio 1g/L, Fosfato disódico 2 g/L, Acetato de sodio 20 g/L, Sacarosa 50g/L, agar 15 g/L y bacitracina 200 U/L) medio de cultivo para *S.mutans* que ha sido descrito como el medio más sensible y selectivo para cultivar esta especie bacteriana <sup>(31)</sup> (FOTOGRAFÍA N°1).



**FOTOGRAFÍA N°1:** Imagen de cubeta de flúor cargada con medio de cultivo TYCSB en placas de petri estériles.

Posteriormente se recortaron de manera de individualizarlas para no más de cuatro piezas dentarias, inmediatamente después, las cubetas fueron colocadas en placas de Petri estériles y guardadas en bolsas plásticas selladas en el refrigerador hasta su utilización.

Previo a la utilización de las cubetas cargadas con medio TYCSB, éstas se llevaron a estufa de incubación por 24 horas a 37°C para un control de calidad.

La toma de muestra se realizó presionando suavemente la cubeta por un minuto sobre la superficie oclusal de la restauración en estudio (FOTOGRAFÍA N° 2). Luego las cubetas fueron depositadas en placas de Petri estériles y llevadas a estufa de incubación a 37°C en jarra con vela para lograr condiciones de microaerofilia (5% CO<sub>2</sub>) durante 48 hrs, en laboratorio de Microbiología Bucal del Departamento de Patología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.



**FOTOGRAFÍA N°2:** Se observa toma de muestra de placa bacteriana dental mediante la Técnica de Cubeta.

### *Muestras de saliva*

Con la finalidad de comprobar la presencia de *S.mutans* en la cavidad oral de cada paciente, se tomó una muestra de saliva no estimulada. Para ello se pidió al paciente que deposite 1 ml de saliva en tubos eppendorf estériles, los cuales fueron transportados a 4°C al laboratorio de Microbiología Bucal del Departamento de Patología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, en un plazo no mayor a 3 horas.

### *Técnica de Mondadientes.*

Se recolectó placa bacteriana desde la superficie de restauraciones seleccionadas mediante un mondadientes de madera afilado estéril como se representa en la FOTOGRAFÍA N° 3:



**FOTOGRAFÍA N°3:** Se observa toma de muestra de placa bacteriana dental mediante el Método del Mondadientes.

Previa a la obtención de la muestra la pieza dentaria debe ser fue aislada con tómulas de algodón, limpiada con agua en spray y secada con aire, con el objeto de no contaminar las muestras con saliva.



Las muestras fueron depositadas en 500 µl de RTF (reduced transport fluid) y transportadas en frío a 4°C al laboratorio de Microbiología Bucal del Departamento de Patología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, en un plazo no mayor a 3 horas para su posterior procesamiento.

#### **4) Procesamiento Microbiológico**

Las muestras obtenidas de placa bacteriana mediante la Técnica de Mondadientes fueron homogeneizadas en un vórtex (Maxi Mix II Type 37600 Mixer®) por 45 segundos. Luego se tomó 100 µl del homogeneizado de muestras de placa y se agregó a un primer tubo con 900 µl de buffer fosfato pH 7,2 0,1M. Después de agitar por 15 segundos en vórtex se volvió a tomar 100µl, ahora de la primera dilución y se agregó a un segundo tubo con 900 µl de buffer fosfato. Así se obtuvo una dilución de placa bacteriana dental de 1:10 y 1:100.

El mismo procedimiento fue realizado con muestras de saliva hasta obtener diluciones de 1:1000 y 1:10000.

Se sembraron 100 µl de cada una de las diluciones realizadas a la muestras de placa y saliva, utilizando una micropipeta, en placas con agar TYCSB.

Todo el proceso de siembra se realizó en condiciones de esterilidad bajo campana o gabinete de Bioseguridad tipo II.

Luego todas las placas fueron colocadas en una jarra con vela para crear un ambiente rico en CO<sub>2</sub> y llevadas a estufa a 37°C por 48 horas.

### 5) Aislamiento e identificación de *S. mutans*.

A partir de las diferentes muestras obtenidas (Técnica de Cubeta, Método de Mondadientes y saliva) se identificaron colonias de *S. mutans* en base a la morfología colonial (macroscópica) y adherencia de las colonias al agar, observadas bajo lupa estereoscópica (Stemi 2000-C, Zeiss) y fuente luminosa (Schott KL1500, Zeiss).

El recuento de *S. mutans*, expresado en UFC se obtuvo a partir de las placas de TYCSB y de las cubetillas con el mismo medio.

Luego del recuento, las colonias seleccionadas por adherencia y morfología compatible con la descrita para *S. mutans* fueron sembradas en caldo Todd-Hetwitt (Difco) e incubadas a 37°C por 48 horas para someterlas a pruebas bioquímicas que permitieron identificar especies del grupo *Streptococci mutans*, principalmente dirigidas a diferenciar *S. mutans* de *S. sobrinus*.

Las pruebas bioquímicas realizadas fueron la fermentación de la Rafinosa y Melobiosa y la hidrólisis de la Esculina, las tres positivas sólo para *S. mutans*<sup>(23)</sup>.

Posterior a las 48 horas, cada caldo incubado fue centrifugado (Serofuge-centrifuge, ClayAdams) por cinco minutos a 1500 rpm aproximadamente, con el propósito de obtener un pellet. Éste se resuspendió en 450 µl de buffer fosfato pH 7.2 hasta obtener un Mackfarland cercano a cinco, luego de esta suspensión se sembraron 100 µl, en Esculina (Brain Heart Infusion, Difco; 1% de Esculina), en Rafinosa (Tioglicolato sin dextrosa y sin indicador, Difco; 1% de Rafinosa) y en Melobiosa (Tioglicolato sin dextrosa y sin indicador, Difco; 1% de Melobiosa).

Los tubos así sembrados fueron llevados a estufa de incubación por 24 horas a 37°C.

Después de este tiempo, se agregó dos a tres gotitas de citrato férrico amoniacal al caldo con Esculina y se adicionó dos a tres gotitas de rojo fenol a los caldos con Melobiosa y con Rafinosa respectivamente.

En el caso de la hidrólisis de la Esculina, es positiva si rápidamente el caldo obtiene una coloración negra y para la fermentación de Rafinosa y Melobiosa la aparición de un amarillo intenso indican la positividad de la prueba. Ambas situaciones confirman el diagnóstico de *S. mutans*.

## **6) Análisis de los resultados**

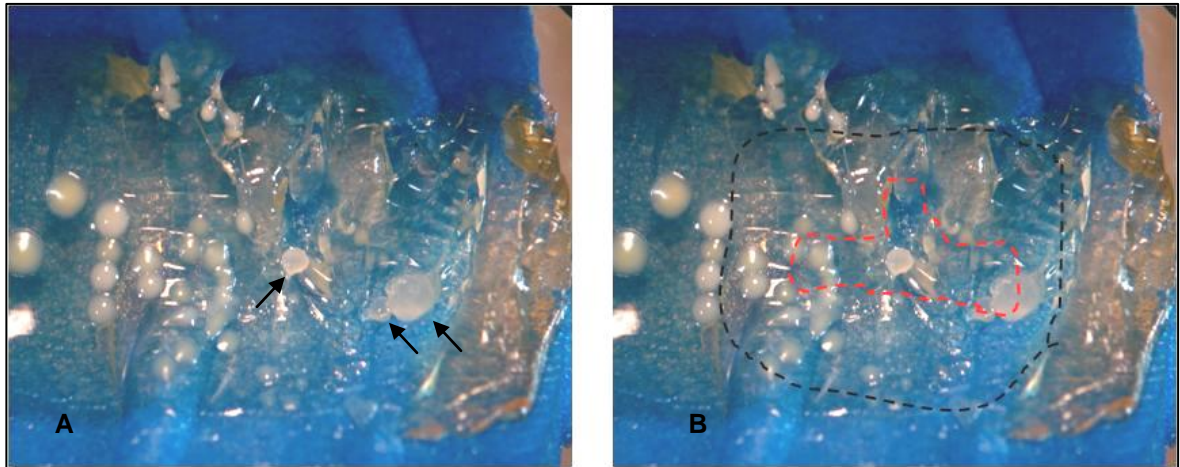
Para el análisis estadístico se utilizó el programa computacional Stata I/C® versión 11.0. La forma en que se distribuyen los datos se obtuvo a través del test Shapiro Wilk. Para correlacionar dos variables numéricas X e Y se estableció una regresión lineal simple.

Para comparar dos variables cuya distribución sea normal se utilizó el test *t student* y para variables que no posean distribución normal se utilizó el test de Wilcoxon.

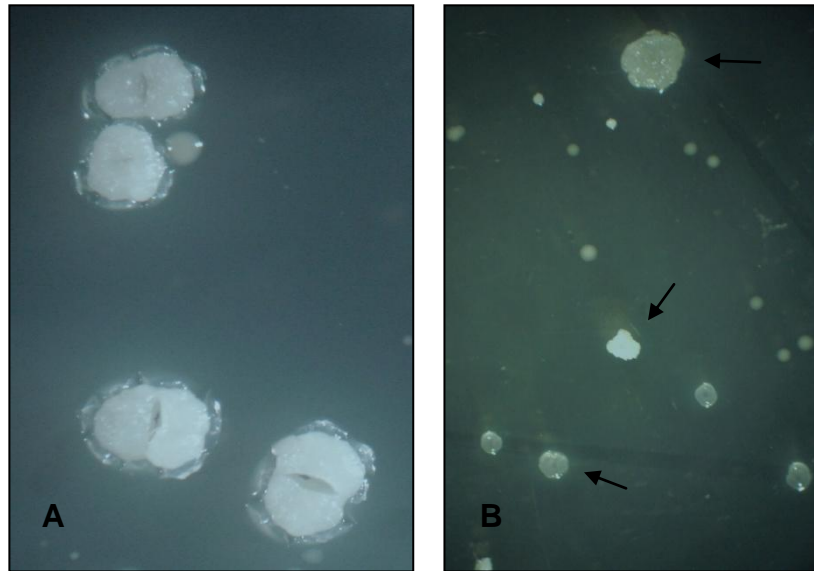
## RESULTADOS

### 1. Identificación y aislamiento de *Streptococcus mutans*.

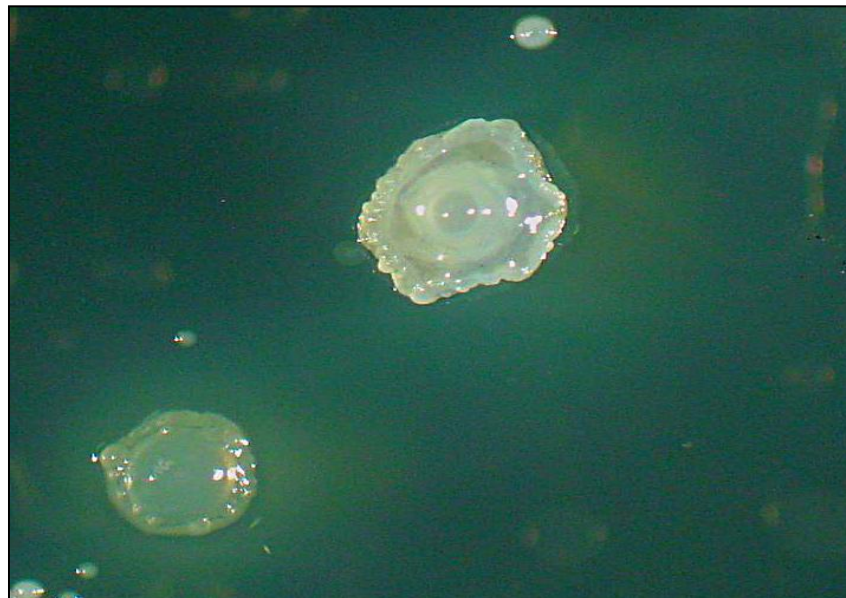
A partir del cultivo y aislamiento bacteriano, de muestras de placa bacteriana dental mediante la Técnica de Cubeta y el Método de Mondadientes, y de muestras de saliva no estimulada en agar TYCSB, se obtuvieron colonias aisladas con características macroscópicas y de adherencia correspondientes a *Streptococcus mutans*. En ciertos pacientes se observó la aparición de un único tipo colonial de esta especie bacteriana, mientras en otros se pudo observar mayor diversidad, ya que por lo menos 3 tipos coloniales diferentes fueron detectados.



