



TESIS DOCTORAL

Departamento de Estomatología

FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**DETERMINACIÓN DE STREPTOCOCCUS MUTANS Y
STREPTOCOCCUS SOBRINUS, MEDIANTE PCR CUANTITATIVA
A TIEMPO REAL, Y SU RELACIÓN CON LA CARIES DENTAL EN
ESCOLARES DE LA COMUNIDAD VALENCIANA**

Tesis doctoral presentada por:
MATEO SÁNCHEZ ACEDO

Dirigida por:
Dr. José Manuel Almerich Silla
Dr. José María Montiel Company
Dr. Francisco José Dasí Fernández

Valencia, 2013

El estudio ha sido financiado por:

- La Conselleria d'Educació de la Generalitat Valenciana, proyecto GVPR/2008/383, investigador principal Dr José María Montiel Company.
- Convocatoria de ayudas para proyectos de investigación en programas de salud, prevención y predicción de la enfermedad, convocadas por la Orden de 21 de diciembre de 2009, de la Conselleria de Sanitat (DOCV núm. 6175, de 30.12.2009) y adjudicadas por la resolución, de este mismo organismo, de 5 de julio de 2010 (DOGV núm. 6319, de 27.07.201).
- Ayudas de la Universitat de València-Vicerectorado de Investigación: Estudio Epidemiológico de Salud Bucodental en la Población Escolar de la Comunidad Valenciana 2010: (UV-INV-AE11-40221) Investigador principal Dr. José Manuel Almerich Silla.
- Dirección General de Salud Pública de la Conselleria de Sanitat de la Generalitat Valenciana: proyecto de investigación "ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO DE SALUD BUCODENTAL EN LA POBLACION ESCOLAR DE LA COMUNIDAD VALENCIANA –

2010" (016/2010). Investigador principal Dr. José Manuel Almerich Silla.



VNIVERSITATIS VALÈNCIAE

Prof. Dr. D. José Manuel Almerich Silla, profesor titular de universidad del Departament d'Estomatologia de la Universitat de València, Dr. José María Montiel Company, profesor ayudante doctor del Departament d'Estomatologia de la Universitat de València, y Dr. D. Francisco José Dasí Fernández, investigador de la Fundación para la Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia

CERTIFICAN

Que D. Mateo Sánchez Acedo, médico estomatólogo, ha efectuado bajo nuestra dirección la presente Tesis Doctoral, titulada:

DETERMINACIÓN DE STREPTOCOCCUS MUTANS Y STREPTOCOCCUS SOBRINUS, MEDIANTE PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL, Y SU RELACIÓN CON LA CARIES DENTAL EN ESCOLARES DE LA COMUNIDAD VALENCIANA

Para optar al grado de Doctor

Para que así conste, firmamos la presente en Valencia, a once de noviembre de dos mil trece.

Dr. J. M. Almerich

Dr. J.M. Montiel

Dr. F. Dasí

Agradecimientos

Especial mención, al Prof. D. José Manuel Almerich Silla, por haberme permitido realizar esta tesis. Mejor dicho, por haberme obligado a hacer esta tesis. Sin su ayuda, sin sus consejos y revisión no hubiese sido posible. José Manuel, gracias por ser mi amigo.

Al Dr. José María Montiel Company, por ser un pilar de conocimientos, disponibilidad y entrega. Gracias por tu ayuda al realizar este trabajo. Sin tu apoyo no hubiera sido posible.

Al Dr. Francisco José Dasí Fernández, por su paciencia y dedicación para facilitar la utilización de la técnica de qPCR.

Quiero mencionar a D. José Agustín García, por ser mi “Pepito grillo”, siempre recordándome mis obligaciones. Gracias por tu amistad.

Al Dr. Roberto Roig Oltra, por su amistad y ayuda en el inicio de este trabajo.

Al Dr. Óscar Zurriaga Llorens, por su constante colaboración con la Unidad Docente de Odontología Preventiva y Comunitaria.

A todos los compañeras y compañeros, en realidad amigas y amigos, de la Unidad Docente de Odontología Preventiva y Comunitaria, por los momentos vividos y por ayudarme a madurar como profesional y como persona.

A mi esposa Dori y mis hijos Marc y Ferran, gracias por aguantarme. Gracias, por vuestro cariño.

Por no extenderme, hay personas que no nombro. Ellos saben quiénes son y tienen mi más sincero agradecimiento.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. LA CARIES.....	5
1.1.1. DEFINICIÓN:.....	5
1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA:.....	5
1.1.3. ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	8
1.1.4. ETIOPATOGENIA:.....	17
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	37
1. MATERIAL Y MÉTODO.....	41
1.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	41
1.2. FINANCIACIÓN.....	41
3.3 TAMAÑO Y SELECCIÓN DE LA MUESTRA.....	43
3.4 RECURSOS HUMANOS.....	45
3.5. CALIBRACIÓN PREVIA AL ESTUDIO.....	46
3.5. AUTORIZACIONES.....	47
3.6. MATERIAL UTILIZADO.....	48
3.7. RECOGIDA DE DATOS.....	49
3.8. PROTOCOLO DE RECOGIDA DE MUESTRA DE SALIVA.....	49
3.9. PERÍODO DE ESTUDIO.....	51
3.10. PROCESAMIENTO DE LOS DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	51

3.11. FORMULARIO DE EXPLORACIÓN.....	52
3.12. CUESTIONARIO-TEST	53
3.13 TÉCNICA DE PCR CUANTITATIVA.....	53
3.14 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS	55
3.15 TAQMAN:.....	62
2. RESULTADOS.....	67
3. DISCUSIÓN	79
4. CONCLUSIONES	93
5. ANEXOS	97
6. BIBLIOGRAFÍA	103

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA CARIES

1.1.1. DEFINICIÓN:

La caries es una enfermedad infecciosa, transmisible, habitualmente crónica e inducida por la placa bacteriana. Mediante la fermentación de carbohidratos que producen ácidos, provocan la disolución y destrucción localizada de los tejidos duros del diente (Baca, Baca & Maestre 2002) (Loesche 1982). Clínicamente, el inicio de la caries se manifiesta como una mancha blanca, como resultado de la desmineralización del esmalte que precede a la cavitación real (Loesche 1982).

1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA:

La palabra “epidemiología” es de origen griego. Puede definirse como el estudio de la salud y la enfermedad en las poblaciones, forma en que estos estados son influidos por el ambiente y los modos de vida.

Las pretensiones a largo plazo de la epidemiología son: el control y la prevención de la enfermedad.

Los estudios epidemiológicos sobre la caries, han permitido determinar la necesidad y eficacia de algunos tratamientos odontológicos, como la fluorización de las aguas de consumo, las conexiones entre el consumo de azúcar y la magnitud del problema de caries, etc...

El epidemiólogo define la frecuencia y gravedad de los problemas sanitarios en relación con la edad, sexo, geografía, raza, situación económica, nutrición y dieta y tiene el enfoque panorámico para estudiar la salud y enfermedad, mejor que otros investigadores.

El método más común de medición es por medio de un *índice* – número de ocurrencias en una población dada.

La medida epidemiológica más frecuente de la caries es el índice CAO, descrito por Klein, Palmer y Knutson en 1938, cuando estudiaron la distribución de la caries dental entre los niños de Hagerstown, Maryland. Más tarde fue adoptada por la OMS para encuestas de salud oral (Burt 1985) (Cortés 1999).

La designación **CAO-D** se utiliza para señalar **Dientes Cariados, Obturados y Ausentes** por caries; en este caso el diente es la unidad.

La designación **CAO-S** se refiere a **Superficies Cariadas, Superficies Obturadas** y superficies **Ausentes** por caries. En este caso la superficie es la unidad. Las dos medidas son para dientes permanentes (sin contar con el tercer molar).

Los criterios para dientes deciduos son idénticos pero en letras minúsculas, **cao-d** y **cao-s**. En este caso no se contabilizan dientes ausentes.

El **CAO** es una medida acumulativa, ya que suma el número de restauraciones y extracciones con el número de dientes con caries activa. Es un índice *irreversible*, lo cual significa que mide la experiencia de la caries en el tiempo total de la vida.

Aplicado a un individuo es la suma de los tres componentes, (C+A+O). Si se trata de una población, es la suma de todos sus valores dividido por el número de sujetos explorados. Se supone que los dientes restaurados o extraídos han recibido ese tratamiento debido a una caries en algún momento anterior al estudio epidemiológico (Cortés 2005) (Baca 2005).

1.1.2.1 INCIDENCIA Y PREVALENCIA:

Un estudio epidemiológico puede valorar la *prevalencia* de una condición en una población, si se toma la prevalencia como la aparición de cierta situación en un momento dado. La Prevalencia de una enfermedad es el número de individuos de una población que tienen dicha enfermedad en un momento determinado. Si la aparición de esa condición en la comunidad se valora en dos momentos distintos, puede determinarse la *incidencia*, siendo esta incidencia el incremento o disminución de ese suceso en un periodo de tiempo dado.

La Incidencia es el número de individuos de una población que desarrollan nuevos casos de dicha enfermedad en un período de tiempo determinado, generalmente un año (Burt 1985).

1.1.3. ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS

El primer estudio epidemiológico de salud buco-dental en la población infantil española fue el realizado por Gimeno de Sande y col. (1969)) (Gimeno-de-Sande et al. 1971) y tenía como objetivos la determinación de la prevalencia de la caries y los distintos componentes del índice CAO.D (número de dientes permanentes careados, ausentes y obturados por individuo), estudiar la relación existente entre la concentración de ion flúor en las aguas de abastecimiento y la caries, además de determinar las necesidades asistenciales para la planificación sanitaria odontológica. En este estudio encontramos los primeros datos referidos a las tres provincias de la Comunidad Valenciana situándonos en un grupo de provincias con menos caries en el conjunto del territorio nacional. Los datos publicados de las provincias no están segmentados por edades sino que se refieren a totalidad agrupando todas las edades exploradas y por ello no son comparables a los estudios posteriores, pero debido a la enorme muestra explorada merecen ser mencionados.

A la edad de 6 años en España el índice co.d (número de dientes temporales careados u obturados por individuo) se situaba en 3.01 y

el índice CAO.D en 0.27. A los 12 años el índice CAO.D era 1.92. En lo que respecta a las tres provincias valencianas, los datos globales obtenidos oscilaban entre el índice CAO.D de 0.63 de Valencia y Alicante al CAO.D de 1.17, para la provincia de Castellón.

Ya en el ámbito de la Comunidad Valenciana, el primer estudio epidemiológico de salud bucodental infantil fue el realizado por la Conselleria de Sanitat i Consum de la Generalitat Valenciana, realizado 1986 que se justificaba por la necesidad de contar con un estudio que estableciera un punto de referencia de la salud oral en la Comunidad Valenciana. Los objetivos del estudio fueron la determinación, para la población infantil escolarizada, de la prevalencia y grado de intensidad del ataque de caries dental, del grado de afectación de otras enfermedades y condiciones bucodentales como la enfermedad periodontal o la fluorosis dental, el nivel de higiene oral, y las necesidades de tratamiento. El estudio debería permitir la evaluación de medidas de prevención y promoción que se adoptaran en este ámbito y proporcionar los criterios para la planificación de servicios y actividades de salud oral. Entre las principales conclusiones de este estudio destacan la ausencia de fluorosis, la prevalencia de sangrado gingival moderada, un índice CAOD a los 12 años bajo (Índice CAO.D 2.53 a las 12 años), y una prevalencia de caries elevada tanto en dentición temporal (52.1% a

los 6 años) como permanente (70.2% a los 12 años)(Zurriaga, Ibáñez 1987).

En 1991 se realizó un segundo estudio epidemiológico de ámbito regional (ESBUD-91) con la finalidad de determinar en la población infantil de los municipios seleccionados, la prevalencia y grado de intensidad del ataque de la caries dental, el nivel de higiene oral y las necesidades de tratamiento. El segundo objetivo era servir de base para el estudio de viabilidad de la localización de futuras ubicaciones de plantas de fluoración de las aguas potables. Para este fin el estudio se centró en los municipios de la Comunidad Valenciana mayores de 30000 habitantes más aquellos incluidos en las grandes redes de abastecimiento (la red de Taibilla en Alicante y la red metropolitana de Valencia). Se exploraron los municipios de Castellón de la Plana, Vila-real, Sagunt, Paterna, Torrent, Alzira, Gandia, Xàtiva, Benidorm, Alcoi, Elda, Villena, la red de Taibilla y la red metropolitana de Valencia. Las conclusiones del estudio destacaron que la salud buco-dental en los diferentes municipios era satisfactoria y que la gran mayoría de los municipios estudiados cumplían en 1991 los objetivos fijados por la OMS para el año 2000. Por todo ello no parecía que la fluoración fuera una medida necesaria para la Comunidad Valenciana, más aun teniendo en cuenta, que la red de distribución de agua potable no presentaba los requisitos técnicos necesarios (Servicio de Epidemiología 1995).

La introducción de los planes de salud bucodentales con una finalidad preventiva en la población infantil por parte de los servicios públicos de salud de las comunidades autónomas que asumieron esas competencias surgió la necesidad de disponer de datos para la planificación sanitaria y la comparación entre diferentes regiones y países. Para tal fin, se empleó desde entonces la metodología de la Organización Mundial de la Salud (OMS) que fija una serie de normas y condiciones para la realización de este tipo de estudios epidemiológicos.

La encuesta de la O.M.S sobre la salud en España de 1985 fijó el techo máximo de afectación de la caries en nuestro país, donde los niños de 12 años presentaban 4,2 dientes permanentes afectados por caries (índice CAO.D=4,2) con una prevalencia de caries del 90,8%, y a los 6 años 3,6 dientes temporales afectados con una prevalencia del 75,5%. Posteriores estudios nacionales como el efectuado en 1994 ya comenzaron a mostrar una marcada tendencia decreciente de la caries dental. Esta tendencia ha sido observada en la mayoría de países desarrollados. (Cuenca 1986)(Sicilia et al. 1990).

Desde 1998 hasta 2010 se han realizado con metodología OMS en la Comunidad Valenciana 3 estudios epidemiológicos (1998-2004-2010), dirigidos desde la Unidad de Odontología Preventiva y Comunitaria del Departamento de Estomatología de la Universitat de València. Estos 12 años de seguimiento sexenal han permitido tener

una idea clara y objetiva de la evolución de las caries en la Comunidad Valenciana.

En el sexenio 1998-2004 la prevalencia de caries en dentición temporal a los 6 años se ha estabilizado alrededor del 32%, y el número de dientes temporales careados se ha situado en 1 (Ico=1). A los 12 años la prevalencia de caries en dentición permanente ha pasado del 46% al 42% y el número de dientes permanentes afectados por caries se ha mantenido alrededor de 1. Es a la edad de 15 años donde se observa el mayor descenso pasando la prevalencia de caries en dentición permanente del 69% al 55% y el índice CAOD bajando de 2,5 a 1,8. (Almerich Silla, Montiel Company 2006).

En el último sexenio, el correspondiente a 2004-2010, los resultados confirman que la caries sigue disminuyendo en la dentición permanente mientras que en temporal parece estabilizarse. Así en dentición temporal a los 6 años, el número de dientes temporales afectados por caries sigue siendo de 1 y la prevalencia de caries en dentición temporal 30%. Es a los 12 y 15 años donde encontramos un nuevo descenso, así en el CAO.D ha pasado de 1,1 a 0,83 con una prevalencia del 38% en el primero, y de 1,8 a 1,1 con una prevalencia de 43,6%, en el grupo de niños y niñas de 15 años. (Bravo et al. 2009)

	<i>1998</i>	<i>2004</i>	<i>2010</i>	<i>Tendencia</i>
<i>Índice cod (6 años)</i>	1,01	1,08	0,98	=
<i>Prevalencia de caries dentición temporal (6 años).</i>	32,8%	32,2%	30%	=
<i>Índice CAOD (12 años).</i>	1,08	1,07	0,83	↓
<i>Prevalencia de caries dentición permanente (12 años).</i>	45,9%	42,5%	37,7%	↓
<i>Índice CAOD (15 años).</i>	2,45	1,84	1,08	↓↓
<i>Prevalencia de caries dentición permanente (15 años).</i>	69,3%	55,9%	43,6%	↓↓

Tabla 1: Evolución de los índices de caries en la población infantil de la Comunidad Valenciana entre 1998 y 2010.

Podemos por lo tanto afirmar que la caries en dentición temporal permanece estabilizada desde finales de los años 90 en los niños de 6 años. Pero es en la caries que afecta a la dentición permanente donde encontramos que los índices han continuado bajando tanto a los 12

como a los 15 años, siendo en esta última cohorte donde el descenso ha sido más importante.

