

Biotipos y susceptibilidad antimicrobiana de *S. mutans* en niños con y sin caries dental

Fredy Gamboa^{1,2*}, Dabeiba-Adriana García^{2**}, Claudia Patricia Lamby^{2***}, Ana Lucía Sarralde^{2****}.

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C., Colombia.

²Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia.

*Correo electrónico: gamboa@javeriana.edu.co

**Correo electrónico: garciad@javeriana.edu.co

***Correo electrónico: clamby@javeriana.edu.co

****Correo electrónico: sarralde@javeriana.edu.co

Recibido para evaluación: 2 de febrero de 2016

Aceptado para publicación: 6 de julio de 2016

RESUMEN

Objetivos: investigar los biotipos de *S. mutans* aislados de niños con y sin caries dental y determinar su susceptibilidad antimicrobiana. **Métodos:** este estudio observacional descriptivo incluyó 206 niños entre los 3 y 5 años de dos preescolares en Bogotá, D. C., Colombia. Después de su aislamiento en agar *Mitis Salivarius Bacitracina*, las cepas *S. mutans* se identificaron por pruebas bioquímicas y se biotipificaron por el sistema api-ZYM. En todos los aislamientos se determinó por el método de dilución en agar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de Penicilina, Amoxicilina, Cefazolina, Eritromicina, Clindamicina, Imipenem, Vancomicina y Teicoplanina. **Resultados:** Se encontró *S. mutans* en 30 de los 79 niños sin caries dental (38%) y en 56 de los 127 niños con caries (44,1%). Los niños con caries presentaron un recuento superior de *S. mutans* en comparación con los niños sin caries ($p < 0,05$). En total se identificaron 121 cepas de *S. mutans* en los 86 niños: 43 cepas en los 30 niños sin caries dental y 78 en los 56 niños con caries dental. Las 121 cepas fueron agrupadas en 38 biotipos: 24 en el grupo de caries y 14 en el grupo sin caries. En el grupo de caries los biotipos más frecuentes fueron el XV, XI, XII y XVII, respectivamente, con 26, 12, 11 y 4 cepas y en el grupo sin caries los biotipos más frecuentes fueron el XXVI, XX y XXXVI, respectivamente, con 14, 8 y 7 cepas. Todos los biotipos

fueron altamente sensibles a los antimicrobianos evaluados; el 50 y 90% de las cepas *S. mutans* fueron inhibidas, respectivamente, por concentraciones menores a 0,12 y 1 µg/ml para todos los antimicrobianos estudiados. Para la penicilina, eritromicina e imipenem se obtuvieron los valores promedios más bajos de CIMs. *Conclusiones:* en la población objeto de estudio se encontró una gran diversidad biotípica, los aislamientos fueron altamente susceptibles a los antimicrobianos evaluados y en cada grupo de pacientes se identificaron patrones únicos que podrían indicar una colonización específica.

Palabras clave: Caries dental, *Streptococcus mutans*, perfil biotípico, susceptibilidad antimicrobiana.

SUMMARY

Biotypes and antimicrobial susceptibility of *S. mutans* in children with and without dental caries

Objectives: The main objective was to investigate the biotypes of *S. mutans* isolated from children with and without dental caries and determine its antimicrobial susceptibility. *Methods:* this descriptive observational study included 206 children aged 3 to 5 years of two preschool institutions in Bogota-Colombia. After isolation on agar Mitis Salivarius Bacitracin, *S. mutans* strains were identified by biochemical tests and biotyped by the api-ZYM system. The minimal inhibitory concentrations (MICs) of the *S. mutans* isolates were evaluated against penicillin, amoxicillin, cefazolin, erythromycin, clindamycin, imipenem, vancomycin and teicoplanin by an agar dilution method. *Results:* *S. mutans* was found in 30 of the 79 children without dental caries (38%) and in 56 of the 127 children with caries (44.1%). Children with cavities had a higher count of *S. mutans* compared to children without caries ($p < 0.05$). A total of 121 strains of *S. mutans* were identified in 86 children: 43 strains in 30 children with dental caries and 78 in the 56 children with dental caries. The 121 strains were grouped into 38 biotypes: 24 in the group caries and 14 in the group without caries. In the group caries the most common biotypes were the XV, XI, XII and XVII, respectively, with 26, 12, 11 and 4 strains and the group caries the most common biotypes were the XXVI, XX and XXXVI, respectively, with 14, 8 and 7 strains. All biotypes were highly sensitive to all antimicrobials tested; 50 and 90% of *S. mutans* strains were inhibited by using concentrations lower than 0.12 and 1 µg/ml, respectively, for all antibiotics studied. The lowest MICs average values were obtained for penicillin, erythromycin and imipenem. *Conclusions:* In the study population a wide variety of biotypes was found, isolates were highly sensitive to

antimicrobials evaluated and in each clinical group were identified unique patterns that could indicate a specific colonization.

Keywords: Dental caries, *Streptococcus mutans*, biotypic profile, antimicrobial susceptibility.

INTRODUCCIÓN

La caries dental es una enfermedad infecciosa multifactorial, crónica, localizada, pos eruptiva y transmisible que conlleva a la destrucción del tejido dental duro [1-3]. *Streptococcus mutans*, un microorganismo acidogénico y acidúrico que normalmente se encuentra colonizando la cavidad oral, es considerado el principal microorganismo asociado al desarrollo de caries dental [1-4].

