

Fenotipos de *Streptococcus mutans* en párvulos chilenos de bajo nivel socioeconómico, con y sin experiencia de caries

Ignacio Castañón Brown

Trabajo de Investigación

Requisito para optar al título de
Cirujano Dentista

TUTOR PRINCIPAL
Marta Gajardo Ramírez

TUTOR ASOCIADO
Andrés Celis Sersen

ÍNDICE

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
MARCO TEÓRICO.....	5
HIPÓTESIS.....	30
OBJETIVO GENERAL.....	30
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
1. Población de estudio.....	31
2. Toma de Muestra para Cultivo Microbiológico.....	33
3. Obtención de Aislados de <i>S.mutans</i>	34
4. Obtención de DNA Genómico de los aislados de <i>S.mutans</i>	35
5. Identificación de aislados mediante PCR.....	36
6. Caracterización Fenotípica de los Aislados.....	39
Ensayo de capacidad acidúrica.....	39
Ensayo de formación de biofilm.....	40
Ensayo de resistencia frente antimicrobianos.....	41
Análisis Estadístico de los dato.....	42
RESULTADOS.....	43
DISCUSIÓN.....	52
CONCLUSIONES.....	59
Referencias.....	60
ANEXOS	66

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) es una especie de bacterias cocáceas Gram positivo, presente en más del 90% de los seres humanos como miembro de la microbiota comensal de la cavidad bucal, que ha sido reportada como factor etiológico de caries dental.

El potencial cariogénico de *S. mutans* está relacionado, entre otros, con su habilidad de producir y tolerar ambientes ácidos, formar biopelículas y adherirse tanto a la película dental adquirida (PDA), como a otros microorganismos. La expresión diferencial de estos factores de virulencia, en el complejo ambiente polimicrobiano del biofilm dental, es esencial para competir, colonizar y sobrevivir en el ecosistema oral.

Mayor diversidad de cepas de *S. mutans* en la cavidad bucal ha sido asociada a una mayor prevalencia de caries, su permanencia se ha asociado con la habilidad de colonizar y resistir el stress ambiental, pero aún no existe consenso respecto de la relación entre la patogenicidad de las cepas aisladas de la cavidad oral de los preescolares chilenos y su experiencia de caries.

Los estudios en salud bucal han determinado que uno de cada dos preescolares chilenos ha padecido caries y que el nivel socioeconómico bajo concentra la mayor carga de enfermedad. Entender la distribución y comportamiento de distintas cepas de *S. mutans* y su capacidad de expresar diferencialmente sus factores de virulencia, resulta útil para establecer grupos de riesgo portadores de cepas más virulentas e implementar medidas específicas de promoción, prevención y control de la caries dental.

OBJETIVO: Demostrar la presencia de diferentes fenotipos de *S. mutans* en un grupo de preescolares chilenos, con y sin historia de caries, mediante una batería de pruebas microbiológicas convencionales.

METODOLOGÍA: Mediante un examen clínico, y la aplicación de criterios de inclusión y de exclusión, se seleccionó un grupo de 12 párvulos que presentaban o no lesiones de caries. Se tomaron muestras microbiológicas mediante hisopado de superficies dentarias y mucosa oral, y a partir de ellas se aislaron colonias de *S. mutans*, identificadas mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se analizó la capacidad de formar biofilms, sobrevivencia al stress ácido y resistencia ante agentes antimicrobianos de los aislados obtenidos de niños con o sin historia de caries, y se comparó la presencia de estos factores de virulencia entre los distintos aislados y la cepa de referencia de *S. mutans*, ATCC 38668.

RESULTADOS: Aislados de *S. mutans* obtenidos de lesiones de caries, presentaron una mayor tolerancia al stress ácido, capacidad de formar biopelículas y de adherencia “*in vitro*”, que aislados obtenidos de niños sin lesiones de caries.

CONCLUSIONES: Preescolares chilenos podrían ser portadores de cepas de *S. mutans* de alta virulencia, lo que amerita la profundización en el estudio de los factores etiológicos de la caries dental en la población infantil nacional.

INTRODUCCIÓN

La caries dental es un proceso infeccioso crónico multifactorial, relacionado con la acumulación de biofilm sobre la superficie dentaria, factores del hospedero, estilos de vida y consumo frecuente de carbohidratos fermentables.

A través de la fermentación de los carbohidratos de la dieta, ciertas bacterias en el biofilm dental producen ácidos que disminuyen el pH del medio e incrementan el potencial de promover la desmineralización del tejido dentario. Además, el ambiente ácido generado por las mismas, permite la selección de bacterias con una mayor capacidad de adaptarse a estas condiciones del medio.

Entre las bacterias que residen normalmente en la cavidad oral, la especie *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), cocácea Gram positivo, es reconocida como una de las más importantes involucradas en la etiología de la caries y que ha cobrado mayor relevancia debido a que, además de ser acidogénico y acidúrico, esto es, puede generar ácidos orgánicos y tolera vivir en su presencia, utiliza la sacarosa para producir glucanos insolubles en la matriz del biofilm, los que juegan un rol fundamental en la adherencia microbiana y el desarrollo de la enfermedad.

Estas propiedades trabajan en conjunto para modificar las características físico-químicas del biofilm, resultando en cambios ecológicos que favorecen el crecimiento de *S. mutans* y otras bacterias involucradas en el desarrollo de la caries dental.

Actualmente se sabe que un cambio en la composición del biofilm es un paso fundamental en la progresión de las infecciones orales, sin embargo existen pocos estudios que demuestren que este proceso tenga relación con el riesgo de presentar la enfermedad.

S. mutans está ampliamente distribuido no sólo en poblaciones con alta o moderada prevalencia de caries, sino que también, en poblaciones con baja o sin experiencia de caries. Se ha postulado como una posible explicación microbiológica a dicho hecho, el que la expresión de distintos factores de virulencia por parte de diversas cepas de *S. mutans* puede diferir entre poblaciones resultando en diferente prevalencia de caries.

Un mayor recuento de *S. mutans* en saliva, se ha asociado con un valor superior de piezas dentarias afectadas por lesiones de caries, extraídas y obturadas en dentición temporal (ceo-d). Sin embargo, a nivel mundial, continúa sin establecerse la asociación entre la diversidad genética de *S. mutans* y la presencia de caries en niños.

La evidencia disponible actualmente, respecto de la relevancia de la presencia de distintas cepas de *S. mutans* en el proceso de caries, es reducida y contradictoria. En la población chilena, la evidencia respecto a la diferencia en la severidad e incidencia de la enfermedad y sus factores relacionados es limitada y no existe evidencia en relación a la diversidad en la expresión de factores de virulencia de *S. mutans* en niños chilenos.

En conjunto, los antecedentes presentados otorgan a *S. mutans* una gran relevancia, lo que sustenta el interés de conocer en Chile cómo se distribuye la diversidad fenotípica en la población infantil y su asociación con la caries dental en los niños, para luego enfocar los esfuerzos hacia la prevención y el control de su proliferación antes que se produzcan lesiones de caries, identificando las cepas más virulentas.

Con este conocimiento, los pacientes infectados con el/los clones más virulentos, o con una mayor diversidad de genotipos, probablemente podrían recibir intervenciones preventivas y educativas más tempranas y oportunas, además de una atención más adecuada en cuanto a las decisiones a tomar durante el tratamiento odontológico.

MARCO TEÓRICO

1. Microbiota Bucal.

En el ser humano existe una diversa microbiota, formando parte del organismo, con la que estamos en constante interacción. Actualmente se acuña el término microbioma para describir al conjunto de genomas que constituyen las comunidades microbianas asociadas al hospedero humano. Se ha calculado que la proporción de células humanas a células microbianas, es de uno a diez en el organismo humano.

Uno de los ecosistemas del cuerpo es la cavidad bucal, un ecosistema abierto constituido por una variedad de microambientes, cada uno de los cuales alberga una compleja comunidad microbiana^{1,33,40}.

Recientes avances en la tecnología de secuenciación del ADN, tales como la pirosecuenciación, han revelado una diversidad inesperadamente alta del microbioma bucal humano; se observó que un pool de placa dental de 98 adultos sanos comprendía alrededor de 10.000 especies microbianas diferentes¹³. Lo que corresponde a un orden de magnitud mayor a los 700 filotipos microbianos bucales previamente reportados, identificados por cultivo o clonación y secuenciación tradicional^{1,12,13,22}. Sin embargo, más del 50% de estas especies no son cultivables y, por lo tanto, no se han caracterizado, por lo que sólo se detectan usando técnicas moleculares.

Estudios han revelado que diferentes sitios en la cavidad bucal tales como superficies dentales duras, mucosas o surcos gingivales, albergan comunidades microbianas únicas. Cuya composición es influenciada por las fluctuaciones físicas y químicas derivadas tanto del consumo de alimentos y bebidas azucaradas, como del resultado de las medidas de higiene bucal.

A pesar de ello, estudios realizados hasta el momento, revelan que la comunidad microbiana bucal es relativamente estable ya que muestra pocas diferencias entre individuos, en comparación con los microbiomas de la piel o del tracto gastrointestinal^{13,14}.

La composición cuantitativa y cualitativa de la microbiota bucal está íntimamente relacionada con la mantención de un equilibrio compatible con salud bucal y, generalmente, se acepta que un cambio en la composición de la comunidad microbiana es un paso importante en la progresión de las patologías bucales, pero existe poca evidencia que haya demostrado realmente que este cambio ecológico esté asociado a un cambio en la condición de salud^{14,40}.

La diversidad de hábitats del ecosistema bucal ofrece variadas condiciones medioambientales, permitiendo su colonización por especies muy diversas, las que interactúan entre sí, forman comunidades y modifican el medio. La saliva por su parte, posee múltiples elementos que intervienen en el procesamiento de las muestras, lo que hace que el estudio de la microbiología bucal sea complejo^{32,33}.

1.1 Adquisición de la Microbiota Bucal Normal.

La cavidad bucal es estéril al momento de nacer, excepto quizás por unos pocos microorganismos que son adquiridos durante el paso por el canal de parto. Unas horas más tarde, microorganismos de la boca de la madre, o del personal de maternidad, o posiblemente algunos del medio ambiente, pueden comenzar a colonizar y establecerse en la cavidad bucal del niño. Se ha reportado que estas especies bacterianas pioneras son generalmente del género *Streptococcus* y que tendrían la capacidad de unirse al epitelio de la mucosa como se une *Streptococcus salivarius*.

Posterior a la adhesión y colonización, la actividad metabólica de la comunidad pionera modifica el medio local, facilitando la colonización por otras especies bacterianas ^{6,11,14,33,36}.

Un cambio importante en el ecosistema bucal del lactante, se produce durante y después de la erupción de las piezas dentarias, puesto que se agregan dos nuevos hábitats a la cavidad bucal susceptibles a la colonización; la superficie del esmalte dental y el surco gingival. Las especies bacterianas que prefieren la colonización de los tejidos duros son *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* y *Actinomyces spp.* Ellas colonizan de forma selectiva la superficie del esmalte recubierta por la película dental adquirida (PDA) ^{11,37,38}.

Por otra parte, especies que prefieren un ambiente anaeróbico y que requieren ligandos y condiciones microambientales provistas por los colonizadores tempranos son *Prevotella spp*, *Porphyromonas spp.* y algunas espiroquetas, las cuales colonizan la zona del surco gingival³².

A partir del primer año de vida, la microbiota bucal consiste mayoritariamente de especies de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Neisseriae* y *Lactobacillus*, junto con algunas especies anaeróbicas de los géneros *Veillonella* y *Fusobacterium*. Menos frecuentes son las especies de *Actinomyces* y de *Prevotella*³⁶. Se ha reportado que especies anaerobias no aparecen en un número importante sino hasta la adolescencia^{21,33}.

1.2 Formación del Biofilm de Placa Dental

El biofilm o biopelícula de placa dental, es una comunidad microbiana estructurada, organizada y compleja, formada por uno o varios tipos de microcolonias rodeadas de un glicocalix compuesto fundamentalmente por exopolisacáridos producidos por las bacterias residentes, las que ocupan un lugar y una función determinada dentro de él. Se desarrolla sobre superficies duras y tejidos blandos de la cavidad bucal. En su constitución están presentes bacterias vivas y muertas, además de productos metabólicos bacterianos y componentes derivados del hospedero^{21,33,38}.

La matriz orgánica que rodea a los microorganismos de la placa dental, representa entre 75% a 80% del volumen total del biofilm. Esta matriz actúa como una reserva de nutrientes, como adherente entre microorganismos y las distintas superficies y además mantiene la integridad estructural del biofilm. Las especies bacterianas se organizan en microcolonias intercaladas por canales que transportan nutrientes, metabolitos y productos de desecho. El biofilm proporciona protección a la comunidad bacteriana frente a cambios en el medio ambiente, defensas del hospedero y sustancias tóxicas externas como la presencia de antibióticos^{10,21,38}.

La formación del biofilm de placa dental es un proceso complejo, que comprende varias etapas, desde la formación de la PDA, adhesión bacteriana a las proteínas de la PDA, coagregación bacteriana, formación de microcolonias intercaladas y finalmente la estructuración de la biopelícula.

El grupo de microorganismos pioneros que coloniza selectivamente la película dental adquirida, está constituido por especies de cocáceas y bacilos Gram-positivo. Estas son sucedidas en el tiempo y de acuerdo a la presión selectiva de determinantes ecológicos por especies de cocáceas, bacilos, cocobacilos y fusobacterias Gram-negativo. Finalmente se pueden agregar especies filamentosas, espirilos y espiroquetas^{3,21,32,33} (Fig. 1).

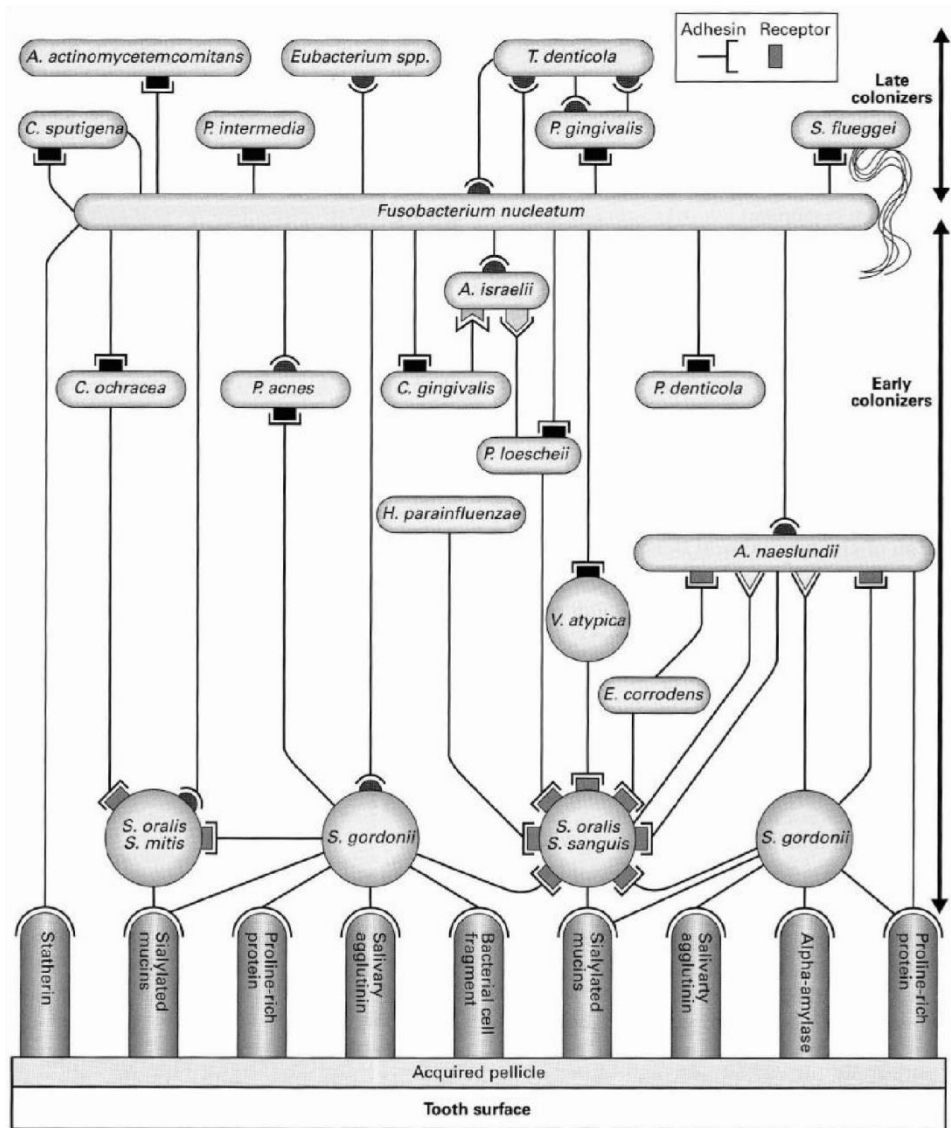


Figura 1. Esquema de la constitución del biofilm de placa dental, indicando colonizadores tempranos y tardíos. Tomado de Kolenbrander *et al.* (2002)

Los productos metabólicos de los colonizadores tempranos alteran radicalmente el medio ambiente, creando un potencial redox más bajo y permitiendo la incorporación de colonizadores anaeróbicos. Así aumenta gradualmente la complejidad microbiana, biomasa y grosor del biofilm. Cuando la biomasa del biofilm alcanza un tamaño crítico, se logra un equilibrio entre los depósitos y pérdida de placa, estableciéndose una comunidad clímax³³.