Referente al índice de restauración, que representa el porcentaje de los dientes afectados por caries que están obturados, en el sexenio 1998-2004 a la edad de 6 años y en dentición temporal pasó del 12% al 18%. En dentición permanente tanto a los 12 años que pasó del 45% al 33%, como a los 15 años del 56% al 45% se produjo un empeoramiento. En el último sexenio 2004-2010 se ha mantenido estabilizado en dentición temporal a los 6 años (del 18% al 14%) y se ha incrementado sustancialmente en dentición permanente, pasando del 33% al 59% a los 12 años de edad y del 45% al 72% a los 15 años de edad. (Bravo et al. 2009)

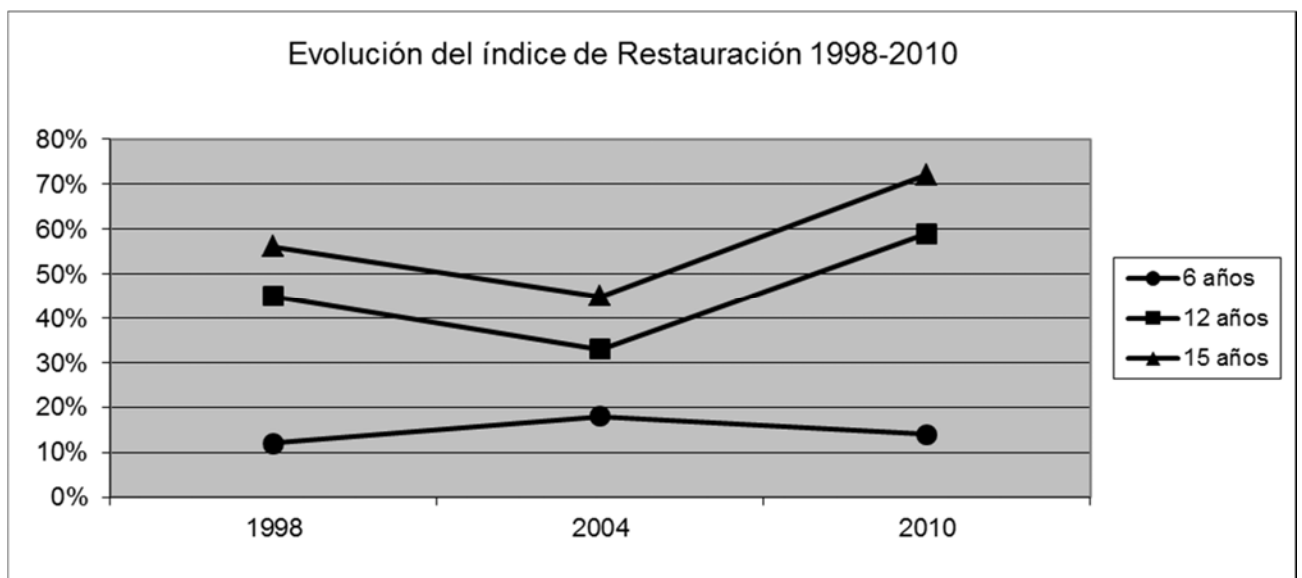


Grafico 1: Evolución del índice de restauración en dentición temporal a los 6 años y en dentición permanente a los 12 y 15 años de edad, durante el periodo 1998-2010.

En los últimos estudios hemos podido constatar el acumulo de caries en determinados grupos de riesgo, principalmente relacionados con el bajo nivel socioeconómico y que se ha visto muy representado en el colectivo inmigrante que ha tenido un crecimiento importante en los años anteriores a la actual crisis económica (Almerich-Silla, Montiel-Company 2007). Además se ha confirmado en la distribución de la caries en los niños un patrón característico denominado fenómeno 80:20, que nos indica que el 20% de los niños acumulan el 80% de las caries. Políticas con enfoques de alto riesgo han debido ser implementadas junto al enfoque tradicional comunitario para proporcionar a estos colectivos una atención bucodental apropiada a sus necesidades.

El SiC, índice de caries significantes a los 12 años es un nuevo indicador que viene registrándose desde 2004, y representa al índice CAOD del tercio de la población con más caries. Este índice se ha reducido de 2,94 en 2004 a 2,36 en 2010, mostrando que ese tercio de la población que acumula la mayor parte de la patología cariosa empieza a tener menos caries.

En 2007, un panel de expertos de la Sociedad Española de Epidemiología y Salud Pública Oral fijó unos objetivos de salud oral en España para 2015/2020. La mayor parte de los objetivos propuestos para la población infantil referentes a la caries han sido alcanzados por la población infantil de la Comunitat Valenciana a la

vista de los resultados obtenidos en la última encuesta de salud bucodental realizada en 2010.

	<i>Encuesta 2010</i>	<i>Objetivo propuesto para 2015/2020</i>
<i>Porcentaje de niños libres de caries en temporales (6 años).</i>	70%	$\geq 65\%$
<i>Índice CAOD (12 años).</i>	0,83	$\leq 1,0$
<i>SiC (12 años).</i>	2,36	$\leq 3,0$
<i>Índice de Restauración (12 años).</i>	59%	$\geq 60\%$
<i>Índice de Restauración (15 años).</i>	72%	$\geq 65\%$
Tabla 2: Cumplimiento de los objetivos de salud bucodental fijados en la población infantil para 2015/2020.		

Finalmente podemos concluir que la caries ha experimentado en los últimos años un descenso importante acorde a los esfuerzos y recursos invertidos situándose en unos bajos niveles similares a los obtenidos en otros países desarrollados de nuestro entorno. La política sanitaria en materia de salud oral tanto en su aspecto asistencial como

de promoción de la salud ha cumplido sus objetivos pero no podemos bajar la guardia. La sesgada distribución de la caries y su relación con factores socioeconómicos, implicará en los próximos años prestar mayor atención a los grupos de riesgo, verdaderas bolsas de enfermedad (Bravo et al. 2009)

1.1.4. ETIOPATOGENIA:

En el siglo XIX se identificó a las bacterias como agentes causantes de muchas enfermedades.

Existen varias teorías respecto a la etiología de la caries dental, de las cuales la más aceptada es la teoría “quimio parasitaria”. Según esta teoría, la caries se produce por la acción de ácidos orgánicos generados por bacterias orales por su actividad fermentativa sobre los carbohidratos. El crédito para la teoría “quimio parasitaria” o acidógena usualmente se atribuye a W.D. Miller (1890), pero es justo decir que sus conclusiones se basaron en los esfuerzos acumulados de otros investigadores, así como de sus propias investigaciones, durante el siglo XIX. En 1897, N.B. Williams publicó su observación de que el esmalte de los dientes humanos estaba cubierto con un material adhesivo “semejante a la gelatina”, compuesto de microorganismos y sugirió que este material podría ser el causante de la localización del ataque ácido de ciertas áreas de la superficie dental. En 1898, G.V. Black acuñó la frase “placas microbianas gelatinosas” para las bacterias sobre la superficie dental, y apoyó la idea de que las

bacterias productoras de ácidos son las responsables de la caries dental

Como ya hemos mencionado, fue entonces cuando se empezó a considerar la caries dental una enfermedad de origen bacteriano y desde entonces hasta ahora se han recopilado una gran cantidad de evidencias, que demuestran que los ácidos producidos por la fermentación bacteriana de los carbohidratos, son los responsables directos de la formación de las caries (Silverstone 1985a).

Los primeros experimentos de la caries sobre animales gnotobióticos, fueron publicados por Orland y cols. en 1954, y confirmaban la hipótesis de que las bacterias son un requisito imprescindible para el inicio y avance de la caries, al demostrar que la caries dental no se producía en animales libres de gérmenes, sin importar lo cariogénica que fuese la dieta que se les administrase(Orland et al. 1954)(Silverstone 1985a).

Varios estudios han demostrado que los antibióticos pueden reducir la incidencia de caries dental, tanto en el hombre como en animales de experimentación (McClure, Hewitt 1946). En los animales se han reducido el número de caries añadiendo penicilina en el alimento o en el agua de beber, y en el hombre se han reducido las caries poniendo penicilina en la pasta dental.

Esta hipótesis también es confirmada por el bajo índice de caries que presentan los niños que han sido tratados durante largos períodos

con altas dosis de penicilina para el tratamiento de la fiebre reumática o las enfermedades respiratorias crónicas(Littleton, White 1964) (Handelman, Mills & Hawes 1966).

Los factores que determinan la formación de caries son: microorganismos cariogénicos, dientes susceptibles y un sustrato adecuado. Deben presentarse simultáneamente para que la caries se manifieste. Estamos hablando de la bien conocida tríada de Keyes (Keyes 1962).

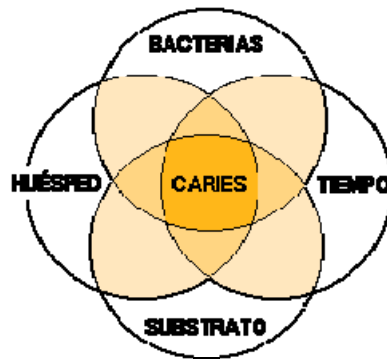


Fig.1. Diagrama de Keyes modificado por Newbrun.

Posteriormente, Ernest Newbrun consideró que debería tenerse en cuenta un cuarto factor, el tiempo, dado que los tres factores iniciales necesitan estar presentes simultáneamente durante un período determinado (Newbrun 1984).

Los anteriores son considerados los factores primarios, necesarios para el inicio de la caries. Existen otros factores que pueden favorecer o dificultar la enfermedad, son los llamados factores secundarios. Ejemplo de ellos son: la composición de la saliva, edad

del diente, morfología, concentración de fluoruros, frecuencia de la higiene bucal, comidas etc. (Nikiforuk 1986).

La saliva tiene un papel protector: efecto limpiador, acción antibacteriana, capacidad tampón y proporciona un ambiente saturado con calcio y fósforo; en el ambiente bucal existe un equilibrio entre desmineralización y remineralización dental (Rioboo 2002). Cuando la saliva se encuentra sobresaturada de calcio y fosfato tiene lugar la función reparadora. Glicoproteínas o proteínas salivares como la estaterinas, histatinas, cistatinas y proteínas ricas en prolina (PRP), se unen a la hidroxiapatita e inhiben la precipitación excesiva de fosfato cálcico. Algunas proteasas bacterianas y la calicreina de la saliva, las inactiva alterando este proceso regulador (Liébana, Castillo 2005).

El pH de la saliva siempre está cerca del punto neutro, entre 6.0 y 7.5, lo que significa que la saliva nunca es suficientemente ácida como para disolver el esmalte y ni siquiera cuando se ingiere azúcar la saliva llega a hacerse tan ácida como para disolverlo (Stralfors 1950).

1.1.4.1 PAPEL ESENCIAL DE LAS BACTERIAS

En la boca, la presencia de la placa bacteriana es esencial para la producción de caries, ya que el metabolismo bacteriano es el que produce el ácido a partir de los alimentos y la consistencia de la placa es la que ayuda a tener el ácido en contacto con la superficie del diente, protegiendo del efecto diluyente y amortiguador de la saliva.

En 1950, Orland y después Keyes y sus colaboradores, demostraron que la presencia de gérmenes es imprescindible para que se desarrollen caries dentales. En 1960, Keyes demostró experimentalmente la naturaleza infecciosa de la caries dental (Silverstone 1985c).

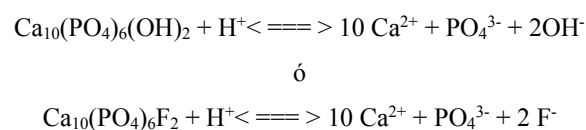
Posteriormente, el uso de roedores gnotobióticos ha ayudado a identificar las especies y combinación de especies que son cariógenas, y por lo tanto podrían ser cariógenas para el hombre (Silverstone 1985c).

Los gérmenes que producen caries en los seres humanos son principalmente estreptococos viridans, en particular la especie conocida como *Streptococcus mutans* y algunas cepas de lactobacilos y de actinomicetos. Estos microorganismos aislados de lesiones humanas han sido utilizados para inducir caries en monos previamente libres de ellas, mantenidos con dietas ricas en sacarosa y otros carbohidratos (Bowen et al. 1975).

El pH de la saliva siempre está cerca del punto neutro, entre 6.0 y 7.5, no siendo éste el caso de la placa bacteriana. Con un pH por debajo de 5 y en ciertos casos de 5.5, se produce la descalcificación del esmalte; la existencia de pH dentro de estos límites pueden ser demostrado en la placa dental después de ingerir carbohidratos.

La placa bacteriana presenta una mayor concentración de bacterias si la comparamos con la de la saliva, esto explicaría la rápida bajada del pH en la placa bacteriana cuando se consume sacarosa. El pH puede caer desde cerca de 6 hasta 4 en cuestión de minutos. Esta caída violenta, seguida de un lento retorno al pH de reposo cuando se ha acabado los carbohidratos fermentables, se conoce como la “curva de Stephan” (Silverstone 1985b).

La fase acuosa que se encuentra en contacto con la superficie del esmalte (película adquirida, placa bacteriana y saliva) sufre unos cambios cíclicos en su acidez como consecuencia de la fermentación de los hidratos de carbono de la dieta, realizada por los microorganismos de la placa. Cuando el pH de la interfase desciende se produce el fenómeno de *desmineralización*, descalcificación o desestructuración de las moléculas de hidroxiapatita o fluorapatita de la superficie del esmalte. Como consecuencia de esto tendremos:



Estas reacciones químicas son reversibles y se rigen por los principios de la ley de acción de masas. Mientras persiste la acidez el

pH se mantiene bajo y el fosfato (PO_4^{3-}) tiende a reducirse en formas no aptas para volver a combinarse y formar apatita de nuevo. Por otra parte, el oxidrilo (iones OH^-) tiende a combinarse con los iones ácidos para formar agua.

Cuando el ácido presente en la interfase es neutralizado por los sistemas tampón (calcio, fosfato y proteínas de la película, la placa y la saliva) se produce una acumulación de calcio y fosfatos disponibles para volver a reaccionar y hacer posible la *remineralización*, procediéndose a la formación de nuevas moléculas de apatita o fluorapatita a partir de los iones que procedían del fenómeno de descalcificación (fosfatos, calcio, oxidrilos y flúor) (Almerich 2005).

Cuando el pH de la interfase acuosa empieza a bajar hay un punto en el que el cristal empieza a disolverse, este es el *pH crítico*. El pH crítico depende de las concentraciones de calcio y fosfato en la saliva, pero en términos generales y para la hidroxiapatita se ha establecido en (5,2 - 5,5), mientras que para la fluorapatita está cerca de (4,5). Dependiendo de estas condiciones químicas, se ha demostrado que cuando el esmalte está expuesto a un tampón acuoso inorgánico con pH inferior a (4,5), la superficie queda grabada, dejando una lesión con la misma apariencia macro y microscópica de una erosión natural (consumo excesivo de frutas y bebidas ácidas). Sin embargo, cuando el esmalte es expuesto a un pH en la placa entre (4,5-5,5), se forma una

lesión como la caries, con una capa superficial relativamente poco afectada y una zona desmineralizada en la subsuperficie.

Estas reacciones de desmineralización/remineralización se suceden de forma cotidiana en la superficie del esmalte dental humano, sin que ello signifique el desarrollo de caries. Sólo cuando la fase de desmineralización se prolonga excesivamente y de forma reiterada, por la concurrencia de factores de riesgo (acumulación de placa, ingesta frecuente de hidratos de carbono) o por el fallo de los mecanismos de defensa (capacidad buffer de la saliva y la placa), acaba por presentarse la primera manifestación clínica de caries: la mancha blanca (Almerich 2005).

1.1.4.2 BIOFILM

La placa bacteriana es una biopelícula, entendiendo como tal una estructura que coloniza una amplia variedad de superficies presentes tanto en el hombre como en la naturaleza. Está constituida por la fusión de colonias de células microbianas adherentes (15-20% de su volumen) y una matriz intercelular (75-80%), la cual permite la entrada de agua y de otros nutrientes.

En la cavidad oral, la placa bacteriana dental se define como un conjunto de microorganismos firmemente adheridos entre sí y a una superficie, embebidos, entremezclados y rodeados de un material

extracelular abiótico de un triple origen : bacterias, saliva y dieta(Liébana, Castillo 2005).

Las biopelículas dentales están relacionadas con dos tipos de procesos infecciosos orales: las enfermedades periodontales y la caries. Para explicar la participación de ellas en la génesis de estas patologías se han propuesto cuatro tipos de hipótesis. Hipótesis de placa inespecífica. Hipótesis de placa específica. Hipótesis de placa ecológica. Hipótesis mixta que es un compendio de las tres anteriores.

Tres son los géneros microbianos especialmente implicados en la aparición de caries.

- Género *Streptococcus*. Estreptococos del grupo *mutans*. En los humanos, y atendiendo a su capacidad cariogénica, destacan las especies *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus* y *S. rattus* (Liébana, Castillo & Rodríguez-Avial 2002).
- Género *Lactobacillus*, p. ej., *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. salivarius*.
- Género *Actinomyces*, menos cariogénico que los dos anteriores géneros (Liébana, Castillo 2005).