Diferentes hallazgos han mostrado una fuerte correlación entre el número de unidades formadoras de colonias de *S. mutans* en la cavidad oral y la prevalencia e incidencia de caries dental [1, 3-4]. Por otro lado, este microorganismo como resultado de tratamientos dentales puede producir bacteriemias, infecciones sistémicas y endocarditis subagudas [5].

El hecho de reconocer a *S. mutans* como el microorganismo cariogénico más importante en caries dental, ha conducido al diseño de medidas preventivas y de control tendientes a eliminar o reducir su presencia en la cavidad oral [1, 3, 6-8].

La tipificación de cepas bacterianas permite la identificación de clones específicos virulentos dentro de una especie bacteriana y el estudio de los clones bacterianos implicados en un evento epidemiológico. La tipificación con el sistema api-ZYM, basado en la acción enzimática de los microorganismos sobre diferentes sustratos, ha sido de gran valor para tipificar y relacionar cepas *S. mutans* de diferentes orígenes [9-10].

El presente estudio tuvo como objetivo fundamental determinar la diversidad biotípica de *S. mutans* en niños con y sin caries dental y evaluar la susceptibilidad antimicrobiana mediante la concentración inhibitoria mínima en los aislamientos clínicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo contiene información de dos proyectos de investigación, realizados en la Universidad Javeriana y que contaron con la aprobación del Comité de Ética e Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Javeriana. Los dos proyectos son: 1). Identificación de cepas de *S. mutans* con efectos antagónicos sobre *S. mutans*. ID propuesta 0650, y 2). Descripción del microcosmos bacteriano ligado a

placa dental en niños con y sin caries dental: seguimiento a 3 y 6 meses después de un proceso de educación. ID propuesta 5536.

Aislamiento de *S. mutans*, recuento e identificación

Población de estudio

Con previo consentimiento informado, firmado por padres o tutores y cumpliendo con las exigencias bioéticas de toma y manejo de muestras, se incluyeron en el estudio 206 niños con edades entre los 3 y 5 años, pertenecientes a dos instituciones educativas de Bogotá de estratos socioeconómicos 2 y 3. El diagnóstico clínico y experiencia de caries, en cada uno de los niños, se determinó mediante revisión clínica por un solo investigador, previamente calibrado, quién estableció el índice ceod (dientes cariados, extraídos y obturados) de acuerdo a los criterios dados por la Organización Mundial de la Salud [11].

En ninguno de los niños se tomó radiografías. De los 206 niños, 79 no presentaron caries dental y los 127 restantes presentaron caries con un índice ceod promedio de 3,1 (rango 2-5). Los 206 niños del estudio no presentaron enfermedades infecciosas sistémicas y no estuvieron en tratamiento antimicrobiano por lo menos en los últimos 7 días previos a la toma de la muestra. Las muestras de saliva se tomaron entre las 8 y 10 de la mañana, con el previo compromiso de los niños de no comer en la mañana y de no cepillarse los dientes antes de la toma de muestras. Mediante suave succión con una pipeta plástica, en cada niño se tomó una muestra de saliva (0,2-1,0 ml) de forma espontánea [12], que fue mantenida en hielo hasta ser transportada al laboratorio de bacteriología. La recolección de todas las muestras de saliva estuvo bajo la supervisión y responsabilidad del mismo investigador que determinó la experiencia de caries.

Procesamiento de las muestras

Las muestras de saliva fueron agitadas en vortex durante 15 segundos y serialmente diluidas (1/10, 1/100 y 1/1000) con tampón fosfato 0,05 M. Con el fin de realizar el aislamiento selectivo y recuento de *S. mutans*, 50 µl de las diluciones seriadas se inocularon por duplicado en agar *Mitis Salivarius Bacitracina* (MSB; Difco Laboratories, Detroit, MI) y en agar sangre de cordero.

El agar MSB contiene caseína pancreática digerida, peptona proteosa N. ° 3, peptona proteosa, dextrosa, sacarosa 20%, fosfato dipotásico, azul tripan, cristal azul, agar, telurito de Chapman y bacitracina 0,2 U/ml. Las cajas de petri con agar MSB y agar sangre de cordero fueron incubadas anaeróbicamente (H₂:CO₂:N₂ 10:10:80) durante 2 días a 37 °C. Después del crecimiento bacteriano en el agar MSB, colonias con características morfológicas de *S. mutans* fueron contadas y expresadas como unidades formadoras de colonia (UFC) por ml de saliva no estimulada [13].

Cinco colonias por muestra con características de *S. mutans* fueron examinadas por la tinción de Gram, prueba de catalasa y sometidas a las siguientes pruebas bioquímicas: fermentación de rafinosa, manitol, melobiosa, trehalosa e inulina; hidrólisis de la esculina en presencia y ausencia de bilis; ureasa; hidrólisis de la arginina; y resistencia a la bacitracina. El perfil bioquímico de *S. mutans* es fermentación positiva de rafinosa, manitol, melobiosa, trehalosa e inulina; hidrólisis negativa de la esculina en la presencia de bilis e hidrólisis positiva de la esculina en ausencia de bilis; ureasa negativa; hidrólisis negativa de la arginina; y resistencia a 2 U de bacitracina. En la identificación de las cepas también se utilizó el sistema comercial Api 20S (bioMérieux, Marcy-l'étoile, France). La prueba Chi cuadrado se utilizó para establecer diferencias en el recuento de *S. mutans* en los grupos con y sin caries.