Las bacterias que están en la superficie del biofilm y forman parte de una comunidad clímax pueden desprenderse y entrar en una fase planctónica, es decir, quedar suspendidos en saliva o en fluido crevicular gingival y así ser transportados a nuevos sitios para comenzar otro ciclo de colonización y diseminación³².

La estructura compleja del biofilm se mantiene a través de un sistema de comunicación bacteria-bacteria, llamado Quorum Sensing. Este es un sistema de comunicación, mediante moléculas, relacionado con la regulación del crecimiento, la activación de genes involucrados en la producción de polisacáridos extracelulares, la reducción del metabolismo y la producción de factores de virulencia, incluyendo la expresión de genes resistentes a antibióticos (Fig. 2)^{27,35}.

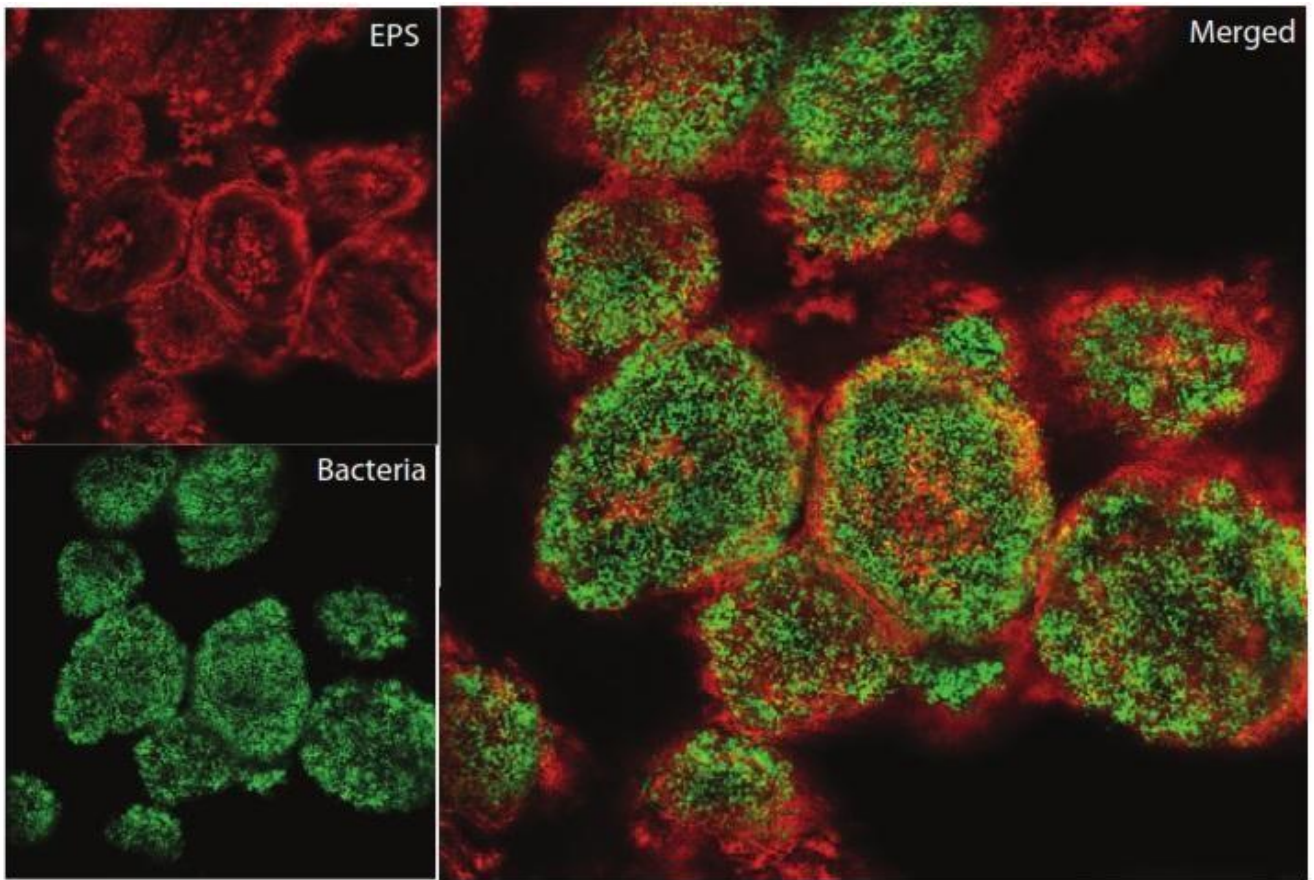


Figura 2. La matriz extracelular del biofilm dental generado en presencia de sacarosa (rojo) proporciona diferentes microambientes para la constitución de una compleja red de comunicaciones que permiten que una diversa microbiota bacteriana (verde) conviva en la superficie del diente. Tomado de Lemos et al(2013)³⁵.

2. Caries Dental

Se ha definido a la caries dental como la destrucción localizada de los tejidos duros dentales susceptibles provocada por los productos ácidos de la fermentación bacteriana de los azúcares de la dieta. Los signos de la desmineralización producida por el proceso de caries se pueden observar en los tejidos duros como una lesión de caries. Los cambios iniciales que se producen en el esmalte dentario son difíciles de detectar a través de los métodos diagnósticos clínicos y radiográficos disponibles en la actualidad^{20,25,56}.

La caries dental representa un proceso multifactorial que se inicia con cambios microbiológicos que se llevan a cabo en el biofilm dental, está en directa relación con el flujo y la composición de la saliva, la disponibilidad de flúor, una dieta rica en azúcares refinados y pobres hábitos de higiene bucal^{56,59}.

La enfermedad en una etapa inicial es reversible y puede ser detenida en cualquiera de sus etapas, incluso si existe la destrucción del esmalte o la dentina, cavitación, modificando los factores que inciden en su desarrollo^{55,56}. Este proceso es considerado una enfermedad crónica, con una progresión lenta en el tiempo en la mayor parte de los individuos y que puede afectar tanto la corona como la raíz de las piezas dentales temporales y permanentes en todas sus superficies. La caries en las piezas temporales de preescolares se ha denominado como caries temprana de la infancia³¹.

El término caries o caries dental es usado comúnmente para referirse a dos conceptos distintos; el proceso de desmineralización de las superficies dentarias y las lesiones producidas por este proceso.

Las lesiones de caries son la secuela del proceso patológico de la caries dental, el cual es caracterizado por los cambios a nivel molecular de la estructura mineral de los tejidos dentarios, independiente de la presencia o no de cavitación.

La determinación de la actividad de caries en una superficie dentaria depende en gran medida del criterio y las herramientas diagnósticas que se utilicen para su detección⁵⁵.

2.1 Patogénesis

La caries dental se produce por un desbalance en el equilibrio fisiológico entre la superficie mineral del diente y el biofilm, estructura que actúa como protector frente a presiones y variaciones del medio, defensas del hospedero y antimicrobianos^{10,40}.

Bacterias endógenas, principalmente *Streptococcus spp.* y *Lactobacillus spp.*, producen ácidos orgánicos como producto del metabolismo de fermentación de los carbohidratos. Estos ácidos provocan un descenso del pH bajo el valor crítico en el cual el tejido dentario comienza a desmineralizarse, que se ha establecido a un pH de 5.5. Si no se restaura el equilibrio en el proceso de mineralización y desmineralización de las superficies dentarias se producirá el colapso estructural de los tejidos, lo que derivará en la cavitación del diente^{55,56}.

Este proceso puede ser revertido en etapas tempranas, mediante la utilización de fluoruros, los que actúan como catalizadores para la difusión de calcio y fosfato al interior de la estructura mineral del diente^{51,60,63,64}.

El componente mineral del esmalte dental está constituido por cristales de hidroxiapatita, estructura cristalina que presenta una menor resistencia al ataque por ácido que la fluorapatita y que la hidroxiapatita expuesta a fluoruros. Las modificaciones en el equilibrio del proceso de mineralización y desmineralización ocurren continuamente en los diversos microambientes bucales, generándose como resultado la reparación, la cavitación o la mantención del status quo en el diente. La saliva actúa como buffer restaurando el pH del medio a valores cercanos al neutro (Fig. 3)^{25,40,56}.

Las lesiones de caries se desarrollarán en superficies donde no se restablezca el equilibrio, ni se favorezca la remineralización, proporcionando nichos ecológicos donde se seleccionarán por presión positiva las especies capaces de tolerar y adaptarse a las condiciones de pH y disponibilidad de nutrientes del entorno, además de proveer una protección mecánica a la eliminación del biofilm por las medidas de control del medio bucal²⁵.

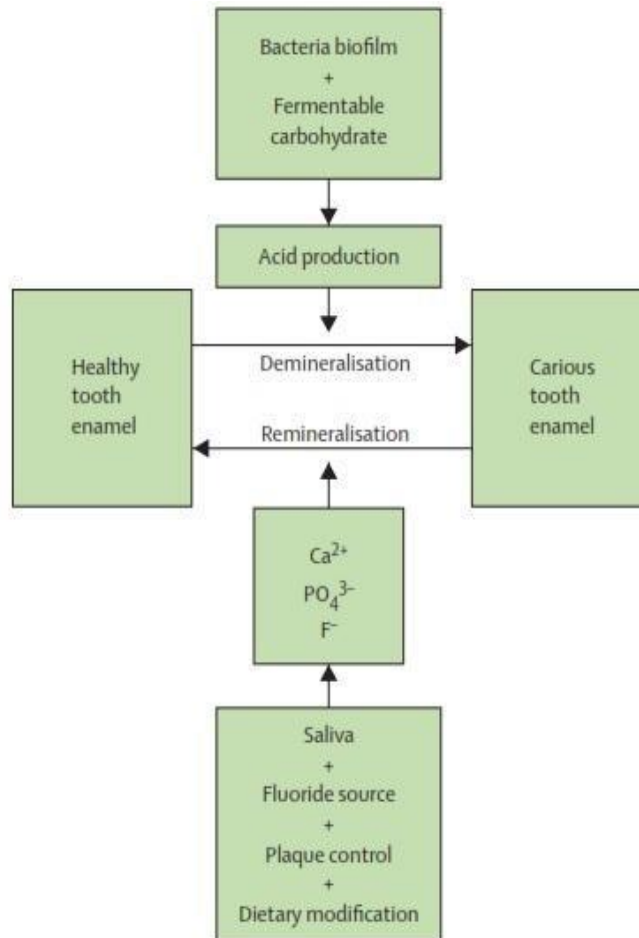


Figura 3. Diagrama del proceso de caries como un flujo constante de desmineralización (destrucción) y remineralización (reparación). Tomado de Selwitz et al. (2007)⁵⁶

La caries temprana de la infancia es una manifestación agresiva del desequilibrio en el proceso que afecta la estructura de las piezas dentales temporales en preescolares y lactantes, por lo general, cursa inicialmente en las superficies de las piezas anteriores comenzando por una lesión de mancha blanca detectable en la zona del margen del diente con la encía^{15,16}. De no ser modificados los factores involucrados en el proceso, la caries progresa provocando cavitaciones que acaban destruyendo toda la corona de la pieza en un tiempo mucho menor al que toma en la dentición definitiva^{8,15,16}.

2.2 Factores de riesgo

El riesgo de un individuo a presentar caries es variable en el tiempo dependiendo del momento de la vida y varía su epidemiología según la población estudiada. Se han descrito como los principales factores de riesgo la composición y flujo salival, el elevado número de bacterias cariogénicas, insuficiente exposición a fluoruros, recesiones gingivales, componentes inmunológicos, necesidades especiales de tratamiento y factores genéticos^{19,20,62}.

La caries está fuertemente relacionada con los estilos de vida y factores conductuales de los individuos, incluyéndose dentro de estos factores los hábitos de higiene oral y la dieta, tanto en constitución como en momento de ingesta y tipo de carbohidratos^{59,60}.

Otros factores que han sido relacionados con un mayor riesgo de presentar caries son el nivel socioeconómico, número de años de escolaridad, acceso a atención dental, uso de sellantes de puntos y fisuras, presencia de aparatos ortodóncicos o restauraciones dentales en mal estado^{52,56} (Fig. 4).

Un factor de riesgo relevante para el niño en la caries temprana de la infancia, es la historia de caries de su madre y sus cercanos, reflejando la importancia en la adquisición de microorganismos relacionados en el proceso de caries a partir de la familia y cómo las conductas del entorno donde se desarrolla el niño favorecen la aparición de lesiones^{26,28}.

La colonización temprana por especies bacterianas asociadas a la etiología de la caries temprana de la infancia debe considerarse como un factor de riesgo clave en el desarrollo de la enfermedad, sin embargo el rol de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) como principal factor etiológico de caries temprana de la infancia aún es controversial debido a la complejidad de la microbiota bucal, en la que conviven cientos de especies y millones de células creciendo en el biofilm dental¹¹.

Resulta difícil predecir el comportamiento y desarrollo de la enfermedad atribuyendo su manifestación a sólo una especie bacteriana, pero se ha demostrado que el conocimiento acabado de los factores involucrados en el desarrollo de la enfermedad permite una mejor toma de decisiones clínicas por parte del odontólogo, además de la determinación de protocolos especiales de atención y cuidados especiales en grupos de riesgo⁵².

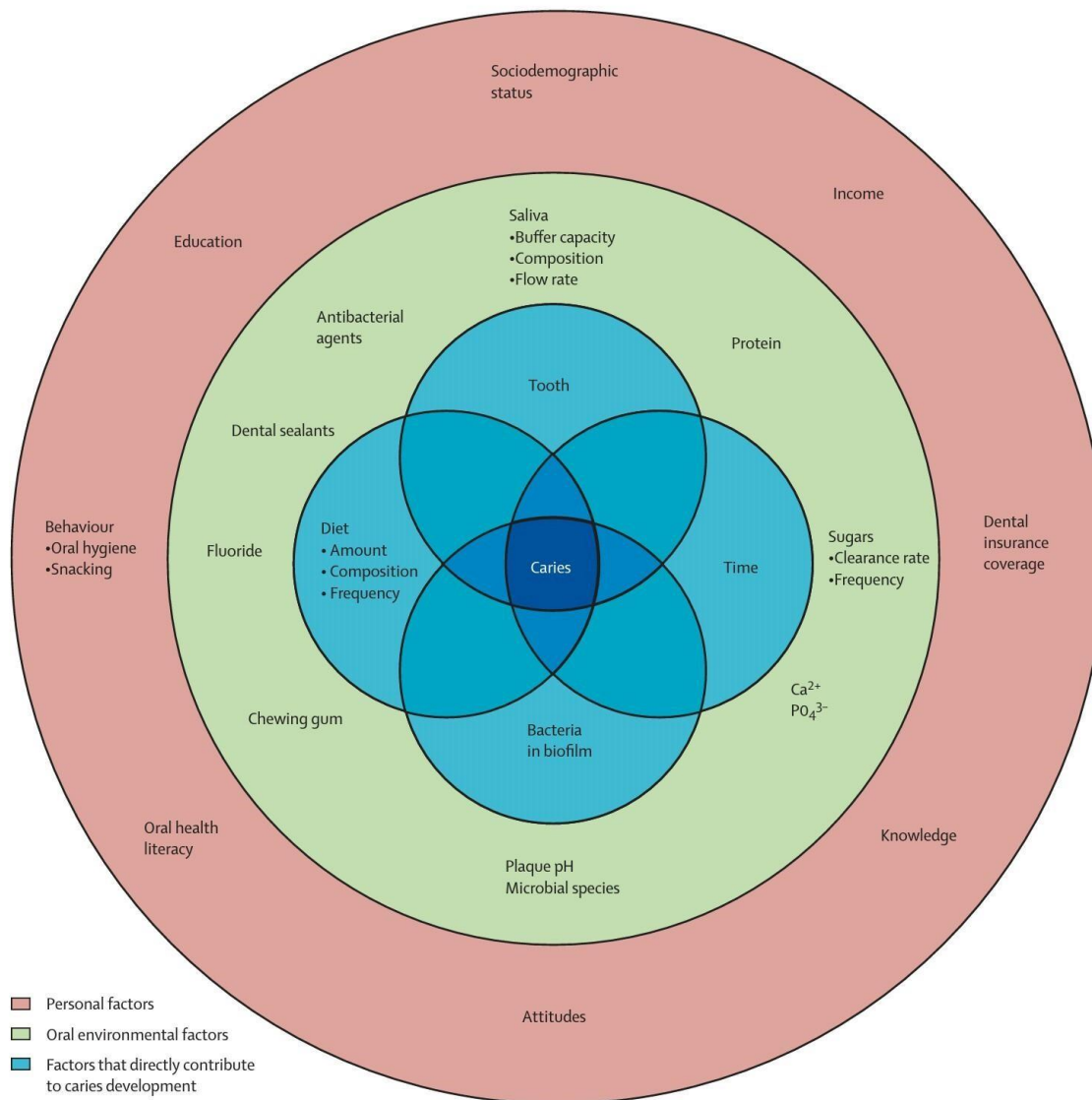


Figura 4. Esquema de los factores involucrados en el desarrollo de caries dental. Tomado de Selwitz et al. (2007)⁵⁶

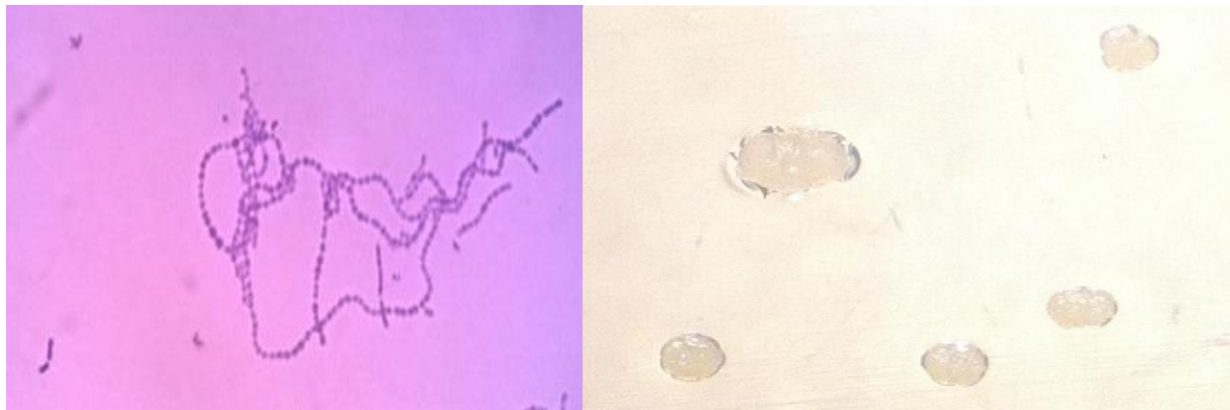
3. *Streptococcus mutans*.