1.1.4.3 BACTERIAS ODONTOPATÓGENAS

Los estudios epidemiológicos, han demostrado que la actividad de caries se correlaciona positivamente con la concentración de *S. mutans* y con los *Lactobacillus* presentes en la placa y en la saliva

(Zickert, Emilson & Krasse 1982), no habiéndose encontrado una correlación igual entre la prevalencia de caries y otras especies microbianas, exceptuando a los Actinomyces en las caries de raíz (Gibbons, van-Houte 1978) (García-Santos 2004) (Loesche 1982).

1.1.4.3.1 GÉNERO LACTOBACILLUS

Sobre todo las especies homofermentativas, ya que producen prácticamente solo lactato, que es el ácido orgánico más desmineralizante (p.ej., *L. acidophilus*, *L. gasseri* y *L. salivarius*). Estos microorganismos tiene poder acidógeno, acidúrico y acidófilo, algunas cepas sintetizan homopolímeros extra e intracelulares a partir de la sacarosa y poseen una discreta actividad proteolítica con posibles implicaciones en la caries de dentina. De todos estos factores, el más destacado es el poder acidófilo, mayor que el de los estreptococos del grupo mutans. Sin embargo carecen de adhesinas para fijarse a la película adquirida (Liébana, Castillo 2005).

1.1.4.3.2 GÉNERO ACTINOMYCES

Con menor poder cariogénico, algunas de sus especies y cepas actúan produciendo ácidos, adhiriéndose, coagregándose mediante fimbrias, elaborando homopolímeros intra y extracelulares (estos

últimos más nutricionales que adherentes), dotados de cierta actividad proteolítica (Liébana, Castillo 2005).

1.1.4.3.3 GÉNERO STREPTOCOCCUS:

Los estreptococos son cocos Gram positivos, generalmente a capsulados; cuando tiene cápsula es antiopsonica y si es polisacárida tiene carácter antigénico. No móviles, aerobios o anaerobios facultativos, pueden presentarse como cocos aislados, en parejas y en forma de cadenas cortas o largas, debido a que no se separan fácilmente después de su división (Mouton, Robert 1995). Presenta un metabolismo fermentativo y tienen actividad catalasa negativa, lo que los diferencia de los estafilococos (Liébana, Castillo & Rodríguez-Avial 2002).

Los estreptococos están presentes en todas las placas, son más abundantes cuando se desarrollan caries y se encuentran más frecuentemente sobre las superficies cariadas que sobre las superficies libres de caries (Street, Goldner & Le Riche 1976). El género *Streptococcus* agrupa especies muy diferentes por sus características químicas taxonómicas y por su poder patógeno:

- Grupo *S. mutans*: *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. ferus*, *S. macacae* y *S. downei*.
- Grupo *S. anginosus*: *S. anginosus*, *S. constellatus* y *S. intermedius*.

- Grupo *S. oralis*: *S. sanguis*, *S. parasanguis*, *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. oralis*, y *S. crista*.
- Grupo *S. salivarius*: *S. salivarius* y *S. vestibularis* (Liébana, Castillo & Rodríguez-Avial 2002).

En 1924 J. Kilian Clarke logra identificar, entre los microorganismos presentes en lesiones de caries, una bacteria de forma esférica a la que denominó, por su aspecto *Streptococcus mutans*.

A pesar de este importante hallazgo los trabajos de Clarke no gozaron de interés científico durante la década de los veinte, aun habiéndose comprobado sus observaciones en 1927 por I.H. McLean y G.F. Abercrombie, bacteriólogos de la Universidad de Cambridge y por W.M. Scott, médico del Ministerio de la Salud de Inglaterra, quienes relacionaron el *Streptococcus mutans* con casos fatales de endocarditis e inflamaciones pericárdicas. Después de estas publicaciones no volvió a tratarse el tema en la literatura científica por más de dos décadas (Tomás-Villegas 1997).

Los trabajos de Fitzgerald y Keyes, sobre la transmisión de la caries en animales de laboratorio (ratas y hámsteres), libres de gérmenes obtenidos y criados específicamente con ese fin, culminaron con la identificación del grupo de *Streptococcus* como

responsable de la caries dental. Estos trabajos relegaron al *Lactobacillus* a un papel secundario en el inicio de la caries (Fitzgerald, Keyes 1960).

En la cavidad bucal se han aislado *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus sanguinis* (*Streptococcus sanguis*), *Streptococcus crista*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus anginosus* y *Streptococcus Vestibularis* (Becker et al. 2002) (Schupbach, Osterwalder & Guggenheim 1996) (Nagaoka et al. 1995) (Tong, Gao & Dong 2003).

Los *Streptococcus mutans* cariogénicos son clasificados en siete especies: *Streptococcus cricetus* (serotipo a), *S. rattus* (el serotipo b), *S. mutans* (los serotipos c, e, y f), *S. sobrinus* (los serotipos d y g), *S. downei* (el serotipo h), *S. ferus* (el serotipo c), y *S. macacae* (el serotipo c) (Whiley et al. 1988) (Kozai et al. 1999). Las especies, *S. mutans* y *S. sobrinus* son las que más frecuentemente se aislaron de la cavidad oral en humanos (Hamada, Slade 1980), y estas dos especies se han implicado como los principales organismos causantes de caries dentales. Varios estudios epidemiológicos han mostrado que el predominio de *S. sobrinus* está más estrechamente asociado con la alta actividad de caries que el de *S. mutans* (Fujiwara et al. 1991) (Hirose et al. 1993).

De todas estas especies la de *Streptococcus mutans* ha sido la más estudiada.

Un estudio, realizado en Japón, en 20 matrimonios y sus 36 hijos, encontraron 144 genotipos, de los cuales 114 pertenecían al grupo de *S. mutans* (serotipo “c” 66.7% y serotipo “e” 12.5%) y 30 al grupo de *S. sobrinus* (serotipo “d” 13.2% y serotipo “g” 7.6%) (Kozai et al. 1999).

Los serotipos “c” y “e” son los más ácido-tolerantes, con un grado óptimo de pH 5.0 para la producción de ácido láctico (Harper, Loesche 1983). Los niños contaminados con ambos estreptococos, el mutans y el sobrinus, presentan una incidencia significativamente mayor de caries que los que tenían sólo *S. mutans* (Kohler, Andreen & Jonsson 1988) (Okada et al. 2002).

1.1.4.4 GRUPO STREPTOCOCCUS MUTANS Y CARIES

La presencia de las bacterias streptococcus mutans y sobrinus es considerada como los principales agentes etiológicos en la enfermedad de la caries dental (Ramos-Gomez et al. 2002). El *Streptococcus mutans* tiene una mayor prevalencia, en la placa dental, que el *Streptococcus sobrinus* (Loesche 1986). Por otra parte, se ha

demostrado que la presencia del *Streptococcus sobrinus* conlleva una mayor incidencia de caries (Bowden 1996).

La prevención de la caries actualmente requiere un nuevo enfoque, consistente en determinar los individuos de alto riesgo, en los cuales las medidas clásicas de prevención como el uso de fluoruros, medidas de higiene dental y dietéticas, selladores de fisuras, etc. se han mostrado insuficientes.

Dentro del grupo de *Streptococcus mutans* se encuentran dos especies, *Streptococcus mutans* (serotipos c, e y f) y *Streptococcus sobrinus* (serotipos d y g), fuertemente implicados en el inicio de la caries dental en humanos (Koga et al. 2002) (Loesche 1986). Por todo ello se considera que la determinación de estas dos especies en la infancia temprana podría ser importante en la predicción y prevención de la caries dental.

Ambas bacterias pueden secretar al menos dos tipos distintos de glucosil-transferasas GTF-I y GTF-S que catalizan la formación de glucanos no hidrosolubles e hidrosolubles respectivamente. La formación de glucano facilita la colonización de los *Streptococcus* sobre la superficie dental. El *S. mutans* produce dos enzimas GTF-I (la GTF-I codificada por el gen *gtfB* y la GTF-SI codificada por el gen *gtfC*) y un enzima GTF-S codificada por el *gtfD*. Por otra parte el *S. sobrinus* produce una enzima GTF-I codificada por el gen *gtfI* y tres enzimas GTF-S codificada por los genes *gtfT*, *gtfU* y *gtfS*.

Investigadores japoneses Oho T, Yamashita Y, Shimazaki Y, Kushiya M, Koga T (Oho et al. 2000) han desarrollado un método de PCR para la detección en saliva de *S. Mutans* y *S. Sobrinus* a partir de primers específicos del gen que codifica la glucosil-transferasa (gtfB de *S.mutans* y gtfI de *S.sobrinus*) que puede ser usado en estudios epidemiológicos para evaluar el nivel de prevalencia de estos organismos.

Autores como Igarashi (1996) (Igarashi, Yamamoto & Goto 1996) y Shiroza (1998) (Shiroza et al. 1998) desarrollaron métodos de detección de *S.mutans* por PCR a partir de muestras de placa dental. Debido a que para estudios epidemiológicos las muestras de placa dental pueden ser difíciles de obtener, autores como Oho T (Oho et al. 2000) sostienen que para la realización de estudios epidemiológicos amplios sería recomendable la utilización de muestras de saliva.

Basándose en una fuerte correlación entre los recuentos de MS en saliva y placa, la determinación de MS en saliva ha sido propuesto por Rupf S, Kneist S, Merte K, y Eschrich K (1999) (Rupf et al. 1999) como un método para la identificación de pacientes con alto riesgo de caries dental.

Un estudio publicado en Caries Research por Gronroos y Alaluusua (Gronroos, Alaluusua 2000) analiza la colonización por parte del *S. mutans* de diferentes superficies dentarias concluyendo

que los patrones de colonización de los diferentes especies de *Streptococcus mutans* pueden variar entre las superficies dentarias de un mismo individuo.

En referencia a estudios epidemiológicos encontramos, en el Journal of Medical Microbiology en 2002 (Okada et al. 2002), un trabajo de detección de *S.mutans* y *S.sobrinus* en muestras de placa dental obtenidas de todos los dientes temporales erupcionados en 77 niños de 3-5 años. Al compararlos con el índice cod concluyen que aquellos que presentan ambas bacterias tienen una incidencia de caries significativamente mayor que aquellos que presentan únicamente el *S.mutans*.

Un estudio mejicano de Aguilera Galaviz LA y col (Aguilera Galaviz, Aceves Medina & Estrada Garcia 2002) evalúa, la presencia de ciertas cepas cariogénicas de *S.mutans* en placa dental, relacionándolas con los índices CAO (D). Sus resultados concluyen que la determinación de la presencia de estas bacterias es más importante que la cantidad de placa acumulada, aunque matiza que otros factores como dieta, higiene, antecedentes genéticos, rango de saliva y la presencia de anticuerpos específicos también juegan un papel importante en el desarrollo de la caries.

Un estudio chino publicado en Caries Research en 2003(Wu et al. 2003) sobre 126 individuos de edades 25-55 años a partir de muestras de placa recogidas del primer molar permanente. Los

resultados coinciden con los obtenidos en los estudios anteriores, confirmando que aquellos sujetos portadores de *S. mutans* y *S. Sobrinus* presentan una prevalencia de caries significativamente mayor que aquellos que presentan únicamente *S. Mutans* o *S. Sobrinus*.

Basándonos en toda la información recogida podemos afirmar que el futuro de la prevención de la caries se encuentra en la determinación de las bacterias presentes en la boca de los individuos.

En la actualidad el diagnóstico de la enfermedad cariosa se basa en la detección precoz de la presencia de lesiones, es decir cuando la enfermedad ya se manifiesta. El nuevo enfoque supone determinar el riesgo, es decir, diagnosticar la enfermedad antes de que esta aparezca y por ello aplicar todas las medidas preventivas disponibles en estos individuos. Los beneficios obtenidos por la población expresados tanto en términos de salud como en términos monetarios serian enormes.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Los estudios epidemiológicos sirven para conocer el estado de salud oral de las poblaciones. Su realización periódica permite estimar la evolución de la salud de una población. En la Comunidad Valenciana se han realizado cinco estudios epidemiológicos, en 1986, 1991, 1998, 2004 y 2010, todo ello permite tener datos que nos definen la evolución de las caries durante esos años.

En el desarrollo del trabajo de campo, durante las exploraciones del estudio del 2004, se procedió a la toma de muestras de saliva en niños, escolarizados en el curso 2004-2005. Estas muestras se han utilizado para hacer identificaciones de *Streptococcus mutans* y *S. sobrinus*, con técnicas de PCR cuantitativa.

El futuro de una parte de la prevención de la caries se encuentra en la determinación de las bacterias presentes en la boca de los individuos. La realización de estudios epidemiológicos transversales, así como las nuevas tecnologías, nos ofrecen la oportunidad de estudiar nuevos factores asociados a la caries dental, como la presencia en saliva de *S. mutans* y *S. sobrinus*.

Todo ello para poder conseguir los siguientes objetivos:

1.-Objetivo general:

Estudio de la prevalencia de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* en la población infantil valenciana

2.-Objetivos específicos:

Puesta a punto de un método de PCR para identificar y cuantificar la presencia de *Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus mutans* en muestras de saliva humana.

Relacionar la prevalencia de caries y los índices CAO (D) y co (d) con la presencia de S. Mutans, S. Sobrinus y la asociación de ambos.

MATERIAL Y MÉTODO

1. MATERIAL Y MÉTODO

La encuesta realizada ha seguido los requisitos recomendados por la OMS para este tipo de estudios (Ref. bibliográfica de la OMS-OHS-4^a ed.). A continuación describimos algunos de los apartados de la metodología que consideramos de importancia en relación al presente estudio:

1.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.

Para alcanzar los objetivos se ha procedido al diseño de un estudio de prevalencia, un estudio también llamado transversal o de corte, donde se va proceder a estudiar las condiciones o el estado de salud oral a través de unas variables, de un grupo de población en un momento dado.

1.2. FINANCIACION.

El estudio ha sido financiado por:

- La Conselleria d'Educació de la Generalitat Valenciana, proyecto GVPR/2008/383, investigador principal Dr. José María Montiel Company.

- Convocatoria de ayudas para proyectos de investigación en programas de salud, prevención y predicción de la enfermedad, convocadas por la Orden de 21 de diciembre de 2009, de la Conselleria de Sanitat (DOCV núm. 6175, de 30.12.2009) y adjudicadas por la resolución, de este mismo organismo, de 5 de julio de 2010 (DOGV núm. 6319, de 27.07.201).
- Ayudas de la Universitat de València-Vicerrectorado de Investigación: Estudio Epidemiológico de Salud Bucodental en la Población Escolar de la Comunidad Valenciana 2010: (UV-INV-AE11-40221) Investigador principal Dr. José Manuel Almerich Silla.
- Dirección General de Salud Pública de la Conselleria de Sanitat de la Generalitat Valenciana: proyecto de investigación “ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO DE SALUD BUCODENTAL EN LA POBLACION ESCOLAR DE LA COMUNIDAD VALENCIANA – 2010” (016/2010). Investigador principal Dr. José Manuel Almerich Silla.

3.3 TAMAÑO Y SELECCIÓN DE LA MUESTRA.

La población objeto de nuestro estudio y a la cual queremos inferir las conclusiones es la población infantil de la Comunidad Valenciana. Las edades a explorar son las recomendadas por la Organización Mundial de la Salud. Este organismo propone las edades 5, 12 y 15 años como óptimas para las exploraciones, aunque reconoce que también puedan emplearse los 6 años. En nuestra Comunidad por razones de índole práctica, al igual que sucedió en el anterior estudio exploramos los niños de 6 años en vez de los 5, porque es la edad donde se inicia la escolarización.

El requisito necesario para poder realizar la inferencia de los resultados a la población infantil de la comunidad valenciana es la obtención de una muestra representativa. Mediante la selección aleatoria se obtienen muestras que son una imagen en pequeño, con ligeras distorsiones debidas al azar, de la población que representan. Una muestra de este tipo se denomina *muestra sin sesgo*.

El muestreo más adecuado cuando los individuos de una población están organizados en grupos pequeños (aulas), es el denominado *muestreo por conglomerados* (Doménech 2002) Consideramos a las aulas de 1º de primaria, 1º de ESO y 4º de ESO como conglomerados de niños con las edades representativas.

Este tipo de muestreo disminuye el coste y mantiene la precisión de las estimaciones respecto del muestreo aleatorio simple, siempre y cuando, los conglomerados sean tan heterogéneos como las variables a estudiar lo sean dentro de la población general.

En la Comunidad Valenciana existen 1199 colegios grandes (con al menos 30 escolares pertenecientes a 1º de primaria, 1º de ESO o 4º de ESO) y 430 colegios pequeños (con menos de 30 escolares de 1º de primaria, 1º de ESO o 4º de ESO) que se pueden agrupar en 23 áreas. En total 1222 conglomerados.