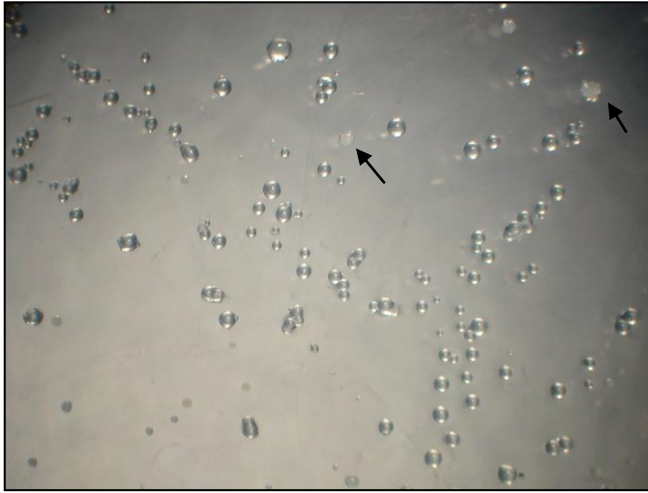
**FOTOGRAFÍA N°4:** Aislamiento bacteriano de muestras de placa dental mediante Técnica de Cubeta. **(A)** Las flechas indican colonias de *Streptococcus mutans* redondas, lisas, cristalina y adherentes sobre la impronta de la cara oclusal de un diente 3.6 restaurado con Amalgama. **(B)** Esquema demostrativo, donde las líneas punteadas semejan el contorno de la cara oclusal del diente 3.6 y su restauración de Amalgama, nótese que colonias de *Streptococcus mutans* se encuentran ubicadas en la obturación.



**FOTOGRAFÍA N°5:** Colonias de *Streptococcus mutans* en agar TYCSB. **(A)** Colonias blanquecinas y de superficie rugosa, nótese como rompen el agar al que se adhiere. **(B)** Obsérvese el polimorfismo colonial. Las flechas apuntan a tres colonias de diferente morfología, todas adherentes.



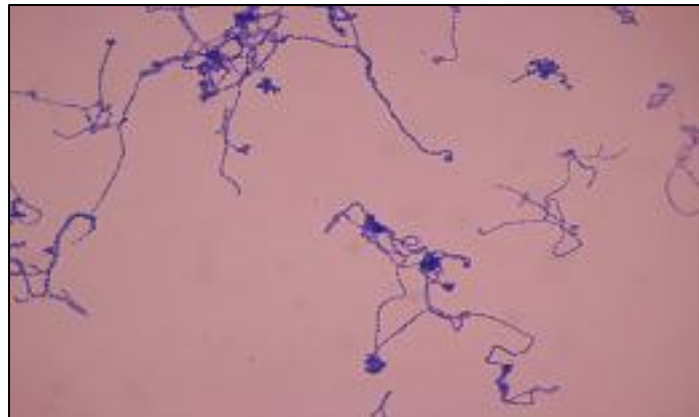
**FOTOGRAFÍA N°6:** Colonias de *Streptococcus mutans* cubiertas por dextrán de dos semanas de cultivo.



**FOTOGRAFÍA N°7:** Pequeñas colonias de *Streptococcus mutans* lisas, cristalinas y adherentes. Las flechas indican otro tipo de morfología blanquecina y adherente.

El frotis de las colonias seleccionadas teñido con Gram mostró formas cocáceas, Gram positivo y dispuestas en cadenas, típico de bacterias del grupo *mutans streptococci*. (FOTOGRAFÍA N°8)

**FOTOGRAFÍA N°8:** Frotis de colonia seleccionada por su morfología colonial macroscópica como *Streptococcus mutans* teñido con tinción Gram.



## 2. Cuantificación de *Streptococcus mutans*.

La TABLA N° 2 presenta los porcentaje de pacientes examinados con presencia de *Streptococcus mutans* en muestras de saliva y en placa bacteriana de restauraciones clase I de Amalgama o Resina Compuesta obtenidas mediante la Técnica de Cubeta y el Método de Mondadientes.

Forma obtención muestra.	Pacientes con presencia de S.mutans		Pacientes sin presencia de S.mutans	
	Cantidad	Porcentaje	Cantidad	Porcentaje
Técnica de Cubeta	35	87,50%	5	12,50%
Método de Mondadientes	35	87,50%	5	12,50%
Saliva	35	87,50%	5	12,50%

**TABLA N°2:** Porcentaje de pacientes con presencia de *Streptococcus mutans* en muestras de placa bacteriana obtenida mediante Técnica de Cubeta y el Método de Mondadientes, y en muestras de saliva

En la TABLA N°3 se describen la cantidad de UFC de *Streptococcus mutans* a partir de muestras placa bacteriana de restauraciones clase I de Amalgama obtenidas mediante la Técnica de Cubeta y el Método del Mondadientes. Se asignaron números correlativos de 1 al 20 a los pacientes con restauraciones clase I de Amalgama.

N°	Técnica de Cubeta (UFC/cm <sup>2</sup> )	Método Mondadientes (UFC/ml)
1	4	0,7 * 10 <sup>3</sup>
2	1	0,05 * 10 <sup>3</sup>
3	8	2,61 * 10 <sup>3</sup>
4	0	0
5	16	8,8 * 10 <sup>3</sup>
6	7	2,1 * 10 <sup>3</sup>
7	5	1,2 * 10 <sup>3</sup>
8	N.D	N.D
9	3	0,7 * 10 <sup>3</sup>
10	2	0,4 * 10 <sup>3</sup>
11	3	0,8 * 10 <sup>3</sup>
12	6	1,33 * 10 <sup>3</sup>
13	4	0,11 * 10 <sup>3</sup>
14	8	1,14 * 10 <sup>3</sup>
15	3	0,81 * 10 <sup>3</sup>
16	3	0,29 * 10 <sup>3</sup>
17	15	7,64 * 10 <sup>3</sup>
18	2	0,425 * 10 <sup>3</sup>
19	N.D	N.D
20	5	0,91 * 10 <sup>3</sup>
	<b>X = 4,75</b>	<b>X = 1,5 * 10<sup>3</sup></b>
	<b>D.S = 4,41</b>	<b>D.S = 2,4 * 10<sup>3</sup></b>

**TABLA N°3:** UFC de *S.mutans* en muestras de placa bacteriana en restauraciones clase I de Amalgama mediante la Técnica de Cubeta y el Método de Mondadientes, donde **N.D** corresponde a especie bacteriana no detectada, **X** es el promedio y **D.S** la desviación estándar.

En la TABLA N°4 se exponen la cantidad de UFC de *Streptococcus mutans* a partir de muestras de placa bacteriana de restauraciones clase I de Resina Compuesta obtenidas mediante la Técnica de Cubeta y el Método del Mondadientes. Se asignaron números correlativos de 21 al 40 a los pacientes con restauraciones clase I de Resina Compuestas.

N°	Técnica de Cubeta (UFC/cm <sup>2</sup> )	Método Mondadientes (UFC/ml)
21	10	3,53 * 10 <sup>3</sup>
22	13	4,23 * 10 <sup>3</sup>
23	2	0,08 * 10 <sup>3</sup>
24	N.D	N.D
25	6	1,06 * 10 <sup>3</sup>
26	4	1 * 10 <sup>3</sup>
27	27	8,2 * 10 <sup>3</sup>
28	3	1 * 10 <sup>3</sup>
29	N.D	N.D
30	18	10,4 * 10 <sup>3</sup>
31	7	1,51 * 10 <sup>3</sup>
32	3	0,64 * 10 <sup>3</sup>
33	8	1,06 * 10 <sup>3</sup>
34	5	1,06 * 10 <sup>3</sup>
35	9	2,09 * 10 <sup>3</sup>
36	18	10,95 * 10 <sup>3</sup>
37	22	13,44 * 10 <sup>3</sup>
38	32	15,2 * 10 <sup>3</sup>
39	35	19,41 * 10 <sup>3</sup>
40	2	0,5 * 10 <sup>3</sup>
	<b>X = 11,2</b>	<b>X = 4,77 * 10<sup>3</sup></b>
	<b>D.S = 10,68</b>	<b>D.S = 5,94 * 10<sup>3</sup></b>

**TABLA N°4:** UFC de *S.mutans* en muestras de placa bacteriana en restauraciones clase I de Resina Compuesta mediante la Técnica de Cubeta y el Método de Mondadientes, donde **N.D** corresponde a especie bacteriana no detectada, **X** es el promedio y **D.S** la desviación estándar.



Con el fin de tener un control de crecimiento de *Streptococcus mutans*, en caso de no recuperar colonias a partir de las muestras, se sembró saliva no estimulada de los pacientes estudiados. Los resultados obtenidos se presentan en la TABLA N°5 (pacientes con restauraciones clase I de Amalgama) y en la TABLA N°6 (pacientes con restauraciones clase I de Resina Compuesta)

N°	Saliva (UFC/ml)
1	$2 * 10^5$
2	$0,5 * 10^5$
3	$23,5 * 10^5$
4	N.D
5	$1,7 * 10^5$
6	$2,75 * 10^5$
7	$0,3 * 10^5$
8	N.D
9	$5,05 * 10^5$
10	$3,95 * 10^5$
11	$3 * 10^5$
12	$1,5 * 10^5$
13	$1,95 * 10^5$
14	$5,1 * 10^5$
15	$20,35 * 10^5$
16	$0,8 * 10^5$
17	$12,5 * 10^5$
18	$0,4 * 10^5$
19	N.D
20	$0,3 * 10^5$
	<b>X = <math>4,28 * 10^5</math></b>
	<b>D.S = <math>6,7 * 10^5</math></b>

**TABLA N°5:** UFC de *Streptococcus mutans* en muestras de saliva de pacientes con restauraciones de Amalgama. Donde **N.D** corresponde a especie bacteriana no detectada, **X** es el promedio y **D.S** la desviación estándar.

N°	Saliva (UFC/ml)
21	$14 * 10^5$
22	$8,5 * 10^5$
23	$4 * 10^5$
24	N.D
25	$2,5 * 10^5$
26	$6,05 * 10^5$
27	$8,75 * 10^5$
28	$0,8 * 10^5$
29	N.D
30	$3,15 * 10^5$
31	$9,9 * 10^5$
32	$0,15 * 10^5$
33	$12,1 * 10^5$
34	$6 * 10^5$
35	$2,75 * 10^5$
36	$1,85 * 10^5$
37	$2,45 * 10^5$
38	$23,8 * 10^5$
39	$11,3 * 10^5$
40	$0,15 * 10^5$
	<b>X = <math>5,91 * 10^5</math></b>
	<b>D.S = <math>6,1 * 10^5</math></b>

**TABLA N°6** UFC de *Streptococcus mutans* en muestras de saliva de pacientes con restauraciones de Resina Compuesta. Donde **N.D** corresponde a especie bacteriana no detectada, **X** es el promedio y **D.S** la desviación estándar.