Streptococcus mutans es una bacteria cocácea Gram positivo del género *Streptococcus*, siendo características su asociación en parejas, cadenas largas o cortas según la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo. Su hospedero principal es el humano. Carecen de catalasa y son anaerobios facultativos, cuando se desarrollan en presencia de oxígeno su crecimiento se ve favorecido por una concentración de 5% a 10% de CO₂³⁵.

Su temperatura óptima de crecimiento es de 36±1°C. Su metabolismo es fermentativo, produciendo abundantes ácidos que hacen descender mucho el pH del medio en el que se desarrollan, lo que obliga a utilizar medios amortiguados para evitar su muerte, siendo común la utilización del medio especial selectivo TYCSB (Tryptone Yeast Cysteine Sucrose Bacitracin) para su crecimiento en laboratorio³⁵ (Fig. 5).

A

B



F
i
g
u
r
a

5: A; Cadenas de *S. mutans* teñidas con tinción de Gram, B; Colonias de *S. mutans* crecidas en agar TYCSB. Fotos obtenidas en el Laboratorio de Microbiología Oral, Facultad de Odontología Universidad de Chile.

El crecimiento en caldo es variable, desde turbidez homogénea a granular, pasando por formas descritas como de cometas, a depósitos en el fondo o en las paredes. Desde el punto de vista estructural difieren de otras especies de *Streptococcus* en la ausencia de cápsula y polisacárido C y en los complejos fibrilares y fimbrias que, cuando están presentes, no son muy prominentes al microscopio electrónico³⁵.

La evidencia disponible atribuye a *S. mutans* factores de virulencia que justifican su asociación con el proceso de deterioro de las estructuras mineralizadas del diente, destacándose como los principales la síntesis de polisacáridos extracelulares solubles e insolubles, síntesis de polisacáridos intracelulares, capacidad de formación de biofilm, aciduria y acidogénesis. Actualmente el análisis de estos factores de virulencia ha cobrado relevancia para comprender procesos similares en otros patógenos humanos (Fig. 6)^{30,35,39}.

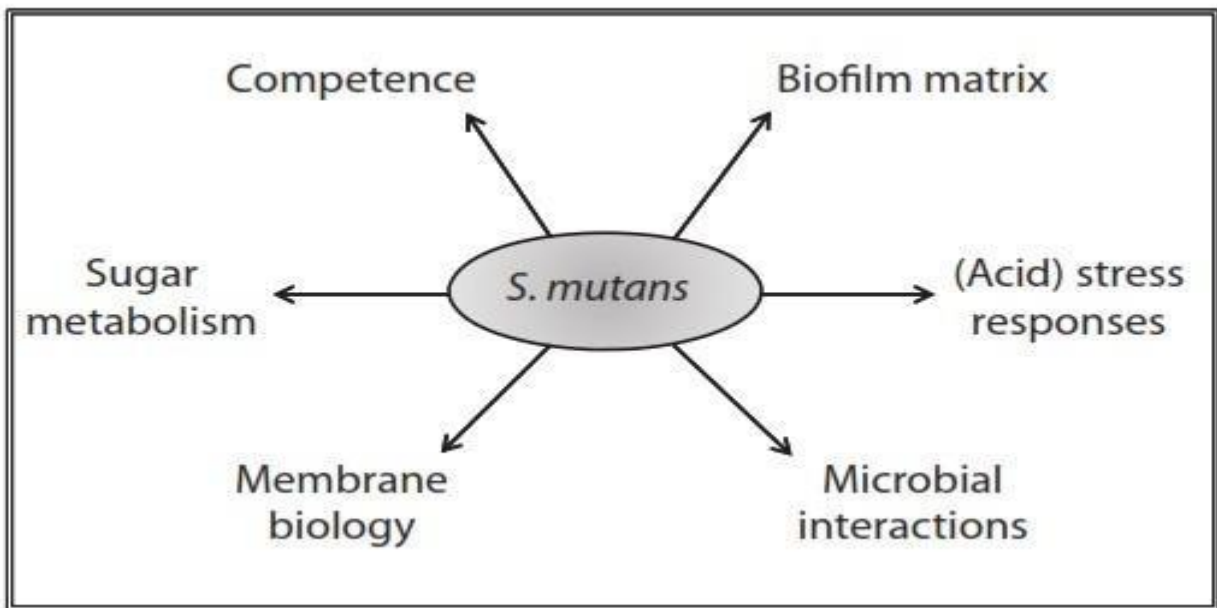


Figura 6. Áreas de la microbiología que han sido ampliamente favorecidas por estudios conducidos en la especie *Streptococcus mutans*. Tomado de Lemos et al. (2013)³⁵

El sustrato más importante para estos microorganismos, como agente etiológico del proceso de caries es la sacarosa, de su metabolización derivan la mayor producción de ácidos y la síntesis de polisacáridos intra y extra celulares^{20,46,59}. La mayor parte de ella es empleada como fuente energética para su desarrollo.

Sólo una pequeña parte de la sacarosa es derivada para la formación de polisacáridos estructurales, dextranos, mutanos y fructanos⁵⁹.

La formación de estos productos se debe a la acción de una o varias enzimas denominadas glucosiltransferasas (GTFs) y fructosiltransferasas (FTFs), las que escinden la molécula de sacarosa y polimerizan los monosacáridos transfiriendo grupos glucosídicos o fructosídicos respectivamente a aceptores de glucanos o fructanos preexistentes³⁰.

Las glucosiltransferasas que determinan glucanos insolubles son de peso molecular elevado (GTF-I), mientras que las que lo hacen con glucanos solubles poseen un peso molecular bajo (GTF-S). Estas proteínas enzimáticas pueden aparecer localizadas en las superficies bacterianas, libres en el medio ambiente o adsorbidas a la película adquirida; en todos estos casos, mantienen su capacidad de sintetizar glucanos, lo que les permite ser el nexo de unión entre bacterias que posean proteínas fijadoras de glucano^{5,30}.

Tras la discusión frente al rol de los diferentes polisacáridos producidos por *S. mutans*, se estima que los glucanos solubles y los fructanos son fácilmente degradables por enzimas bacterianas, las que generan subproductos utilizables de bajo peso molecular, por lo que suelen desaparecer con facilidad del biofilm. Por el contrario, los glucanos insolubles son degradados con dificultad por las bacterias, poseen propiedades adherentes y forman parte importante de la matriz acelular del biofilm, a la que se unirán las proteínas fijadoras interviniendo en el fenómeno de agregación bacteriana^{3,30} (Fig. 7).

S. mutans sigue siendo sensible a una amplia gama de antimicrobianos, como betalactámicos, macrólidos y lincosaminas. En los últimos años se ha observado una lenta y progresiva pérdida de sensibilidad y se han descrito cepas con elevados grados de resistencia a los aminoglucósidos y tolerantes a penicilina^{10,34,35}.

Se ha descrito que *S. mutans* está ampliamente distribuido, no solamente en poblaciones con una alta o moderada prevalencia de caries, sino también en poblaciones con baja o nula experiencia de caries dental^{7,9,23,24,45}.

Diversas hipótesis han planteado como posible explicación, la diversidad genotípica de *S. mutans* presente en la cavidad bucal de distintas poblaciones humanas, la que podría determinar distintos niveles de riesgo de presentar la enfermedad asociados a la expresión diferencial de los factores de virulencia^{12, 17,49}.

Actualmente, se reconoce la heterogeneidad genética entre las distintas cepas de *S. mutans*^{12,34,45,46}, sin embargo la relación entre dicha diversidad genética y la actividad e historia de caries, aún es controversial (fig. 8). Alaluusua et al. sugirieron que niños con caries activas y alto consumo de sacarosa eran portadores de una mayor cantidad de biotipos de *S. mutans*⁶, en comparación con niños libres de caries, y Kreulen et al. evidenciaron una correlación negativa entre la actividad de caries y la diversidad genotípica²⁹.

Estudios que han usado metodologías que permiten la fenotipificación y/o genotipificación sugieren que la madre es la principal fuente de infección en niños portadores de *S. mutans*^{11,28,36} y que la saliva es el vehículo principal para esta transferencia⁵⁴. Sin embargo, la detección de genotipos que no son encontrados en las madres o en otros miembros cercanos de la familia indica que *S. mutans* puede ser adquirido horizontalmente de otras fuentes¹².

Además, la variabilidad en la transmisión puede ser asociada a las susceptibilidades individuales de los niños como el número y tipo de piezas erupcionadas, la presencia de hipoplasias de esmalte, fluorosis, cantidad de carbohidratos disponible, producción de saliva, acción de factores salivales, además de las condiciones inmunológicas de los niños³⁷.

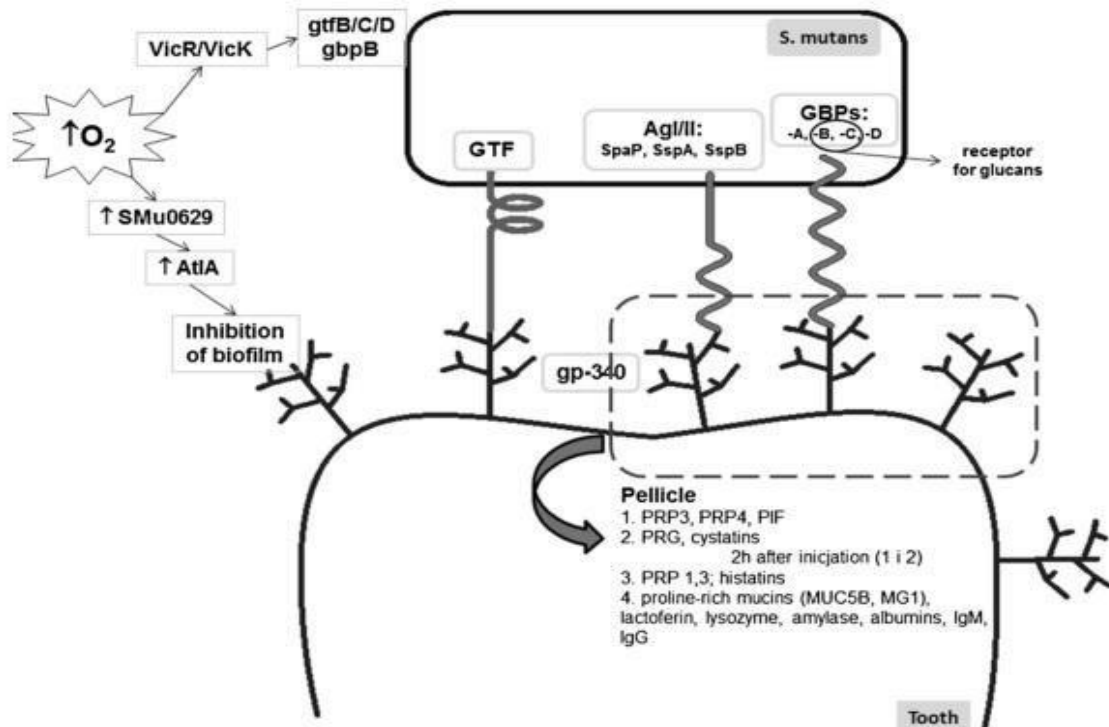


Figura 7. Esquema con los factores de virulencia de *Streptococcus mutans* involucrados en la colonización de la superficie dental y en la formación del biofilm. En una primera etapa en el desarrollo del biofilm, *S. mutans* se adhiere a la superficie del diente a través de enzimas de la familia de las glucosiltransferasas (GTF), elementos indispensables para la adhesión de *S. mutans*. Otro grupo de adhesinas denominadas antígeno I/II y proteínas de unión a glucanos (GBP's) interactúan con proteínas de la pellicula adquirida y del biofilm, favoreciendo la colonización. Tomado de Krzysciak et al(2014).

Se ha descrito que los niños poseen entre una a cinco cepas diferentes de *S. mutans* a distintas edades y que su distribución entre distintos sitios de la cavidad bucal, dorso de lengua, mucosas y biofilm dental, es homogénea^{26,57,58}.

Estudios en relación a la colonización inicial de *S. mutans* indican que es necesaria la presencia de superficies dentarias para el establecimiento del microorganismo^{12,42}, pero métodos más sensibles basados en técnicas moleculares sugieren que el dorso de la lengua puede funcionar como reservorio en lactantes edéntulos para la posterior colonización de los tejidos dentarios⁵⁸. No obstante, existe poca evidencia en relación a la estabilidad de los genotipos detectados al momento de la adquisición inicial.

Existe evidencia que cepas de *S. mutans* capaces de colonizar tempranamente la cavidad oral pueden mantenerse de manera estable por muchos años, aunque algunas de estas cepas pueden *no* ser detectadas en los mismos individuos en años posteriores⁴¹. Klein et al (2004) identificaron en un grupo de niños, un total de 52 genotipos distintos de los cuales sólo 16 eran compartidos con la madre, sin embargo se observó una tendencia a la mantención de dichos genotipos a lo largo de la vida de los niños²⁶.

Una posible explicación para este fenómeno es que la interacción entre dichos genotipos y la respuesta del hospedero interfiera con la colonización de otros genotipos, menos preparados para ocupar el nicho ecológico^{37,46}. Además, el rol de la madre en la infección también sugiere la transmisión de anticuerpos IgAs presentes en su saliva, los que permitirían la sobrevivencia selectiva de las cepas mejor adaptadas^{4,46}.

En un estudio realizado en adultos jóvenes, Redmo-Emanuelsson et al. (2003) encontraron un máximo de siete genotipos distintos en sujetos con historia de caries⁵³. Estos resultados son consistentes con ensayos en una población de Brasil, de Napimoga et al. (2004), quienes obtuvieron resultados similares⁴⁵.

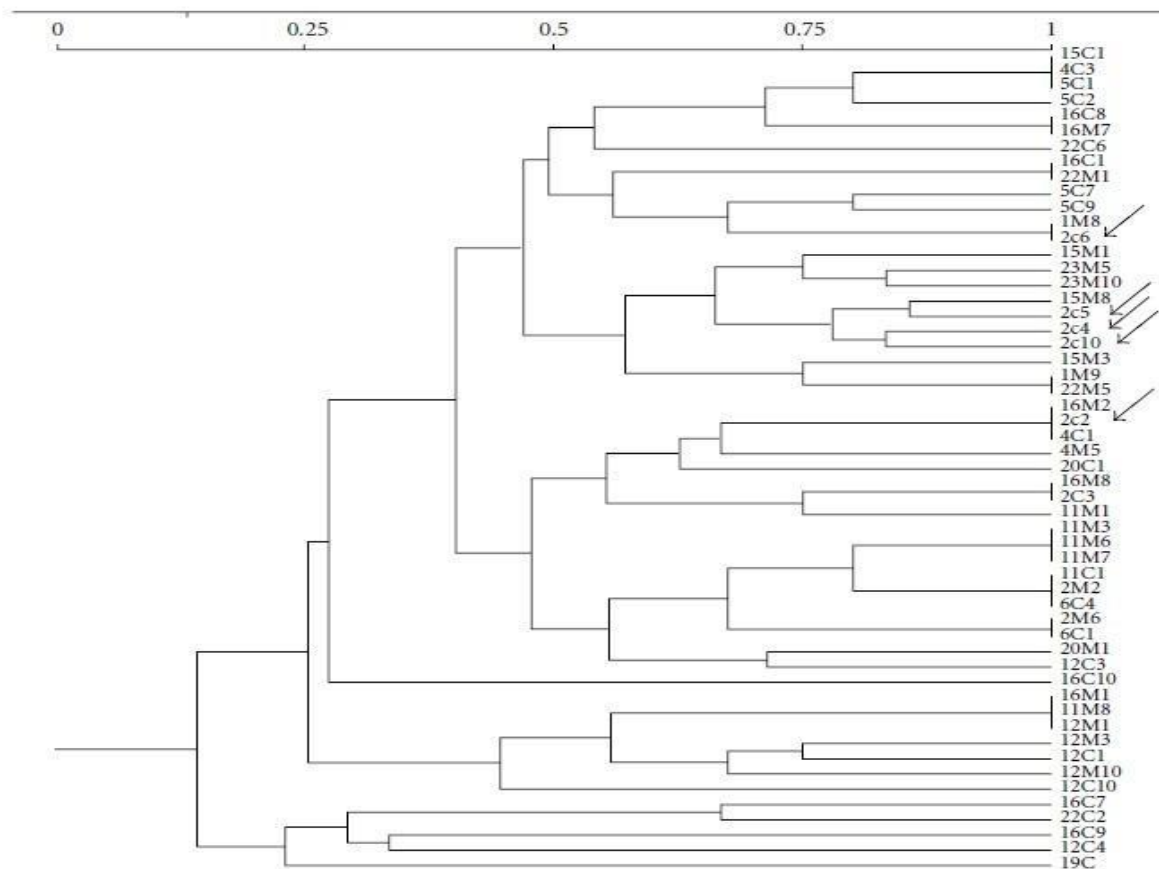


Figura 8. Dendrograma que ilustra la diversidad genética de aislados de *S. mutans* obtenidos de preescolares con diferentes experiencias de caries. Tomado de Peralisi et al. (2013)

Ensayos en una población de niños brasileños entre cinco y ocho años de edad, demostraron que era posible encontrar entre uno a tres genotipos diferentes de *S. mutans* en dicha población, y que los genotipos encontrados en niños con lesiones de caries activas tenían una mejor respuesta a stress por ácido en relación a las cepas de los niños libres de caries^{6,17,45,53}.