A partir de los datos de la prevalencia de caries obtenida en el estudio epidemiológico de 1998 en cada una de las edades y del tamaño promedio de los conglomerados del anterior estudio, se ha calculado el número de conglomerados a explorar siempre para una precisión (error de estimación definido por nosotros) de 0.04 y con una confianza del 95 % ($\alpha=0.05$).

<i>Curso</i>	<i>Nº de conglomerados</i>
<i>1º de primaria</i>	15.42
<i>1º de ESO</i>	26.59
<i>4º de ESO</i>	19.91

Tabla 3: Resultado del cálculo del número de conglomerados necesarios.

Se efectuaron tres sorteos independientes, para obtener las muestras de los alumnos de cada curso. En cada uno de los sorteos se dispuso un vector con las etiquetas de los colegios ordenados de menor a mayor. Estas se repitieron tantas veces como alumnos entran en el sorteo. Sobre este vector se realizó un muestreo sistemático. Cada centro seleccionado supuso la revisión de un grupo de 30 alumnos.

Una vez en el centro se exploraron un máximo de 30 alumnos, aunque el centro dispusiera de más alumnos de esa edad, produciéndose en este caso una selección aleatoria simple. Se seleccionaron 9 colegios de la provincia de Castellón, 16 de Alicante y 35 de Valencia.

De la población examinada, las muestras de saliva solo fueron recogidas de los niños cuyos padres firmaron el consentimiento informado, quedando una muestra total de 894 individuos, divididos en 280 de 6 años, 303 de 12 años y 311 de 15 años de edad. En la realización del muestreo fuimos asistidos y supervisados por la Dirección General de Salud Pública de la Generalitat Valenciana.

3.4 RECURSOS HUMANOS.

Para la realización del estudio se contrataron 6 licenciados en Odontología, a través de una beca de colaboración en el Departament d'Estomatologia de la Universitat de Valencia (BC04-186), que

serían los encargados de realizar el trabajo de campo del estudio epidemiológico. Los 6 odontólogos seleccionados se dividieron 3 equipos de exploración asignándoles una función de explorador o anotador dependiendo de la prueba de calibración.

3.5. CALIBRACIÓN PREVIA AL ESTUDIO.

Para asegurar la fiabilidad y validez de los resultados se realizó una calibración de los odontólogos seleccionados. Durante los días 8 y 9 de noviembre de 2004 se realizaron unas sesiones donde se expusieron los criterios diagnósticos y se formaron a los odontólogos para la realización del estudio.

El día 15 de noviembre se efectuó la evaluación de los odontólogos mediante una prueba de calibrado. Diez niños de 6 años fueron explorados por un explorador, patrón de referencia, perfectamente adiestrado con los criterios diagnósticos OMS. A continuación los 6 odontólogos exploraron a los niños. En total se realizaron 70 exploraciones.

Se realizó un análisis de la concordancia Inter.-examinadores mediante un índice Kappa en el diagnóstico de caries. Los resultados fueron los siguientes:

<i>Odontólogo</i>	<i>% de acuerdo</i>	<i>Kappa</i>
1	96,4%	0,225
2	99%	0,857
3	99,4%	0,91
4	99,4%	0,85
5	96%	0,148
6	97,7%	0,772
Tabla4: Concordancia inter-examinador		

Entre 0.61-0,80 concordancia buena.

Entre 0,81-1 concordancia muy buena.

A partir de estos resultados aquellos tres odontólogos que obtuvieron mejor índice de concordancia Kappa fueron designados como exploradores. Los tres restantes hicieron de anotadores.

Se formaron 3 equipos de exploración compuestos por un odontólogo explorador y un odontólogo anotador.

3.5. AUTORIZACIONES.

Para poder realizar las exploraciones a los niños se procedió en primer lugar a enviar una carta al director del centro educativo. En el

interior del sobre encontraba una carta del director general de salud pública dirigida al director y a los padres de los niños donde se solicitaba la colaboración de ambos en el proyecto y se exponía la importancia del proyecto. El director del centro se encargaba de que los padres recibieran la carta y firmaran la autorización necesaria sin la cual, no se podría explorar al niño. También el sobre contenía una carta del director del proyecto en el Departament d'Estomatologia donde le explicaba todos los pormenores del mismo.

Una vez explorados los niños, se emitía un informe a los padres con los hallazgos más importantes para que estuvieran informados.

3.6. MATERIAL UTILIZADO.

El material utilizado para la exploración consistía en una sonda periodontal tipo OMS y un espejo plano intraoral del nº 5. Cada equipo de exploración disponía de un recipiente portátil de plástico con 35 juegos de sonda y espejo debidamente esterilizado y conservado en bolsas selladas. El recipiente plastificado se utilizaba a su vez para la recogida del material usado. Con cada niño se usaba un par de guantes de látex y mascarillas desechables. Al terminar la jornada de exploración el material era esterilizado en autoclave en la clínica odontológica de la Universitat de València. Para la iluminación llevaban una lámpara portátil de 60 Watios. Los equipos

disponían de un número suficiente de formularios o fichas de exploración y de cuestionarios-test.

3.7. RECOGIDA DE DATOS.

Las exploraciones se realizaron en los mismos centros educativos, en los lugares elegidos por cada centro. Los exploradores fueron adiestrados para que el acto de la recogida de datos se realizase en las mejores condiciones posibles.

El examen se realizaba con el niño sentado en una silla con el cuello extendido y el explorador enfrente sentado. Mientras el explorador iba realizando la exploración en voz alta, el anotador a su lado iba rellenando la ficha de exploración. La iluminación fue constante durante todas las sesiones de exploración ya que disponían de una lámpara portátil con una luz en el espectro blanco-azul.

Las sesiones de exploración no superaron en ningún momento los 30 niños seguidos para evitar los fenómenos de cansancio visual. La duración media de cada exploración era de 5 minutos. En la zona del examen se tuvo en cuenta evitar tanto el ruido como la aglomeración que pudieran distraer o entorpecer el proceso de recogida de los datos.

3.8. PROTOCOLO DE RECOGIDA DE MUESTRA DE SALIVA.

Material necesario: puntas de papel del número 50 estériles, tubos eppendorf estériles y pinza de boca estéril, hoja de recogida de muestra, rotulador indeleble y nevera portátil.

Procedimiento:

Con guantes estériles abrir la caja de las puntas de papel y con la pinza coger una punta de papel del número 50 y colocarla en la punta de la lengua del paciente. Posteriormente el paciente cierra la boca y esperamos un minuto para que la punta de papel esté totalmente empapada de saliva.

Recogemos la punta de papel con la pinza. Previamente abriremos el tubo eppendorf e introduciremos la punta de papel en el interior del tubo con cuidado de no tocar la boca del tubo. El tubo se cierra y se comprueba que esté perfectamente cerrado.

Anotamos con un rotulador indeleble el código del paciente.

Anotamos en la hoja de recogida de muestras: fecha de recogida, nombre del paciente y código del mismo.

Introduciremos el tubo con la muestra en el interior de la caja de corcho correspondiente y ésta en el interior de la nevera portátil hasta que sea guardada en un congelador. Es importante que la muestra no permanezca a temperaturas superiores a 5 grados centígrados. Ninguno de los tiempos de transporte excedió de las 4 horas. Los tubos fueron guardados un congelador con una temperatura de -80°C.



3.9. PERÍODO DE ESTUDIO.

El trabajo de campo se desarrolló entre el 15 de noviembre de 2004 y el 15 de diciembre del mismo año.

3.10. PROCESAMIENTO DE LOS DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos fueron procesados y almacenados en una base de datos diseñada a tal fin con el programa ACCES® de Microsoft®. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 18.0®. Se emplearon para la comparación de medias los test ANOVA y T de Student, y para la comparación de proporciones el test Chi cuadrado. Además se realizó una estadística multivariante con regresión logística. Se estableció un nivel de significación $p < 0,05$.

3.11. FORMULARIO DE EXPLORACIÓN.

Para la recogida de los datos se ha utilizado un formulario de exploración similar al empleado para la encuesta epidemiológica de 1998 con el fin de asegurarnos la comparación inter-encuestas. El diseño del formulario presenta una serie de campos con variables a explorar que van desde la identificación, estado de caries, índice periodontal comunitario, fluorosis dental, mal oclusiones, etc. No es el *formulario OMS de evaluación de la salud bucodental de 1997*, pero algunos campos de nuestro formulario coinciden exactamente con él, caso de la exploración de la fluorosis, del índice periodontal comunitario, del estado de la caries, incluso de las opacidades del esmalte. (Ver anexo).

De todos los datos recogidos en los distintos formularios empleados se utilizan las siguientes variables:

- Índice CAO (D).
- Componente C de ICAO (D).
- Índice co (d).
- Componente c del Ico (d).
- Prevalencia de caries ICAO (D)>0.
- Prevalencia de caries Ico (d)>0.
- Clase social.
- Cepillado dental.
- Enjuagues de Flúor.

- Ingesta de alimentos cariogénicos entre comidas.
- Presencia de *S.mutans*.
- Presencia de *S. Sobrinus*.
- Presencia de la asociación *S. mutans-S. sobrinus*.
- Ausencia de *S. mutans* y *S. sobrinus*.

3.12. CUESTIONARIO-TEST

Es un cuestionario de preguntas tipo test auto administrado sobre hábitos de higiene, asistencia al dentista, conocimientos sobre la utilidad del flúor, cariogenicidad de ciertos alimentos, frecuencia de cepillado e ingesta de alimentos ricos en hidratos de carbono. Este cuestionario a diferencia del formulario de exploración fue rellenado sólo por los niños de 12 y 15-16 años.

3.13 TÉCNICA DE PCR CUANTITATIVA

La reacción en cadena de la polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR ("polymerase chain reaction"), es una técnica que fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una

cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina), y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora (el cebador, en inglés "primer")(Mullis et al. 1986).

Sin embargo esta técnica tiene algunas limitaciones como la dificultad de cuantificar el producto de la PCR y el riesgo de provocar contaminación en el laboratorio. Para superar esta limitación se ha desarrollado la técnica de PCR en tiempo real, también llamada PCR cuantitativa en tiempo real. Esta técnica está basada en la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y se usa para amplificar y al mismo tiempo cuantificar moléculas de ADN o ADN complementario (ADNc) específicas y así acceder a datos fiables y precisos sobre la expresión genética de las células en estudio. Para obtener estos resultados, este sistema incluye dos componentes: elementos ópticos integrados al termociclador y marcadores fluorescentes que proporcionan información acerca de amplificación a lo largo de los ciclos de la PCR(Heid et al. 1996).

Usamos un método basado en la PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) para la detección cuantitativa de los patógenos dentales *S. mutans* y *S. sobrinus*.

Para la realización de las curvas patrón se utilizaron las cepas bacterianas *S. mutans* (CCUG 11877T; serotipo c; Clarke 1924-AL) y *S. sobrinus* (CCUG 27507; serotipo d; Coykendall 1983-VP). Las cepas bacterianas se cultivaron en placas de agar sangre y posteriormente se realizó una suspensión a 0.5 McFarland (equivalente a 1.5×10^8 UFC/ml). A partir de aquí se realizaron diluciones seriadas para obtener suspensiones bacterianas desde 10^1 hasta 10^7 UFC. Con estas diluciones se realiza la calibración del termociclador.

El aislamiento y purificación del ADN genómico se realizó con el ChargeSwitch Forensic DNA Purification kit (Invitrogen). El método de qPCR se realizó según el protocolo descrito por Yoshida A *et al.* (Yoshida et al. 2003) y Suzuki et al. (Suzuki et al. 2004).

3.14 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Usaremos Bolas magnéticas. Con esta tecnología, los ácidos nucleicos se unen selectivamente a bolas paramagnéticas en presencia de sales caotrópicas mientras que el resto de los contaminantes son eliminados de la muestra. Los ácidos nucleicos purificados se eluyen de la solución con las bolas paramagnéticas bajo condiciones de baja salinidad y están listos para ser usados en posteriores aplicaciones.

Esta técnica nos la ofrece:

- ChargeSwitch® Forensic DNA Purification Kit
- Catalog no. CS11200.
- 25-0826 Version A; 21 Dec 2004



Los pasos para preparación de la muestra son los siguientes:

1. Preparación de la muestra.

1.1 Preparamos un baño de laboratorio a 55°C.



1.2 Agregamos 1 ml Lysis Buffer (L13) y 10 μ l del Proteinase K, a un tubo eppendorf que contiene la muestra, usando micro pipetas.



1.3 Incubamos en 55°C durante 60 minutos.

1.4 Quitamos la muestra y trasladamos el sobrenadante a un tubo nuevo.



2. Fijar el DNA.

2.1 Agregue 200 μ l de Purification Buffer (N5) al tubo.



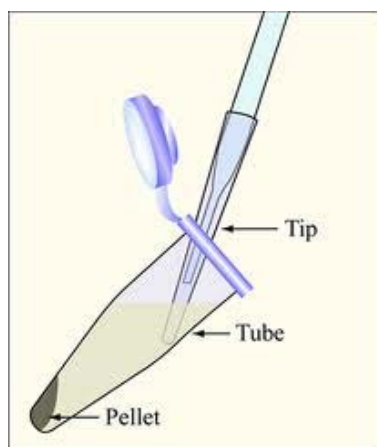
2.2 Agitamos ChargeSwitch®Magnetic Beads para que los granos magnéticos queden en suspensión, entonces agregamos 20 μ l de granos a la muestra. Los mezclamos.



2.3 Lo dejamos un minuto a temperatura ambiente, después colocamos el tubo en el de MagnaRack durante 1 minuto.



2.4 Quitamos y desechamos el sobrenadante, después sacamos el tubo del imán. (Magna Rack)



3. Lavado de los granos.

3.1. Agregamos 500 μ l Wash Buffer (W12) al tubo, y mezclamos con una pipeta suavemente hacia arriba y hacia abajo dos veces.



3.2. Colocamos el tubo en MagnaRack durante 1 minuto.

3.3. Quitamos y desechamos el sobrenadante, después se quita el tubo del imán.

3.4. Repetimos el proceso 2 veces.

4. Enjuague del DNA y extracción del mismo.

4.1. Agregamos 150 μ l Elution Buffer (E5) al tubo, y mezclamos con una pipeta suavemente arriba y abajo hasta que los granos se suspenden de nuevo totalmente.



4.2. Dejamos a la temperatura ambiente durante 1 minuto.

4.3. Colocamos el tubo en el de MagnaRack durante 1 minuto, o hasta que se forma un conglomerado de granos bien definido.



4.4. Transferimos la solución del DNA purificado a un tubo eppendorf nuevo.

Los tubos eppendorf, con las muestras del DNA purificado se guardaron en refrigerador a -80°C , para su posterior utilización.

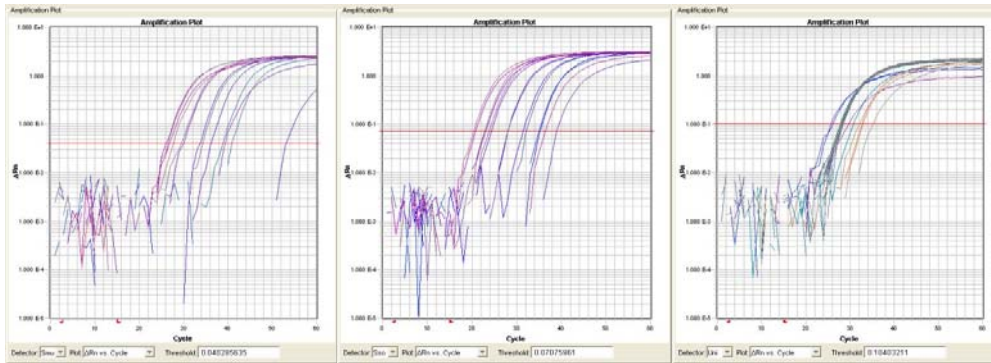
3.15 TAQMAN:

Las qPCR se realizaron con el ABI Applied Biosystems 7900HT.



Curvas estándar se obtuvieron utilizando las cepas bacterianas *S. mutans* (CCUG 11877T, serotipo c; Clarke 1924-AL) y *S. sobrinus* (CCUG 27507, serotipo d; Coykendall 1983-VP). Las cepas bacterianas fueron cultivadas en placas de agar sangre y luego sometido a suspensión 0,5 de McFarland (equivalente a 1.5×10^8 UFC/ml). Se realizaron diluciones seriadas para obtener suspensiones bacterianas de 1×10^0 a 1×10^7 CFU. La detección cuantitativa de *S. mutans* y *S. sobrinus* se realizó mediante el ensayo de TaqMan Yoshida A *et al.* (Yoshida et al. 2003). Brevemente, pares de primers gen-específicos (200 nM) y sondas (250 nM) para *S. mutans* y *S. sobrinus* fueron utilizados con 1 X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) y 5 μ l de ADN bacteriano aislado en el volumen de reacción de 20 μ l. Las condiciones PCR fueron 10 min a 95 ° C para la activación de la enzima, seguida por 45 ciclos de dos etapas (15 sec 95 ° C, 1 min a 58 ° C).