Biotipificación de las cepas

La tipificación de todas las cepas de *S. mutans* aisladas se realizó utilizando el sistema api-ZYM (bioMérieux, Marcy-l'étoile, France) de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. El sistema api-Zym es un micro-método semicuantitativo de investigación que permite detectar rápida y simultáneamente 19 actividades enzimáticas a partir de pequeñas cantidades de inóculo de la bacteria. El sistema consta de una tira con 20 micropozos o cúpulas (1 control y 19 pruebas), cuya base contiene los sustratos enzimáticos y el buffer.

La base permite el contacto entre la enzima del microorganismo y el sustrato generalmente insoluble. Los sustratos son inoculados con una suspensión densa de bacterias (turbidez 5-6 de McFarland) que rehidrata y ejerce acción enzimática sobre los sustratos contenidos. Los productos finales generados, durante un período de incubación de 4 horas, son detectados a través de reacciones coloreadas producidas después de la adición de reactivos. La biotipificación se realizó por duplicado y los biotipos se asignaron de acuerdo a la acción ejercida por las cepas de *S. mutans* sobre los 19 sustratos del sistema [14]. Después de la identificación y biotipificación las cepas se preservaron a -85°C en caldo tripticosa soya con 3% de glicerol hasta el momento de realizar las técnicas moleculares.

Susceptibilidad antimicrobiana

En las cepas aisladas provenientes de niños con y sin caries dental se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a Penicilina, Amoxicilina, Cefazolina, Eritromicina, Clindamicina, Imipenem, Vancomicina y Teicoplanina, por el método de dilución en agar, en concentraciones entre 0,007 y 32 $\mu\text{g/ml}$ [9, 15-16]. Los antimicrobianos Penicilina, Amoxicilina, Cefazolina, Eritromicina, Clindamicina, Vancomicina y Teicoplanina fueron obtenidos de Sigma Chemical (St Louis, MO, USA), e imipenem de Merk (Germany). Con el uso de un replicador se sembraron en el agar Wilkins-Chalgren

suspensiones de 10^5 UFC/ml de las cepas a evaluar. Después de 48 horas de incubación a 37 °C en atmósfera anaeróbica ($H_2:CO_2:N_2$ 10:10:80), la CIM se determinó como la concentración de antimicrobiano más baja que inhibe el crecimiento del organismo evaluado.

RESULTADOS

Aislamiento e identificación de *S. mutans*.

La experiencia de caries dental en los niños fue de 61,6% (127/206) y *S. mutans* se encontró en 30 de los 79 niños sin caries dental (frecuencia de 38 %) y en 56 de los 127 niños con caries dental (frecuencia de 44,1 %) (ver tabla 1). En total se identificaron 121 cepas de *S. mutans* en los 86 niños (teniendo en cuenta que en algunos niños se identificaron más de 1 cepa): 43 cepas en los 30 niños sin caries dental y 78 cepas en los 56 niños con caries dental. El recuento de *S. mutans* en la población en general fue variado y estuvo desde 10^3 hasta por arriba de 10^7 UFC/ml. Los niños con caries presentaron un recuento superior de *S. mutans* en comparación con los niños sin caries y las diferencias en el recuento fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabla 1. Presencia de *S. mutans* en niños con y sin caries dental

Presencia de <i>S. mutans</i>	Número de niños		Total (%)
	Con caries	Sin caries	
Positiva	56	30	86 (42)
Negativa	71	49	120 (58)
Total	127	79	206 (100)

Biotipos de *S. mutans*.

Los biotipos se asignaron de acuerdo a una previa estandarización y teniendo en cuenta la acción enzimática de las cepas sobre los 19 sustratos del sistema Api-ZYM [10]. En las tablas 2 y 3 se presentan los biotipos encontrados en las 121 cepas de *S. mutans* aisladas de niños con y sin caries. El rango de actividad de estos microorganismos está reflejado en los 38 biotipos encontrados: 24 en el grupo de caries y 14 en el grupo sin caries. Los dos grupos presentaron en común los biotipos VIII, XX y XXIV (ver tablas 2 y 3). En el grupo de caries los biotipos más frecuentes fueron el XV, XI, XII y XVII, respectivamente, con 26, 12, 11 y 4 cepas. En el grupo sin caries los biotipos más frecuentes fueron el XXVI, XX y XXXVI, respectivamente, con 14, 8 y 7 cepas; los demás biotipos se presentaron con una frecuencia de 1 cepa.

Tabla 2. Presencia de los diferentes biotipos caracterizados por el sistema api-ZYM y encontrados en las 78 cepas *S. mutans* aisladas en niños con caries dental.