Del total de pacientes examinados, veintiséis presentaba valores superiores a  $1 \times 10^5$  UFC/ml de *Streptococcus mutans* en saliva, siendo el 65% pacientes de alto riesgo cariogénico, de los cuales cinco pacientes fueron considerados de muy alto riesgo cariogénico por presentar valores sobre  $1 \times 10^6$  UFC/ml en saliva.

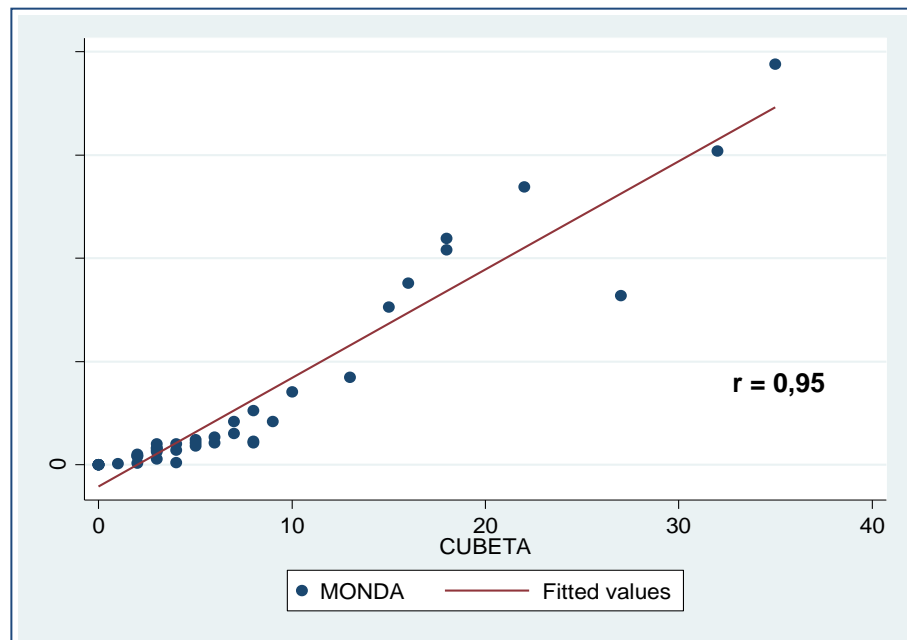
Las pruebas de hidrólisis de Esculina y fermentación de Rafinosa y Melobiosa, fueron positivas para todos los aislados, por lo tanto no se detectó presencia de *Streptococcus sobrinus*.



**FOTOGRAFÍA N°9:** (E) Tubo de ensayo con medio de cultivo BHI luego de la adición de citrato férrico amoniacal. (R) Tubo de ensayo con medio de cultivo Tioglicolato con 1% de Rafinosa luego de la adición de rojo fenol. (M) Tubo de ensayo con medio de cultivo Tioglicolato con 1% de Melobiosa luego de la adición de rojo fenol. La aparición rápida de coloración negra y amarillo intenso indicó positividad de la prueba y confirmó diagnóstico de *Streptococcus mutans*.

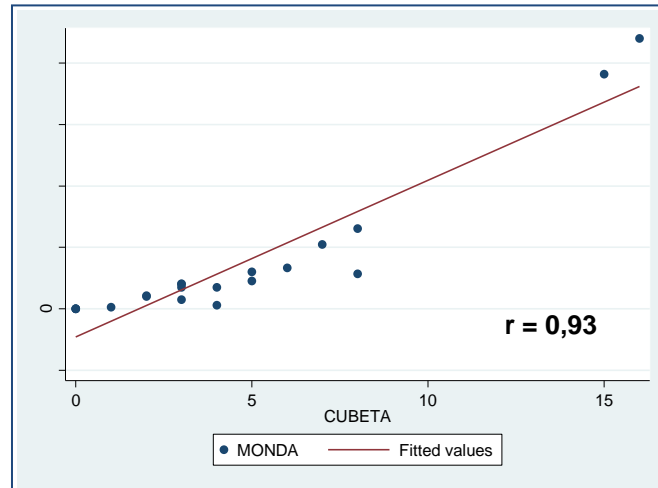
### 3. Correlación entre Técnica de Cubeta y Método de Mondadientes.

Se calculó Regresión Lineal Simple para observar la correlación existente entre el recuento de *Streptococcus mutans* obtenidos mediante la Técnica de Cubeta y el Método del Mondadientes, estableciendo un valor para el coeficiente de correlación ( $r$ ) mayor o igual a 0,65, para que la correlación sea significativa y positiva. Los resultados obtenidos se muestran el GRÁFICO N°1:



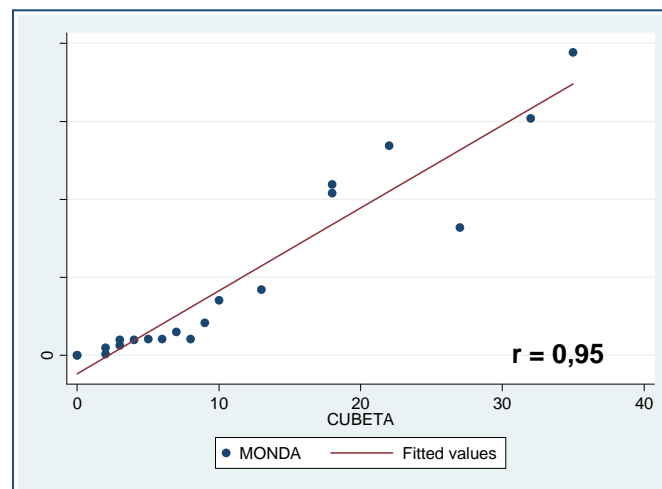
**GRÁFICO N° 1:** Correlación entre el recuento de *Streptococcus mutans* mediante la Técnica de Cubeta y el Método del Mondadientes, a partir de muestras de placa bacteriana dental obtenidas en restauraciones de Amalgamas y Resinas compuestas donde  $r$  corresponde a el coeficiente de correlación y MONDA a los valores obtenidos por el Método del Mondadientes.

En el GRÁFICO N° 2 se observa una correlación significativa y positiva ( $r = 0,93$ ) en el recuento de *Streptococcus mutans* entre la Técnica de Cubeta y el Método del Mondadientes, a partir de muestras de placa bacteriana dental en restauraciones de Amalgamas.



**GRÁFICO N° 2:** Correlación entre el recuento de *Streptococcus mutans* mediante la Técnica de Cubeta y el Método del Mondadientes, a partir de muestras de placa bacteriana obtenidas en restauraciones de Amalgamas, donde  $r$  corresponde a el coeficiente de correlación, y MONDA a los valores de UFC obtenidos por el método del Mondadientes.

La correlación fue significativa y positiva ( $r = 0,95$ ) en el recuento de *Streptococcus mutans* mediante la Técnica de Cubeta y el Método del Mondadientes, a partir de muestras de placa bacteriana dental en restauraciones de Resinas Compuestas, lo cual se observa en el GRÁFICO N°3.



**GRÁFICO N° 3:** Correlación entre el recuento de *Streptococcus mutans* mediante la Técnica de Cubeta y el Método del Mondadientes, a partir de muestras de placa bacteriana obtenidas en restauraciones de Resinas Compuestas, donde  $r$  corresponde a el coeficiente de correlación y MONDA a los valores de UFC obtenidos por el Método del Mondadientes.

La correlación entre el recuento de *Streptococcus mutans* a partir de muestras de placa bacteriana en restauraciones de Amalgama y Resina Compuestas obtenida mediante la Técnica de Cubeta y recuento de *Streptococcus mutans* en saliva fue positiva pero no significativa con un  $r = 0,47$ .

#### 4. Diferencias en el recuento de *Streptococcus mutans* en restauraciones de Amalgama y Resina Compuestas.

Se aplicó el Test Shapiro-Wilk para determinar la forma en que se distribuyen los datos de la muestra. Para una muestra de  $n = 40$  el valor de  $w$  debe ser mayor o igual a 0,94 para que los datos presenten una distribución normal <sup>(91)</sup>. Los valores de  $w$  para los datos estudiados se presentan en la TABLA N°7, en donde se observa que los datos obtenidos no se distribuyen en forma normal.

Forma obtención muestra	$W$
Técnica de Cubeta	<b>0,79</b>
Método Mondadientes	<b>0,66</b>
Saliva	<b>0,75</b>

**TABLA N°7:** Valores de prueba Shapiro-Wilk ( $w$ ) para recuento de *Streptococcus mutans* mediante la Técnica de Cubeta, Método del Mondadientes y en Saliva.

Se aplicó el Test de Wilcoxon, un test no paramétrico, para establecer las diferencias entre dos muestras independientes, debido a que la variable que se compara no se distribuye en forma normal.

El promedio de recuento de *Streptococcus mutans* (UFC/cm<sup>2</sup>) a partir de muestras de placa bacteriana en restauraciones de Resina Compuesta mediante la Técnica de Cubeta fue mayor que en restauraciones de Amalgama. La diferencia fue estadísticamente significativa con  $p = 0,04$ .

La diferencia en el recuento de *Streptococcus mutans* (UFC/ml) también fue estadísticamente significativa mediante el Método del Mondadientes, con  $p = 0,04$ , siendo mayor en restauraciones de Resina Compuestas.

En saliva, la diferencia en el recuento de *Streptococcus mutans* (UFC/ml) en pacientes con restauraciones de Amalgamas y Resinas Compuestas no fue estadísticamente significativa con un  $p = 0,18$ .

## DISCUSIÓN

Una de las formas de prevenir la caries secundaria es estudiar la presencia de microorganismos patógenos en dientes, especialmente el *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, agentes etiológicos reconocidos de caries<sup>(19, 26, 62,78)</sup>. Actualmente la influencia de ambas especies bacteriana ha sido discutida, debido al concepto actual de Placa Ecológica, en donde la caries no necesitaría de especies específicas, sino que cualquier especie con características relevantes y condicionadas por factores ambientales podrían desarrollar la enfermedad<sup>(15)</sup>. La importancia de medir la presencia de estas especies en placa bacteriana de restauraciones radicaría en tener la capacidad de observar en forma longitudinal aquellas restauraciones con alto recuento de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* y ver que porcentajes de ellas desarrolla caries secundaria en el tiempo, de modo de realizar medidas preventivas adecuadas al riesgo de cada de paciente.

Para monitorear *Streptococcus mutans* en restauraciones el método más utilizado con propósitos de investigación y seguimientos clínicos es el Método del Mondadientes propuesto por Wallman y Krasse. Es un método simple, económico, viable de realizar en la consulta dental y es el más utilizado en estudios y ensayos clínicos pero posee ciertas limitaciones: (a) produce una subestimación del microorganismo en las zonas retentivas, (b) es un método con cierto grado de subjetividad debido a que depende de la forma en que el operador hace el rayado con el mondadientes sobre la restauración en la toma de muestra; (c) al igual que el recuento en saliva, el procesamiento de la muestra requiere de un proceso de laboratorio más complejo. Todo esto aleja al clínico de esta importante herramienta diagnóstica<sup>(52)</sup>.