La detección se realizó mediante el sistema de detección de secuencia ABI PRISM 7900. Curvas estándar para cada organismo se obtuvieron de la amplificación del ADN genómico de las muestras que contienen 1.0×10^0 a 1.0×10^7 CFU.



S. mutans

S. sobrinus

Universal

Cada muestra se analizó por triplicado y el valor de Ct de cada muestra fue convertido a la cantidad de *S. mutans* y *S. sobrinus* utilizando las curvas estándar de medida en el mismo experimento. La linealidad y la sensibilidad del ensayo se determinaron de estas curvas estándar por qPCR. La detección y cuantificación fue lineal en un rango de 1.0×10^2 y 1.0×10^7 CFU por la mezcla de reacción para *S. mutans* y *S. sobrinus*. Este análisis fue utilizado para determinar la cantidad de *S. mutans* y *S. sobrinus* de 280 de 6 años, 303 niños de 12 y 311 de 15 años de edad.

RESULTADOS

2. RESULTADOS

El tamaño total de la muestra ha sido de 894 individuos, divididos en 280 de 6 años, 303 de 12 años y 311 de 15 años de edad. La distribución de la muestra por sexo se muestra en la tabla 5.

Sexo	6 años N=280	12 años N=303	15 años N=311	total N=894
<i>Masculino</i>	132 (47,1%)	157 (51,8%)	134 (43,1%)	423 (47,7%)
<i>Femenino</i>	148 (52,9%)	146 (48,2%)	177 (56,9%)	471 (52,7%)

Tabla 5: Distribución de la muestra por edad y sexo

Los niños de 6 años presentan un índice $co(d)$ de 0,97 y los niños de 12 y 15 años un índice CAO (D) de 1,13 y 1,81 respectivamente. En la tabla 6 encontramos los valores obtenidos de los índices de caries y de los componentes C para los 3 grupos etarios estudiados.

Índices de caries		6 años	12 años	15 años
<i>ICAO(D)</i>	media (95% CI)	0,06 (0,03-0,10)	1,13 (0,94-1,32)	1,81 (1,53-2,09)
<i>Componente C de ICAO(D)</i>	media (95% CI)	0,05 (0,02-0,07)	0,67 (0,51-0,83)	0,89 (0,68-1,10)
<i>Ico(d)</i>	media (95% CI)	0,97 (0,72-1,22)	0,17 (0,11-0,24)	0,01 (0-0,03)
<i>Componente c de Ico(d)</i>	media (95% CI)	0,79 (0,55-1,02)	0,16 (0,10-0,22)	0,01 (0-0,03)

Tabla 6: Índices de caries para los 3 grupos de edad.

La prevalencia de caries en dentición temporal ha sido del 30,7% a los 6 años, mientras que en dentición permanente ha sido de 44,2% y de 54,3% a los 12 y 15 años de edad (tabla 7).

Prevalencia de caries		6 años	12 años	15 años
<i>Dentición Permanente ICAO(D)>0</i>	% (95% CI)	4,6% (2,7-7,8)	44,2% (38,7-49,8)	54,3% (48,7-59,7)
<i>Dentición Temporal Ico(d)>0</i>	% (95% CI)	30,7% (25,6-36,7)	11,2% (8,1-15,2)	0,3% (0,05-1,7)
<i>Ambas denticiones ICAO(D) o Ico(d)>0</i>	% (95% CI)	32,9% (27,6-38,5)	50,2% (44,5-55,7)	54,3% (48,7-59,7)

Tabla 7: Prevalencia de caries para los tres grupos de edad.

La distribución tanto de la variable socioeconómica relativa a la clase social así como la de otras variables relacionadas con los hábitos de higiene oral se muestran en la tabla 8. Así, solo un 20% aproximadamente de la muestra de 12 y 15 años, pertenece a un estrato social bajo. Casi el 80% de la muestra realiza al menos un cepillado diario. Un 20% de los niños de 15 años ingieren alimentos cariogénicos entre comidas, aunque a los 12 años ese porcentaje es bastante menor (7%). Más del 80% de la muestra ha realizado enjuagues de flúor en el colegio.

<i>Variables</i>		<i>12 años</i>		<i>15-16 años</i>	
		<i>N</i>	<i>% (IC-95%)</i>	<i>N</i>	<i>% (IC-95%)</i>
<i>Clase Social</i>	Alta-media	197	79.4% (197 de 248)	226	82.2% (226 de 275)
	Baja	51	20.6% (51 de 248)	49	17.8% (49 de 275)
<i>Cepillado diario</i>	Si	203	77.5% (203 de 262)	232	79.7% (232 de 291)
	No	59	22.5% (59 de 262)	59	20.3% (59 de 291)
<i>Ingesta de alimentos cariogénicos entre comidas</i>	Diaria	19	7.3% (19 de 259)	67	23.0% (67 de 291)
	< frecuencia	240	92.7% (240 de 259)	224	77.0% (224 de 291)
<i>Enjuagues de Flúor</i>	Si	222	85.1% (222 de 261)	237	81.4% (237 de 291)
	Nunca	39	14.9% (39 de 261)	54	18.6% (54 de 291)

Tabla 8: Frecuencias de las variables socioeconómicas y de hábitos según los grupos de edad en la muestra

La concentración en saliva de *S. mutans* ha sido de 6.36×10^4 UFC/ml (3.93×10^4 - 8.78×10^4) a los 6 años, de 6.47×10^4 UFC/ml (1.81×10^3 - 1.28×10^5) a los 12 años de edad y de 2.11×10^4 (5.95×10^3 - 3.63×10^4) a los 15 años. En cuanto a los niveles de *S. sobrinus* fueron de 5.50×10^4 UFC/ml (3.33×10^4 - 7.66×10^4), de 1.44×10^4 UFC/ml (3.04×10^3 - 2.56×10^4) y 1.36×10^3 UFC/ml (0 - 2×10^3) respectivamente.

La prevalencia de *S. mutans* ya sea solo o asociado con *S. sobrinus* es del 38,2% en la edad de 6 años, 35,4% en la edad 12 años y 22,9% en la edad de 15 años. Con respecto a *S. sobrinus* lo presentan un 20,3% a los 6 años de edad, 18,9% a los 12 años de edad y 8,4% a los 15 años de edad. La asociación del *S. mutans* y *S. sobrinus* da cifras de 18,2%, 18,2% y 6,8% a los 6, 12 y 15 años de edad respectivamente. En la tabla 9 se muestran la prevalencia de *S. mutans* y *S. sobrinus* estructurados en 4 grupos: libres de Streptococos, solo *S. mutans*, solo *S. sobrinus* y la asociación *S. mutans*-*S. sobrinus*.

GRUPOS		6 años N=280	12 años N=303	15 años N=311	total N=894
<i>Libres de Streptococci mutans y sobrinus</i>	% (95% CI)	59,6% (53,8-65,2)	64,0% (58,5-69,2)	75,6% (70,5-80,0)	66,7% (63,5-69,7)
<i>Solo S. mutans</i>	% (95% CI)	20,0% (15,7-25,1)	17,2% (13,3-21,8)	16,1% (12,4-20,6)	17,7% (15,3-20,3)
<i>Solo S. sobrinus</i>	% (95% CI)	2,1% (0,9-4,5)	0,7% (0,1-2,3)	1,6% (0,6-3,7)	1,5% (0,8-2,5)
<i>Asociación S. mutans-S. sobrinus</i>	% (95% CI)	18,2% (14,1-23,1)	18,2% (14,2-22,8)	6,8% (4,4-10,1)	14,4% (12,1-16,6)

Tabla 9: Prevalencia de los diferentes grupos de portadores de *Streptococos S. mutans* y *S. sobrinus*

Los diversos grupos de portadores estudiados exhiben diferencias significativas tanto en la prevalencia de caries como en los índices de caries. A los 6 años de edad tanto la prevalencia de caries en dentición temporal como el índice cod existen diferencias significativas entre los diferentes grupos. La prevalencia de caries es mayor en los grupos solo *S. mutans* y solo *S. sobrinus* respecto a los libres de Streptococos y a la asociación. El grupo solo *S. mutans* presenta un índice cod significativamente mayor que el resto de grupos (tabla 10).

		<i>Libres de Streptococci mutans and sobrinus</i>	<i>Solo S. mutans</i>	<i>Solo S. sobrinus</i>	<i>Asociación S. mutans-S. sobrinus</i>	<i>Test estadístico</i>
6 años N=280	n	167	56	6	51	
	<i>Prevalencia de caries*</i> Ico(d) > 0 % (95% CI)	29,9% (23,5-37,2)	42,9% (30,7-55,8)	50,0% (18,7-81,2)	17,6% (9,5-30,2)	Chi 2 p valor=0,028
	<i>Icod*</i> <i>Media</i> (95% CI)	0,90 (0,60-1,19)	1,45 (0,71-2,18)	1,01 (0-12,7)	0,88 (0,52-1,23)	ANOVA p valor=0,041
	<i>Comp c de Icod</i> <i>Media</i> (95% CI)	0,75 (,46-1,04)	1,14 (0,43-1,86)	0,79 (0-6,14)	0,37 (0,07-0,68)	ANOVA p valor=0,107

Tabla 10: Prevalencia de caries e índices de caries a los 6 años de edad en los diferentes grupos de portadores de *Streptococcus mutans* y *sobrinus*
* p< 0.05

A los 12 años existen diferencias significativas entre los 4 grupos estudiados tanto en la prevalencia de caries en dentición permanente, como en el ICAO (D) y su componente C. El grupo solo *S. mutans* es el que presenta cifras más elevadas (tabla 11).

		<i>Libres de Streptococci mutans and sobrinus</i>	<i>Solo S. mutans</i>	<i>Solo S. sobrinus</i>	<i>Asociación S. mutans-S. sobrinus</i>	<i>Test estadístico</i>
12 años N=303	n	194	52	2	55	
	<i>Prevalencia de caries*</i> ICAO(D) > 0 % (95% CI)	37,6% (31,1-44,6)	67,3% (53,7-78,4)	50,0% (9,4-90,5)	45,5% (33,0-58,4)	Chi 2 p valor=0,002
	<i>ICAO(D)*</i> <i>Media</i> (95% CI)	0,93 (0,72-1,15)	2,12 (1,47-2,76)	1,01 (0-12,7)	0,88 (0,52-1,23)	ANOVA p valor=0,000
	<i>Comp C de ICAOD*</i> <i>Media</i> (95% CI)	0,59 (0,41-0,77)	1,25 (0,69-1,81)	0 –	0,44 (0,22-0,65)	ANOVA p valor=0,007

Tabla 11: Prevalencia de caries e índices de caries a los 12 años de edad en los diferentes grupos de portadores de *Streptococcus mutans* y *sobrinus*

* p< 0.05

A los 15 años existen diferencias significativas entre los grupos en la prevalencias de caries en permanentes, en el ICAO (D) y en el componente C. El grupo asociación *S. mutans*-*S. sobrinus* y el grupo solo *S. mutans*, muestran las cifras más altas (tabla 12).

		<i>Libres de Streptococci mutans and sobrinus</i>	<i>Solo S. mutans</i>	<i>Solo S. sobrinus</i>	<i>Asociación S. mutans-S. sobrinus</i>	<i>Test estadístico</i>
15 años N=311	n	235	50	5	21	
	<i>Prevalencia de caries*</i> ICAO(D) > 0 % (95% CI)	48,5% (42,2-54,9)	74,0% (60,4-84,1)	60,0% (23,1-88,2)	71,4% (50,1-86,2)	Chi 2 p valor=0,004
	<i>ICAO(D)*</i> <i>Media</i> (95% CI)	1,36 (1,09-1,63)	3,08 (2,22-3,94)	2,20 (0-5,41)	3,71 (2,02-5,41)	ANOVA p valor=0,000
	<i>Comp C de ICAOD*</i> <i>Media</i> (95% CI)	0,67 (0,48-0,86)	1,40 (0,69-2,11)	1,20 (0,84-3,24)	2,00 (0,56-3,44)	ANOVA p valor=0,002

Tabla 12: Prevalencia de caries e índices de caries a los 15 años de edad en los diferentes grupos de portadores de *Streptococcus Mutans* y *Sobrinus*

* p< 0.05

La tabla 13, muestra que de entre todas las variables estudiadas de tipo socioeconómico y relacionadas con los hábitos de higiene oral, solo la ingesta de alimentos cariogénicos entre comidas, muestra una asociación significativa con la caries, tanto con el valor del ICAO (D),

como con la prevalencia de caries en dentición permanente, a la edad de 12 y 15 años.

			Índices de Caries ICAOD		Prevalencia de Caries ICAOD>0	
			media IC 95%	Student t test p-value	% IC 95%	Chi ² test p-value
<i>Clase social</i>	12 años	Alta-media N=197	0,91 (0,69-1,12)	0,056	43,7% (36,9-50,6)	0,053
		Baja N=51	1,39 (0,87-1,91)		58,8% (45,1-71,2)	
	15-16 años	Alta-media N=226	1,63 (1,33-1,93)	0,699	52,2% (45,7-58,6)	0,914
		Baja N=49	1,78 (1,01-2,54)		53,1% (39,3-66,2)	
<i>Cepillado diario</i>	12 años	Ausencia N=59	1,44 (0,92-1,96)	0,571	45,8% (39,1-52,6)	0,362
		Presencia N=203	0,87 (0,67-1,06)		52,5% (40,0-64,7)	
	15-16 años	Ausencia N=59	1,83 (1,43-2,05)	0,295	53,9% (47,4-60,1)	0,677
		Presencia N=232	1,74 (1,43-2,05)		50,8% (38,4-63,1)	
<i>Ingesta de alimentos cariogénicos entre comidas</i>	12 años	Diaria N=19	1,37 (0,56-2,18)	0,226	52,6% (31,7-72,6)	0,591
		< frecuencia N=240	0,93 (0,73-1,12)		46,3% (40,0-52,5)	
	15-16 años	Diaria N=67	2,31 (1,68-2,95)	0,034*	68,7% (56,7-78,4)	0,004*
		< frecuencia N=224	1,59 (1,28-1,91)		48,7% (42,1-55,1)	
<i>Enjuagues de Flúor</i>	12 años	Ausencia N=39	1,13 (0,53-1,73)	0,571	47,7% (41,2-54,3)	0,631
		Presencia N=222	0,97 (0,77-1,17)		43,6% (29,3-59,0)	
	15-16 años	Ausencia N=54	2,07 (1,35-2,80)	0,295	51,9% (45,5-58,1)	0,328
		Presencia N=237	1,69 (1,38-1,99)		59,3% (45,9-71,3)	

Tabla 13: Relación entre las variables socioeconómicas y de hábitos de higiene oral con la prevalencia de caries en dentición permanente e índices de caries a los 12 y 15 años de edad

La tabla 14, muestra los resultados del modelo multivariante de regresión logística, con la prevalencia de caries como la variable dependiente. De las variables introducidas en el modelo: los cuatro grupos, las variables de higiene oral, las variables socioeconómicas y ajustando por la edad, solamente el hecho de ser portador de solo *S. mutans*, e ingerir alimentos cariogénicos entre comidas se han mostrado como variables independientes y significativas en el modelo. Así los portadores de solo mutans presentan una prevalencia 3 veces mayor de caries frente a los no portadores de *streptococos* que actuaban como indicador. La asociación *S. Mutans-S. Sobrinus* presenta una prevalencia 1.5 veces mayor de caries que los no portadores aunque no se ha mostrado significativa en el modelo. Los niños que ingieren alimentos azucarados cariogénicos entre comidas han mostrado una prevalencia de caries 2 veces mayor frente a los que no lo ingieren.

<i>Variables independientes</i>	<i>Odds Ratio prevalencia Exp(B)</i>	<i>IC-95%</i>	<i>Wald p-value</i>
<i>Libres de Streptococci (Indicador)</i>	1	-	-
<i>Solo S. mutans*</i>	3,10	1,83-5,25	0,000
<i>Solo S. sobrinus</i>	2,10	0,46-9,61	0,336
<i>Asociación S. mutans-S. sobrinus</i>	1,45	0,82-2,56	0,200
<i>Ingesta de alimentos cariogénicos entre comidas*</i>	2,40	1,40-4,09	0,001
<i>No cepillado diario</i>	0,88	0,56-1,40	0,595
<i>Ausencia de enjuagues de flúor</i>	1,14	0,70-1,87	0,588
<i>Clase social baja</i>	1,41	0,88-2,25	0,148
<i>Edad*</i>	1,14	1,02-1,28	0,022

Tabla 14: Análisis multivariante de regresión logística con la prevalencia de caries (ICAOD >0) como la variable dependiente (n=614). Niños de 12 y 15 años.