La existencia de varios genotipos de *S. mutans* en el biofilm se podría entender como una consecuencia de la mayor capacidad de adaptación de dichas cepas al medio, pero también sería posible que la acción simultánea de diferentes cepas, con distinta expresión de factores de virulencia, pudiese incrementar el riesgo de caries^{4,13,34,46,49,57}.

4. Epidemiología de la caries dental en preescolares chilenos.

La evidencia disponible señala que las actividades preventivas y educativas son fundamentales para reducir los niveles de enfermedades de la cavidad bucal, pero a nivel de intervenciones masivas comunitarias, estas han sido poco eficaces en reducir de manera considerable los niveles de caries en niños menores de 6 años⁴⁸.

La caries dental presenta la más alta prevalencia entre las enfermedades infecciosas crónicas de los niños y es uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial.

Como ocurre en otros grupos etarios, la mayor parte de los menores de 6 años que presentan la enfermedad no reciben tratamiento pese a la cobertura garantizada. Se ha asociado la caries dental a un mayor ausentismo escolar, y laboral por parte de sus cuidadores, bajo rendimiento académico y afectación del desarrollo normal del individuo⁸. Es por esto que planes de salud bucal integrales se vuelven críticos, sobre todo en la población más vulnerable.

Dentro de los Objetivos Estratégicos y Metas de Salud Bucal para el periodo 2011-2020 del MINSAL, el objetivo en salud bucal de prevenir y reducir la morbilidad bucal de mayor prevalencia en menores de 20 años con énfasis en los más vulnerables, tiene como meta aumentar en un 33% la prevalencia de ausencia de caries en niños de 6 años⁴³.

Con este propósito, es fundamental cambiar el paradigma actual en base a los resultados obtenidos en nuestro país y a las experiencias internacionales, que evidencian que la salud bucal a los 6 años de niños en situación de pobreza sólo mejorará comenzando por prevenir, controlar y sanar la patología en la niñez temprana y haciendo partícipe de ello a toda la comunidad involucrada en el desarrollo del sujeto⁴⁸.

En Chile, la información sobre la salud bucal en niños preescolares todavía es limitada. Un estudio del año 2003 sobre caries del biberón en niños de 2 a 4 años de edad, pertenecientes a jardines infantiles JUNJI de la R.M. de Santiago, evidenció que el 33.7% de los niños presentaban caries dental y destacó la necesidad de incorporar programas educativos y preventivos desde el primer año de vida de los niños¹⁸.

En el año 2007, un estudio sobre la salud bucal de niños pre-escolares de 2 a 4 años de edad de la R.M. de Santiago, conducido por el MINSAL², mostró que el 83% de los niños de 2 años no presentaban historia de caries dental, mientras que a los 4 años, el porcentaje de niños sin caries disminuía al 52%³.

Sumado a esto, un estudio realizado en 2011 para determinar la prevalencia y severidad de la caries temprana de la infancia (CTI) y de algunos factores asociados, en niños de 2 y 4 años de edad atendidos en el Hospital de Calbuco, mostró que la prevalencia de CTI era de un 70% con una severidad de un 52%.

Se encontró además, una asociación estadísticamente significativa entre CTI y variables tales como edad, ruralidad, estado nutricional, uso biberón nocturno e índice de higiene oral simplificado⁶⁴.

Posteriormente, en 2010, estudiando la prevalencia de caries dental en niños preescolares de 3 a 5 años de dos comunas de la RM, se reportó que el 24% de los niños de Maipú estaban libres de caries contrastando con el 55% en Peñalolén, diferencia que se asoció al uso de agua potable fluorurada en esta última, frente a la no disponibilidad de ella en Maipú⁶³.

De lo anterior se puede inferir que la población chilena presenta distintos niveles de riesgo, debido a los distintos factores que confluyen en el desarrollo de la caries dental (fig. 9).

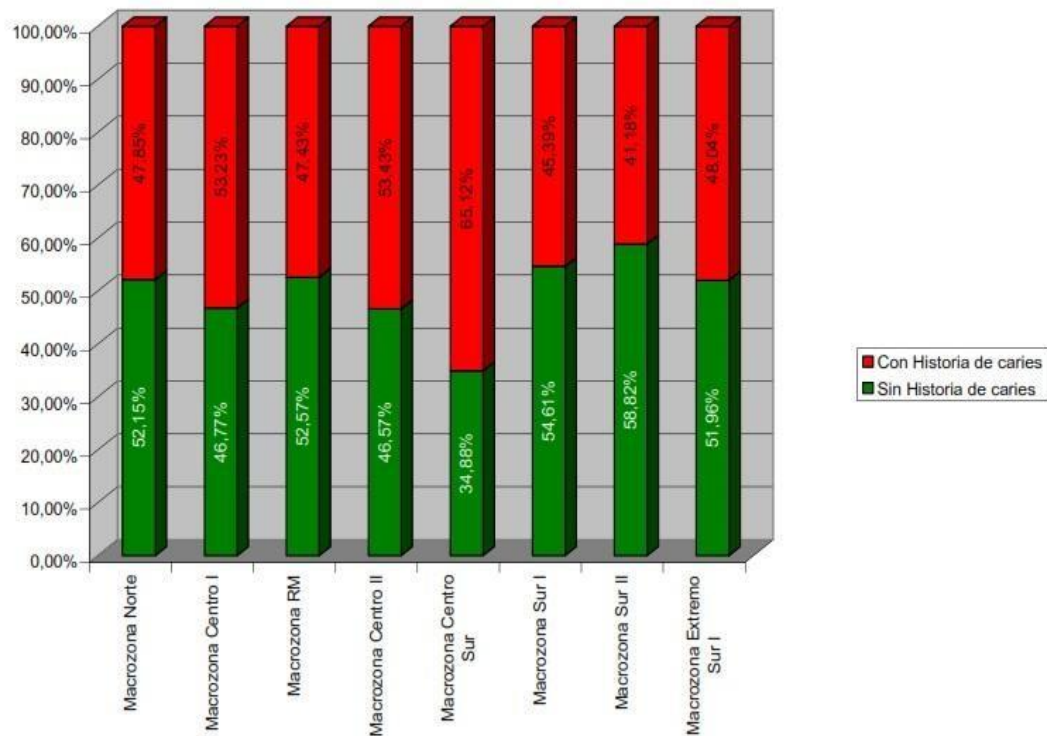


Figura 9 Prevalencia de historia de caries según macrozona en párvulos de 4 años. Chile 2007-2010. Tomado de MINSAL (2010)⁴⁴

Actualmente los programas de salud pública bucal en niños invierten la mayor parte de sus recursos y tiempo, por parte de los odontólogos y el personal de apoyo, en labores restauradoras, lo que trae consigo grandes costos económicos y no necesariamente logra modificar los factores que permitirán regular y controlar el proceso infeccioso en el futuro, a pesar de los esfuerzos de varios actores, entre ellos el Estado, por cambiar este concepto⁴⁴. El problema radica en que, en el momento en que el niño logra tener acceso garantizado a una atención odontológica, el daño acumulado provoca casi irremediablemente que los recursos sean destinados en su mayoría, a tratar tardíamente las secuelas de la patología.

Hasta el momento, no existe evidencia a nivel nacional que caracterice fenotípicamente cepas de *S. mutans* provenientes de preescolares y, a nivel mundial, la evidencia respecto de la relación entre diversidad de cepas presentes en la cavidad bucal y la expresión diferencial de factores de virulencia es acotada.

Entender cómo se comportan y se distribuyen distintas cepas de *S. mutans* y su capacidad para expresar diferencialmente sus factores de virulencia resulta útil para establecer grupos de riesgo portadores de cepas más virulentas, en los que sean necesarias medidas específicas de promoción, prevención, control y tratamiento de la caries dental. Hoy en día, uno de cada dos preescolares chilenos ha padecido caries, con el daño económico, de desarrollo biológico, cognitivo y emocional que esto conlleva.

Contribuir a sentar bases para la mejor comprensión del proceso patológico y del rol que juegan diferentes fenotipos de *S. mutans* en la etiopatogenia y epidemiología de la caries es de interés de acuerdo a la literatura analizada, por lo que en esta unidad de investigación se propone evaluar la correlación que puede existir entre la expresión diferencial de factores de virulencia asociados a caries de distintas cepas de la especie bacteriana *S. mutans* aisladas de la cavidad bucal de niños chilenos con distinta historia de caries.

Hipótesis:

En base a los antecedentes presentados, en este estudio se propone trabajar bajo la siguiente hipótesis:

“Aislados de *Streptococcus mutans* obtenidos de párvulos con experiencia de caries, poseen mayor resistencia al stress ácido, capacidad de adherencia y resistencia a antimicrobianos, que aislados de párvulos sin experiencia de caries”

Objetivo General.

Demostrar que aislados de *Streptococcus mutans* de la cavidad oral de párvulos con experiencia de caries, poseen mayor capacidad de virulencia que aislados de párvulos sin experiencia de caries.

Objetivos Específicos.

1. Aislar e identificar a nivel de especie, colonias de *S. mutans* provenientes de la cavidad oral de párvulos chilenos, con o sin experiencia de caries, mediante su identificación macroscópica y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
2. Evaluar comparativamente la resistencia al stress ácido de los aislados de *S. mutans* obtenidos de niños con o sin experiencia de caries.
3. Analizar la capacidad de formación de biofilm “*in vitro*”, en presencia de sacarosa, de los aislados de *S. mutans*.
4. Estudiar comparativamente la sensibilidad de los aislados de *S. mutans* de niños con o sin experiencia de caries, frente a una batería de agentes antimicrobianos.

Materiales y métodos.

1. Población en estudio

En este estudio se invitó a participar a un grupo de párvulos ($n=12$), de 3 a 4 años de edad, niñas y niños del Jardín Infantil Antü Liwën de la comuna de la Pintana, RM de Santiago, Chile. Este es un Jardín Infantil al que concurren párvulos con alto índice de vulnerabilidad.

Párvulos que presentaron enfermedades sistémicas o crónicas, y/o que habían recibido tratamiento con antibióticos durante los dos meses previos al examen, fueron excluidos de participar.

En este estudio fueron incluidos niñas ($n= 7$) y niños ($n= 5$) sanos sistémicamente, que no estaban, ni habían estado bajo tratamiento farmacológico, en los últimos 3 meses. A los padres o apoderados de todos los párvulos seleccionados se les solicitó la firma de un consentimiento informado como requisito para participar en este estudio (Anexo 1).

Luego, a cada niño se le solicitó verbalmente su consentimiento antes del examen clínico y la toma de muestra, ambos realizados siempre en presencia de su educadora. El examen clínico fue realizado por un único evaluador calibrado, para determinar la evolución de la dentición temporal e índice ceo-d de cada párvulo (ICB).

En base a este examen, los niños seleccionados se ordenaron en dos grupos: A: ceo-d =0, y B. ceo-d > 0.

Después de obtenerse la muestra microbiológica los niños participaron, si así lo quisieron, en diversas actividades educativo-preventivas y lúdicas, realizadas en recintos del Jardín por odontólogos y estudiantes capacitados.

A los niños y niñas participantes del estudio que presentaron caries se les invitó a ser atendidos en la Clínica Móvil de la Facultad de Odontología, en el contexto del programa “Seamos sonrisas” de la Dirección de Extensión. En caso necesario, se asesorará su derivación al servicio de salud que corresponda según el caso.

El procedimiento experimental usado en este estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Bioética (Anexo n°2).

2. Toma de muestras para cultivo microbiológico.

Las muestras microbiológicas para cultivo de microbiota bucal de cada niño, fueron obtenidas mediante hisopado firme durante 10 segundos, con hisopo de algodón estéril, desde el dorso lingual, encías, superficies bucales lisas de los dientes y de las superficies afectadas por lesiones de caries.

El hisopo fue separado de su mango y depositado en un tubo con 1 ml de PBS estéril, a 4°C. Estos tubos fueron mantenidos a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio de Microbiología Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. El tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y su procesamiento nunca sobrepasó las dos horas.

3. Obtención de aislados de *Streptococcus mutans*

En el laboratorio, las muestras fueron agitadas vigorosamente durante 30 segundos y luego diluidas en PBS estéril hasta 10^{-3} . Todo el proceso se realizó a 4°C. 100 µl de cada dilución fueron sembrados en duplicado en placas de agar TYCSB (Trypticase, Yeast, Casitone, Sucrose 10% y Bacitracina 0,2 U/ml).

Las placas de Petri sembradas fueron cultivadas por 48 horas en jarras con condiciones de capnofilia, a 37°C en una estufa de cultivo y posteriormente, en base a su morfología colonial evaluada bajo lupa estereoscópica (Stemi 2000C, Zeiss) fueron aisladas mediante resiembra.

Se obtuvo hasta 8 aislados bacterianos por cada niño, en base a la morfología colonial, priorizando la inclusión de colonias con diferencias morfológicas evidentes, compatibles con la morfología colonial de *S. mutans*, descrita para el medio de cultivo utilizado.

Cada colonia individual fue transferida a 5 ml de caldo cerebro-corazón (Brain-Heart Infusion, BHI, Broth, Difco Laboratories) y cultivada durante 20 horas en capnofilia, a 37°C.

Se procedió a tomar una alícuota de 500 µl que fue mezclada con 500 µl de glicerol y conservada a -20°C. Para reactivar las cepas se tomó una alícuota de 100 µl del tubo descongelado por 10 minutos a temperatura ambiente y se resembró en 5 ml de medio líquido BHI. Las cepas que no presentaron crecimiento posterior a esta etapa fueron descartadas.

Como cepa de referencia se utilizó *S. mutans* ATCC 38668, gentileza de la doctora María Teresa Ulloa, ICBM, Facultad de Medicina Universidad de Chile.

4. Obtención de DNA genómico de los aislados de *S. mutans*.

Los aislados mantenidos a -20°C se descongelaron a temperatura ambiente durante 20 minutos y 100 µl de éstos fueron transferidos a 5 ml de caldo BHI, donde se incubaron por 20 horas en condiciones de capnofilia a 37°C

Posteriormente, alícuotas de 1000 µl fueron centrifugadas a 14.000 rpm (Eppendorf 5417R) durante 5 minutos a 4°C, se repitió el proceso dos veces, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 200 µl de PBS agitando a velocidad media por 1 minuto.

Con ayuda del kit de extracción de ADN QIAampR DNA Mini Kit, se procedió a obtener muestras del material genético bacteriano según el protocolo inserto en el producto.

5. Identificación de aislados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

a) Identificación de ADN genómico bacteriano en las muestras

Inicialmente, para confirmar la presencia de ADN bacteriano en las muestras, el ADN obtenido se analizó utilizando dos partidores universales que amplifican un fragmento de 512 pb del genbacteriano de DNA ribosomal de 16 s (DNAr 16s). En un tubo para PCR se agregó 4 µl de MyTaq Red Mix (Bioline), 4 µl de DNA genómico de cada cepa, 5 µl de partidore PU1F 5`-GCCTACAGCTCAGAGATGCTATTCT-3 y 5 µl de partidore PU1R 5`-GCCATACACCACTCATGAATTGA-3`. Se completó el volumen de 25 µl con agua bidestilada desionizada estéril de grado molecular³⁴.

El programa de ciclaje térmico fue denaturación inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos con denaturación a 94°C por 15 segundos, alineamiento a 60°C durante 15 segundos y extensión a 72°C por 45 segundos, con un paso de extensión final a 72°C por 10 minutos.

Se preparó agarosa al 1,5% en tampón TAE pH 7,9, al que se agregaron 4 µl de RED Stain. Se cargaron 18 µl de mix de PCR en cada bolsillo del gel de agarosa.

b) Identificación de los aislados a nivel de especie.