A partir de la necesidad de encontrar mejores métodos y más precisos para el recuento de *Streptococcus mutans* de muestras de placa bacteriana dental en restauraciones, esta investigación propuso un nuevo método denominado Técnica de Cubeta.

Se escogió a *Streptococcus mutans* como microorganismo de estudio, por diferentes razones:

1. Existe una correlación positiva entre los niveles de *Streptococcus mutans* en saliva y pacientes adultos con caries activa <sup>(92)</sup>.
2. Es el principal agente etiológico de la caries primaria <sup>(93,94)</sup>.
3. Es el microorganismo con mayor potencial cariogénico <sup>(24-26)</sup>.
4. Es el principal agente etiológico de la caries secundaria <sup>(79, 95,96)</sup>.
5. Estudios “*in vitro*” e “*in vivo*” muestran que *Streptococcus mutans* es la principal bacteria aislada desde muestra obtenidas en dientes sanos y restaurados <sup>(97,98)</sup>.
6. Se encuentra en mayores concentraciones en placa dental sobre la superficie de restauraciones dentarias, encontrándose en un 47% versus *Streptococcus sobrinus* en un 9% <sup>(29,99)</sup>.
7. *Streptococcus mutans* ha sido encontrado en todas las restauraciones de Amalgama y Resina Compuesta <sup>(4)</sup>.

Las muestras de placa bacteriana se obtuvieron de restauraciones de Resinas Compuestas y Amalgamas por ser los materiales mayormente empleados en operatoria dental y por que la Caries Secundaria es la responsable del 60% de fracasos de este tipo de restauraciones en la práctica odontológica común <sup>(60)</sup>.

La Técnica de Cubeta fue capaz de aislar *Streptococcus mutans* en el 87,5% de las restauraciones estudiadas, resultados que concuerdan con los publicados por Coogan y colaboradores, los cuales fueron capaces de aislar esta bacteria en el 89% de las superficies obturadas <sup>(58)</sup>.

Se tomó además muestras de saliva de los pacientes estudiados como control de crecimiento de *Streptococcus mutans*, en caso de no recuperar colonias. En aquellos pacientes en que la Técnica de Cubeta no fue capaz de aislar colonias, su recuento de *Streptococcus mutans* en saliva fue cero, por lo que



se puede concluir que en estos pacientes la presencia de esta especie bacteriana en boca no fue detectada, debido a que la cantidad de éste microorganismo cariogénico es muy baja para ser recuperado por los métodos empleados y que no corresponde a una deficiencia de la Técnica de Cubeta.

Al ser una técnica nueva, surge la necesidad de comparar los resultados obtenidos con métodos ya validados, como el Método del Mondadientes, pero la comparación no puede realizarse debido a que la Técnica de Cubeta utiliza como unidad de medición UFC/cm<sup>2</sup> y el Método del Mondadientes UFC/ml, por lo que los resultados obtenidos fueron correlacionados.

El Método del Mondadientes, también fue capaz de aislar *Streptococcus mutans* en el 87.5% de las restauraciones estudiadas y la correlación existente entre ambos métodos fue estadísticamente significativa y positiva, por lo que los resultados obtenidos por la Técnica de Cubeta están en concordancia con este método que puede ser considerado uno de los más efectivos en aislamiento de *Streptococcus mutans* <sup>(49)</sup>.

Estudios señalan que existe una correlación positiva entre los niveles de *Streptococcus mutans* en saliva y en placa obtenidos mediante el Método del Mondadientes <sup>(92)</sup>, la misma correlación fue encontrada entre recuento en Saliva y la Técnica de Cubeta, por lo que el uso de ambos métodos pueden ser útiles en la predicción de actividad de caries.

La composición química de la superficie de las restauraciones es importante para la colonización bacteriana, particularmente cuando la superficie posee componentes que pueden resultar beneficiosos o perjudiciales para los microorganismos <sup>(60)</sup>.

La literatura señala que restauraciones de Resina Compuesta poseen mayor recuento de *Streptococcus mutans* que obturaciones de Amalgama <sup>(4,65)</sup>.

Al comparar la cantidad de UFC/cm<sup>2</sup> de *Streptococcus mutans* en restauraciones de Amalgama y Resina Compuesta mediante la Técnica de Cubeta se encontraron diferencias significativas, siendo mayor para restauraciones de Resina Compuesta. Los mismos resultados fueron obtenidos mediante el Método del Mondadientes.

Lo anterior podría explicarse debido a que la Amalgama libera componentes antimicrobianos, como la plata, que disminuirían la colonización bacteriana de este material, por al contrario de la Resina Compuesta, que no posee componentes con efectos bacteriostáticos o bactericidas<sup>(63,70)</sup>.

Es importante mencionar que los tamaños de la muestra fueron realizados para establecer correlaciones de datos y no para efectuar comparación, aunque las diferencias encontradas fueron estadísticamente significativas, existiría esta limitación. Para futuros estudios se sugiere calcular el tamaño muestral necesarios para realizar la comparación de datos.

La Técnica de Cubeta fue capaz de aislar *Streptococcus mutans* a partir de muestras de placa bacteriana dental en restauraciones de Amalgama y Resinas Compuestas, permitió el recuento bacteriano y al compararlo con un Método validado, obtuvo una correlación positiva y significativa, comprobando la hipótesis planteada en esta investigación.

Tiene la ventaja de ser una método simple, de bajo costo, que permite la toma de muestra directa y objetiva de placa bacteriana dental sobre piezas dentarias sana como restauradas, que puede ser realizada en una clínica dental común, no requiere de gran conocimiento microbiológico y tiempo en laboratorio, debido a que no es necesario realizar etapas como dilución y siembra de la muestra. Nos permite reconocer topográficamente donde se localizan las especies bacterianas en estudio en la superficie dentaria, con lo que podremos efectuar medidas preventivas ajustadas al riesgo individual de cada diente.

Una dificultad que posee la Técnica de Cubeta, es ejercer la presión exacta sobre las restauraciones dentarias, que permita una correcta impronta de la cara oclusal sin desgarrar el medio de cultivo, por lo que se sugiere aumentar la concentración de agar mejorando la resistencia al desgarro de este material y calibrar la presión ideal que se debe ejercer. Pero su desventaja principal, al igual que otros métodos que miden *Streptococcus mutans* en placa bacteriana dental, radica en que es una técnica que no permite conocer el riesgo bucal cariogénico del paciente, porque para determinarlo debería medir la cantidad de *Streptococcus mutans* en la boca completa, en donde el recuento en Saliva sigue siendo el único método validado<sup>(100)</sup>.

Por último recordar que la caries es un proceso complejo, en donde el recuento de *Streptococcus mutans* es uno de los factores que favorecen el desarrollo de esta enfermedad, pero por sí solo no puede ser considerado un agudo y seguro predictor de futuras lesiones.

## **CONCLUSIONES**

Al finalizar esta investigación se puede concluir que:

1. La Técnica de Cubeta fue capaz de aislar y recuperar *Streptococcus mutans* a partir de muestras de placa bacteriana dental en restauraciones de Resina Compuesta y Amalgama.
2. La Técnica de Cubeta posee una correlación positiva y significativa con el Método del Mondadientes en relación al aislamiento y recuento de *Streptococcus mutans* a partir de muestras de placa bacteriana dental en restauraciones de Resina Compuesta y Amalgama.
3. Existe una correlación positiva en el aislamiento y recuento de *Streptococcus mutans* a partir de muestras de placa bacteriana dental en restauraciones de Resina Compuesta y Amalgama mediante la Técnica de Cubeta y el recuento de *Streptococcus mutans* en saliva.
4. Existen diferencias significativas en el recuento de *Streptococcus mutans* en restauraciones de Resina Compuestas y en restauraciones de Amalgama, siendo mayor en restauraciones de Resina Compuestas a partir de muestras de placa bacteriana dental obtenidas mediante la Técnica de Cubeta.

## SUGERENCIAS

- Realizar este estudio controlando variables de rango etario (con menor diferencia de edad por rango), sexo, nivel socioeconómico y riesgo cariogénico.
- Estandarizar la presión ideal que se debe ejercer durante la toma muestra mediante la Técnica de Cubeta, para evitar desgarros del medio de cultivo.
- Debido a la correlación encontrada en esta investigación entre la Técnica de Cubeta con el Método del Mondadientes, se sugiere, en futuros trabajos de investigación, comparar ambos métodos para el aislamiento y recuento de *Streptococcus mutans* a partir de muestras de placa bacteriana es restauraciones dentarias.
- La Técnica de Cubeta podría utilizarse como un método para el recuento y aislamiento de *Streptococcus mutans* en placa bacteriana dental de piezas sanas y comparar los resultados con los obtenidos en esta investigación.
- Esta investigación deja abierta la posibilidad de utilizar la Técnica de Cubeta como un método de aislamiento y recuento bacteriano de otras especies bacterianas encontradas en la placa dental como *Streptococcus sobrinus* modificando el medio de cultivo que se utiliza en las cubetillas.
- Realizar un estudio longitudinal para comparar la muestra obtenida sobre una restauración en más de una ocasión y así poder establecer la reproducibilidad de la Técnica de Cubeta.

- Realizar un estudio prospectivo y reevaluar las restauraciones con alto porcentajes de *S. mutans* encontradas en este estudio para poder observar cuál de ellas desarrollo caries secundarias y así determinar el valor predictivo de la técnica.
- Realizar un diseño de *split mouth* o boca partida, que permita medir en un paciente ambas restauraciones y poder observar si la diferencia en la colonización bacteriana es paciente dependiente o restauración dependiente.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- (1) Anderson MH, Molvar MP, Powel LV. "Treating Dental Caries as an Infectious Disease." Operative Dentistry. 1991; 16: 21-28.
- (2) Bernimuolin, JP. "Recent concepts in plaque formation." J Clin Periodont 2003; 30:7-9.
- (3) Emilson CG, Krasse B. "Support for and implications of the specific plaque hypothesis." J Dent Res 1993; 93: 96-104
- (4) Svanberg M, Mjor I, Ostavik D. "Mutans Streptococci in Plaque from Margins of Amalgam, Composite and Glass ionomer Restorations." J Dent Res 1990; 69:861-864.
- (5) Mjor I, Moorhead J. "Reasons for replacement of restorations in permanent teeth in general dental practice." Int Dent J 2000; 50:361-366.
- (6) Fejerskov, O. "Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care." Caries Res 2004; 38:182-191
- (7) Fejerskov, O. "Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease." Communty Dent Oral Epidemiol 1997; 25:5-12.
- (8) Chaussain-Miller, C. Fioretti, F. Goldberg, M. Menashi, S. " The Role of Matrix Metaloproteinases (MMPs) in human caries". J Dent Res 2006; 85:22-32.
- (9) Li, J. Helmerhost, E. Leone, C. Troxler, R. Yaskell, T. Haffajee, A. Socransky, S. Oppenheim F. "Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm." J of Applied Microbiol 2004; 97: 1311-1318.
- (10) Kidd, E. "The diagnosis and management of the "early" carious lesion in permanent teeth." Dent Update 1984; 11: 69-70
- (11) Negroni. Microbiología Estomatológica. Panamericana (eds), 2009, pp. 235-245
- (12) Keyes, PH. "The infecticious anda transmissible nature of dental caries. Finding and implications." Arch Oral Biol 1960; 1:304-320.