* Variables significativas, $p < 0.05$

DISCUSIÓN

3. DISCUSIÓN

La etiología de la caries es multifactorial, los factores genéticos, del comportamiento, ambientales y microbianos están siempre presentes (Corby et al. 2005). La caries es una infección de carácter poli microbiano (Marchant et al. 2001). Cada especie bacteriana desempeña un papel en la determinación de la cariogenicidad del biofilm o placa dental. En la interfase placa dental y superficie del diente se produce la caries. La toma de muestras, para estudio microbiano, es una tarea difícil y sería necesario recoger de diferentes localizaciones. En algunas ocasiones, superficies oclusales y zonas interproximales, la dificultad es evidente (Baca 1988).

La validez de la saliva, para determinar el grado de colonización de bacterias cariogénicas en boca, ha sido cuestionada (Lembo et al. 2007). Sin embargo, está demostrada una equivalencia entre los niveles bacterianos en saliva y en la placa bacteriana (van Houte 1993) (Vanderas 1986) (Krasse 1988).

En este estudio, analizamos muestras de la saliva sin estimular, para determinar la presencia del *S. mutans* y *S. sobrinus* y relacionarlo con los índices de caries en alumnos en la comunidad de Valenciana.

Hay estudios que demuestran una asociación entre el número y la concentración de *Streptococcus mutans* en la placa y/o la saliva y el estado de caries dental de poblaciones, y en un grado menor al estado

de caries de un individuo (Beighton et al. 1991) (Stecksen-Blicks 1987).

El sistema que empleamos para detectar *S. mutans*, en muestras de la saliva sin estimular, es por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (qRT-PCR) que se ha utilizado en otros estudios y ha demostrado ser válido y fiable (Yoshida et al. 2003). No obstante, las limitaciones de los estudios transversales para establecer asociaciones entre los microorganismos y la caries dental deben ser tenidas en cuenta (Gabris et al. 1999). La determinación del *S. mutans* y *S. sobrinus*, midiendo UFC/ml, usando la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real, se ha mostrado como un método fiable, rápido y que es aplicable en los estudios epidemiológicos (Loyola-Rodríguez et al. 2008) (Oho et al. 2000).

El grupo *Streptococcus mutans* es el que más frecuentemente se ha aislado de la cavidad bucal humana. De este grupo las especies *S. mutans* y *S. sobrinus* han estado implicadas como los gérmenes principales que causaban caries dentales en los seres humanos (Babaahmady et al. 1998). Hay estudios que han demostrado que la presencia de *S. el sobrinus* se asocia a la mayor actividad de la caries (de Soet et al. 1991).

En nuestro trabajo el *S. mutans* es la especie predominante y es a veces la única aislada. En el actual estudio, como en otros

(Rosenbloom, Tinanoff 1991), cuando *S. sobrinus* era aislado *S. mutans* está presente también.

Los resultados de este estudio dan una prevalencia de *S. mutans* del 38,2% en la edad de 6 años, 36% a los 12 y 24.5% a los 15 años.

La prevalencia del *S. sobrinus* es de 20,3% en la edad de 6 años, 18.9% a los 12 y 8.4% a los 15 años.

La prevalencia de la asociación de *S. mutans* y *S. sobrinus* es de 18.2% en la edad de 6 años, 18,2% en la de 12 años y 6.8% en la de 15. Estos valores están por debajo de los obtenidos en otros estudios, que dan cifras comprendidas entre el 50% y el 100% para el *S. mutans* y entre el 20% y el 85% para el *S. sobrinus* (Okada et al. 2002) (Okada et al. 2005) (Rodis et al. 2006) (Choi, Lee & Kim 2009). Hay varias explicaciones posibles para nuestro predominio bajo de *S. mutans* y *S. sobrinus*. En primer lugar, los estudios epidemiológicos publicados, con determinaciones en la saliva de *S. mutans* y *S. sobrinus* usando qPCR, tienen un número bajo de muestras, extendiéndose a partir del 80 (Loyola-Rodríguez et al. 2008) a 140 muestras (Nurelhuda et al. 2010), comparadas a 894 muestras en el actual estudio.

Otro punto importante es que la población de niños de la región de Valencia, en donde la muestra representativa, obtenida al azar, está caracterizada por unos niveles bajos de caries, hay programas públicos del sellado de fisuras, enjuagues semanales de fluoruro en escuelas y de un alto porcentaje de población que se cepilla

regularmente, todo ello podría influenciar el predominio bajo de *Streptococcus*.

Un punto que debe ser considerado, al evaluar los datos, es que nuestro estudio usa muestras de saliva no estimulada, y podría ser que estimulando la saliva con parafina, un procedimiento usado en otros estudios, disgregamos algo del biofilm bacteriano que está adherido a la superficie del esmalte, dando un mayor número de bacterias en estado planctónico que son encontradas en la saliva.

Por otra parte, hay estudios que han encontrado una relación proporcional entre las cantidades de *S. mutans* en placa y saliva, así que si una gran cantidad de gérmenes se encuentran en la saliva, el número en la placa también será alto y viceversa (Mundorff et al. 1990) (Sullivan et al. 1996).

En lo que concierne a la relación entre *S. mutans* y caries dental, encontramos un predominio perceptiblemente más alto de la caries en los portadores de *S. mutans*, para los tres grupos de niños.

También encontramos una relación positiva entre portadores de *S. mutans* y el índice de DMFT (CAOD), al igual que otra publicación (Hegde, Ashok Kumar & Ankola 2005).

Con respecto a la asociación del *S. mutans* - *S. sobrinus*, en el actual estudio los niños de 15 años con esta asociación exhibió cifras más altas de DMFT, similares a los informes en otros estudios que demuestran que la asociación de estas dos bacterias está relacionada

con unos niveles de caries más altos (Okada et al. 2002) (Loyola-Rodríguez et al. 2008). Sin embargo, el actual estudio no encontró esta asociación en los grupo de 6 y 12 años o analizando la muestra en su totalidad. Los estudios longitudinales indican que la asociación de *S. mutans* y *S. sobrinus* tiene una incidencia perceptiblemente más alta de la caries dental que los que sean solo positivos para el *S. mutans* (Okada et al. 2005). Para establecer la relación entre la caries y la presencia de ciertas bacterias, debe ser considerado que las lesiones de la caries pasan a través de varias etapas según su profundidad y que ésta influenciará la presencia y el predominio de ciertos microorganismos y la disminución o la ausencia de otros (Scheie, Petersen 2004).

Una revisión sistemática de la literatura (Tanzer, Livingston & Thompson 2001) confirma que *S. mutans* juega un papel importante en la iniciación de la caries dental del esmalte y de la raíz. Sin embargo, algunos estudios recientes indican que la relación entre el *S. mutans* y caries no es una verdad absoluta: hay superficies dentales con elevadas concentraciones de *S. mutans*, de manera persistente, sin desarrollar lesión de caries y se puede producir caries sin la presencia de esta especie (Takahashi, Nyvad 2008).

La caries ocurre como resultado de una interacción compleja entre la placa dental (cuyas características fisiológicas se pueden modificar por los carbohidratos en la dieta), la dieta, y las prácticas

orales de la higiene. Estas interacciones son difíciles de entender, especialmente con nuestro conocimiento de la micro flora asociada a la salud, la enfermedad y la transición de la salud a la enfermedad que es muy limitado (Beighton 2005). En nuestro trabajo el análisis múltiple de regresión logística con predominio de la caries como la variable dependiente, solamente la presencia de *S. mutans*, el efecto de alimentos cariogénicos y la edad, han demostrado ser variables independientes significativas.

Nuestros resultados pudieron sugerir una asociación clara entre la caries y la presencia de *Streptococcus mutans* pero no confirman tal relación entre la caries y la asociación *S. mutans*- *S. sobrinus*. En poblaciones con índices de caries bajos, el predominio del *S. mutans* y *S. sobrinus* en saliva sin estimular no es tan alto como se habría previsto. Su determinación en estudios epidemiológicos puede proporcionar la información valiosa para valorar el riesgo de caries, aunque la naturaleza multifactorial de esta enfermedad no debe ser olvidada.

Los factores que determinan la formación de caries son: microorganismos cariogénicos, dientes susceptibles y un sustrato adecuado, además de otros factores que se han añadido en las últimas décadas, como las condiciones socio-económicas o la influencia de los factores relacionados con enfermedades sistémicas concomitantes.

La génesis de la caries es multifactorial, hay factores genéticos, conductuales, ambientales y microbianos. Desde el punto de vista microbiano, podemos decir que sin gérmenes no hay caries y que además tiene participación poli microbiana (Beighton 2005) (Milnes, Bowden 1985).

Siguiendo los conocimientos de N. Takahasi, hemos de estudiar la placa que desarrolla caries desde un punto de vista ecológico (Takahashi, Nyvad 2008).

Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo (Costerton et al. 1995).

Aunque normalmente se asocian los biofilms bacterianos con procesos infecciosos, es necesario señalar que algunos biofilms tienen un papel protector (Lasa et al. 2005). Así, los biofilms de lactobacilos presentes en la vagina fermentan el glucógeno producido por las células epiteliales al ser inducidas por los estrógenos, produciendo ácidos que disminuyen el pH vaginal y previenen de esa manera la colonización por microorganismos patógenos. La desaparición de este biofilm con la consiguiente neutralización del pH suele venir acompañada del desarrollo de microorganismos patógenos como *Gardnerella vaginalis* y otros microorganismos anaerobios. Otro ejemplo de biofilms beneficiosos lo constituyen los biofilms formados sobre la superficie de los dientes, que protegen frente a la

colonización por otros patógenos exógenos. Este biofilm suele estar compuesto en una persona por 20- 30 especies bacterianas distintas, entre las que invariablemente destacan en número los *Streptococcus* y *Actinomyces* spp. Las bacterias de la placa dental viven en equilibrio mientras las condiciones externas se mantengan constantes. Una persona que consuma muchos alimentos o bebidas ricas en azúcares, favorecerá el desarrollo de especies bacterianas que fermentan los azúcares, desequilibrando la población bacteriana y favoreciendo el desarrollo de especies como *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus* spp., que producen ácidos que disuelven el esmalte protector de los dientes. La consecuencia final es el desarrollo de las dos infecciones más prevalentes en el hombre, la caries y la periodontitis (Lasa et al. 2005).

Desde un enfoque ecológico la placa o biofilm dental tiene tres fases o etapas: Fase de estabilidad dinámica, fase acidogénica y fase acidúrica (Takahashi, Nyvad 2008).

La fase de estabilidad dinámica se caracteriza por la presencia de estreptococos no mutans y *Actinomyces* spp.

La fase acidogénica, influenciada por cambios ambientales, es dominada por bacterias de “bajo pH”, no siendo *Streptococcus mutans*, dando pérdida de mineral en el proceso de desmineralización-remineralización.

La acidogénesis mantenida genera una selección de bacterias, proliferando *Streptococcus mutans* y otras bacterias acidúricas. En esta fase acidúrica se dan pérdidas netas de mineral. Todo ello da lugar a cambios en la superficie de esmalte que pasa de liso a rugoso y en la dentina que de dura pasa a ser blanda.

Estas características clínicas de la superficie pueden ser invertidas en cualquier momento del desarrollo de la lesión siempre que la "acidogenicidad/aciduricidad" propiedades de la biopelícula se resuelvan. Desde un punto de vista ecológico es por lo tanto, no sólo importante describir qué bacterias están involucradas en la caries, sino también saber lo que están haciendo.

Este nuevo concepto micro dinámico de caries, sugiere que una explicación actualizada de la etiología ecología de caries, debe tener en cuenta que la actividad de caries puede cambiar con el tiempo, en respuesta a las derivas de pH en la biopelícula (Takahashi, Nyvad 2008).

Mucha investigación ha sugerido que los *Streptococcus mutans* (SM) son los principales patógenos de caries humana. Esto es porque, en primer lugar, (SM) son con frecuencia aislados en las lesiones de caries cavitadas; en segundo lugar, (SM) inducen formación de caries en los animales cuando son alimentados con una dieta rica en sacarosa; en tercer lugar, (SM) son altamente acidogénico y acidúrico (Hamada, Slade 1980)(Loesche 1986), y en cuarto lugar, (SM) son

capaces de producir glucanos insolubles en agua, que promueve la adhesión bacteriana a la superficie del diente y a otras bacterias (Hamada, Slade 1980). Sin embargo, algunos estudios indican que la relación entre (SM) y la caries no es absoluta: altas proporciones de (SM) pueden persistir en las superficies de los dientes sin lesión el desarrollo y la caries se pueden desarrollar en la ausencia de estas especies (Nyvad 1993) (Bowden, Hamilton 1987) (Aas et al. 2008).

Algunos estudios han demostrado que los colonizadores iniciales de superficies dentales recién limpias constituyen una parte muy seleccionada de la micro flora oral, principalmente *S. sanguinis*, *S. oralis* y *S. mitis* (Nyvad, Kilian 1987). Estas tres especies de estreptococos pueden dar cuenta de 95% de los estreptococos y 56% de la micro flora inicial total (Li et al. 2004) (Nyvad, Kilian 1987). Sorprendentemente, *S. mutans* comprenden sólo el 2% o menos de la población inicial de estreptococos, independientemente de la actividad de caries del individuo (Nyvad, Kilian 1990). Estas observaciones implican que la inmensa mayoría de los primeros colonizadores de dientes pertenece al grupo *S. mitis* (Takahashi, Nyvad 2008). Estas bacterias, así como otros estreptococos del grupo viridans, excepto para la (SM) (*Streptococcus mutans*), a menudo se conocen como la no-SM (estreptococos no mutans), que se distinguen genéticamente de los pertenecen al 'grupo mutans' (Kawamura et al. 1995). A medida que envejece la micro flora pasa de *Streptococcus-*

dominante a *Actinomyces*-dominante (Syed, Loesche 1978) (van Palenstein Helderman 1981).

La especie predominante en la placa madura de superficie lisa pertenece a *Actinomyces* y *Streptococcus*, la mayoría de los cuales son no-SM (Ximenez-Fyvie, Haffajee & Socransky 2000). Los MS se encuentran en muy bajo número (Bowden, Hardie & Slack 1975).

Todo ello nos hace pensar que encontraremos *S.mutans* y *S.sobrinus* solo cuando la placa tiene predominio acidúrico y posiblemente hay lesiones cavitadas.

CONCLUSIONES

4. CONCLUSIONES

1. El método de PCR cuantitativa ha sido válido para detectar los gérmenes en saliva.
2. La prevalencia de *S. Mutans* es del 38,2% en la edad de 6 años, 35,4% en la edad 12 años y 22,9% en la edad de 15 años.
3. La prevalencia de *S. Sobrinus* es de un 20,3% a los 6 años de edad, 18,9% a los 12 años de edad y 8,4% a los 15 años de edad.
4. La asociación del *S. Mutans* y *S. Sobrinus* da cifras de 18,2%, 18,2% y 6,8% a los 6, 12 y 15 años de edad respectivamente.
5. Los portadores de la asociación *S. Mutans-S. Sobrinus* presenta índices y prevalencia de caries más altos, solo en el grupo de 15 años de edad.
6. Los portadores de solo *S. Mutans* muestran una prevalencia de caries 1,5 veces mayor que los no portadores. Considerando los tres grupos de edad.