Para la identificación a nivel de especie de los aislados obtenidos, se realizó una PCR con partidores específicos para el gen *gtfB*, que la literatura describe como un gen altamente conservado en cepas de *S.mutans* (forward 5`-ACTACACTTTTCGGGTGGCTTGG-3` y reverse 5` CAGTATAAGCGCCAGTTTCATC-3`) dando como producto de la reacción un amplicón de 114 pb³⁴.

Las reacciones de amplificación fueron llevadas a cabo en un volumen final de 25 µl que contenía: 1.5 µl de Tampón PCR 10X pH 8.4 (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.3); 0.3 µl de dNTP's 10 mM, Invitrogen®; 0,6 µl de MgCl₂ 50 mM; 0,6 µl de cada partidor Forward y Reverse 25 µM, Alpha DNA®; 0.2 µl de la enzima ADN polimerasa de *Thermus Aquaticus*, Biolase®; y 1, 3 ó 5 µl de ADN obtenido.

El programa de ciclaje térmico se realizó en un termociclador Labnet® y consistió en un paso de denaturación inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de denaturación a 94°C por 15 segundos, alineamiento a 60°C durante 30 segundos y extensión a 72°C por 60 segundos, con un paso de extensión final a 72°C por 10 minutos.

Como control positivo se utilizó la cepa de referencia ATCC 38668 de *S. mutans* y como control negativo se utilizó agua y ADN genómico proveniente de una cepa de *P. gingivalis*.

Los productos obtenidos en PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 1,5%.

La agarosa fue disuelta en tampón TAE pH 7,9 (40mM Tris-HCl, 5mM acetato de sodio, 1mM EDTA).

Se llevó a ebullición por calentamiento y luego se dejó enfriar hasta que la solución alcanzó una temperatura aproximada de 50°C a 55°C; se agregó 4 µl de STAIN RED, y fue vertida en una placa de acrílico provista de un peine con espaciadores de 0,5 mm. Se dejó gelificar a temperatura ambiente por 20 minutos^{33,34}. El gel fue dispuesto en una cámara de electroforesis horizontal que contenía tampón TAE.

Se depositaron 18 µl de cada muestra de PCR en los bolsillos del gel. Para la determinación del tamaño molecular de los fragmentos de ADN amplificados, se utilizó como estándar DNA ladder 100 pb plus de Fermentas®.

La electroforesis se corrió a 78 Volts durante una hora y luego los geles se observaron en un transiluminador dual UV DNA light, Labnet International® a una longitud de onda 302nm.

Cada gel fue registrado tomando una fotografía, mediante cámara digital con filtro polarizador ²⁸.

6. Caracterización fenotípica de los aislados

a). Ensayo de capacidad acidúrica

Los aislados congelados fueron resembrados en 5 ml de caldo BHI+1% sacarosa y cultivados a 37°C en condiciones de capnofilia durante 20 horas.

Se vortearon a velocidad media por 30 segundos y se tomaron 50µl de la suspensión para resiembra en un tubo eppendorf con 1,2 ml de BHI, suplementado al 1% con sacarosa. Los tubos se cultivaron por 3 horas a 37°C. Este ensayo se realizó en duplicado por cada cepa.

Los tubos anteriormente descritos se centrifugaron (centrífuga refrigerada Eppendorf 5417R) a 8000 RPM x 1 minuto, a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 1ml de buffer glicina 0.1M 2,8 pH a uno de los tubos eppendorf cultivados y buffer glicina 0.1M 7,0 pH al duplicado usado como control.

Se tomaron alícuotas de 100 µl de la resuspensión: en tiempo cero (T0), 30 (T1) y 60 (T2) minutos.

Las alícuotas fueron diluidas en serie desde 10^{-1} hasta 10^{-3} y 100 µl de cada dilución se sembró en placa de agar TYCSB. Todas las placas fueron cultivadas en jarra bajo condiciones de capnofilia por 48 horas, para estimar la capacidad de resistencia al stress ácido de cada cultivo.

La viabilidad de las células a distintos momentos fue leída como el número de UFC/ml en relación al tiempo cero ³⁰.

b). Ensayo in vitro de la capacidad de formación de biofilm, de los aislados de *S. mutans*

La capacidad de formación de biofilm fue analizada “in vitro”, en placas de poliestireno, de 96 pocillos de base plana, estériles y sin carga eléctrica (Falcon).

Alícuotas de 100 µl de los aislados fueron resembradas en BHI fresco y cultivadas hasta fase exponencial, durante 20 horas a 37°C, en jarra con condiciones de capnofilia. La lectura inicial de densidad óptica después de este tiempo de incubación fue de 0.5 a 0.6, a 600 nm. ($OD_{600}=0.5-0.6$). Todos los ensayos se realizaron en duplicado.

Cada cultivo fue diluido en BHI fresco hasta una absorbancia de 0,125 nm (McFarland 1,5) medida en espectrofotómetro (Dynamica Halo RB-10). De esta dilución se tomaron 100µly se depositaron en cada uno de los pocillos de la placa, la que se llevó a cultivo a 37°C en condiciones de capnofilia, durante 48 hrs.

Después de este tiempo, se eliminó el medio de cultivo (sobrenadante) de las placas y los pocillos fueron lavados dos veces por inmersión en agua destilada estéril. Posteriormente, 100 µl de una solución de cristal violeta disuelto en agua bidestilada estéril fue inoculada en cada pocillo, y cada placa fue incubada a temperatura ambiente por 15 minutos, para la posterior eliminación del colorante residual mediante dos lavados por inmersión en agua destilada estéril.

Se añadió a cada pocillo 100 µl de alcohol al 95%, el que se mantuvo por cinco minutos. Posterior a este tiempo, se recuperaron los 100 µl con el colorante eluído, y se transfirieron a una placa nueva para medir su densidad óptica a 490 nm. Con este fin las placas fueron procesadas según protocolo y leídas con lector universal de microplacas (ELx800, Bio-Tek Instruments, inc.).

El nivel de formación de biofilm se estimó normalizando las lecturas obtenidas mediante el analizador de placas de Elisa, respecto del 100% asignado a la lectura mayor. A mayor absorbancia del eluido, mayor capacidad de formación de biofilm del aislado^{30,32,34}.

c) Ensayo mediante pruebas de difusión, de la resistencia a antimicrobianos de los diferentes aislados de *S. mutans*.

Aislados de *S. mutans* de niños con o sin caries fueron crecidos en caldo BHI, 1% Sacarosa. Para el ensayo de resistencia a antimicrobianos, los aislados fueron resuspendidos en PBS según protocolo, hasta una concentración equivalente al 0,5 de la escala visual McFarland® y sembradas en placas de Petri de 100 x 15mm, que contenían agar TYCS. Las placas fueron cultivadas en jarras de capnofilia por 48 horas a 37°C.

Posterior al tiempo de incubación, se procedió a medir con regla milimetrada el diámetro de los halos de inhibición producidos alrededor de cada disco cargado de agente antimicrobiano (Sensidiscos), registrándose los resultados en una planilla de Excel. El nivel de resistencia/susceptibilidad de cada aislado a los diferentes antimicrobianos ensayados se estableció de acuerdo a tablas estándares (anexo 3)

7. Análisis estadísticos de los resultados.

Los resultados obtenidos en este estudio fueron analizados con el paquete estadístico SPSS 21.

Para establecer diferencias de medias entre grupos se utilizó la prueba ANOVA one way y para determinar diferencias específicas entre dos grupos se utilizó la prueba t de diferencias de medias.

La significancia estadística se consideró a $p < 0.05$. Los gráficos se realizaron con Microsoft Excel 2010.

Resultados

I. Obtención de aislados de *S. mutans* a partir de muestras de hisopado de la cavidad bucal de párvulos con y sin experiencia de caries.

Aislados bacterianos para la detección de *S. mutans* fueron obtenidos a partir de las muestras de hisopado de distintos sitios de la cavidad bucal de párvulos chilenos, 7 niñas y 5 niños (n=12) sistémicamente sanos, (6) presentaban caries y (6) , de un jardín infantil de la comuna de La Pintana.

En total se obtuvieron 8 aislados bacterianos por niño, los cuales fueron seleccionados en base a sus características macroscópicas coloniales, similares o compatibles con la morfología descrita para *S. mutans* en el medio de cultivo utilizado. Un aislado por niño se destinó para las reacciones de PCR, análisis de resistencia a stress ácido y susceptibilidad a antibióticos. Para el ensayo de formación de biofilm se utilizaron 7 aislados.

II. Identificación de aislados mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

A. Obtención e identificación de DNA genómico bacteriano

Mediante la reacción de PCR con una pareja de partidores universales para un fragmento de 512 pb del gen del DNAr 16s, se pudo determinar que el DNA extraído de los aislados constituía material genético bacteriano. Como se observa en la Figura 10, en los carriles 4 al 17 se puede apreciar una banda nítida de ADN genómico proveniente de los aislados bacterianos, equivalente en tamaño a la obtenida para el control positivo en carriles 2 y 3 (fig. 10).

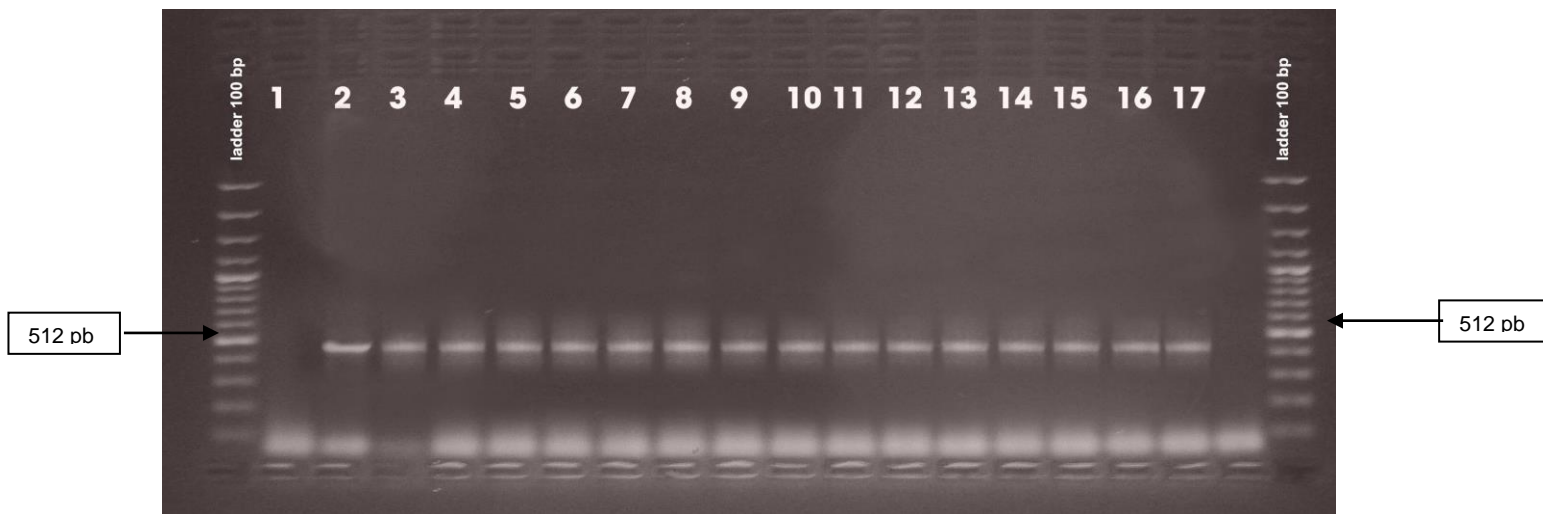


Figura 10: Identificación mediante PCR de ADN bacteriano. Carril 1: control negativo; Carril 2 y 3: Control positivo DNAg *S. mutans* ATCC 38668; Carril 4 al 17 DNAg aislados.

b) Identificación a nivel de especie de los aislados bacterianos.

Como se observa en la Figura 11, el material genético obtenido de los aislados bacterianos sometidos a PCR con una pareja de primers que amplifica un fragmento de 114 pb del gen *gtfB*, permitió su identificación como pertenecientes a la especie *S. mutans*. Los carriles 5 al16, que contienen DNA de los aislados, muestran una banda equivalente al fragmento de 114 pb que identifica al fragmento del gen *gtfB* de *S. mutans*.

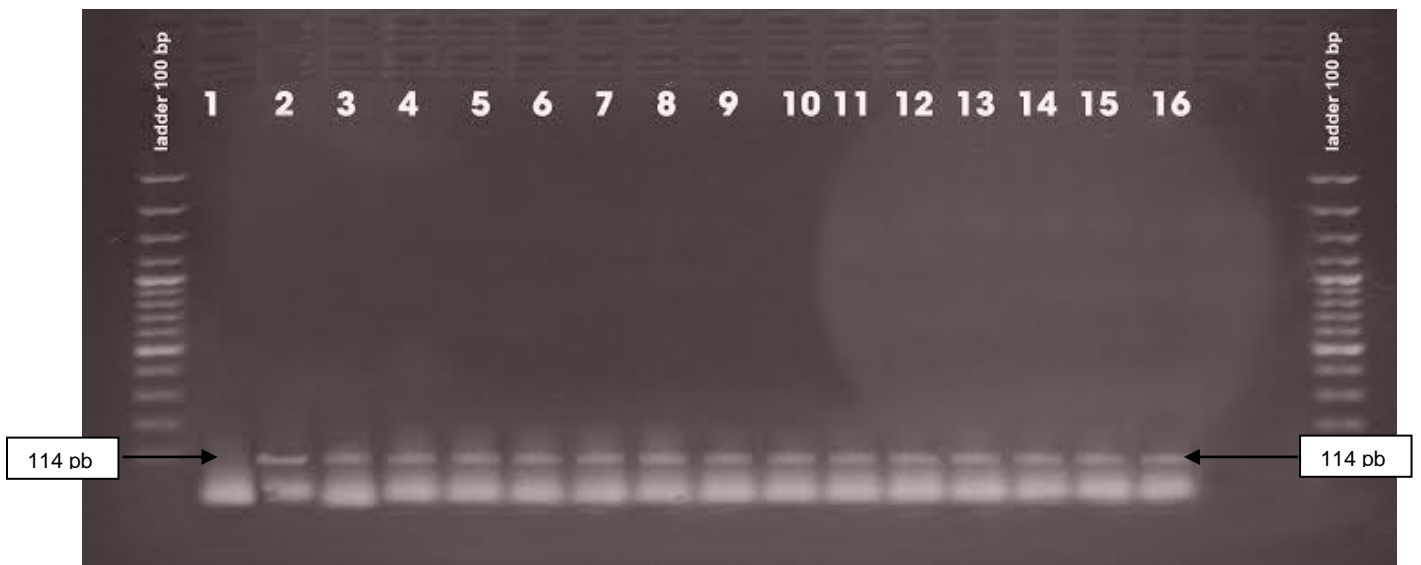


Figura 11: Identificación mediante PCR de un fragmento de 114 pb del gen *gtfB* de *S. mutans*. Carril 1: Control negativo; Carril 2 a 4: control positivo DNAg ATCC 38668 Carril 5 a 16: DNAg de aislados.

III. Capacidad acidúrica: sobrevivencia al stress ácido de los aislados de *S. mutans*.

Luego de 48 horas de cultivo en jarras de capnofilia a 37°C, se procedió al recuento de unidades formadoras de colonias por ml de muestra (UFC/ml) cuando fue posible, de lo contrario se constató como crecimiento bacteriano en césped al que se asignó el valor 2×10^3 UFC/ml.

Se detectaron

que en la prueba en duplicado de control, la curva de sobrevivencia evidencia un número más constante respecto al tiempo 0 (tabla 1, fig. 12).

Tabla 1: Sup

Al crecimiento en césped se asignó el valor de 2×10^3 UFC/ml. Se indica en rojo las cepas provenientes de niños con caries y en verde las cepas provenientes de niños sin caries. Como referencia se usó la cepa de *S. mutans* ATCC 38668. El nombre de cada aislado corresponde a la muestra de origen.