- (13) Balakrishnan, M. Simmonds, R. Tagg, J. (2000). "Dental Caries is a preventable infectious disease." Australian Dental Journal 45:235-245.
- (14) Loesche, WJ. "Chemotherapy on dental plaque infections." Oral Sciences Reviews 1976; 9:63-107.
- (15) Marsh, P. "Are Dental disease examples of ecological catastrophes?." Oral Microbiol 2003; 149: 279-294.
- (16) Marsh, P. "Dental plaque as a biofilm and microbial community implications for health and disease." BMC Oral Health 2006; 1: 14-21.
- (17) Marsh, P. Branshaw, D. Physiological approaches to the control oral biofilms. Adv Dent Res 1997; 11:176-185,
- (18) Yoshida, K. Tanagawa, M. Matsumoto, S. Yamada, S. Astuta, M. "Antibacterial activity on resin composites with silver-containing materials." Eur J Oral Sci 1999; 107: 290-296.
- (19) Fejerskov, O. Kidd, A. Dental Caries. The disease and its clinical management. Blackwell, 2003.
- (20) Huerta, J. Gajardo, M. Silva, N Gómez, L. Palma, P. Zillmann, G. Manual de Laboratorio Microbiológico Clínico en Odontología. Santiago, Chile, 2010. Cap.9, pp.103-113. Cap.10, pp. 168-193
- (21) Moncada, C. Urzúa, I. Cariología Clínica. Bases Preventivas y Restauradoras. Santiago, Chile, 2008. Cap. 3, pp. 51-72
- (22) Hamada, S. Slade, H. "Biology, Immunology, and Cariogenicity of *Streptococcus mutans*." Microbiol Rev 1980;44:331-384
- (23) Coykendall, A. "Classification and Identification of the Viridans Streptococci." Clin Microbiol Rev 1989; 2:315-328.
- (24) Donly, KJ. Segura, A. "Fluoride release and caries inhibition associated with a resin-modified glass-ionomer cement at varying fluoride loading doses." Am J Dent . 2002; 15:8-10.



- (25) Yli-Urpo, H. Narhi, T. Soderling, E. "An antimicrobial effect of glass ionomer cements containing bioactive glass (S53P4) on oral microorganism in vitro." Acta Odontol Scand 2003; 61:241-246.
- (26) De Soet, JJ. Val Loveren, C. Lammens, AJ. Pavicic, M. Homburg, CH. Cate, JM. De Graaff, J. "Differences in cariogenicity between fresh isolates of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*." Caries Res 1991; 25:116-122.
- (27) Brambilla, E. García, F. Strohmer, L. "Principles of diagnosis and treatment of high caries risk subjects." Pediatr Dent 2000; 44(3):507-539.
- (28) Liébana, J. Microbiología Oral. McGraw-Hill (eds), 1995. Cap. 15, pp. 220-239.
- (29) Stanke, F. Urzúa, I. Marine, A. Nuevas Estrategias en Cariología. 2001. Cap. 2, pp. 16-30.
- (30) Seki, M. Yamahita, Y. Torigoe, H. Tsuda, H. Maeno, M. "Effect of mixed mutans streptococci colonization on caries development." Oral Microbiol Immunol 2006; 21:47-52.
- (31) Schaeken, M. Van Der Hoeven, J. Franken, H. "Comparative recovery of *Streptococcus Mutans* on Five Isolation Media, including a New Simple Selective Medium." J Dent Res 1986; 65(6): 906-908
- (32) Jordan, H. 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.
- (33) Banas, J. "Virulence factors of *Streptococcus mutans*." Frontiers in Bioscience 2004; 9:1267-1277.
- (34) Shahal, Y. Steinberg, D. Hirschfeld, Z. Bronshtyn, M. Kopolovic, K. "In vitro bacterial adherence onto pellicle-coated aesthetic restorative materials." J Oral Rehabil 1998; 25:52-58.
- (35) Paes Leme, A. Koo, H. Bellato, C. Bedi, G. Cury, J. "The role of sucrose in cariogenic dental biofilms formation- New insight." J Dent Res 2006; 85: 878-887
- (36) Emilson, C. Carlsson, P. Bratthall, D. "Strains of mutans streptococci isolated in a population with extremely low caries prevalence are cariogenic in the hamster model." Oral Microbiol Immunol 1987; 2:183-186.

- (37) Okada, M. Soda, Y. Hayashi, F. Doi, T. Suzuki, J. Miura, K. Kozai, K. "Longitudinal study of dental caries incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in pre-school children." J of Med Microbiol 2006; 54:661-665
- (38) Smith SI, Aweh AJ, Coker AO, Savage KO, Abosede DA, Oyedeji KS. "Lactobacilli in human dental caries and saliva". Microbios. 2001; 105:77-85.
- (39) Van Houte, J. Gibbons, R. Pulkkinen, A. "Ecology of human oral Lactobacilli." Infect Immun 1972; 6:723-729.
- (40) Holbrooks, W. De Soet, J. De Graaf, J. "Prediction of dental caries in pre-school children." Caries Res 1993; 27:424-430.
- (41) Loesche, WJ. Dental Caries: a treatable infection. Chicago: Thomas, 1982
- (42) Loesche, WJ. Syed, SA. "The predominant cultivable flora of carious plaque and carious dentine." Caries Res 1973;7:201-216.
- (43) Burt, B. "Sugar Consumption and Caries Risk: a Systematic Review." J Dent Educ 2001; 65:1017-1022.
- (44) Burt, B. "Concepts of risk in dental public health." Community Dent Oral Epidemiol 2005; 33:240-247.
- (45) Leveritt, D. Featherstone, J. Proskin, H. Adair, S. Eisenberg, A. Mundorffshrestha, S. Shields, C. Shaffer, C. Billings, R. "Caries Risk Assessment a Cross-sectional Discrimination Model." J Dent Res 1993; 72:529-537.
- (46) Park, JH. Tanabe, Y. Tinanoff, N. Turng, BF. Lilli, H. Minah, GE. "Evaluation of Microbiological Screening Systems Using Dental Plaque Specimens from Young Children Aged 6-36 Months." Caries Res 2006; 40:277-280.
- (47) Alaluusua, S. "Salivary counts of *mutans streptococci* and *lactobacilli* and past caries experience in caries prediction." Caries Res 1993;27:68-71.
- (48) Seppa, L. Hause, H. Pollanen, L. Karkkainen, S. Helasharju, K. "Effect of intensified caries prevention on approximal caries in adolescent with light caries prediction." Caries Res 1991; 35:392-395.

- (49) Motisuki, C. Monti, L. "Influence of sample type and collection method on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp counts in the oral cavity." Arch Oral Biol 2005; 50:341-345
- (50) Syed, SA. Loesche,WJ. "Survival of human plaque dental in various transport media." J Appl Microbiol 1972; 24:638-644.
- (51) Emilson, CG. "Prevalence of *Streptococcus mutans* with different colonial morphologies in the human plaque." Scand J Dent Res 1983; 91:26-32.
- (52) Wallman C, Krasse B. "A simple method for monitoring mutans streptococci in margins of restorations." J Dent 1993; 21:216-219.
- (53) Jensen, B. Brathall, D. "A new method for the estimation of mutans streptococci in human saliva." J Dent Res 1989; 68: 468-471.
- (54) Keene, HJ. "Sampling of cariogenic microorganisms in human populations." Oral Microbiol Immunol 1986; 1:7-12.
- (55) Wennerholm, K. Lindquist, B. Emilson,CG. "The toothpick method in relation to other plaque sampling techniques for evaluating mutans streptococci." Eur J Oral Sci 1995; 103:36-41.
- (56) Meirs, J. Schaechtele,C. "Fissure removal and needle scraping for evaluation of bacteria in occlusal fissures oh human teeth. ." J Dent Res 1984; 63: 1051-1055.
- (57) Wallman, C. Krasse,B"Mutans streptococci in margins of fillings and crowns." J Dent . 1992; 20:163-166.
- (58) Coogan, M. Mackeown, J. Galpin, J. Fatti, L. "Microbiological impressions of teeth, saliva and dietary fibre can predict caries activity." J Dent 2008; 36: 892-899.
- (59) Matalon, S. Slutzky, H. Weiss, El."Surface antibacterial properties packable resin composites: Part I." Quintessence Int 2004; 35:189-193.
- (60) Auschill, TM. Arweiler, NB. Breex, M. Reich, E. Sculean, A. Netuschil, L. "The effect of dental restoratives materiales on dental biofilm." Eur Oral Sci 2002; 110:48-53.
- (61) Boeckh, C. Schumacher, E. Podbielski, A. Haller, B. "Antibacterial activity of restorative dental biomaterials in vitro." Caries Res 2002 ;36:101-107.

- (62) Eick, S. Glockmann, E. Brandl, B. Pfister, W. "Adherence of *Streptococcus mutans* to various restorative materials in a continuous flow system." J Oral Rehab 2004; 31:278-285.
- (63) Karinka-Kouma, A. Dionysopoulos, P. Koliniotou-Koubia, E. Kolokotronis, A. "Antibacterial properties of denting bonding systems, polyacid-modified composite resins and composite resin." J Oral Rehabil 2001; 28:157-160.
- (64) Kawai, K. Takaoka, T. "Inhibition of bacterial and glucan adherence to various light-cured fluoride-releasing restorative materials." J Dent 2001; 29:119-122.
- (65) Brambilla, E. Cagetti, MG. Gagliani, M. Fadini, L. García-Godoy, F. Strohmenger, L. "Influence of different adhesive restorative materials on *mutans streptococci* colonization." Am J Dent 2005; 18:173-176.
- (66) Anusavice, K. Ciencia de los materiales dentales. Mc Graw Hill(eds), 1998. Cap.12, pp. 283-312. Cap.17, pp. 375-405.
- (67) Gordan, V. Riley, J. Blaser, O. Mjor, I. "2-year clinical evaluation of alternative treatment to replacement of defective amalgam restorations." Operative Dentistry 2006; 31(4): 418-425.
- (68) Skjorland, K. Sonju, T. "Effect of sucrose rinses on bacterial colonization on amalgam and composite." Acta Odontol Scand 1986; 40:193-196.
- (69) Friedl, K. Schmalz, G. Hiller, K. Shams, M. "Resin-modified glass ionomer cements: fluoride release and influence on *Streptococcus mutans* growth-." Eur J Oral Sci 1997; 105: 81-85.
- (70) Imazato, S. "Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems." Dental Materials 2003; 19:449-489.
- (71) Lyttle, H. Bowden, G. "The level of mercury in human dental plaque and interactions in vitro between biofilms and *streptococcus mutans* and dental amalgam." J Dent Res 1993; 72: 1320-1324.
- (72) Hotta, M. Nakajima, H. Yamamoto, K. Aono, M. "Antibacterial temporary filling materials: the effect of adding various ratios of Ag-Zn-Zeolite." J Oral Rehabilitation 1998; 25: 485-489.
- (73) Goma, A. Lorenzetti, M. Nagib, S. Pita, M. Cerqueira, M. "Streptococcus mutans induced secondary caries adjacent to glass ionomer cement, composite resin and amalgam restorations in vitro." Braz Oral Res 2007; 21: 368-274.