ANEXOS

5. ANEXOS

Encuesta Epidemiológica de salud oral COMUNIDAD VALENCIANA, 2004

Fecha de la exploración d d m m a a	Examinador <input type="text"/>	Lote <input type="text"/>	Nº de identificación <input type="text"/>	Original/Duplicado <input type="checkbox"/>	Nacionalidad <input type="checkbox"/> 1=españa 2= otro
Nombre: <input type="text"/>	Sexo <input type="checkbox"/> 1 = Hombre 2 = Mujer	Fecha Nacimiento Mes <input type="text"/> Año <input type="text"/>	Años resid. <input type="text"/>		PAIS <input type="text"/>
Ocupación padres: <input type="text"/>	Padre <input type="text"/>	Madre <input type="text"/>			

CARIES

	Diente	M	O	D	V	L
17						
16						
15						
14						
13						
12						
11						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						

	Diente	M	O	D	V	L
37						
36						
35						
34						
33						
32						
31						
41						
42						
43						
44						
45						
46						
47						

<p>Dientes</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 50%;">Dientes Primar</th> <th style="width: 50%;">Dientes Perman</th> </tr> <tr><td>A</td><td>0 Sano</td></tr> <tr><td>B</td><td>1 Cariado</td></tr> <tr><td>C</td><td>2 Obturado, con caries</td></tr> <tr><td>D</td><td>3 Obturado, sin caries</td></tr> <tr><td>E</td><td>4 Perdido, como resultado de caries</td></tr> <tr><td>-</td><td>5 Perdido, por cualquier otro motivo</td></tr> <tr><td>F</td><td>6 Fisura obturada</td></tr> <tr><td>G</td><td>7 Soporte de puente, corona especial o funda/implante</td></tr> <tr><td>-</td><td>8 Diente sin brotar (corona) o raíz cubierta</td></tr> <tr><td>T</td><td>Traumatismo (fractura)</td></tr> <tr><td>-</td><td>9 No registrado</td></tr> </table>	Dientes Primar	Dientes Perman	A	0 Sano	B	1 Cariado	C	2 Obturado, con caries	D	3 Obturado, sin caries	E	4 Perdido, como resultado de caries	-	5 Perdido, por cualquier otro motivo	F	6 Fisura obturada	G	7 Soporte de puente, corona especial o funda/implante	-	8 Diente sin brotar (corona) o raíz cubierta	T	Traumatismo (fractura)	-	9 No registrado	<p>INDICE PERIODONTAL COMUNITARIO</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr><td style="width: 33%;">16</td><td style="width: 33%;">11</td><td style="width: 33%;">26</td></tr> <tr><td style="border: 1px solid black; width: 33px; height: 20px;"></td><td style="border: 1px solid black; width: 33px; height: 20px;"></td><td style="border: 1px solid black; width: 33px; height: 20px;"></td></tr> <tr><td>46</td><td>31</td><td>36</td></tr> </table> <p>0 = Sano 1 = Hemorragia 2 = Cálculo/obt. desbordante</p>	16	11	26				46	31	36
Dientes Primar	Dientes Perman																																	
A	0 Sano																																	
B	1 Cariado																																	
C	2 Obturado, con caries																																	
D	3 Obturado, sin caries																																	
E	4 Perdido, como resultado de caries																																	
-	5 Perdido, por cualquier otro motivo																																	
F	6 Fisura obturada																																	
G	7 Soporte de puente, corona especial o funda/implante																																	
-	8 Diente sin brotar (corona) o raíz cubierta																																	
T	Traumatismo (fractura)																																	
-	9 No registrado																																	
16	11	26																																
46	31	36																																

<p>MALOCLUSIONES</p> <p>Clase de Angle (molar)</p> <p>1 = Clase I <input type="checkbox"/> IZQ. <input type="checkbox"/> DER.</p> <p>2 = Clase II <input type="checkbox"/> IZQ. <input type="checkbox"/> DER.</p> <p>3 = Clase III <input type="checkbox"/> IZQ. <input type="checkbox"/> DER.</p> <p>Relación cúspide</p> <p>0 = Normal <input type="checkbox"/> IZQ. <input type="checkbox"/> DER.</p> <p>1 = Media Cúspide <input type="checkbox"/> IZQ. <input type="checkbox"/> DER.</p> <p>2 = Completa <input type="checkbox"/> IZQ. <input type="checkbox"/> DER.</p>	<p>Mordida Cruzada Posterior</p> <p>0 = No <input type="checkbox"/> IZQ. <input type="checkbox"/> DER. Nº de dientes: _____</p> <p>1 = Si <input type="checkbox"/> IZQ. <input type="checkbox"/> DER. Nº de dientes: _____</p> <p>Mordida Cruzada Anterior</p> <p>0 = No <input type="checkbox"/> IZQ. <input type="checkbox"/> DER. Nº de dientes: _____</p> <p>1 = Si <input type="checkbox"/> IZQ. <input type="checkbox"/> DER. Nº de dientes: _____</p> <p>Anquilosis en Dent. Temporal</p> <p>0 = No <input type="checkbox"/> IZQ. <input type="checkbox"/> DER. Nº de dientes: _____</p> <p>1 = Si <input type="checkbox"/> IZQ. <input type="checkbox"/> DER. Nº de dientes: _____</p>	<p>FLUOROSIS DENTAL</p> <p>Dientes permanentes <input type="checkbox"/></p> <p>0 = Normal 1 = Discutible 2 = Muy ligera 3 = Ligera 4 = Moderada 5 = Intensa 6 = Excluida 7 = No registrada</p>
--	--	---

Conselleria de Sanitat
GENERALITAT VALENCIANA

Facultad de Medicina y Odontología
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

97

A

OPACIDADES/HIPOPLASIA DEL ESMALTE

Dientes permanentes

0 = Sano
 1 = Opacidad delimitada
 2 = Opacidad difusa
 3 = Hipoplasia
 4 = Otros defectos
 5 = Opacidad delimitada y difusa
 6 = Opacidad delimitada e hipoplasia
 7 = Opacidad difusa e hipoplasia
 8 = Las tres alteraciones
 9 = No registrado

	14	13	12	11	21	22	23	24	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
46									36

B

NECESIDAD INMEDIATA DE ASISTENCIA Y CONSULTA

Trastorno que amenaza la vida 0 = Ausente
 Dolor o infección 1 = Presente
 Otro trastorno 9 = No registrado

especificar:

C

UTILIZACIÓN DE SERVICIOS

¿Ha visitado alguna vez la consulta del dentista?

0 = No
 1 = Sí, público.
 2 = Sí, privado.
 3 = Sí, ambos.

D

TRATAMIENTO DE ORTODONCIA

0 = No
 1 = Removible
 2 = Fija.
 3 = Mixta.

	Superior	Inferior
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

E

MATERIALES DE OBTURACIÓN

Nº de dientes con obturación de AMALGAMA
 Nº de dientes con obturación de COMPOSITE

OBSERVACIONES:

CUESTIONARIO-TEST.

Encuesta Epidemiológica de salud oral COMUNIDAD VALENCIANA, 2004

Nº de identificación

--	--	--	--

Este cuestionario es confidencial, y no se trata de un examen, sino para conocer tus opiniones y tus hábitos en salud bucodental. Contesta con total sinceridad

Por favor: lee detenidamente las preguntas y contesta poniendo un círculo alrededor la respuesta escogida, por ejemplo:

La seda dental, sirve para :

- 1 Pescar
- 2 Atar los dientes
- 3 Limpiar entre los dientes

1. ¿ Has realizado enjuagues de flúor en el colegio ?
 - 1 No, nunca
 - 2 Si, solo durante 1 curso
 - 3 Si, dos o más cursos

2. ¿ Sabes para que sirve el flúor.?
 - 1 Para proteger el diente
 - 2 Para refrescar el aliento
 - 3 Para tener los dientes más blancos
 - 4 No sé

3. ¿ Cuándo fuiste por última vez al dentista.?
 - 1 Hace menos de 6 meses
 - 2 Más de 6 meses pero menos de 1 año
 - 3 Más de un año
 - 4 Nunca he ido

4. ¿ Por qué razón fuiste al dentista.?
 - 1 Para una revisión rutinaria
 - 2 Para revisión del tratamiento de ortodoncia que llevo
 - 3 Por que tengo caries, dolor o infección
 - 4 Por otras razones
 - 5 Nunca he ido

5. El hecho de ir al dentista ¿ te resulta.....?
 - 1 Agradable
 - 2 Desagradable
 - 3 Indiferente
 - 4 No sé

6. ¿ Cuantas veces al día te cepillas los dientes.?
 - 1 Más de una vez al día
 - 2 1 vez al día
 - 3 Menos de 1 vez al día
 - 4 De vez en cuando
 - 5 Nunca / casi nunca

7. ¿ Crees que comer entre las comidas es bueno para la alimentación.?

- 1 Sí
- 2 No
- 3 No se

8. ¿ Acostumbras a tomar entre las principales comidas alimentos como golosinas, bollos, pasteles, refrescos,.....?

- 1 Todos / casi todos los días
- 2 Uno o dos días a la semana
- 3 Con menos frecuencia
- 4 Nunca / casi nunca

9. ¿ Cual de los siguientes alimentos crees que es perjudicial para los dientes.?

SI	NO	NO SE	
1	2	3	Carne y pescado
1	2	3	Chocolate
1	2	3	Frutas frescas
1	2	3	Verdura y ensaladas
1	2	3	Bebidas refrescantes
1	2	3	Huevos y leche
1	2	3	Helados, polos
1	2	3	Frutos secos
1	2	3	Galletas, pasteles
1	2	3	Golosinas, caramelos

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aas, J.A., Griffen, A.L., Dardis, S.R., Lee, A.M., Olsen, I., Dewhirst, F.E., Leys, E.J. & Paster, B.J. 2008, "Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults", *Journal of clinical microbiology*, vol. 46, no. 4, pp. 1407-1417.
- Aguilera Galaviz, L.A., Aceves Medina Mdel, C. & Estrada Garcia, I.C. 2002, "Detection of potentially cariogenic strains of *Streptococcus mutans* using the polymerase chain reaction", *The Journal of clinical pediatric dentistry*, vol. 27, no. 1, pp. 47-51.
- Almerich Silla, J.M. & Montiel Company, J.M. 2006, "Oral health survey of the child population in the Valencia Region of Spain (2004)", *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*, vol. 11, no. 4, pp. E369-81.
- Almerich, J.M. 2005, "Fundamentos y concepto actual de la actuación preventiva y terapéutica del flúor." in *Odontología preventiva y comunitaria. Principios, métodos y aplicaciones.* , eds. E. Cuenca & P. Baca, 3a. Edición edn, Masson, Barcelona, pp. 104-130.
- Almerich-Silla, J.M. & Montiel-Company, J.M. 2007, "Influence of immigration and other factors on caries in 12- and 15-yr-old children", *European journal of oral sciences*, vol. 115, no. 5, pp. 378-383.
- Babaahmady, K.G., Challacombe, S.J., Marsh, P.D. & Newman, H.N. 1998, "Ecological study of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus*

- sobrinus and *Lactobacillus* spp. at sub-sites from approximal dental plaque from children", *Caries research*, vol. 32, no. 1, pp. 51-58.
- Baca, P. 2005, "Caries: fundamentos actuales de su prevención y control" in *Odontología preventiva y comunitaria. Principios, métodos y aplicaciones.*, eds. E. Cuenca & P. Baca, 3a. Ed. edn, Masson, Barcelona, pp. 19-40.
- Baca, P. 1988, *Saliva y microbiota oral. Simposio sobre Saliva y Salud Dental*, Promolibro, Valencia.
- Baca, P., Baca, A. & Maestre, J.R. 2002, "Microbiología de la caries" in *Microbiología oral*, ed. Liébana J., 2a. Ed edn, ed.Mc Graw-Hill/Interamericana. , pp. 561-570.
- Becker, M.R., Paster, B.J., Leys, E.J., Moeschberger, M.L., Kenyon, S.G., Galvin, J.L., Boches, S.K., Dewhirst, F.E. & Griffen, A.L. 2002, "Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries", *Journal of clinical microbiology*, vol. 40, no. 3, pp. 1001-1009.
- Beighton, D. 2005, "The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process", *Community dentistry and oral epidemiology*, vol. 33, no. 4, pp. 248-255.
- Beighton, D., Hellyer, P.H., Lynch, E.J. & Heath, M.R. 1991, "Salivary levels of mutans streptococci, lactobacilli, yeasts, and

- root caries prevalence in non-institutionalized elderly dental patients", *Community dentistry and oral epidemiology*, vol. 19, no. 5, pp. 302-307.
- Bowden, G.H. 1996, "Mutans streptococci caries and chlorhexidine", *Journal (Canadian Dental Association)*, vol. 62, no. 9, pp. 700, 703-7.
- Bowden, G.H. & Hamilton, I.R. 1987, "Environmental pH as a factor in the competition between strains of the oral streptococci *Streptococcus mutans*, *S. sanguis*, and "*S. mitior*" growing in continuous culture", *Canadian journal of microbiology*, vol. 33, no. 9, pp. 824-827.
- Bowden, G.H., Hardie, J.M. & Slack, G.L. 1975, "Microbial variations in approximal dental plaque", *Caries research*, vol. 9, no. 4, pp. 253-277.
- Bowen, W.H., Cohen, B., Cole, M.F. & Colman, G. 1975, "Immunization against dental caries", *British dental journal*, vol. 139, no. 2, pp. 45-58.
- Bravo, M., Cortes, J., Casals, E., Llena, C., Almerich-Silla, J.M. & Cuenca, E. 2009, "Basic oral health goals for Spain 2015/2020", *International dental journal*, vol. 59, no. 2, pp. 78-82; quiz 62.
- Burt, B.A. 1985, "Epidemiología de la caries dental." in *Caries Dental. Etiología patología y prevención.*, ed. Silverstone L.M. y col., El Manual Moderno, S.A. de C.V., México D.F., pp. 15-42.

- Choi, E.J., Lee, S.H. & Kim Y.J. 2009, "Quantitative real-time polymerase chain reaction for *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in dental plaque samples and its association with early childhood caries", *International journal of paediatric dentistry / the British Paedodontic Society [and] the International Association of Dentistry for Children*, vol. 19, no. 2, pp. 141-147.
- Corby, P.M., Lyons-Weiler, J., Bretz, W.A., Hart, T.C., Aas, J.A., Boumenna, T., Goss, J., Corby, A.L., Junior, H.M., Weyant, R.J. & Paster, B.J. 2005, "Microbial risk indicators of early childhood caries", *Journal of clinical microbiology*, vol. 43, no. 11, pp. 5753-5759.
- Cortés, F.J. 2005, "Medición de la enfermedad en odontología comunitaria." in *Odontología preventiva y comunitaria. Principios, métodos y aplicaciones.*, eds. E. Cuenca & P. Baca, 3a. Ed. edn, Masson, Barcelona, pp. 337-369.
- Cortés, F.J. 1999, "Medición de la enfermedad en odontología comunitaria." in *Odontología preventiva y comunitaria. Principios, métodos y aplicaciones.*, ed. Cuenca E. y Col., 2a. Ed. edn, Masson, Barcelona, pp. 303-325.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R. & Lappin-Scott, H.M. 1995, "Microbial biofilms", *Annual Review of Microbiology*, vol. 49, pp. 711-745.

- Cuenca, E. 1986, "La encuesta de la OMS sobre la salud bucodental en España. Una aproximación personal", *Arch Odontoestomatol.*, vol. 2, pp. 15-20.
- de Soet, J.J., van Loveren, C., Lammens, A.J., Pavicic, M.J., Homburg, C.H., ten Cate, J.M. & de Graaff, J. 1991, "Differences in cariogenicity between fresh isolates of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*", *Caries research*, vol. 25, no. 2, pp. 116-122.
- Doménech, J.M. 2002, "UD6: Estimación de parámetros. Intervalos de confianza" in *Fundamentos de Diseño y Estadística.*, ed. J.M. Doménech, Signo edn, Barcelona.
- Fejerskov, O. & Nyvad, B. 2003, *Is dental caries an infectious disease? Diagnostic and treatment consequences for the practitioner in school*, Quintessence Publishing Co Ltd, Copenhagen.
- Fitzgerald, R.J. & Keyes, P.H. 1960, "Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster", *Journal of the American Dental Association (1939)*, vol. 61, pp. 9-19.
- Fujiwara, T., Sasada, E., Mima, N. & Ooshima, T. 1991, "Caries prevalence and salivary mutans streptococci in 0-2-year-old children of Japan", *Community dentistry and oral epidemiology*, vol. 19, no. 3, pp. 151-154.

- Gabris, K., Nagy, G., Madlena, M., Denes, Z., Marton, S., Keszthelyi, G. & Banoczy, J. 1999, "Associations between microbiological and salivary caries activity tests and caries experience in Hungarian adolescents", *Caries research*, vol. 33, no. 3, pp. 191-195.
- García-Santos, M.C. 2004, *Estudio a doble ciego aleatorio, sobre la prevención quimioterapéutica de la caries dental con barnices de clorhexidina y timol en niños de 5 a 8 años*, Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Odontología.
- Gibbons, R.J. & van-Houte, J. 1978, "Bacteriology of Dental Caries" in *Textbook of Oral Biology*, eds. J.H. Shaw, E.A. Sweeney, C.C. Cappacino & S.M. Miller, Saunder, Philadelphia, pp. 975-991.
- Gimeno-de-Sande, A., Sánchez-Fernández, B., Viñes- Rueda, J.J., Gomez-Pomar, F. & Mariño-Aguilar, F. 1971, "Estudio epidemiológico de la caries dental y patología bucal en España.", *Revista de Sanidad e Higiene Pública*, vol. 45, pp. 301-433.
- Gronroos, L. & Alaluusua, S. 2000, "Site-specific oral colonization of mutans streptococci detected by arbitrarily primed PCR fingerprinting", *Caries research*, vol. 34, no. 6, pp. 474-480.
- Hamada, S. & Slade, H.D. 1980, "Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*", *Microbiological reviews*, vol. 44, no. 2, pp. 331-384.