	UFC/ml T0	UFC/ml T1	UFC/ml T2
ATCC 38668	$7,3 \times 10^2$	$4,32 \times 10^2$	$5,6 \times 10^2$
4dc 2	1×10^6	1×10^6	$1,016 \times 10^3$
24.8	1×10^6	1×10^6	1×10^6
37.3	1×10^6	1×10^6	$7,68 \times 10^2$
4 4	$1,12 \times 10^3$	$3,55 \times 10^2$	$7,6 \times 10^2$
5 dc 6	1×10^6	1×10^6	1×10^6
5 dc 4	1×10^2	1×10^6	1×10^6
35.6	$7,44 \times 10^2$	$2,44 \times 10^2$	$5,6 \times 10^2$
6 1	$1,28 \times 10^3$	$9,24 \times 10^2$	$6,88 \times 10^2$
6 3	$1,48 \times 10^3$	$9,76 \times 10^2$	$1,22 \times 10^2$
6 d 6	$7,76 \times 10^2$	$4,45 \times 10^2$	$1,12 \times 10^2$
33.3	7×10^1	3×10^1	1×10^1
36.3	$9,2 \times 10^3$	2×10^1	0

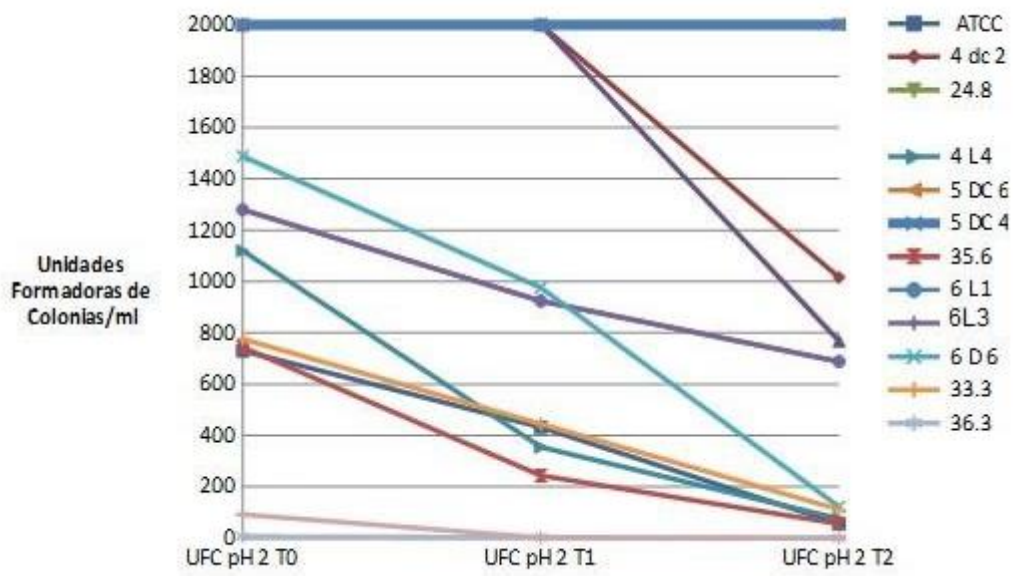


Figura 12: Gráfico de la supervivencia al stress ácido de aislados de *S. mutans*

IV. Capacidad de formación de biofilm “in vitro”, de los aislados de *S. mutans* provenientes de niños con o sin caries.

Luego del cultivo en capnofilia por 48 horas, el crecimiento de biofilm en las placas fue visualizado por tinción con Cristal Violeta, a ojo desnudo y bajo lupa estereoscópica, y fotografiado como se observa en la Figura 13. Luego, las placas fueron procesadas según protocolo (materiales y método) y la densidad óptica del eluido recuperado fue medida en el lector universal de micro placas (ELx800, Bio-Tek Instruments, inc.). Los resultados obtenidos se expresaron como absorbancia a 490 nm y fueron automáticamente ordenados por el lector en orden decreciente.

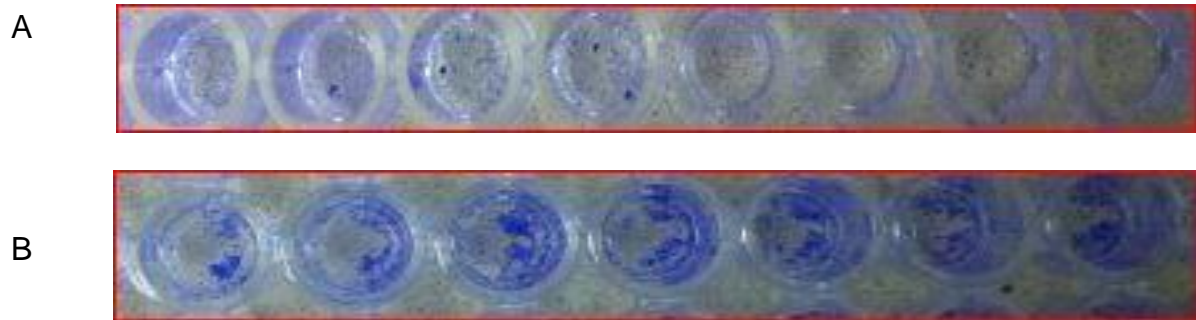


Figura 13: Formación de biofilm en placas de ELISA. Fotografía de la formación de biofilm en dos series de pocillos, después de 48 h de cultivo, antes de ser sometidos a lectura de absorbancia. A: Pocillos conteniendo una cepa proveniente de un preescolar sano; B: Cepa proveniente de lesión cariosa. Imágenes obtenidas en laboratorio de Microbiología Oral, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

En la Figura 14 se puede observar el porcentaje de absorbancia promedio obtenido para los aislados de *S. mutans* de niños con o sin caries, observándose una tendencia a una mayor formación de biofilm en las condiciones de estudio por parte de cepas aisladas de lesiones de caries (fig.14).

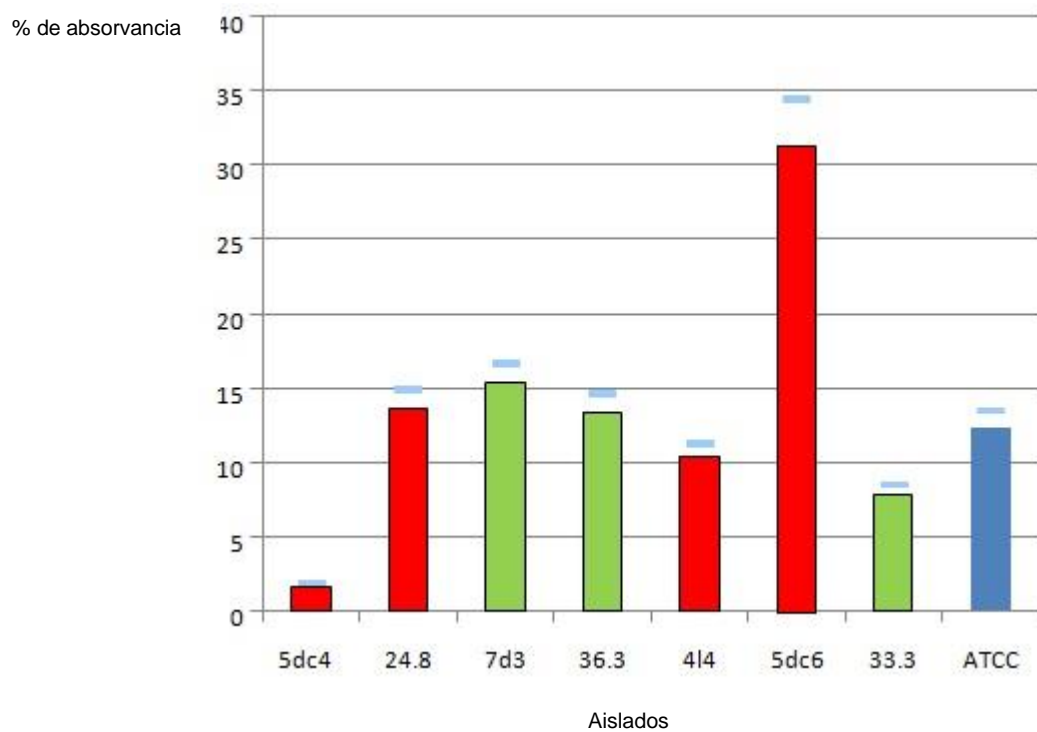


Figura 14. Gráfico que presenta los promedios de porcentajes de absorbancia, normalizados respecto al 100%, de aislados de *S. mutans* provenientes de niños con o sin caries.

V. Ensayo de resistencia ante agentes antimicrobianos: antibiograma por difusión.

Los resultados de este ensayo no mostraron diferencias significativas en cuanto a la inhibición de crecimiento por los antibióticos usados, entre aislados de *S. mutans* provenientes de niños con o sin caries (Fig. 15 y Tabla 3).

La mayor sensibilidad de los aislados se observó frente a Amoxicilina, antibiótico de amplio espectro representante de la familia de betalactámicos (fig. 16).

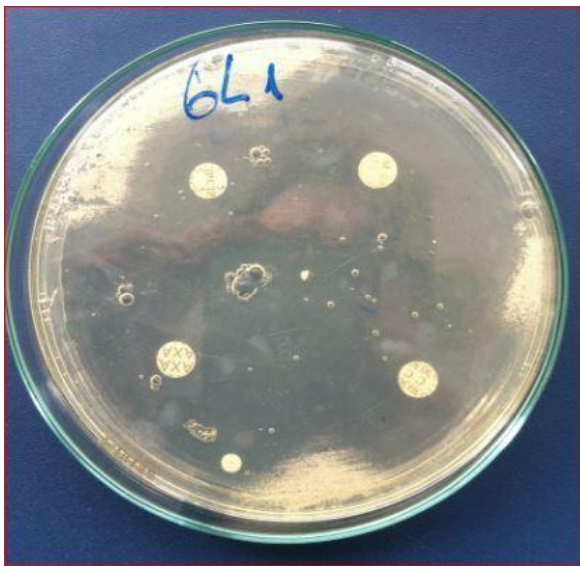


Figura 15: Ejemplos de prueba de resistencia/susceptibilidad, frente a compuestos antimicrobianos. A: cepa proveniente de superficie dentaria sana de párvulo sin experiencia de caries. B: cepa proveniente de lesión de caries.

Tabla 3: Diámetro de halos de inhibición de crecimiento, expresados en milímetros, frente a los diferentes antimicrobianos utilizados, de aislados de *S. mutans* de niños con caries (rojo) y sin caries (verde).

	Halo amoxicilina	Halo Ciprofloxacino	Halo Cloranfenicol	Halo Eritromicina
ATCC 38668	58	24	37	50
4 DC 2	47	24	36	47
24.8	48	22	34	46
37.3	46	26	35	44
4 L 4	76	36	46	64
5 DC 6	40	16	30	40
5 DC 4	42	22	35	44
35.6	46	30	40	52
6 L 1	58	28	38	54
6 L 3	43	24	28	43
6 D 6	50	26	34	42
33.3	54	23	40	48
36.3	46	29	36	50

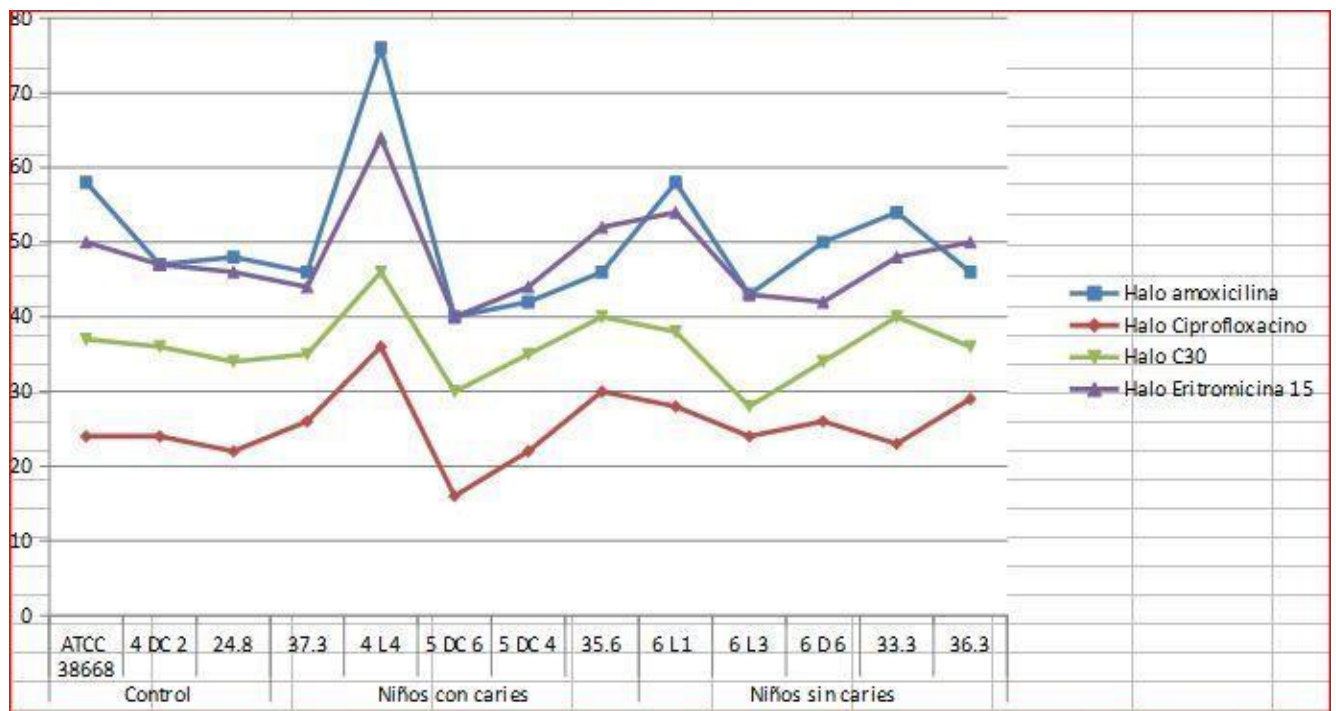


Figura 16: Gráfico representativo de los halos de inhibición en milímetros producidos por los diferentes antimicrobianos.

DISCUSIÓN

Streptococcus mutans (*S. mutans*) es uno de los principales agentes etiológicos de la caries dental, afirmación sustentada por la expresión de diversos factores de virulencia por esta especie, entre los que destacan su capacidad de adherencia y formación de biopelículas, resistencia al stress ácido y producción de ácidos por el metabolismo de azúcares.

La síntesis extracelular de glucanos catalizada por glucosiltransferasas (*Gtfs*) producidas por *S. mutans*, es necesaria para la acumulación de bacterias y la formación del biofilm dental; la aciduria es la capacidad que permite a *S. mutans* sobrevivir y proliferar en ambientes ácidos y la resistencia a antimicrobianos dificulta su eliminación o disminución numérica, cuando estos son utilizados^{5,7,35,39}.

Consecuente con lo anterior, el propósito de este estudio fue demostrar que aislados de *S. mutans* provenientes de niños con experiencia de caries presentan mayor capacidad de virulencia que aislados provenientes de niños sin historia de caries. Con este fin, en este estudio se realizó una caracterización fenotípica mediante ensayos microbiológicos, de los aislados obtenidos.

La evidencia actualmente disponible, expuesta por ejemplo por Redmo (2003) y Napimoga (2004), no es concluyente respecto a la relación entre una mayor diversidad de cepas de *S. mutans* y la historia de caries y no existen a nivel nacional, estudios en la población menor de cinco años respecto a este tema^{29,30}.

Resulta por esto interesante investigar y profundizar en el conocimiento del cambio, desde una microbiota oral comensal a una patógena, aspecto previo a la manifestación clínica del proceso de caries, ya que este factor ha sido identificado como clave en el desarrollo del proceso de caries^{14,20}.

El proceso de toma de muestra microbiológica usado en este estudio, es sencillo, mínimamente invasivo y bien tolerado por los niños, ya que gracias a visitas lúdico-educativas previas, se mostraron confiados y dispuestos a participar, generándose una relación empática y respetuosa entre el párvulo y el examinador.

En este ensayo se utilizó un fragmento del gen *gtfB* para identificar los aislados obtenidos a nivel de especie, puesto que representa un factor de virulencia con una relación íntimamente ligada al cambio microbiológico previo al inicio de las manifestaciones clínicas y es parte del material genético altamente conservado y estudiado de *S. mutans*⁵.

La metodología utilizada permitió la identificación a nivel de especie de todos los aislados obtenidos mediante el hisopado de las cavidades orales de los preescolares.

No obstante el rendimiento de esta técnica molecular sólo da cuenta de presencia y no de colonización, pudiendo ser detectada una cepa transeúnte en la cavidad oral del preescolar examinado. Si bien es cierto, la literatura demuestra que la microbiota bucal tiende a mantenerse estable a nivel de especies, estudios longitudinales han demostrado variabilidad entre las cepas presentes en situaciones temporalmente distantes^{11,26,28,36}.

Por otra parte, en este estudio se evidenció que debido a las condiciones y características particulares del crecimiento de *S. mutans* en agar TYCSB, la extracción de su material genético es compleja, debido a la resistencia que le proporciona su capa de peptidoglicán frente a los procedimientos de extracción de DNA, lo que implica la necesidad de utilizar protocolos especiales para realizar ensayos de biología molecular.

En relación al ensayo de resistencia al stress ácido, los resultados obtenidos demostraron una tendencia hacia una mayor tolerancia al pH ácido, de las cepas aisladas de la cavidad bucal de niños con caries, permitiéndoles mantener activo su metabolismo a través del ensayo y creciendo en el medio de cultivo sin cambios morfológicos macroscópicos detectables, o una disminución significativa en las UFC respecto del control con pH 7.

Este hecho contrasta con la tendencia hacia una disminución en el número de UFC/ml provocada por el stress ácido en cepas provenientes de niños sin caries, por lo que se recomienda indagar más profundamente en este factor de virulencia aumentando el n muestral con el fin de obtener resultados estadísticamente significativos.

Las razones por las que ciertas cepas poseen una mayor capacidad de resistir constantes cambios en el pH del medio son diversas. Se ha descrito que están involucrados factores que otorgan a *S. mutans* la habilidad de activar genes de manera rápida y efectiva que le permiten adaptarse eficientemente a la disminución del pH del medio^{30,47}.

Son conocidos e interesantes de estudiar, los múltiples mecanismos que posee *S. mutans* para mantener un ambiente intracelular favorable para el desarrollo de su metabolismo, como un sistema activo de bombeo de protones al exterior y también su capacidad de incorporar material genético externo ante condiciones de stress ambiental. Dichos factores, son condicionantes de sus sobrevivencia, competitividad y eventual predominancia como factor etiológico de caries dental^{7,39}.