- (74) Schartz, R. Summit, J. Robbin, J. Fundamentals of Operative Dentistry. Quintessence books, 1996.
- (75) Pearson, A. Claesson, R. Van Dijken, J. "Levels of mutans streptococci and lactobacilli in plaque on aged restorations of and ion-releasing and a universal hybrid composite resin." Acta Odontol Scand 2005; .63: 21-25.
- (76) Hansel, C. Leyhausen, G. Mai, E. Geurtsen, W. "Effects of various resin composite (co)monomers and extract on two caries associated microorganisms in vitro." J Dent Res 1998; 77: 60-67.
- (77) Kidd, E. "Diagnosis of Secondary Caries." J Dent Educ 2001; 65:997-1000.
- (78) Kidd, E. "Secondary Caries." Int Dent J 1992; 42: 127-138.
- (79) Gonzales C, Li Y, Noblin T, Gregory R, Kafrawy A, Stookey G. "Detection of Mutans Streptococci in Secondary Carious Lesions Using Immunofluorescent Techniques and Confocal Laser Scanning Microscopy." Caries Res 1995; 29:198-203.
- (80) Grieve, A. "The occurrence of secondary caries-like lesions in vitro." Br Dent J 1973; 134: 530-536.
- (81) Goldberg, A. "Deterioration of restorative materials and risk for secondary caries." Adv Dent Res 1990; 4:14-18.
- (82) Charbenau, G. Klausner, H. Green, T. "The placement and replacement of amalgam restorations." J Dent Res 1986; 65:219-224.
- (83) Mo, S. Bao, W. Lai, G. Wang, J. Li, M. "The microfloral analysis of secondary caries biofilms around class I and II composite and amalgam fillings." BMC Infectious Disease 2010; 10:241-247.
- (84) Kidd, E. "Caries diagnosis within restored teeth." Operative Dent 1989; 14:149-158.
- (85) Thomas, R. van der Mei, H. van der Veen, M. De Soet, J. Huysmans, M. "Bacterial composition and red fluorescence of plaque in relation to primary and secondary caries next to composite: an in situ study." Oral Microbiol Immunol 2008; 23:7-13.

- (86) Díaz, P. Fernández, P. "Determinación del tamaño muestral para calcular la significación del coeficiente de correlación lineal. Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario Juan Canalejo. A Coruña." Cad Aten Primaria 2002; 9:209-211.
- (87) Ryge, G. "Evaluating the clinical quality of restorations." J Am Dent Assoc 1972; 87:369-377.
- (88) Ryge, G. Jendresen, M. Glantz, P. Mjor, I. "Standardization of Clinical Investigators for Studies of restorative Materials." Swed Dent J 1981; 5:235-239.
- (89) Zibell, S. Mandansky, E. "Impact of gum chewing on stress levels: on line self –perceptions research study." Curr Med Res Opin 2009; 25:1491-1500.
- (90) Poyato, F. Segura, E. Bullon, F. "Comparison of modify Bass technique with normal toothbrushing practices for efficacy in supragingival plaque removal." Int J Dent Hyg 2003; 1:110-117.
- (91) Shapiro, S. Wilk, M. "An analysis of variance test for normality (complete samples)." Biometrika 1965; 52:591-611.
- (92) Mundorff S, Eisemberg A, Leverett D, Espeland M, Proskin M. "Correlations between Numbers of Microflora in Plaque and Saliva." Caries Res 1990; 24:312-317
- (93) Krasse, B. "Biological factors as indicators of future caries." Int Dent J 1988; 38:219-225.
- (94) Loesche, W. "Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay." Microbiol Rev 1986; 50:353-380.
- (95) Svanberg, M. Jacobson, C. Hager, B. "*Streptococcus mutans*, lactobacilli and *Streptococcus sanguis* in plaque from abutment teeth of cemented and loose retainers." Caries Res 1997; 21: 474-480.
- (96) Rask, P. Emilson, C. Krasse, B. "Effect of preventive measures in 50-60 years old with a high risk of dental caries." Scand J Dent Res 1988; 96:500-504.
- (97) Burne, R. "*Oral streptococci mutans* products of their environment." J Dent Res 1998; 77:445-452

- (98) Sbordone, L. Bortolaia, C. "Oral microbial biofilms and plaque related diseases: Microbial communities and their role in the shift from oral health to disease." Clin Oral Investig 2003; 7:181-188.
- (99) Ahmady, K. Marshs E. Newman, R. Bulman, J. " Distribution of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* at sub site in Human Aproximal Dental Plaque." Caries Res 1993; 27:135-139.
- (100) Newbrun, E. Matsukubo, T. Hoover, Cl. Graves, RC. Brown, AT. Disney, JA. Bohannan, HM. "Comparison of two screening test for *Streptococcus mutans* and evaluation of their suitability for mass screenings and private practice." Community Dent Oral Epidemiol 1984; 12: 325-331.

## **ANEXOS.**



**ANEXO N°1**

Universidad de Chile  
 Facultad de Odontología  
 Departamento de Odontología Restauradora.  
 Departamento Patología.

N°MUESTRA \_\_\_\_\_

## FICHA CLINICA

Nombre \_\_\_\_\_

RUT \_\_\_\_\_

Edad \_\_\_\_\_ Género \_\_\_\_\_

Teléfono \_\_\_\_\_ Celular \_\_\_\_\_ Otro \_\_\_\_\_

## 1. Antecedentes Sistémicos generales y farmacológicos

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## 2. Higiene Bucal

a) Frecuencia de cepillado \_\_\_ Nunca \_\_\_ 1 \_\_\_ 2 \_\_\_ 3 o más

b) Uso de otros elementos \_\_\_ Seda o hilo dental \_\_\_ Colutorios \_\_\_ No usa

c) Hora Último Cepillado \_\_\_\_\_

## 3. Examen Bucal

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

N° de Pieza Dentaria	AMALGAMA	RESINA COMPUESTA	Alfa	Bravo	Charlie
1.8					
1.7					
1.6					
2.8					
2.7					
2.6					
4.8					
4.7					
4.6					
3.6					
3.7					
3.8					

## 4. Toma de muestra

a) Hora \_\_\_\_\_

b) Fecha \_\_\_\_\_



Universidad de Chile  
 Facultad de Odontología  
 Departamento de Odontología Restauradora, Operatoria Clínica 4º año.  
 Departamento Patología Área de Microbiología Bucal

## ANEXO N°2

Fecha de Edición: 11 de Octubre de 2010

### Consentimiento Informado

**Título del Protocolo:** Evaluación de la Técnica de Cubeta como un método para aislamiento y recuento de *Streptococcus mutans* a partir de muestras de placa dental de restauraciones de Resina Compuestas y Amalgamas.

**Investigador Principal:** Prof. Dr. Gustavo Moncada C

**Sede de Estudio:** Facultad de Odontología, Universidad de Chile – Olivos 943 – Santiago.

**Nombre del Paciente:** .....

Yo Gustavo Moncada Cortés docente de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Estoy realizando una investigación acerca la bacteria que produce la *caries*, la cual es una de las enfermedades de mayor frecuencia en la población humana. Les proporcionaré información y los invitaré a ser parte de ella. No tiene que decidir hoy si lo harán o no. Antes de hacerlo pueden hablar acerca de la investigación con cualquier persona de su confianza. Este proceso se conoce como Consentimiento Informado y puede que contenga términos que usted no comprenda, por lo que siéntase con la absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido la Investigación y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme este formulario.

Los aspectos de este formulario tratan los siguientes temas: Justificación de la Investigación, Objetivo de la Investigación, Tipo de Intervención y procedimiento, Beneficios y Riesgos Asociados a la Investigación y Aclaraciones.

#### **Justificación de la Investigación**

La caries dental es uno de los principales problemas de salud bucal a nivel mundial, afectando entre el 60% a 90% de la población escolar y a la gran mayoría de los adultos. Su origen es infeccioso y se asocia con la presencia de altas poblaciones de bacterias adheridas sobre los dientes. La bacteria más relacionada con esta enfermedad es el *Streptococcus mutans*, la cual tiene la capacidad de los transformar los azúcares que comemos en ácidos que debilitan nuestros dientes, facilitando a que la caries se instale sobre ellos. Es importante considerar que esta bacteria no solo produce caries en dientes sanos sino también en dientes con obturaciones ("tapaduras"), siendo la principal causa de los fracasos de estos tratamientos.

Para el estudio de esta bacteria se recogen muestras tanto de la superficie de los dientes y sus obturaciones como de saliva. Esta información en conjunto con el conocimiento de hábitos de higiene y de alimentación, sirve para predecir el riesgo de contraer futuras caries como de asegurar el éxito de futuros tratamientos odontológicos.

#### **Objetivo de la Investigación**

La presente investigación tiene por objetivo proponer un innovador método para la aislación y recuento de *Streptococcus mutans* sobre obturaciones dentarias.

#### **Beneficio de la Investigación.**

Usted tendrá el beneficio de poder someterse a un examen de salud bucal donde podrá conocer el estado actual de boca, y evaluar así la necesidad de posibles tratamientos.

Aprenderá una correcta técnica de higiene en relación a su edad y condición psicomotora.

Conocer la cantidad *Streptococcus mutans* que usted posee, nos permitirá dirigir terapias preventivas y futuros tratamientos según su riesgo individual, permitiendo así un menor porcentajes de fracasos.

Una vez obtenidos los resultados y si su recuento de bacterias es superior o igual  $10^5$  UFC/ml, será considerado una paciente de alto riesgo<sup>1</sup>, por lo que tendrá que someterse a una terapia de control de higiene, mediante la enseñanza de una correcta técnica de cepillado y una profilaxis, junto con la aplicación de barniz de flúor cada tres meses e indicación de pasta dental con concentración mayor o igual a 2500 ppm de ión flúor para uso diario.

**Tipo de Intervención y Procedimiento.**

Si usted decide participar se le realizará en una primera sesión un examen bucal y se le enseñara una técnica de higiene.

Para la toma de muestras de placa dental, se utilizará una cubetilla, que es una especie de receptáculo pequeño, del ancho y largo de una pieza dentaria, que en su interior contiene una gelatina que permite la adherencia y crecimiento de la bacteria en estudio.

La obtención de la muestra se llevara a cabo presionando suavemente por un minuto esta cubetilla sobre sus piezas dentarias.

**Lugar donde se realizará la intervención.**

El Procedimiento se llevará a cabo durante Operatoria Clínica de 4to año, ubicada en la Clínica Odontológica de la Facultad de Chile, cuya dirección es Av. La Paz 750, comuna de Independencia. Durante los lunes de 11 horas a 13 horas y los miércoles de 14 horas a 17 horas.

**Riesgo de la Investigación.**

Usted no correrá ningún riesgo mediante y posterior al procedimiento de la investigación debido a que el material gelatinoso de la cubetilla sólo entrará en contacto con su pieza dentaria, la cual tampoco sufría daño alguno debido a que la presión ejercida es mínima y el material no es perjudicial para la misma.

**Aclaraciones**

- La participación es completamente voluntaria
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la intervención
- Si usted decide puede retirarse cuando lo desee.
- Las muestras obtenidas serán de exclusiva utilización para este estudio.
- No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- Usted podrá solicitar información actualizada sobre el estudio, al investigador responsable.
- La información obtenida de la Investigación, respecto de la identificación de pacientes, será mantenida con estricta confidencialidad por los investigadores, para esto, no se utilizará sus nombres sino un sistema de código que enumerará las muestras.

Si considera que no existen dudas ni preguntas acerca de su participación, puede si lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado anexa al documento.