Identificación de la cepa*	Biotipo**	Frecuencia (%)
11C, 15C, 30C1, 136C, 143C1, 145C1, 150C, 154C2, 160C, 161C, 163C1, 168C, 175C1, 176C, 183C, 186C, 187C, 192C, 194C1, 197C1, 200C, 205C, 206C1, 207C, 208C, 220C	XV	N=26 (33,3%)
10C, 30C, 85C, 154C3, 180C, 182C1, 193C, 195C1, 196C, 201C, 209C, 214C,	XI	N=12 (15,4%)
14C, 131C, 161C1, 163C, 174C, 175C, 178C, 183C1, 193C1, 206C, 209C1	XII	N=11 (14,1%)
171C	I	N=1 (1,28%)
173C	II	N=1 (1,28%)
152C1	III	N=1 (1,28%)
185C	IV	N=1 (1,28%)
197C2	V	N=1 (1,28%)
218C1	VI	N=1 (1,28%)
217C1, 217C2	VII	N=2 (2,56%)
152C2	VIII	N=1 (1,28%)
140C	IX	N=1 (1,28%)
190C2	X	N=1 (1,28%)
189C	XIII	N=1 (1,28%)
101C2, 171C1, 216C	XIV	N=3 (3,85%)
154C1, 219C	XVI	N=2 (2,56%)
100C1, 145C, 195C2	XVII	N=3 (3,85%)
147C1, 147C2, 147C3	XVIII	N=3 (3,85%)
143C2	XIX	N=1 (1,28%)
148C	XX	N=1 (1,28%)
101C1	XXI	N=1 (1,28%)
167C	XXII	N=1 (1,28%)
190C1	XXIII	N=1 (1,28%)
194C	XXIV	N=1 (1,28%)

*La designación de la cepa se hizo de acuerdo al número dado al paciente.

**El biotipo se asignó de acuerdo al comportamiento enzimático de la bacteria.

Tabla 3. Presencia de los diferentes biotipos caracterizados por el sistema api-ZYM y encontrados en las 43 cepas *S. mutans* aisladas en niños sin caries dental.

Identificación de la cepa*	Biotipo**	Frecuencia (%)
1SC1, 26SC1, 29SC, 32SC, 41SC, 48SC1, 51SC, 54SC, 57SC, 61SC, 63SC, 67SC, 6SC, 59SC	XXVI	N=14 (32,6%)
5SC2, 5SC1, 6SC3, 27SC, 43SC, 48SC, 63SC1, , 54SC1,	XX	N=8 (18,6 %)
11SC1, 30SC1, 36SC, 40SC, 41SC1, 49SC, 73SC	XXXVI	N=7 (16,3%)
8SC	VIII	N=1 (2,3%)
6SC1	XXIV	N=1 (2,3%)
11SC2	XXV	N=1 (2,3%)
25SC1	XXVII	N=1 (2,3%)
23SC1	XXVIII	N=1 (2,3%)
6SC2	XXIX	N=1 (2,3%)
30SC2	XXX	N=1 (2,3%)
30SC	XXXI	N=1 (2,3%)
26SC2	XXXII	N=1 (2,3%)
34SC	XXXIII	N=1 (2,3%)
16SC	XXXIV	N=1 (2,3%)
15SC	XXXV	N=1 (2,3%)
23SC2	XXXVII	N=1 (2,3%)
18SC	XXXVIII	N=1 (2,3%)

*La designación de la cepa se hizo de acuerdo al número dado al paciente.

**El biotipo se asignó de acuerdo al comportamiento enzimático de la bacteria.

Diferencias intra-individuo de biotipos en niños con caries y sin caries

En niños con caries dental, las cepas aisladas de los pacientes 30 (30C y 30C1), 101 (101C1 y 101C2), 143 (143C1 y 143C2), 145 (145C y 145C1), 152 (152C1 y 152C2), 154 (154C1, 154C2 y 154C3) 161 (161C y 161C1), 163 (163C y 163C1), 171 (171C y 171C1), 175 (175C y 175C1), 183 (183C y 183C1), 190 (190C1 y 190C2), 193 (193C y 193C1), 194 (194C y 194C1), 195 (195C1 y 195 C2), 197 (197C1 y 197C2), 206 (206C y 206C1) y 209 (209C y 209C1) se agruparon en biotipos diferentes lo que permitió obtener diferencias intra-individuo (ver tabla 2).

Sin embargo, las cepas aisladas de los pacientes 147 (147C1, 147C2 y 147C3) y 217 (217C1 y 217C2) presentaron los mismos biotipos intra-individuo y en consecuencia no permitieron establecer diferencias. Por otro lado en niños sin caries dental, las cepas

aisladas de los pacientes 6 (6SC, 6SC1, 6SC2 y 6SC3), 11 (11SC1 y 11SC2), 23 (23SC1 y 23SC2), 26 (26SC1 y 26SC2), 30 (30SC, 30SC1, 30SC2), 41 (41SC y 41SC1), 48 (48SC y 48 SC1) y 54 (54SC y 54SC1) se agruparon en biotipos diferentes, señalando de igual manera diferencias de clones intra-individuo (ver tabla 3). Sin embargo, las dos cepas aisladas del paciente 5 (5SC1 y 5SC2) se tipificaron en el mismo biotipo.