Comprendiendo el proceso de colonización, es necesario enfatizar en el fenómeno de presión positiva que ejerce el stress ácido frente a ingestas constantes de carbohidratos fermentables por la microbiota asociada a caries, la que queda en evidencia al establecerse *S. mutans* en la comunidad polimicrobiana del biofilm, modificando por medio de su alta producción de metabolitos ácidos, principalmente lactato, el medio ambiente a su alrededor, generándose una selección de los microorganismos más adaptados a bajas constantes y pronunciadas en el pH del medio^{6,11,30,34,47}.

Dicha adaptación podría además presentar un componente histórico o familiar de exposición a condiciones de acidez, lo que permitiría que, en familias donde la ingesta de carbohidratos fermentables es mayor, tanto en cantidad como en momentos de ingesta, se seleccionen cepas más virulentas, las que luego serán transmitidas a los niños. Como consecuencia, la cavidad bucal desde la infancia temprana, hospedaría cepas con factores de virulencia que les permitan una mejor adaptación al medio y una mayor incidencia en los procesos patológicos, todo lo cual da cuenta de los factores sociales, conductuales y de estilo de vida relacionados con la progresión de la caries⁴².

Nuestro país ocupa uno de los primeros lugares a nivel mundial en consumo de bebidas altamente azucaradas, por lo que es de esperar que las cepas portadas por los cuidadores y principalmente la madre del preescolar posean una adaptación mayor a utilizar dichos carbohidratos y modificar el medio convenientemente para su desarrollo.

La capacidad de formar biofilm, como factor de virulencia, es crucial para el establecimiento y la colonización de las bacterias en distintas superficies, estructuras y órganos, incluido el diente, el surco gingival, la encía, entre otros nichos de la cavidad bucal. A través de un ensayo de formación de biofilm en una superficie de poliestireno se evidenció una tendencia hacia una mayor capacidad de formación de biofilm en presencia de sacarosa por una cepa aislada de un niño con historia de caries.

La literatura actual es concluyente en afirmar que una mayor capacidad de formar biofilm por parte de especies patógenas guarda una íntima relación con un mayor grado de severidad de patologías asociadas a comunidades microbianas, favoreciendo la comunicación entre células de la misma o distintas especies, y proporcionando una matriz que protege a los microorganismos frente a cambios en el medio, entre otras^{3,30,32}.

En el proceso de caries, la remoción mecánica del biofilm dental se ha descrito como la manera más eficiente de controlar el equilibrio fisiológico asociado al inicio de la enfermedad, por lo que la presencia de cepas más eficientes en este factor de virulencia, asociado a una mala higiene oral, puede desencadenar que los párvulos tengan diferentes experiencias de caries en un contexto sociocultural y económico precario, debido, por ejemplo a la falta de inclusión en los programas educativos nacionales, aspecto fundamental para conservar de manera adecuada su salud a lo largo de la vida ^{40,48,50,51,55}.

En relación al ensayo de resistencia frente a agentes antimicrobianos, no constituye un análisis común dentro de los estudios microbiológicos analizados, generalmente en *S. mutans*, probablemente porque la resistencia de dicha bacteria a fármacos antibióticos no representa un factor de virulencia relevante en el desarrollo de la caries dental, puesto que su uso no es parte del tratamiento de la patología¹⁰.

Sin embargo, resulta una prueba válida e importante de estudiar, por la permanente exposición que tiene la población infantil ante los antimicrobianos y por representar un factor de virulencia clásico de patógenos de relevancia clínica, ya que informa no solo sobre la capacidad de resistir el embate de tratamientos, sino que también de la capacidad de adaptarse al medio mediante la obtención de genes de resistencia, hecho que es crucial gracias a la capacidad de *S. mutans* de adquirir material genético por transformación⁵².

Si bien es cierto, los resultados obtenidos mediante el experimento realizado no son suficientes como para demostrar diferencias significativas en las cepas estudiadas, se corroboró lo que presentaba la literatura respecto de la sensibilidad de *S. mutans* a antibióticos de amplio espectro de uso clínico común. Resulta interesante continuar la investigación a nivel del comportamiento en biofilm y la posible selección en el medio ambiente bucal que pueden provocar estos fármacos.

Siendo la mayoría de los fármacos testeados de uso común en pediatría, podrían actuar facilitando o dificultando, mediante la moderación o erradicación de otros componentes de la microbiota, el establecimiento de cepas con una mayor capacidad de competencia genética de *S. mutans* no solo por administración directa a los niños, sino que también por su capacidad de difundir a través de la leche materna y modificar eventualmente el ambiente bucal seleccionando positivamente a *S. mutans*⁵⁸.

Dentro de las múltiples variables que determinan la mantención del equilibrio en el ecosistema bucal, es sabido que la presencia de bacterias asociadas al proceso de caries puede tener relación con la historia de caries, pero la variabilidad genética de cepas de *S. mutans* no ha sido asociada a una mayor experiencia de caries de manera concluyente.

Se desconoce si cepas más virulentas son adquiridas con una mayor adaptación en sus factores de virulencia o estas son seleccionadas en el biofilm por adaptación a un medio con constantes bajas de pH, producto del consumo de sacarosa. Es por esto que la adquisición temprana de cepas más virulentas se añade como agravante en la etiología de caries.

La caries dental es una enfermedad infecciosa multifactorial transmisible asociada a biofilm. De alta prevalencia a nivel mundial, como lo demuestran estudios en EE.UU que han encontrado una prevalencia para caries tres veces superior al asma, que genera múltiples costos no sólo en estructuras biológicas, sino que además implica un impacto negativo en la calidad de vida, en el desarrollo psicoemocional del niño y pérdida económica en días laborales de los cuidadores⁵⁶.

Su tratamiento reparativo es de un alto costo y su modalidad de cobertura en el sistema de salud chileno es de resorte tardío, a la edad de 6 años, cuando ya el daño está establecido y podemos hablar de historia de caries, el factor con la asociación más directa al desarrollo de nuevas lesiones^{51,56}.

Sin embargo es de fácil prevención, siempre y cuando la estrategia utilizada sea implementada en las etapas iniciales de la vida del individuo, momento en el que se forman los hábitos y se crean las conductas, hábitos y estilos de vida que en su mayoría mantendrá por el resto de su vida. Esto es, sin dejar de lado el inmenso daño ya establecido en la dentadura de la población, enfocar los esfuerzos a la promoción y prevención en pos de mantener o recuperar la salud ^{51,56}.

La evidencia orienta un movimiento internacional de práctica clínica, alejándose de la odontología operatoria hacia la prevención de la caries⁵¹. Se plantea que el proceso de caries debe ser manejado en el tiempo individualmente por paciente y que una odontología mínimamente invasiva debe ser provista ⁶⁰.

La alta prevalencia, larga cronicidad y baja mortalidad de la enfermedad, la han mantenido lejana a las prioridades en lo que a políticas públicas de salud se refiere. Siendo sólo garantizada explícitamente en momentos de la vida de los chilenos; a los seis años, durante el embarazo, a los sesenta años y en caso de urgencias dolorosas.

En el último caso, la capacidad de pago condiciona muchas veces la elección del tratamiento, por lo que en gran parte de los casos se termina optando por la extracción.

La reivindicación del componente oral de la salud como factor transcendental de la salud general y una odontología de enfoque preventivo permitirán, en un futuro auspicioso, evitar el dolor, mejorar la alimentación y el desarrollo psicoemocional, social e intelectual de los niños de Chile, lo que contribuirá a la atenuación de las inequidades de nuestro pueblo.

CONCLUSIONES

Los preescolares chilenos del nivel socioeconómico bajo podrían ser portadores de cepas de *S. mutans* de alta virulencia, factor que podría determinar una progresión y severidad mayor del proceso de destrucción de los tejidos dentales.

La profundización en el estudio y conocimiento de los factores etiológicos de la caries dental en la población infantil nacional, propone argumentos para medidas de promoción y prevención con enfoque integral de riesgo que tiendan a disminuir la desigualdad en el acceso a la salud.

Referencias

- (1) Aas, J.A., Paster, B.J., Stokes, L.N. (2005). —Defining the normal bacterial flora of the oral cavityll *J. Clin.Microbiol.* Vol. 43:5721–5732.
- (2) Acevedo C, Corsini G, 2007. Diagnosis of buccal health of children of 2 and 4 years, that attend the preschoolastic education in the Metropolitan Region. Chilean Health Ministry; *Ministerio de Salud. Programa de Promoción y Prevención de Salud Bucal en Preescolares.*
- (3) Ahn SJ, Wen ZT, Brady LJ, Burne RA (2008) Characteristics of biofilm formation by *Streptococcus mutans* in the presence of saliva. *Infect Immun* 76(9):4259–4268
- (4) Alaluusua S, Alaluusua SJ, Karjalainen J, Saarela M, Holttinen T, Kallio M, Hölttä P, Torkko H, Relander P, Asikainen S (1994) The demonstration by ribotyping of the stability of oral *Streptococcus mutans* infection over 5 to 7 years in children. *Arch Oral Biol* 39, 467-471.
- (5) Alaluusua S, Grönroos L, Zhu X, Saarela M, Mattö J, Asikainen S, Fukushima K (1997) Production of glucosyltransferases by clinical mutans streptococcal isolates as determined by semiquantitative cross-dot assay. *Arch Oral Biol* 42, 417-422.
- (6) Alaluusua S, Mätto J, Grönroos L *et al.* (1996). Oral colonization by more than one clonal type of mutans streptococcus in children with nursing-bottle dental caries. *Arch Oral Biol*; 41: 167-173.
- (7) Arthur R. (2001). Genotypic and Phenotypic Analysis of *S. mutans* Isolated from Dental Biofilms Formed In Vivo Under High Cariogenic conditionsll *Braz Dent J* 22: 267-274.
- (8) Bader JD, Rozier RG, Lohr KN *et al.* (2004). Physicians' roles in preventing dental caries in preschool children — A summary of the evidence for the US Preventive Services Task Force. *Am J Prev Med*; 26: 315–325.

- (9) Becker M, Paster B. (2002). Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol* 40, 1001–1009.
- (10) Brescó-Salinas, Costa Riu N, Berini-Aytés L, Gay-Escoda C. (2006). Antibiotic Susceptibility, of the bacteria causing odontogenic infections. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*; 11:E70-5
- (11) Caulfield PW, Cutter GR, Dasanayake AP. (1993). Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res*; 72: 37-45.
- (12) Caulfield PW, Walker TM (1989) Genetic diversity within *Streptococcus mutans* evident from chromosomal DNA restriction fragment polymorphisms. *J Clin Microbiol* 27, 274-278.
- (13) Cornejo O, Lefe´ T. (2012). Evolutionary and Population Genomics of the Cavity Causing Bacteria *Streptococcus mutans*. *Mol. Biol. Evol.* 30(4):881–893
- (14) Crielaard W, Zaura E, Schuller A, Huse S, Montijn R, Keijser B. (2011) Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health. *BMC Med. Genomics*. Vol 4: 22-34.
- (15) Curzon ME, Preston AJ. (2004). Risk groups: nursing bottle caries/caries in the elderly. *Caries Res*; 38 (suppl 1) : 24–33.
- (16) De Grauwe A, Aps JK, Martens LC. (2004). Early Childhood Caries (ECC): what's in a name? *Eur J Paediatr Dent*; 5: 62–70.
- (17) Do T, Gilbert S. (2010). Generation of diversity in *Streptococcus mutans* genes demonstrated by MLST. *PLoS One*. 5;5(2):e9073
- (18) Echeverría S, Soto D. (2003). Prevalencia de caries de la Lactancia en niños de 2 a 4 años de la región Metropolitana. Diagnóstico actualizado. *Revista Dental de Chile*, 94:14-8.
- (19) Featherstone JD, Adair SM, Anderson MH, et al. (2002). Caries management by risk assessment: consensus statement. *J Calif Dent Assoc* 2003; 31: 257–69.
- (20) Fejerskov O, Kidd EAM, eds. (2003). Dental caries: the disease and its clinical management. Copenhagen, Denmark. *Blackwell Monksgaard*.
- (21) Guillarte C, Perrone M. (2004). Microorganismos de la placa dental relacionados con la etiología de la periodontitis. *Acta Odontol. Venez.* Vol 42: 213-217.

- (22) He X, SHI W. (2009). Oral microbiology: past, present and future. *Int. J. Oral Sci.* Vol 1: 47-58.
- (23) Herczegh A, Ghidán A. (2008). Comparison of *Streptococcus mutans* strains from children with caries-active, caries-free and gingivitis clinical diagnosis by pulsed-field gel electrophoresis *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 55 (4), pp. 419– 427
- (24) Kamiya R, Napimoga M. (2005). Mutacins production in *Streptococcus mutans* genotype isolated from caries-active and caries-free individuals. *Oral Microbiol Immunol* 20, 20–24.
- (25) Kidd EA, Fejerskov O. (2004). What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res*; 83: C35–38
- (26) Klein MI, Florio FM, Pereira AC, Höfling JF, Gonçalves RB (2004). Longitudinal study of transmission, diversity, and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes in Brazilian nursery children. *J Clin Microbiol* 42, 4620-4626.
- (27) Kolenbänder P, Andersen R, Blehert D. (2002). Communication among oral bacteria. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* Vol 66: 486-505.
- (28) Kosai K, Nakayama R, Tedjosasongko U, Kuwahara S, Suzuki J, Okada M, Nagasaga N (1999). Intrafamilial distribution of *mutans* streptococci in Japanese families and possibility of father-to-child transmission. *Microbiol Immunol* 43, 99-106.
- (29) Kreulen, C.M., de Soet, H.J., Hogeveen, R. & Veerkamp, J.S. (1997). *Streptococcus mutans* in children using nursing bottle. *ASDC J Dent Child* 64, 107-111.
- (30) W. Krzysciak & A. Jurczak & D. Koscielniak & B. Bystrowska & A. Skalniak. (2014). The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33:499–515
- (31) Krol D (2003). Dental caries, oral health, and pediatricians. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*; 33: 253–70.

- (32) Kuboniwa M, Lamont R. (2010). Subgingival biofilm formation. *Periodontol. 2000* Vol 52: 38-52.
- (33) Lakshman, S. (2006). Normal oral flora, the oral ecosystem and plaque biofilms. *Essential microbiology for dentistry, Third Ed.*, 255-265.
- (34) Lembo F, Longo P. (2007). Genotypic and phenotypic analysis of *Streptococcus mutans* from different oral cavity sites of caries free and caries active children. *Oral Microbiol Inmuno* 22:313-319.
- (35) A. Lemos, Robert G. Quivey, Jr, Hyun Koo and Abranches. (2013). *Streptococcus mutans*: a new Gram-positive paradigm? *Microbiology* 159, 436–445
- (36) Li Y, Caufield PW. (1995). The fidelity of initial acquisition of *Streptococcus mutans* by infants from their mothers. *J Dent Res*; 74: 681-685.
- (37) Li Y, Navia JM, Caufield PW. (1994). Colonization by *Streptococcus mutans* in the mouths of 3- and 4-year-old Chinese children with or without enamel hypoplasia. *Arch Oral Biol*; 39: 1057-1062.
- (38) Listgarten, M. A. (1994) The structure of dental plaque. *Periodontol. 2000* Vol 5: 52-65.
- (39) Loesche WJ. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.*50:353-80.
- (40) Marsh PD. (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* 149:279-94.
- (41) Masuda N, Tsutsumi N, Sobue S, Hamada S. (1979). Longitudinal survey of the distribution of various serotypes of *Streptococcus mutans* in infants. *J Clin Microbiol*; 10: 497-502.
- (42) Mattos-Graner RO, Li Y, Caufield PW, Duncan M, Smith FJ (2001). Genotypic diversity of *Streptococcus mutans* in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. *J Clin Microbiol* 39, 2313-2316.
- (43) Ministerio de Salud (2007). *Programa de Promoción y Prevención de Salud Bucal en Preescolares.*
- (44) Ministerio de Salud (2010). Informe consolidado —*Diagnóstico nacional de salud bucal de los niños y niñas de 2 y 4 años que participan en la educación parvularia en Chile.*

- (45) Napimoga M, Kamiya R. (2004). —Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals. *J Med Microbiol* 53:697–703
- (46) Nascimento MM, Höfling JF, Gonçalves RB (2004). *Streptococcus mutans* genotypes isolated from root and coronal caries. *Caries Res* 38, 454-463
- (47) Nascimento MM, Lemos JA, Abranches J, Gonçalves RB, Burne RA (2004). Adaptive acid tolerance response of *Streptococcus sobrinus*. *J Bacteriol* 186, 6383-6390.
- (48) Nowak J. (2011). Paradigm shift: Infant oral health care – *Primary prevention journal of dentistry* 39s2 s49–s55
- (49) Paddick JS, Brailsford SR, Kidd EA, Gilbertz SC, Clark DT, Alam S, Killick ZJ, Beighton D. (2003). Effect of the environment on genotypic diversity of *Actinomyces naeslundii* and *Streptococcus oralis* in the oral biofilm. *Appl Environ Microbiol* 69, 6475-6480.
- (50) Parahitiyawa, N.B., Scully, C., Leung, W.K. (2010) —Exploring the oral bacterial flora: current status and future directions. *Oral Diseases* Vol. 16: 136-145.
- (51) Pitts NB.(2004). Are we ready to move from operative to non-operative/preventive treatment of dental caries in clinical practice? *Caries Res*; 38: 294-304
- (52) Ramos-Gomez FJ, Weintraub JA, Gansky SA, Hoover CI, Featherstone JDB.(2002). Bacterial, behavioral and environmental factors associated with early childhood caries. *J Clin Pediatr Dent*; 26: 165–73
- (53) Redmo Emanuelsson IM, Carlsson P, Hamberg K, Bratthall D. (2003). Tracing genotypes of mutans streptococci on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Oral Microbiol Immunol* 18, 24-29.
- (54) Russel RRB. (1994). The application of molecular genetics to the microbiology of dental caries. *Caries Res*; 28: 69-82.
- (55) Scheie A, Peterson F. (2004). The biofilm concept: consequences for future prophylaxis of oral diseases? *Crit Rev Oral Biol Med*; 15: 4–12.
- (56) Selwitz R., Ismail A., Pitts N. (2007). Dental caries. *Lancet*; 369: 51–59

- (57) Tabchoury C. (2008). Evaluation of genotypic diversity of *Streptococcus mutans* using distinct arbitrary primers. *J Appl Oral Sci* 16:403-7.
- (58) Tanner A, Milgrom P. (2002). The microbiota of young children from tooth and tongue samples. *J. Dent. Res.* Vol 81 (1):53-57.
- (59) Touger-Decker R, van Loveren C. (2003). Sugars and dental caries. *Am J Clin Nutr*, 78: S881–92.
- (60) Tyas MJ, Anusavice, Frenken JE, Mount GJ. (2000). Minimal intervention dentistry- a review. FDI commission project 1-97. *Int Dent J*, 50: 1-12.
- (61) Wan AK, Seow WK, Purdie DM, Bird PS, Walsh LJ, et al. (2001). Oral colonization of *Streptococcus mutans* in six-month-old pre-dentate infants. *J Dent Res* 80: 2060–5.
- (62) Winn DM. (2001). Tobacco use and oral disease. *J Dent Educ* 65: 306–12. 25
- (63) Ismael Yévenes, Barbara Hernández, Alfredo Apip, Miguel Neira, Paula Maass, Ljubica Petrasic. (2010). Dental caries in preschoolers from communes with fluoridated and non-fluoridated public water supplies in Chile. *Rev. odonto ciênc.* 25(1):20-24)
- (64) Zaror S, Pineda T. (2011). Prevalencia de caries temprana de la infancia y sus factores asociados en niños chilenos de 2 y 4 años. *Int. J. Odontostomat.*, 5(2):171-177.