### Carta de Consentimiento Informado

A través de la presente, declaro y manifiesto, libre y espontáneamente y en consecuencia acepto que:

1. He leído y comprendido la información anteriormente entregada y que mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria.
2. He sido informado /a y comprendo la necesidad y fines de ser atendido.
3. Tengo conocimiento del procedimiento a realizar.
4. Conozco los beneficios de participar en la Investigación
5. El procedimiento no tiene riesgo alguno para mi salud.
6. Además de esta información que he recibido, seré informado/a en cada momento y al requerimiento de la evolución de mi proceso, de manera verbal y/o escrita si fuera necesaria y al criterio del investigador.
7. Autorizo a usar mi caso para investigación y para ser usado como material audiovisual en clases, protegiendo mi identidad

Doy mi consentimiento al investigador y al resto de colaboradores, a realizar el procedimiento diagnóstico pertinente, PUESTO QUE SE QUE ES POR MI PROPIO BENEFICIO

- Nombre del Paciente, Tutor o Representante Legal: \_\_\_\_\_
- RUT: \_\_\_\_\_
- Firma: \_\_\_\_\_
- Fecha: \_\_\_\_\_

### Sección a llenar por el Investigador Principal

He explicado al Sr(a) \_\_\_\_\_ la naturaleza de la investigación, le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que conozco la normativa vigente para la realizar la investigación con seres humanos y me apego a ella.

- Nombre del Investigador Principal: \_\_\_\_\_
- Firma: \_\_\_\_\_
- Fecha: \_\_\_\_\_

En caso de cualquier duda puede acudir a Av. La Paz 571, Facultad de Odontología de Universidad de Chile, Área de Operatoria Dental los días Lunes de 8 a 13 horas o Miércoles de 14 a 19 horas o comunicarse con Paula Zúñiga S. los números 3152281 o 07-8873845

### Anexo N°3

#### Criterios Clínicos Generales Ryge/USPHS

Alfa	La restauración presenta excelente condición y se espera que proteja al diente y los tejidos adyacentes
Bravo	La restauración es aceptable pero muestra uno o más parámetros defectuosos. Será necesario su reemplazo en el futuro
Charlie	La restauración es inaceptable y necesita reemplazo

#### Criterios Clínicos Ryge/USPHS Específicos por Parámetro

	<b>Alfa</b>	<b>Bravo</b>	<b>Charlie</b>
<b>Color</b>	La restauración concuerda en color y translucidez con la estructura dentaria adyacente.	La diferencia en color y translucidez entre restauración y diente están dentro de un rango aceptable.	La diferencia en color y translucidez entre restauración y diente están fuera de un rango aceptable.
<b>Adaptación Marginal</b>	La sonda no se retiene al pasarla a través de la interfase diente-restauración.	La sonda penetra en un surco cuando pasa por la interfase diente-restauración.	Se observa dentina o material de base expuesto en el margen de la restauración.
<b>Anatomía</b>	El contorno de la restauración sigue el contorno del diente.	El contorno de la restauración no sigue el contorno del diente.	La restauración presenta sobre contorno en proximal.
<b>Rugosidad</b>	La superficie de la restauración no presenta defectos.	La superficie de la restauración presenta defectos superficiales leves.	La superficie de la restauración presenta defectos superficiales severos.
<b>Tinción Marginal</b>	No hay tinción en el margen.	Hay tinción de menos del 50% del margen.	Hay tinción de más del 50% del margen.
<b>Tinción del Material</b>	No hay tinción del material o la tinción es igual en el diente y la restauración.	Hay mas tinción en la restauración que en el tejido dentario circundante	La tinción no puede ser eliminada mediante pulido (tinción de la masa de material)
<b>Contacto</b>	Normal	Suave	Sin contacto
<b>Sensibilidad</b>	No hay sensibilidad cuando se sopla con la jeringa triple por 2 seg. a 1 cm de distancia de la restauración, con la superficie vestibular de los dientes vecinos cubiertos con una gasa.	Hay sensibilidad cuando se sopla con la jeringa triple por 2 seg. a 1 cm. de distancia de la restauración, con la superficie vestibular de los dientes vecinos cubiertos con una gasa, y termina al retirar el estímulo.	Hay sensibilidad cuando se sopla con la jeringa triple por 2 seg. a 1 cm. de distancia de la restauración, con la superficie vestibular de los dientes vecinos cubiertos con una gasa, y no termina al retirar el estímulo.
<b>Caries Secundaria</b>	No hay caries secundaria.		Hay caries secundaria.
<b>Brillo</b>	La superficie de la restauración es brillante.	La superficie de la restauración es opaca.	La superficie de la restauración es opaca y estéticamente desagradable.

- Ryge, G. "Evaluating the clinical quality of restorations." *J Am Dent Assoc* 1972; 87:369-377.
- Ryge, G. Jendresen, M. Glantz, P. Mjor, I.. Standardization of Clinical Investigators for Studies of restorative Materials." *Swed Dent J* 1981; 5:235-239.

## Bibliografía

- Ahmady, K. Marshs E. Newman, R. Bulman, J. " Distribution of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus at sub site in Human Aproximal Dental Plaque." Caries Res (1993): 27:135-139.
- Alaluusua, S. "Salivary counts of mutans streptococci and lactobacilli and past caries experience in caries prediction." Caries Res (1993): 27:68-71.
- Alaluusua, S. Savolainen, J. Tuompo, H. Gronroos, I. "Slide-scoring Method for Estimation of Streptococcus mutans levels in saliva." Scand J Den Res (1984): 92:127-133.
- Anderson MH, Molvar MP, Powel LV. "Treating Dental Caries as an Infectious Disease." Operative Dentistry (1991): 16, 21-28.
- Anusavice, K. Ciencia de los materiales dentales. Mc Graw Hill, 1998.
- Auschill, TM. Arweiler, NB. Breex, M. Reich, E. Sculean, A. Netuschil, L. "The effect of dental restoratives materiales on dental biofilm." Eur Oral Sci (2002): 110:48-53.
- Balakrishnan, M. Simmonds, R. Tagg, J. "Dental Caries is a preventable infectious disease." Australian Dental Journal (2000): 45:235-245.
- Banas, J. "Virulence factors of Streptococcus mutans." Frontiers in Bioscience (2004): 9:1267-1277.
- Bernimuolin, JP. "Recent concepts in plaque formation." J Clin Periodont (2003): 30:7-9.
- Boeckh, C. Schumacher, E. Podbielski, A. Haller, B. "Antibacterial activity of restorative dental biomaterials in vitro." Caries Res (2002): 36:101-107.
- Brambilla, E. Cagetti, MG. Gagliani, M. Fadini, L. García-Godoy, F. Strohmenger, L. "Influence of different adhesive restorative materials on mutans streptococci colonization." Am J Dent (2005): 18:173-176.
- Brambilla, E. García, F. Strohmenger, L. "Principles of diagnosis and treatment oh high caries risk subjects." Pediatr Dent (2000): 44(3):507-539.
- Burne, R. "Oral streptococci mutans products of their environment." J Dent Res (1998): 77:445-452 .
- Burt, B. "Concepts of risk in dental public health." Community Dent Oral Epidemiol (2005): 33:240-247.
- . "Sugar Consumption and Caries Risk: a Systematic Review." J Dent Educ (2001): 65:1017-1022.
- CG, Emilson and Krasse B. "Support for and implications of the specific plaque hypothesis." Scand J Dent Res (1985): 93, 96-104.
- Charbenau, G. Klausner, H. Green, T. "The placement and replacement of amalgam restorations." J Dent Res (1986): 65:219-224.
- Coogan, M. Mackeown, J. Galpin, J. Fatti, L. "Microbiological impressions of teeth, saliva and dietary fibre can predict caries activity." J Dent (2008): 36: 892-899.
- Coykendall, A. "Classification and Identification of the Virindans Streptococci." Clin Microbiol Rev (1989): 2:315-328.
- De Soet, JJ. Val Loveren, C. Lammens, AJ. Pavicic, M. Homburg, CH. Cate, JM. De Graaff, J. "Differences in cariogenicity between fresh isolates of Streptococcus sobrinus and Streptococcus mutans." Caries Res (1991): 25:116-122.
- Díaz, P. Fernández, P. "Determinación del tamaño muestral para calcular la significación del coeficiente de correlación lineal. Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario Juan Canalejo. A Coruña." Cad Aten Primaria (2002|): 9:209-211.
- Donly, KJ. Segura, A. " Fluoride release and caries inhibition associated with a resin-modified glass-ionomer cement at varying fluoride loading doses." Am J Dent (2002): 15:8-10.

- Eick, S. Glockmann, E. Brandl, B. Pfister, W. "Adherence of Streptococcus mutans to various restorative materials in a continuous flow system." J Oral Rehab (2004): 31:278-285.
- Emilson CG, Krasse B. "Support for and implications of the specific plaque hypothesis." J Dent Res (1993): 93: 96-104.
- Emilson, C. Carlsson, P. Bratthall, D. "Strains of mutans streptococci isolated in a population with extremely low caries prevalence are cariogenic in the hamster model." Oral Microbiol Immunol (1987): 2:183-186.
- Emilson, CG. "Prevalence of Streptococcus mutans with different colonial morphologies in the human plaque." Scand J Dent Res (1983): 91:26-32.
- Fejerskov, O. "Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care." Caries Res (2004): 38:182-191.
- . "Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease." Community Dent Oral Epidemiol (1997): 25:5-12.
- Fejerskov, O. Kidd, A. Dental Caries. The disease and its clinical management. Blackwell, 2003.
- Friedl, K. Schmalz, G. Hiller, K. Shams, M. "Resin-modified glass ionomer cements: fluoride release and influence on Streptococcus mutans growth." Eur J Oral Sci (1997): 105: 81-85.
- Goma, A. Lorenzetti, M. Nagib, S. Pita, M. Cerqueira, M. "Streptococcus mutans induced secondary caries adjacent to glass ionomer cement, composite resin and amalgam restorations in vitro." Braz Oral Res (2007): 21: 368-274.
- Gonzales C, Li Y, Noblin T, Gregory R, Kafrawy A, Stookey G. . "Detection of Mutans Streptococci in Secondary Carious Lesions Using Immunofluorescent Techniques and Confocal Laser Scanning Microscopy." Caries Res (1995): 29:198-203 .
- Gordan, V. Riley, J. Blaser, O. Mjor, I. "2-year clinical evaluation of alternative treatment to replacement of defective amalgam restorations." Operative Dentistry (2006): 31(4): 418-425.
- Grieve, A. "The occurrence of secondary caries-like lesions in vitro." Br Dent J (1973): 134: 530-536.
- Hamada, S. Slade, H. "Biology, Immunology, and Cariogenicity of Streptococcus mutans." Microbiol Rev (1980): 44:331-384.
- Hansel, C. Leyhausen, G. Mai, E. Geurtsen, W. "Effects of various resin composite (co)monomers and extract on two caries associated microorganisms in vitro." J Dent Res (1998): 77: 60-67.
- Holbrooks, W. De Soet, J. De Graaf, J. "Prediction of dental caries in pre-school children." Caries Res (1993): 27:424-430.
- Hotta, M. Nakajima, H. Yamamoto, K. Aono, M. . "Antibacterial temporary filling materials: the effect of adding various ratios of Ag-Zn-Zeolite." J Oral Rehabilitation (1998): 25: 485-489.
- Huerta, J. Gajardo, M. Silva, N. Zillmann, G. Arriagada, M. Rojas, R. Laboratorio Microbiológico en Odontología. 2001.
- Imazato, S. "Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems." Dental Materials (2003): 19:449-489.
- Jensen, B. Bratthall D, D. "A new method for the estimation of mutans streptococci in human saliva." J Dent Res (1989): 68: 468-471.
- Jordan, H. 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.
- Karinka-Kouma, A. Dionysopoulos, P. Koliniotou-Koumba, E. Kolokotronis, A. "Antibacterial properties of denting bonding systems, polyacid-modified composite resins and composite resin." J Oral Rehabil (2001): 28:157-160.
- Kawai, K. Takaoka, T. "Inhibition of bacterial and glucan adherence to various light-cured fluoride-releasing restorative materials." J Dent (2001): 29:119-122.