Susceptibilidad antimicrobiana

En la tabla 4 se presenta la CIM₅₀, CIM₉₀ y valores promedios de la CIM para los 121 aislamientos. Todos los 121 aislamientos fueron altamente sensibles a Penicilina, Amoxicilina, Cefazolina, Eritromicina, Clindamicina, Imipenem, Vancomicina y Teicoplanina. El 50 y 90% de las cepas *S. mutans* fueron respectivamente, inhibidas, con todos los antibióticos, por concentraciones menores a 0,12 y 1,0 µg/ml. Los valores promedios más bajos de CIMs se obtuvieron para la penicilina, eritromicina e imipenem. En general no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los biotipos en cuanto a susceptibilidad antimicrobiana.

Tabla 4. Susceptibilidad antimicrobiana (µg/ml) in vitro de 121 aislamientos clínicos de *S. mutans* a 8 agentes antimicrobianos

Antibióticos	Rango	Media	CIM50	CIM90
Penicilina	0,015-0,03	0,020	0,030	0,030
Amoxicilina	0,015-0,25	0,11	0,12	0,25
Cefazolina	0,03-1,0	0,15	0,12	0,25
Eritromicina	0,007-0,25	0,15	0,12	0,25
Clindamicina	0,015-0,25	0,16	0,12	0,25
Imipenem	0,007-0,25	0,10	0,12	0,25
Vancomicina	0,015-1,0	0,24	0,25	1,0
Teicoplanina	0,12-1,0	0,35	0,25	1,0

DISCUSIÓN

El establecimiento y posterior multiplicación de *S. mutans* en la cavidad oral está influenciado por varios factores [5]. La capacidad metabólica de este microorganismo para sintetizar glucanos insolubles a partir de la sacarosa presente en la dieta, y producir ácidos que descienden el pH y conducen a la desmineralización del diente, tiene gran importancia en el proceso de iniciación y desarrollo de la caries dental [5]. El claro reconocimiento de este microorganismo como la principal especie bacteriana implicada

en la caries dental, ha conducido a la implementación de medidas de prevención y control dirigidas hacia la eliminación o disminución de este en la cavidad oral [8].

En diferentes investigaciones se ha mostrado la relación directa que existe, entre la cantidad de *S. mutans* en cavidad oral con la incidencia y prevalencia de la caries dental [1, 4, 17]. En el presente estudio, además de que la frecuencia de *S. mutans* en los niños con caries dental fue superior a la presentada en niños sin caries dental (44,1% vs 38%), se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el recuento en las dos poblaciones, que señalan la alta tasa de colonización con *S. mutans* que tienen los niños con caries dental.

En el presente estudio no se pudo tener acceso a información sobre los diferentes hábitos de higiene que llevaban a cabo los niños incluidos en el estudio. Existió mucha dificultad para recoger esta información que por otro lado puede ser muy variable e impedir hacer una correlación correcta con los biotipos encontrados en los dos grupos clínicos. La indicación de no cepillarse los dientes y evitar la ingesta de alimentos antes de la toma de muestra, tuvo como fin normalizar todas las muestras y recuperar *S. mutans* en un momento muy oportuno sin alteraciones.

De acuerdo a lo que manifiesta Krzysciak y colaboradores [18] muy seguramente tener información y control de los hábitos higiénicos que llevan los niños, permitirá entender mejor el papel de los biotipos de *S. mutans* y su relación en la patogenicidad en niños con y sin caries dental.

La prueba api-ZYM (bioMérieux Marcy-l'étoile, France) no es la prueba de "oro" para la caracterización biotípica de *S. mutans*. Existe otra prueba, Sistema STREPTOtest (Lachema, Pliva) [18] que también se ha utilizado con este fin. La idea de utilizar estos sistemas es poder determinar algunas diferencias que presenta esta bacteria en su sistema enzimático. El sistema api-ZYM [9-10, 19-20] ha permitido obtener diferencias en el perfil enzimático que conduce a obtener diferentes biotipos que se pueden relacionar con presencia o ausencia de caries.

En cuanto a sensibilidad esta prueba requiere de una concentración bacteriana > 10.000 UFC/ml, por lo cual es necesario tener esta bacteria aislada en forma abundante en agar sangre o agar BHI. En cuanto a especificidad, para caracterizar esta bacteria por el sistema api-ZYM, es necesario que la bacteria *S. mutans* esté previa y correctamente identificada por pruebas bioquímicas o moleculares. Si no se tiene esta claridad, otras bacterias podrían tener un perfil biotípico muy parecido a *S. mutans* que conduciría a interpretaciones erróneas [9-10]. Es muy importante resaltar en este estudio que el mayor número de reacciones enzimáticas positivas dadas en el sistema Api-Zym se presentaron en un pH ácido ($\text{pH} = 5,4$), situación que puede estar relacionada con algunas

de las características específicas de *S. mutans*, capacidad de producir constantemente ácidos en un pH bajo o ácido (acidogenicidad) y de tolerar y sobrevivir en medios ácidos (aciduricidad) [1].

En niños menores de 6 años se han identificados los siguientes factores que predisponen el desarrollo de caries dental en la infancia temprana: un alto número de *S. mutans*, presencia de placa dental, inadecuadas prácticas de alimentación, bajo estatus socioeconómico y cultural, bajo nivel de educación de los padres y no disponibilidad de los servicios de salud [21]. La muestra del presente estudio estuvo conformada por 206 niños con edades entre 3 y 5 años de los estratos socioeconómicos 2 y 3.