ANEXOS



Consentimiento Informado Para Participación en Proyecto de Investigación **Dirigido a Padres y/o Tutores**

Título del Protocolo: Caracterización genotípica y fenotípica de *Streptococcus mutans* en un grupo de preescolares chilenos de 0 a 5 años de edad, y su relación con la experiencia de caries de los niños.

Investigador Principal: Marta Kelly Gajardo Ramírez

Sede de Estudio: Facultad de Odontología, Universidad de Chile – Sergio Livingstone 943 – Independencia, Santiago.

Nombre del Participante:
.....

Este documento de Consentimiento Informado se aplicará a padres y/o tutores del Jardín Infantil Anti Liwen de La Pintana, y consta de dos partes:

- Información (proporciona información sobre el estudio para usted).
 - Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar).
- Ud. recibirá una copia completa del Documento de Consentimiento Informado.

Mi nombre es Marta Kelly Gajardo Ramírez y soy académico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Estoy realizando una investigación de la cual le proporcionaré información y a la que lo invitaré a participar. No tiene que decidir hoy si lo hará o no. Antes de tomar su decisión puede 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 aclarada todas sus consultas y después que haya comprendido los objetivos de la Investigación y si desea participar, se le solicitará que firme este formulario.

Los aspectos de este formulario tratan los siguientes temas: Justificación de la Investigación, Objetivo, Beneficios, Tipo de Intervención y procedimiento, Riesgos, Confidencialidad y Difusión de datos, Criterios para selección de los participantes en el estudio y Aclaraciones.

Justificación de la Investigación

En nuestro país, las enfermedades de la boca y los dientes, principalmente caries dental, son muy frecuentes, afectando prácticamente a toda la sociedad. El acceso a atención dental para comunidades de escasos recursos es limitado, ya sea por cuestiones económicas o de oportunidad de atención, y su enfoque es rehabilitar el daño actual, dejando de lado la prevención y la educación

de conductas saludables, tanto de higiene como de alimentación. Por esto, los niños corresponden a un grupo que necesita medidas especiales que permitan mejorar su salud, no solamente en relación a su boca y dientes, sino que de su salud general. El daño que se produce en la niñez por caries influye de gran manera en su desarrollo y en su riesgo a futuro de presentar enfermedades en la boca. Estos riesgos se pueden controlar a través de medidas que generen en los niños hábitos de vida saludables que les permitan desarrollarse de manera óptima como personas sanas en sus comunidades.

Objetivo

La presente investigación tiene por objetivo establecer que preescolares chilenos con una mayor experiencia de caries son portadores en su cavidad bucal de diferentes tipos de bacterias que se relacionan con la presencia de caries dental y con un mayor riesgo de daño en los dientes.

Beneficios

Si usted decide que su pupilo participe del proyecto este se beneficiará de manera directa Durante el desarrollo del mismo a través de actividades educativas y preventivas, las cuales consistirán en talleres de educación en salud oral, alimentación saludable e instrucción de higiene oral enfocados a toda la comunidad del jardín infantil. Además se entregará cepillos de dientes y pastas dentales, junto con los informes de los resultados de los exámenes de salud bucal de los niños a sus apoderados. El beneficio para la comunidad que Ud. estaría aportando, es contribuir a determinar si la muestra obtenida presenta microorganismos dañinos para las estructuras bucales, información que permitirá contribuir a elaborar terapias preventivas para las enfermedades descritas anteriormente

Tipo de Intervención y Procedimiento

Si usted decide que su hijo(a) participe se le realizará un examen de salud bucal y la toma de una muestra de saliva obtenida de la lengua de los niños. La recolección de la muestra se hará con un —cotonitoll que se frota suavemente encima de la lengua.

Riesgos

Su hijo(a) no correrá ningún riesgo durante y posterior al procedimiento de la investigación debido a que los métodos utilizados son no invasivos, la toma de muestra de saliva no produce daño ni dolor, y tarda entre 3 y 7 minutos. Si Ud. quisiera estar presente en el momento en que este procedimiento se realiza lo puede solicitar. Además si el niño/a rechaza el procedimiento no se insistirá y podrá desistir de participar en el momento que lo desee. En caso de presentarse algún problema durante el procedimiento, su pupilo será tratado de inmediato de acuerdo a los requerimientos del caso y/o derivado al servicio asistencial más cercano.

Criterios para selección de los participantes en el estudio

Los criterios de inclusión serán: ser niños y niñas entre 0 a 5 años de edad

Los criterios de exclusión serán: quienes presenten enfermedades crónicas, que hayan recibido tratamiento con antibióticos durante los 3 meses previos al examen, o que usen aparatos ortodóncicos.

Confidencialidad y difusión de datos.

La información obtenida de la Investigación, respecto de la identificación de participantes, será mantenida con estricta confidencialidad por el investigador. El nombre y datos personales de su pupilo serán codificados para el uso en este estudio y no serán identificados públicamente. Los resultados emanados de este estudio podrán ser publicados en revistas científicas.

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.
- 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.
- Si considera que no existen dudas ni preguntas acerca de la participación de su hijo(a), 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 mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria.
2. Tengo conocimiento del procedimiento a realizar.
3. Conozco los beneficios de participar en la Investigación.
4. El procedimiento no tiene riesgo alguno para la salud de mi hijo(a).
5. 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.
6. En caso de cualquier duda puede acudir a Marta Kelly Gajardo Ramírez, a la dirección Sergio Livingstone #943, Independencia, de lunes a viernes de 9:00 a 12:00 horas o vía telefónica al 29781764 o dirigirse a la Dra. María Angélica Torres, Presidente del Comité Ético Científico, Facultad de Odontología, Universidad de Chile al correo electrónico cec.fouch@odontologia.uchile.cl.

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

Nombre del participante: _____

Nombre del padre, madre o tutor legal: _____

Firma del padre madre o tutor legal: _____

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: _____

Nombre del Director del establecimiento donde realiza la investigación o de su representante

Firma: _____

Fecha:



Santiago, 16 de Enero de 2014.

C E R T I F I C A D O

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto de Investigación presentado al Concurso FIOUCH 2013, titulado "Caracterización Genotípica y Fenotípica de *Streptococcus mutans* en un Grupo de Preescolares Chilenos de 0 a 5 Años de Edad y su Relación con la Experiencia de Caries de los Niños". El Investigador Responsable de este proyecto es el Dr. Andrés Celis Sersen, Académico del Departamento de Patología y Medicina Oral.

Los procedimientos experimentales, que involucran el uso y manejo de material biológico y Microorganismos Patógenos se realizarán en el laboratorio de Microbiología Bucal en la Facultad de Odontología cuyo responsable es la Prof. T.M. Leyla Gómez Carranza.

El CIB certifica que el laboratorio y la Facultad mencionada anteriormente, cuenta con las facilidades tanto para el manejo y desecho del material biológico y microorganismos patógenos a utilizar en el proyecto de acuerdo al Manual de Bioseguridad, Conicyt 2008. Además, el investigador se compromete a velar por el cumplimiento de las normas de bioseguridad, durante el desarrollo del proyecto.

Se extiende el presente certificado a solicitud del Dr. Celis para ser presentado a la Dirección de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Dr. Mario Chiong
Secretario

Dra. Carla Lozano M.
Presidenta

Facultad de Odontología. Sergio Livingstone P. 943, Independencia, Fono 9781793-9781832, Fax: 9781748, Santiago.

<http://odontologia.uchile.cl>

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Sergio Livingstone P. 1007, Independencia, Fono 9781792 Fax: 9781748, Santiago.

<http://www.quimica.uchile.cl/>

CEFMETAZOLE N.GONORREA	30 µg 30 µg	12 27	13-15 28-32	16 33
CEFONICID	30 µg	14	15-17	18
CEFOPERAZONA	75 µg	15	16-20	21
CEFOPERAZONA/SULBACTAM(*)	75/30 µg	15	16-20	21
CEFOTAXIMA N.GONORREA ESTREPTOCOCOS BETA GRUPO VIRIDANS HEMOLITICOS	30 µg 30 µg 30 µg 30 µg	14 25	15-22 26-27	23 31 24 28
CEFOTETAN N.GONORREA	30 µg 30 µg	12 19	13-15 20-25	16 26
CEFOXITINA N.GONORREA E. AUREUS Y E. COAGULASA NEGATIVA EXCEPT LUGDUNENSIS LUGDUNENSIS	30 µg 30 µg 30 µg 30 µg	14 23 19 24	15-17 24-27	18 28 20 25

CEFPODOXIME N.GONORREA HAEMOFILUS	10 µg 10 µg 10 µg	17	18-20	21 29 21
CEFPROZIL	30 µg	14	15-17	18
CEFTAZIDIMA N.GONORREA	30 µg 30 µg	14	15-17	18 31
CEFTIBUTEN HAEMOFILUS	30 µg 30 µg	17	18-20	21 28
CEFTIZOXIMA N.GONORREA	30 µg 30 µg	14	15-19	20 38
CEFTRIAXONA N.GONORREA ESTREPTOCOCOS GRUPO VIRIDANS BETA HEMOLITICOS	30 µg 30 µg 30 µg 30 µg	13 13	14-20 14-20	21 35 24 21
CEFUROXIMA AXETIL ORAL HAEMOFILUS	30 µg 30 µg	14 16	15-22 17-19	23 20
CEFUROXIMA SODICA (PARENTERAL) N.GONORREA	30 µg 30 µg	14 25	15-17 26-30	18 31
CIPROFLOXACINA N.GONORREA HAEMOFILUS	5 µg 5 µg 5 µg	15 27	16-20 28-40	21 41 21
CLARITROMICINA HAEMOFILUS	15 µg 15 µg	13 10	14-17 11-12	18 13
CLINDAMICINA E. PNEUMONIAE	2 2 µg µg	14 15	15-20 16-18	21 19

CLORAMFENICOL E. HAEMOFILUS			30 30 30 µg	µg µg	12 20 25	13-17 26-28	18 21 29
COLISTINA (*)			10 µg		8	9-10	11
DOXICICLINA			30 µg		12	13-15	16
ENOXAXINA S.SAPROFITICUS N.GONORREA	Y	EPIDERMIDIS	10 10 µg	µg	14 31	15-17 32-35	18 36
ERITROMICINA E.PNEUMONIAE			15 15 µg	µg	13 15	14-22 16-20	23 21
ESPTREPTOMICINA ENTEROCOCOS OTROS MICROORGANISMOS	(ALTA	RESISTENCIA)	300 10 µg	µg	6 11	7-9 12-14	10 15
FOSFOMICINA (*) (**)			50 µg		12	8	18
FOSFOMICINA (**)			200 µg		12	13-15	16
GENTAMICINA ENTEROCOCOS OTROS MICROORGANISMOS	(ALTA	RESISTENCIA)	120 10 µg	µg	6 12	7-9 13-14	10 15
KANAMICINA			30 µg		13	14-17	18
LOMEFLOXACINA N.GONORREA HAEMOFILUS			10 10 10 µg	µg µg	18 26	19-21 27-37	22 38 22
LORACARBEF HAEMOFILUS			30 30 µg	µg	14 15	15-17 16-18	18 19
LEVOFLOXACINA ESTAFILOCOCOS HAEMOFILUS			5 5 5 µg	µg µg	13 15	14-16 16-18	17 19 17
METICILINA CON ESTAFILOCOCO AUREUS			5 µg		9	10-13	14
MEZLOCILINA PSEUDOMONAS ACINETOBACTER SP Y ENTEROBACTERIAS		AUREGINOSA	75 75 µg	µg	15 17	18-20	16 21
MINOCILINA			30 µg		14	15-18	19
MOXALACTAM			30 µg		14	15-22	23
NAFCILINA CON ESTAFILOCOCO AUREUS			1 µg		10	11-12	13
NALIDIXICO ACIDO			30 µg		13	14-18	19
NETILMICINA			30 µg		12	13-14	15
NITROFURANTOINA			300 µg		14	15-16	17
NORFLOXACINA			10 µg		12	13-16	17

PIPERACILINA/TAZOBACTAM P.AUREGINOSA Y ENTEROBACTERIAS Y ACINETOBACTER SP	ESTAFILOCOCOS	100/10 100/10 µg	µg 17 17		18-20	18 21
--	---------------	---------------------	----------------	--	-------	----------

OFLOXACINA N.GONORREA ESTAFILOCOCOS HAEMOFILUS		5 5 5 5 µg	µg µg µg	12 24 14	13-15 25-30 15-17	16 31 18 16
OXACILINA ESTAFILOCOCOS AUREUS Y E. ESTAFILOCOCOS COAG. (-) EXCEPTO E. PNEUMONIAE	LUGDUNENSIS LUGDUNE NSIS	1 1 µg	µg	10 17	11-12	13 18 20
PENICILINA ESTAFILOCOCOS ENTEROCOCOS N.GONORREA ESTREPTOCOCOS EXCEPTO E. PNEUMONIAE	G	10 10 10 U	U U	28 14 26	27-46	29 15 47 24
PEFLOXACINA (*)		5 µg		16	5	22
PIPERACILINA P.AUREGINOSA ENTEROBACTERIAS Y ACINETOBACTER SP		100 100 µg	µg	17 17	18-20	18 21
PIPERACILINA/TAZOBACTAM P.AUREGINOSA Y ENTEROBACTERIAS Y ACINETOBACTER SP	ESTAFILOCOCOS	100/10 100/10 µg	µg	17 17	18-20	18 21
POLIMIXINA B (*)		300 U		8	9-11	12
RIFAMPICINA ESTAFILOCOCOS - ENTEROCOCOS - E. PNEUMONIAE	HAEMOFILUS	5 5 µg	µg	16 16	17-19 17-18	20 19
TETRACICLINAS ESTAFILOCOCOS - V. N.GONORREA ESTREPTOCOCOS HAEMOFILUS	CHOLERAEE	30 30 30 30 µg	µg µg µg	14 30 18 25	15-18 31-37 19-22 26-28	19 38 23 29
TEICOPLANINA		30 µg		10	11-13	14
TICARCILINA P.AUREGINOSA ENTEROBACTERIAS Y ACINETOBACTER SP.		75 75 µg	µg	14 14	15-19	15 20
TICARCILINA-A P.AUREGINOSA ENTEROBACTERIAS Y ACINETOBACTER SP ESTAFILOCOCOS	CLAVULANICO	75/10 75/10 75/10 µg	µg µg	14 14 22	15-19	15 20 23
TOBRAMICINA		10 µg		12	13-14	15
TRIMETOPRIMA		5 µg		10	11-15	16
TRIMETOPRIMA/SULFAMETOXAZOL PSEUDOMONAS		1,25/23,75 1,25/23,75 µg	µg	10 15	11-15 16-18	16 19

VANCOMICINA				
ENTEROCOCOS	30	µg	14	17
ESTAFILOCOCOS	30	µg	14	15
ESTREPTOCOCOS	30 µg			17

(*) No hay información por parte del NCCLS de estos antimicrobianos. Los datos fueron tomados de estas publicaciones.

(**) Contiene 50 µg de glucosa 6 fosfato