- Keene, HJ. "Sampling of cariogenic microorganisms in human populations." Oral Microbiol Immunol (1986): 1:7-12.
- Keyes, PH. "The infectious and transmissible nature of dental caries. Finding and implications." Arch Oral Biol (1960): 1:304-320.
- Kidd E., Toffenetti F., Mjor I. "Secondary Caries." Int Dent J (1992): 42; 127-138.
- Kidd, E. "The diagnosis and management of the "early" carious lesion in permanent teeth." Dent Update (1984): 11-69.
- Kidd, E. "Caries diagnosis within restored teeth." Operative Dent (1989): 14:149-158.
- . "Diagnosis of Secondary Caries." J Dent Educ (2001): 65:997-1000.
- . "Secondary Caries." Int Dent J (1992): 42: 127-138.
- Kleimberg, I. " A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causations: An alternative to Streptococcus mutans and the specific-plaque hypothesis." Crit Rev Oral Biol Med (2002): 13:108-125.
- Krasse, B. "Biological factors as indicators of future caries." Int Dent J (1988): 38:219-225. .
- Leveritt, D. Featherstone, J. Proskin, H. Adair, S. Eisenberg, A. Mundorffshrestha, S. Shields, C. Shaffer, C. Billings, R. "Caries Risk Assessment a Cross-sectional Discrimination Model." J Dent Res (1993): 72:529-537.
- Li J., Helmerhost E., Leone C., Troxler R., Yaskell T. Haffajee A., Socransky S., Oppenheim F. "Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm." J of Applied Microbiol (2004): 97: 1311-1318.
- Liébana, J. Microbiología Oral. McGraw-Hill, 1995.
- Loesche, WJ. "Chemotherapy of dental plaque infections." Oral Sciences Reviews (1976): 9:63-107.
- . Dental Caries: a treatable infection. Chicago: Thomas, 1982.
- . "Role of Streptococcus mutans in human dental decay." Microbiol Rev (1986): 353-380.
- Loesche, WJ. Syed, SA. "The predominant cultivable flora of carious plaque and carious dentine." Caries Res (1973): 7:201-216.
- Lund, M. "Secondary caries a problem of primary concern." Oper Dent (2009): 34:249-250.
- Lyttle, H. Bowden, G. "The level of mercury in human dental plaque and interactions in vitro between biofilms and streptococci mutans and dental amalgam." J Dent Res (1993): 72: 1320-1324.
- Marsh, P. "Are Dental disease examples of ecological catastrophes?." Oral Microbiol (2003): 149: 279-294.
- Marsh, P. Branshaw, D. Physiological approaches to the control oral biofilms. Adv Dent Res: 11:176-185, 1997.
- Marsh, P. "Dental plaque as a biofilm and microbial community implications for health and disease." BMC Oral Health (2006): Suppl 1: 14-21.
- . "Dental Plaque as a Microbial Biofilm." Caries Res (2004): 38:204-211.
- Matalon, S. Slutzky, H. Weiss, EI. "Surface antibacterial properties packable resin composites: Part I." Quintessence Int (2004): 35:189-193.
- Meirs, J. Schaechtele, C. "Fissure removal and needle scraping for evaluation of bacteria in occlusal fissures of human teeth. ." J Dent Res (1984): 63: 1051-1055.
- Mjor I, Moorhead J. " Reasons for replacement of restorations in permanent teeth in general dental practice." Int Dent J (2000): 50:361-366.
- Mjor, I. "Frequency of secondary caries at various anatomical lesions." Operative Dent (1985): 10:88-92.
- Mo, S. Bao, W. Lai, G. Wang, J. Li, M. "The microfloral analysis of secondary caries biofilms around class I and II composite and amalgam fillings." BMC Infectious Disease (2010): 10:241-247.



- Moncada, C. Urzúa, I. Cariología Clínica. Bases Preventivas y Restauradoras. Santiago, Chile, 2008.
- Motisuki, C. Monti, L. "Influence of sample type and collection method on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp counts in the oral cavity." Arc Oral Biol (2005): 50:341-345.
- Mundorff S, Eisemberg A, Leverett D, Espeland M, Proskin M. "Correlations between Numbers of Microflora in Plaque and Saliva." Caries Res (1990): 24:312-317.
- Negróni. Microbiología Estomatológica. Panamericana, n.d.
- Newbrun, E. Matsukubo, T. Hoover, CI. Graves, RC. Brown, AT. Disney, JA. Bohannon, HM. "Comparison of two screening test for *Streptococcus mutans* and evaluation of their suitability for mass screenings and private practice." Community Dent Oral Epidemiol (1984): 12: 325-331.
- Okada, M. Soda, Y. Hayashi, F. Doi, T. Suzuki, J. Miura, K. Kozai, K. "Longitudinal study of dental caries incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in pre-school children." J of Med Microbiol (2006): 54:661-665.
- Paes Leme, A. Koo, H. Bellato, C. Bedi, G. Cury, J. "The role of sucrose in cariogenic dental biofilms formation- New insight." J Dent Res (2006): 85: 878-887.
- Park, JH. Tanabe, Y. Tinanoff, N. Turng, BF. Lilli, H. Minah, GE. "Evaluation of Microbiological Screening Systems Using Dental Plaque Specimens from Young Children Aged 6-36 Months." Caries Res (2006): 40:277-280.
- Pearson, A. Claesson, R. Van Dijken, J. "Levels of mutans streptococci and lactobacilli in plaque on aged restorations of and ion-releasing and a universal hybrid composite resin." Acta Odontol Scand (2005): 63: 21-25.
- Poyato, F. Segura, E. Bullon, F. "Comparison of modify Bass technique with normal toothbrushing practices for efficacy in supragingival plaque removal." Int J Dent Hyg (2003): 1:110-117.
- Rask, P. Emilson, C. Krasse, B. "Effect of preventive measures in 50-60 years old with a high risk of dental caries." Scand J Dent Res (1988): 96:500-504.
- Ryge, G. "Evaluating the clinical quality of restorations." J Am Dent Assoc (1972): 87:369-377.
- Ryge, G. Jendresen, M. Glantz, P. Mjor, I. "Standardization of Clinical Investigators for Studies of restorative Materials." Swed Dent J (1981): 5:235-239.
- Sbordone, L. Bortolaia, C. "Oral microbial biofilms and plaque related diseases: Microbial communities and their role in the shift from oral health to disease." Clin Oral Investig (2003): 7:181-188.
- Schaeken, M. Van Der Hoeven, J. Franken, H. "Comparative recovery of *Streptococcus Mutans* on Five Isolation Media, including a New Simple Selective Medium." J Dent Res (1986): 65(6): 906-908.
- Schaeken, M. Van Der Hoeven, J. Franken, H. "Comparative recovery of *Streptococcus Mutans* on Five Isolation Media, including a New Simple Selective Medium." J Dent Res (1986): 65(6): 906-908.
- Schartz, R. Summit, J. Robbin, J. Fundamentals of Operative Dentistry. Quintessence books, 1996.
- Seki, M. Yamahita, Y. Torigoe, H. Tsuda, H. Maeno, M. "Effect of mixed mutans streptococci colonization on caries developmet." Oral Microbiol Inmunol (2006): 21:47-52.
- Seppa, L. Hause, H. Pollanen, L. Karkkainen, S. Helasharju, K. "Effect of intensified caries prevention on approximal caries in adolescent with light caries prediction." Caries Res (1991): 35:392-395.
- Shahal, Y. Steinberg, D. Hirschfeld, Z. Bronshtyn, M. Kopolovic, K. "In vitro bacterial adherence onto pellicle-coated aesthetic restorative materials." (1998): 25:52-58.
- Shahal, Y. Steinberg, D. Hirschfeld, Z. Bronshteyn, M. Kopolovic, K. "In

- vitro bacterial adherence onto pellicle-coated aesthetic restorative materials." J Oral Rehabilitation (1998): 25: 52-58.
- Shapiro, S. Wilk, M. "An analysis of variance test for normality (complete samples)." Biometrika (1965): 52:591-611.
- Skjorland, K. Sonju, T. "Effect of sucrose rinses on bacterial colonization on amalgam and composite." Acta Odontol Scand (1986): 40:193-196.
- Stanke, F. Urzúa, I. Marine, A. Nuevos Conceptos en cariológia. 2001.
- Svanberg M, Mjor I, Ostavik D. "Mutans Streptococci in Plaque from Margins of Amalgam, Composite and Glass ionomer Restorations." J Dent Res (1990): 69:861-864. .
- Svanberg, M. Jacobson, C. Hager, B. " Streptococcus mutans, lactobacilli and Streptococcus sanguis in plaque from abutment teeth of cemented and loose retainers." Caries Res (1997): 21: 474-480.
- Syed, SA. Loesche, WJ. "Survival of human plaque dental in various transport media." Appl Microbiol (1972): 24, 638-644.
- Tanzer, J. "Dental caries is a transmissible infectious disease: the Keyes and Fitzgerald revolution." J Den Res (1995): 74(9):1536-42.
- . "Re-restoration of teeth: material failure, secondary caries and socioeconomic factors." J Dent Res (1988): 67(suppl):103.
- Thomas, R. van der Mei, H. van der Veen, M. De Soet, J. Huysmans, M. "Bacterial composition and red fluorescence of plaque in relation to primary and secondary caries next to composite: an in situ study." Oral Microbiol Immunol (2008): 23:7-13.
- Van Houte, J. Gibbons, R. Pulkkinen, A. "Ecology of human oral Lactobacilli." Infect Immun (1972): 6:723-729.
- Wallman C, Krasse B. A simple method for monitoring mutans streptococci in margins of restorations. 1993. "A simple method for monitoring mutans streptococci in margins of restorations." J Dent (1993): 21:216-219.
- Wallman, C. Krasse, B. "Mutans streptococci in margins of fillings and crowns." J Dent (1992): 20:163-166.
- Wennerholm, K. Lindquist, B. Emilson, C. "Mutans streptococci on different tooth surfaces a comparison between various sampling methods." Swed Dent J (1987): 11:281-288.
- Wennerholm, K. Lindquist, B. Emilson, CG. "The toothpick method in relation to other plaque sampling techniques for evaluating mutans streptococci." Eur J Oral Sci (1995): 103:36-41.
- Yli-Urpo, H. Narhi, T. Soderling, E. " Antimicrobial effects of glass ionomer cements containing bioactive glass (S53P4) on oral microorganism in vitro." Acta Odontol Scand (2003): 61:241-246 .
- Yoshida, K. Tanagawa, M. Matsumoto, S. Yamada, S. Astuta, M. "Antibacterial activity on resin composites with silver-containing materials." Eur J Oral Sci (1999): 107: 290-296.
- Zibell, S. Mandansky, E. "Impact of gum chewing on stress levels: on line self-perceptions research study." Curr Med Res Opin (2009): 25:1491-1500.