En los niños, el estrato socioeconómico 3 prevaleció en un 58%, el grado de escolaridad de secundaria incompleta en el padre fue de 46% y la unión libre se presentó en un 52%. Por otro lado en un 55% los ingresos familiares fueron de hasta un salario mínimo y el 70% de las familias estaban afiliadas al sistema de salud. Estos resultados contrastan con los informados por Díaz y colaboradores [22] en un estudio realizado en niños escolares en Cartagena, en el que se reportó la prevalencia del estrato socioeconómico 2 con un 47%, el grado de escolaridad de secundaria incompleta en el padre de 38%, la presencia de unión libre en un 46%, ingresos familiares en un 47% de hasta un salario mínimo y afiliación de las familias al sistema de salud en un 66%.

En el estudio de Gómez-Osorno y colaboradores [23] realizado en una población entre 3 a 5 años en una institución educativa de Medellín, se evidenciaron de igual manera situaciones sociodemográficas, económicas y culturales de inequidad que conducen al desarrollo de caries dental.

Por otro lado en el presente estudio prevalecieron las lesiones cariosas no cavitadas y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los estados de caries dental y la presencia de biotipos de *S. mutans*, es decir los biotipos más frecuentes de *S. mutans* en niños con caries dental (XV, XI, XII, XIV, XVII y XVIII) se distribuyeron de igual manera entre los niños con lesiones no cavitadas y con índices de caries muy similares.

En este estudio sobresale el alto número de biotipos obtenidos: 24 en el grupo de caries y 14 en el grupo sin caries. Estos perfiles biotípicos, que indican una variada actividad enzimática de *S. mutans*, permitieron establecer diferencias inter e intra-individuo (ver tablas 2 y 3). En niños sin caries, las cepas aisladas de los pacientes 6, 11, 23, 26, 30, 41, 48 y 54 al ubicarse en diferentes grupos permitieron establecer diferencias intra-individuo. Sin embargo, las dos cepas del paciente 5 se agruparon en el mismo biotipo y no lograron determinar diferencias intra-individuo.

En niños con caries, las cepas aisladas de los pacientes 30, 101, 143, 145, 152, 154, 161, 163, 171, 175, 183, 190, 193, 194, 195, 197, 206 y 209 se tipificaron en diferentes grupos lo que en consecuencia permitió establecer diferencias intra-individuo. Sin embargo, las cepas aisladas de los pacientes 147 y 217 se agruparon en los mismos biotipos y no permitieron obtener diferencias intra-individuo. Estos hallazgos señalan la capacidad discriminatoria del método de tipificación, que puede ser de gran valor en estudios epidemiológicos de transmisión intra-familiar y en estrategias de prevención [24].

En otros estudios se han utilizado diferentes métodos de tipificación para demostrar la heterogeneidad y variabilidad genética de cepas *S. mutans* presentes en la cavidad oral [5, 10, 25-31]. Está claramente establecido que se encuentran diferentes tipos de *S. mutans* en niños con caries dental con relación a los niños sin caries [25, 26, 32-34].

En este estudio llama la atención la diferencia encontrada en los biotipos más frecuentes en los niños con y sin caries dental. En el grupo de caries los biotipos más frecuentes fueron el XV, XI y XII, respectivamente, con 26, 12 y 11 cepas y en el grupo sin caries los biotipos más frecuentes fueron el XXVI, XX y XXXVI, respectivamente, con 14, 8 y 7 cepas. Muy seguramente la presencia de perfiles únicos encontrados en los niños con caries dental respecto a los niños sin caries dental pueda sugerir una mayor capacidad de virulencia de las cepas *S. mutans*. En este sentido en el estudio de Napigoma y colaboradores [34] se evaluó la relación entre la diversidad clonal y algunos factores de virulencia de *S. mutans* aislados de individuos con caries y sin caries dental; los resultados mostraron 44 diferentes perfiles, con un número máximo de 8 perfiles en un individuo.

También hallaron un gran número de genotipos de *S. mutans* con mayor habilidad para sintetizar glucanos insolubles, uno de los puntos importantes de contribución para la génesis y desarrollo de la caries dental. Por otro lado en el estudio de Krzysciak y colaboradores [18] se habla de la utilidad de la biotipificación en el reconocimiento de determinantes patogénicos en *S. mutans*. También demostraron que la enzima deshidrogenasa prefenato del Biotipo I (tipificado con el sistema STREPTOtest) presente en la mayoría de cepas *S. mutans* de niños con caries dental tenía mayor actividad que la presentada en *S. mutans* aislados de niños sin caries dental. Por todo lo anterior y por la utilidad de la biotipificación en la discriminación de cepas *S. mutans* en niños con y sin caries dental, se deben continuar las investigaciones para demostrar las implicaciones y relaciones de los biotipos con la patogenicidad de *S. mutans* y su papel en la génesis y desarrollo de la caries dental.

La bacteriemia originada desde cavidad oral es común y en algunas ocasiones produce endocarditis. *S. mutans*, por su alta frecuencia en niños con y sin caries dental y como resultado de tratamientos dentales puede producir bacteriemia, infecciones sistémicas y endocarditis subaguda [35]. El adecuado tratamiento de estas infecciones hace necesario conocer la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *S. mutans* aisladas de cavidad oral. Las 121 cepas de *S. mutans* aisladas en este estudio, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de pacientes, mostraron alta sensibilidad a los antimicrobianos evaluados, no presentaron resistencia antimicrobiana y los patrones obtenidos están muy de acuerdo con los observados por otros autores [9, 15-16, 36].