- Handelman, S.L., Mills, J.R. & Hawes, R.R. 1966, "Caries incidence in subjects receiving long term antibiotic therapy", *Journal of oral therapeutics and pharmacology*, vol. 2, no. 5, pp. 338-345.
- Harper, D.S. & Loesche, W.J. 1983, "Effect of pH upon sucrose and glucose catabolism by the various geno groups of *Streptococcus mutans*", *Journal of dental research*, vol. 62, no. 5, pp. 526-531.
- Hegde, P.P., Ashok Kumar, B.R. & Ankola, V.A. 2005, "Dental caries experience and salivary levels of *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli* in 13-15 years old children of Belgaum city, Karnataka", *Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, vol. 23, no. 1, pp. 23-26.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. & Williams, P.M. 1996, "Real time quantitative PCR", *Genome research*, vol. 6, no. 10, pp. 986-994.
- Hirose, H., Hirose, K., Isogai, E., Miura, H. & Ueda, I. 1993, "Close association between *Streptococcus sobrinus* in the saliva of young children and smooth-surface caries increment", *Caries research*, vol. 27, no. 4, pp. 292-297.
- Igarashi, T., Yamamoto, A. & Goto, N. 1996, "Direct detection of *Streptococcus mutans* in human dental plaque by polymerase chain reaction", *Oral microbiology and immunology*, vol. 11, no. 5, pp. 294-298.

- Kawamura, Y., Hou, X.G., Sultana, F., Miura, H. & Ezaki, T. 1995, "Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*", *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 45, no. 2, pp. 406-408.
- Keyes, P.H. 1962, "Recent advances in dental caries research. Bacteriological findings and biological implications", *Int.Dent.J.*, vol. 12, pp. 443-464.
- Kleinberg, I. 2002, "A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: an alternative to *Streptococcus mutans* and the specific-plaque hypothesis", *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*, vol. 13, no. 2, pp. 108-125.
- Koga, T., Oho, T., Shimazaki, Y. & Nakano, Y. 2002, "Immunization against dental caries", *Vaccine*, vol. 20, no. 16, pp. 2027-2044.
- Kohler, B., Andreen, I. & Jonsson, B. 1988, "The earlier the colonization by *mutans streptococci*, the higher the caries prevalence at 4 years of age", *Oral microbiology and immunology*, vol. 3, no. 1, pp. 14-17.
- Kozai, K., Nakayama, R., Tedjosongko, U., Kuwahara, S., Suzuki, J., Okada, M. & Nagasaka, N. 1999, "Intrafamilial distribution of *mutans streptococci* in Japanese families and possibility of father-

- to-child transmission", *Microbiology and immunology*, vol. 43, no. 2, pp. 99-106.
- Krasse, B. 1988, "Biological factors as indicators of future caries", *International dental journal*, vol. 38, no. 4, pp. 219-225.
- Lasa, I., Del Pozo, J.L., Penades, J.R. & Leiva, J. 2005, "Bacterial biofilms and infection", *Anales del sistema sanitario de Navarra*, vol. 28, no. 2, pp. 163-175.
- Lembo, F.L., Longo, P.L., Ota-Tsuzuki, C., Rodrigues, C.R. & Mayer, M.P. 2007, "Genotypic and phenotypic analysis of *Streptococcus mutans* from different oral cavity sites of caries-free and caries-active children", *Oral microbiology and immunology*, vol. 22, no. 5, pp. 313-319.
- Li, J., Helmerhorst, E.J., Leone, C.W., Troxler, R.F., Yaskell, T., Haffajee, A.D., Socransky, S.S. & Oppenheim, F.G. 2004, "Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm", *Journal of applied microbiology*, vol. 97, no. 6, pp. 1311-1318.
- Liébana, J. & Castillo, A. 2005, "Saliva y placa bacteriana." in *Odontología preventiva y comunitaria. Principios métodos y aplicaciones.*, eds. E. Cuenca & P. Baca, 3a Edición edn, Masson, Barcelona, pp. 41-62.
- Liébana, J., Castillo, A.M. & Rodríguez-Avial, C. 2002, "Género *Streptococcus* y Bacteria relacionadas." in *Microbiología Oral.*,

- ed. J. Liébana, 2a. Edición edn, McGraw-Hill-Interamericana de España, Madrid, pp. 325-344.
- Littleton, N.W. & White, C.L. 1964, "Dental Findings from a Preliminary Study of Children Receiving Extended Antibiotic Therapy", *Journal of the American Dental Association (1939)*, vol. 68, pp. 520-525.
- Loesche, W.J. 1982, *Dental caries: A treatable infection*. Charles C. Thomas, Illinois.
- Loesche, W.J. 1986, "Role of Streptococcus mutans in human dental decay", *Microbiological reviews*, vol. 50, no. 4, pp. 353-380.
- Loyola-Rodriguez, J.P., Martinez-Martinez, R.E., Flores-Ferreyra, B.I., Patino-Marin, N., Alpuche-Solis, A.G. & Reyes-Macias, J.F. 2008, "Distribution of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in saliva of Mexican preschool caries-free and caries-active children by microbial and molecular (PCR) assays", *The Journal of clinical pediatric dentistry*, vol. 32, no. 2, pp. 121-126.
- Marchant, S., Brailsford, S.R., Twomey, A.C., Roberts, G.J. & Beighton, D. 2001, "The predominant micro flora of nursing caries lesions", *Caries research*, vol. 35, no. 6, pp. 397-406.
- Marsh, P.D. 2006, "Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease", *BMC oral health*, vol. 6 Suppl 1, pp. S14.

- Marsh, P.D. 1991, "The significance of maintaining the stability of the natural micro flora of the mouth", *British dental journal*, vol. 171, no. 6, pp. 174-177.
- McClure, F.J. & Hewitt, W.L. 1946, "The relation of penicillin to induced rat dental caries and oral *L. acidophilus*", *Journal of dental research*, vol. 25, no. 6, pp. 441-443.
- Milnes, A.R. & Bowden, G.H. 1985, "The micro flora associated with developing lesions of nursing caries", *Caries research*, vol. 19, no. 4, pp. 289-297.
- Mouton, C. & Robert, J.C. 1995, "Bacterias gram positivas." en *Bacteriología bucodental.*, eds. C. Mouton & J.C. Robert, Masson, Barcelona, pp. 73-90.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. 1986, *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.* .
- Mundorff, S.A., Eisenberg, A.D., Leverett, D.H., Espeland, M.A. & Proskin, H.M. 1990, "Correlations between numbers of micro flora in plaque and saliva", *Caries research*, vol. 24, no. 5, pp. 312-317.
- Nagaoka, S., Liu, H.J., Minemoto, K. & Kawagoe, M. 1995, "Microbial induction of dentinal caries in human teeth in vitro", *Journal of endodontics*, vol. 21, no. 11, pp. 546-551.

- Newbrun, E. 1984, "Conceptos actuales de la etiología de la caries." in *Cariología* Editorial Limusa S.A, México DF, pp. 29-77.
- Nikiforuk, G. 1986, "Etiología de la Caries Dental -Un Repaso de las Primeras Teorías y Concepto Actuales" in *Caries Dental.*, ed. G. Nikiforuk, Editorial Mundi, Argentina, pp. 60-82.
- Nurelhuda, N.M., Al-Haroni, M., Trovik, T.A. & Bakken, V. 2010, "Caries experience and quantification of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in saliva of Sudanese schoolchildren", *Caries research*, vol. 44, no. 4, pp. 402-407.
- Nyvad, B. 1993, "Microbial colonization of human tooth surfaces", *APMIS. Supplementum*, vol. 32, pp. 1-45.
- Nyvad, B. & Kilian, M. 1990, "Comparison of the initial streptococcal micro flora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals", *Caries research*, vol. 24, no. 4, pp. 267-272.
- Nyvad, B. & Kilian, M. 1987, "Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo", *Scandinavian journal of dental research*, vol. 95, no. 5, pp. 369-380.
- Oho, T., Yamashita, Y., Shimazaki, Y., Kushiya, M. & Koga, T. 2000, "Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction", *Oral microbiology and immunology*, vol. 15, no. 4, pp. 258-262.

- Okada, M., Soda, Y., Hayashi, F., Doi, T., Suzuki, J., Miura, K. & Kozai, K. 2005, "Longitudinal study of dental caries incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in pre-school children", *Journal of medical microbiology*, vol. 54, no. Pt 7, pp. 661-665.
- Okada, M., Soda, Y., Hayashi, F., Doi, T., Suzuki, J., Miura, K. & Kozai, K. 2002, "PCR detection of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in dental plaque samples from Japanese pre-school children", *Journal of medical microbiology*, vol. 51, no. 5, pp. 443-447.
- Orland, F.J., Blayney, J.R., Harrison, R.W., Reyniers, J.A., Trexler, P.C., Wagner, M., Gordon, H.A. & Luckey, T.D. 1954, "Use of the germfree animal technic in the study of experimental dental caries. I. Basic observations on rats reared free of all microorganisms", *Journal of dental research*, vol. 33, no. 2, pp. 147-174.
- Ramos-Gomez, F.J., Weintraub, J.A., Gansky, S.A., Hoover, C.I. & Featherstone, J.D. 2002, "Bacterial, behavioral and environmental factors associated with early childhood caries", *The Journal of clinical pediatric dentistry*, vol. 26, no. 2, pp. 165-173.
- Rioboo, R. 2002, "La Dinámica de la Desmineralización-Remineralización de las Estructuras Dentales." in *Odontología*

- Preventiva y Odontología Comunitaria.*, ed. R. Rioboo, Ediciones Avances, Madrid, pp. 119-141.
- Rodis, O.M., Shimono, T., Matsumura, S., Hatamoto, K., Matsuo, K., Kariya, N., Okazaki, Y. & Ji, Y. 2006, "Cariogenic bacteria and caries risk in elderly Japanese aged 80 and older with at least 20 teeth", *Journal of the American Geriatrics Society*, vol. 54, no. 10, pp. 1573-1577.
- Rosenbloom, R.G. & Tinanoff, N. 1991, "Salivary Streptococcus mutans levels in patients before, during, and after orthodontic treatment", *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics : Official Publication of the American Association of Orthodontists, its Constituent Societies, and the American Board of Orthodontics*, vol. 100, no. 1, pp. 35-37.
- Rupf, S., Kneist, S., Merte, K. & Eschrich, K. 1999, "Quantitative determination of Streptococcus mutans by using competitive polymerase chain reaction", *European journal of oral sciences*, vol. 107, no. 2, pp. 75-81.
- Scheie, A.A. & Petersen, F.C. 2004, "The Biofilm Concept: Consequences for Future Prophylaxis of Oral Diseases?", *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*, vol. 15, no. 1, pp. 4-12.

- Schupbach, P., Osterwalder, V. & Guggenheim, B. 1996, "Human root caries: micro biota of a limited number of root caries lesions", *Caries research*, vol. 30, no. 1, pp. 52-64.
- Servicio de Epidemiología 1995, *Estudio de salud bucodental en escolares de municipios seleccionados*, Valencia.
- Shiroza, T., Shinozaki, N., Watanabe, T., Ikemi, T., Fukushima, K. & Abiko, Y. 1998, "Rapid isolation of chromosomal DNA from oral streptococci and polymerase chain reaction-oriented restriction fragment-length polymorphism analysis for genetic heterogeneity", *Oral microbiology and immunology*, vol. 13, no. 1, pp. 11-16.
- Sicilia, A., Cobo, J., Noguerol, B., Hernández, R., Lucas, V., Ainamo, J., Bascones, A. & López, J.S. 1990, "Prevalencia de caries en los niños y jóvenes escolares españoles, de siete, doce y quince a diecinueve años.", *Avances en Odontoestomatología*, vol. 6, pp. 323-330.
- Silverstone, L.M. 1985a, "Epidemiología de la caries dental" in *Caries Dental. Etiología patología y prevención.*, ed. Silverstone LM y col., El Manual Moderno, S.A. de C.V., México D.F., pp. 43-62.
- Silverstone, L.M. 1985b, "Eventos bioquímicos en la placa dental." in *Caries Dental. Etiología patología y prevención.*, ed. L.M.y.c.

- Silverstone, El Manual Moderno, S.A. de C.V., México D.F., pp. 93-119.
- Silverstone, L.M. 1985c, "Naturaleza y problema de la caries dental en el hombre." in *Caries Dental. Etiología patología y prevención.*, ed. L.M.y.c. Silverstone, El Manual Moderno, S.A. de C.V., México DF, pp. 1-14.
- Stecksen-Blicks, C. 1987, "Lactobacilli and Streptococcus mutans in saliva, diet and caries increment in 8- and 13-year-old children", *Scandinavian journal of dental research*, vol. 95, no. 1, pp. 18-26.
- Stralfors, A. 1950, "Investigations into the bacterial chemistry of dental plaques", *Odontologisk tidskrift*, vol. 58, no. 3-4, pp. 152-341.
- Street, C.M., Goldner, M. & Le Riche, W.H. 1976, "Epidemiology of dental caries in relation to Streptococcus mutans on tooth surfaces in 5-year-old children", *Archives of Oral Biology*, vol. 21, no. 4, pp. 273-275.
- Sullivan, A., Borgstrom, M.K., Granath, L. & Nilsson, G. 1996, "Number of mutans streptococci or lactobacilli in a total dental plaque sample does not explain the variation in caries better than the numbers in stimulated whole saliva", *Community dentistry and oral epidemiology*, vol. 24, no. 3, pp. 159-163.
- Suzuki, N., Nakano, Y., Yoshida, A., Yamashita, Y. & Kiyoura, Y. 2004, "Real-time TaqMan PCR for quantifying oral bacteria

- during biofilm formation", *Journal of clinical microbiology*, vol. 42, no. 8, pp. 3827-3830.
- Syed, S.A. & Loesche, W.J. 1978, "Bacteriology of human experimental gingivitis: effect of plaque age", *Infection and immunity*, vol. 21, no. 3, pp. 821-829.
- Takahashi, N. & Nyvad, B. 2008, "Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process", *Caries research*, vol. 42, no. 6, pp. 409-418.
- Tanzer, J.M., Livingston, J. & Thompson, A.M. 2001, "The microbiology of primary dental caries in humans", *Journal of dental education*, vol. 65, no. 10, pp. 1028-1037.
- Tomás-Villegas, D. 1997, "Cariología: su necesaria aplicación en la práctica diaria" en *Cariología. Prevención, diagnóstico y tratamiento contemporáneo de la caries dental.*, ed. R. Tomás-Seif, 1a Edición edn, Actualidades Médico Odontológicas Latinoamérica, C.A., Caracas, pp. 13-34.
- Tong, H., Gao, X. & Dong, X. 2003, "Streptococcus oligofermentans sp. nov., a novel oral isolate from caries-free humans", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 53, no. Pt 4, pp. 1101-1104.
- van Houte, J. 1993, "Microbiological predictors of caries risk", *Advances in Dental Research*, vol. 7, no. 2, pp. 87-96.

- van Palenstein Helderman, W.H. 1981, "Longitudinal microbial changes in developing human supragingival and subgingival dental plaque", *Archives of Oral Biology*, vol. 26, no. 1, pp. 7-12.
- Vanderas, A.P. 1986, "Bacteriologic and non bacteriologic criteria for identifying individuals at high risk of developing dental caries: a review", *Journal of public health dentistry*, vol. 46, no. 2, pp. 106-113.
- Whiley, R.A., Russell, R.R.B., Hardie, J.M. & Beighton, D. 1988, "Streptococcus downei sp.nov. for strains previously described as Streptococcus mutans serotype h.", *Int JSyst Bacteriol*, vol. 38, pp. 25-29.
- Wu, H., Fan, M., Zhou, X., Mo, A., Bian, Z., Zhang, Q. & Chen, Z. 2003, "Detection of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus on the permanent first molars of the Mosuo people in China", *Caries research*, vol. 37, no. 5, pp. 374-380.
- Ximenez-Fyvie, L.A., Haffajee, A.D. & Socransky, S.S. 2000, "Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis", *Journal of clinical periodontology*, vol. 27, no. 10, pp. 722-732.
- Yoshida, A., Suzuki, N., Nakano, Y., Kawada, M., Oho, T. & Koga, T. 2003, "Development of a 5' nuclease-based real-time PCR assay for quantitative detection of cariogenic dental pathogens

- Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus", *Journal of clinical microbiology*, vol. 41, no. 9, pp. 4438-4441.
- Zickert, I., Emilson, C.G. & Krasse, B. 1982, "Streptococcus mutans, lactobacilli and dental health in 13-14-year-old Swedish children", *Community dentistry and oral epidemiology*, vol. 10, no. 2, pp. 77-81.
- Zurriaga, O. & Ibañez, J. 1987, *La salud bucodental en la Comunidad Valenciana. Encuesta de prevalencia en población infantil.*, Valencia.