Aunque el tratamiento de caries dental no se hace con antimicrobianos, ya que pueden llevar a la destrucción inespecífica de muchos microorganismos de la cavidad oral que conduce a una reinfección con *S. mutans* con posibilidad de regresar a los niveles de pretratamiento, es importante dejar claro que las cepas *S. mutans* de origen colombiano aisladas en este estudio siguen siendo sensibles y que en el caso de presentarse infecciones sistémicas o endocarditis producidas por *S. mutans* se dispone de un buen número de antimicrobianos que van a tener alta efectividad sobre este microorganismo.

En conclusión, se encontró lo siguiente: a) en la población de estudio se encontró una gran diversidad biotípica, b) los aislamientos fueron altamente susceptibles a los antimicrobianos evaluados, y c) en cada grupo de pacientes se identificaron biotipos particulares que podrían indicar una colonización específica.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por Vicerrectoría de Investigación de la Pontificia Universidad Javeriana dentro del proyecto “Identificación del microcosmos bacteriano ligado a placa dental en niños con y sin caries dental: seguimiento a 3 y 6 meses después de un proceso de educación” con número de proyecto 5499.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. W. Loesche, Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay, *Microbiol. Rev.*, **50**, 353 (1986).
2. F.H.M. Mikx, J.S. van der Hoeven, K.G. Konig, A.J.M. Plasschaert, B. Guggenheim, Establishment of defined microbial ecosystems in germ-free rats I: The effect of the interaction of *Streptococcus mutans* or *Streptococcus sanguis* with *Veillonella alcalescens* on plaque formation and caries activity, *Caries Res.*, **6**, 211 (1972).
3. D. Beighton, F. Manji, V. Baelum, O. Fejerskov, N.W. Johnson, J.M. Wilton, Associations between salivary levels of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, lactobacilli, and caries experience in Kenyan adolescents, *J. Dent. Res.*, **68**, 1242 (1989).
4. N. Lang, P.R. Hotz, F.A. Gusberti, A. Joss, Longitudinal clinical and microbiological study on the relationship between infection with *Streptococcus mutans* and the development of caries in human, *Oral Microbiol. Immunol.*, **2**, 39 (1987).
5. S. Hamada, H.D. Slade, Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*, *Microbiol. Rev.*, **44**, 331 (1980).
6. A.L. Coykendall, K.B. Gustafson, Taxonomy of *Streptococcus mutans*, En: "Molecular microbiology and immunobiology of *Streptococcus mutans*", S. Hamada, S.M. Michalek, H. Kiyono, L. Menaker, J.R. McGhee eds., Elsevier Science, Amsterdam, 1986.
7. K.H. Schleifer, R. Kilpper-Bälz, Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci, and lactococci: a review, *System Appl. Microbiol.*, **10**, 1 (1987).
8. F. Gamboa, B. Herazo, M.C. Martínez, Control microbiológico sobre *Streptococcus mutans* y su acción acidogénica, *Univers. Scient.*, **9**, 45 (2004).
9. A. de La Higuera, J. Gutiérrez, J. Liébana, A. García-Mendoza, A. Castillo, A new biotyping method for *Streptococcus mutans* with the api-ZYM system, *Clin. Microbiol. Infect.*, **5**, 88 (1999).
10. F. Gamboa, M. Chaves, M. Estupiñan, A. Galindo, Bacteriocins in *S. mutans* strains isolated from children with and without dental caries: biotypes and sensitivity to antibiotics, *Acta Odontol. Latinoam.*, **1**, 103 (2008).

11. World Health Organization, Individual tooth status and treatment need, En: "Oral Health Surveys: Basic Methods", 3rd ed., World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1987.
12. S. Fure, Five year incidence of caries, salivary and microbial conditions in 60-, 70- and 80-year-old swedish individuals, *Caries Res*, **32**, 166 (1988).
13. C.G. Emilson, Prevalence of *Streptococcus mutans* with different colonial morphologies in human plaque and saliva, *Scand. J. Dent. Res.*, **91**, 26 (1981).
14. F. Gamboa, M. Chaves, C. Lamby, A. Fajardo, A. Arevalo, Antagonistic action of indiginous *Streptococcus mutans* strains, *Acta Odontol. Latinoam.*, **22**, 129 (2009).
15. J. Liebana, A. Castillo, J. Peis, P. Baca, G. Piedrola, Antimicrobial susceptibility of 1042 strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*: Comparison from 1985 to 1989, *Oral Microbiol. Immunol.*, **6**, 146 (1991).
16. A. De la Higuera, A. Castillo, J. Gutiérrez, A. García-Mendoza, J. Liébana, In vitro susceptibility, tolerance and glyocalix production in *Streptococcus mutans*, *J. Antimicrob. Chemother.*, **40**, 359 (1997).
17. R.U. Kamiya, M.H. Napimoga, R.T. Rosa, J.F. Höfling, R.B. Goncalves, Mutacin production in *Streptococcus mutans* genotypes isolated from caries-affected and caries-free individuals, *Oral Microbiol. Immunol.*, **20**, 20 (2005).
18. W. Krzysciak, K. Pluskwa, J. Piatkowski, P. Krzysciak, A. Jurczak, D. Koscielniak, A. Skalniak, The usefulness of biotyping in the determination of selected pathogenicity determinants in *Streptococcus mutans*, *BMC Microbiology*, **14**, 194 (2014).
19. M.W. Humble, A. King, I. Phillips, API-ZYM: A simple rapid system for the detection of bacterial enzymes, *J. Clin. Pathol.*, **30**, 275 (1977).
20. S. Waitkins, L. Ball, C. Fraser, Use of the API-ZYM system in rapid identification of alfa and non-haemolytic streptococci, *J. Clin. Pathol.*, **33**, 53 (1980).
21. T. Parisotto, C. Steiner-Olivera, C. Duque, R. Rocha, L. Azevedo, M. Nobredos-Santos, Relationship among microbiological composition and presence of dental plaque, sugar exposure, social factors and different stages of early childhood caries, *Arch. Oral Biol.*, **55**, 365 (2010).
22. S. Díaz-Cárdenas, F. González-Martínez, Prevalencia de caries dental y factores familiares en niños escolares de Cartagena de Indias, Colombia, *Rev. Salud Pública*, **33**, 843 (2010).

23. A. Gómez-Osorno, T. Bernal-Álvarez, A. Posada-López, A. Agudelo-Suárez, Caries dental, higiene bucal y necesidades de tratamiento en población de 3 a 5 años de una institución educativa de Medellín y sus factores relacionados, *Rev. Nacional Odontol.*, **11**, 23 (2015).
24. D.M. Palomari, J.F. Höfling, A.C. Pizzolitto, E.A. Rosa, T.C. Negrini, L.C. Spolidorio, Genetic polymorphism of *Streptococcus mutans* in Brazilian family members, *Braz. J. Microbiol.*, **34**, 213 (2003).
25. L. Grønroos, S. Alaluusua, Site-specific oral colonization of mutans streptococci detected by arbitrarily primed PCR-Fingerprinting, *Caries Res.*, **34**, 474 (2000).
26. Y. Li, P.W. Caufield, E.I. Redmo, E. Thornqvist, Differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* via genotypic and phenotypic profiles from three different populations, *Oral Microbiol Immunol.*, **16**, 16 (2001).
27. J. Kelstrup, S. Richmond, C. West, R.J. Gibbons, Fingerprinting human oral streptococci by bacteriocin production and sensitivity, *Arch. Oral Biol.*, **15**, 1109 (1970).
28. C. van Loveren, J.F. Buijs, J.M. Ten Cate, Similarity of bacteriocin activity profiles of mutans streptococci within the family when the children acquire the strains after the age of 5, *Caries Res.*, **34**, 481 (2000).
29. Emanuelsson I.M., Carlsson P., Hamberg K., Bratthall D., Tracing genotypes of mutans streptococci on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Oral Microbiol Immunol*, **18**, 24 (2003).
30. N. Damé-Teixeira, R. Alex, C. Fatturi, M. Maltz, Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* isolated from carious dentin after partial caries removal and sealing, *The Scientific World Journal*, **2014**, Article ID 165201, 6 pages (2014), doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/165201>
31. D. Lynch, A. Villhauer, J. Warren, T. Marshall, D. Dawson, D. Blanchette, K. Phipps, D. Starr, D. Drake, Genotypic characterization of initial acquisition of *Streptococcus mutans* in American Indian children, *J. Oral. Microbiol.*, **7**, 10.3402/jom.v7.27182 (2015), doi: <http://dx.doi.org/10.3402/jom.v7.27182>
32. D. Cogulu, E. Sabah, A. Uzel, F. Ozkinay, Genotyping of *Streptococcus mutans* by using arbitrarily primed polymerase chain reaction in children with Down Syndrome, *Arch. Oral Biol.*, **51**, 177 (2006).
33. C.P. Tabchoury, M.C. Sousa, R.A. Arthur, R.O. Mattos-Graner, A.A. Del Bel Cury, J.A. Cury, Evaluation of genotypic diversity of *Streptococcus mutans* using distinct arbitrary primers, *J. Appl. Oral. Sci.*, **16**, 403 (2008).

34. M.H. Napigoma, R.U. Kamiya, R. Takaki, E.V. Rosa, J.F. Hôfling, R.O. Matos-Graner, R.B. Gonçalves, Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries -free and caries-active individuals, *J. Med. Microbiol.*, **53**, 697 (2004).
35. R.F. Ullman, S.J. Miller, M.J. Strampfer, B.A. Cunha, *Streptococcus mutans* endocarditis: report of three cases and review of the literature, *Heart Lung*, **17**, 209 (1988).
36. G. Pasquantonio, S. Condó, L. Cerroni, L. Bikiqu, M. Nicoletti, M. Prenna, S. Ripa, Antibacterial activity of various antibiotics against oral streptococci isolated in the oral cavity, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, **3**, 805 (2012).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

F. Gamboa, D.A. García, C.P. Lamby, A.L. Sarralde, Biotipos y susceptibilidad antimicrobiana de *S. mutans* en niños con y sin caries dental, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **45**(2), 288-304 (2016).