

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADOS

MICROBIOTA DE LA CARIES DENTAL EN PIEZAS PRIMARIAS DE UNA
POBLACIÓN INFANTIL COSTARRICENSE

Trabajo final de investigación aplicada sometido a la consideración de la
Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Odontopediatría para optar
por el grado y título de Maestría Profesional en Odontopediatría

KEYSY LEONELA TENORIO SOTO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2023

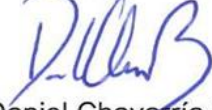
Dedicatoria y agradecimientos

Le dedico este trabajo a toda mi familia. Principalmente, a mis padres y hermana que me apoyaron y estuvieron en los momentos malos y en los menos malos. Gracias por enseñarme a afrontar las dificultades sin perder nunca la cabeza ni morir en el intento. Me han enseñado a ser la persona que soy hoy, mis principios, mis valores, mi perseverancia y mi empeño.

Quiero también agradecerle a cada uno de mis profesores durante todo el posgrado por su paciencia y vocación al enseñarme. Además, de mi comité asesor y directora de tesis por confiar siempre en que saldríamos adelante con esta investigación, a pesar de tantas pruebas que afrontamos en el camino.

“Este trabajo final de investigación aplicada fue aceptado por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Odontología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado y título de Maestría Profesional en Odontopediatría.”

Odontopediatría.”



PhD Daniel Chavarria Bolaños
Representante de la Decana
Sistema de Estudios de Posgrado



Mag. Natalia Gutiérrez Marín

Directora



PhD. Tatiana Ramírez Mora

Asesora



PhD. Pamela Altamirano Silva

Asesora



Dr. Adrián Gómez Fernández

Representante del Director
Programa de Posgrado en Odontopediatría



Keysy Leonela Tenorio Soto
Sustentante

TABLA DE CONTENIDO

Dedicatoria y agradecimientos.....	ii
Resumen.....	v
Summary.....	vi
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 2 PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.....	7
2.1 Justificación	8
2.2 Pregunta de Investigación.....	8
2.3 Objetivo General	8
2.4 Objetivos específicos	9
2.5 Hipótesis	9
2.6 Diseño del estudio.....	9
2.7 Lugar de realización.....	9
2.8 Determinación de la muestra	10
2.9 Criterios de selección.....	10
CAPÍTULO 3 METODOLOGÍA.....	11
3.1 Recolección de las muestras.	12
3.2 Consideraciones Éticas.....	15
CAPÍTULO 4 RESULTADOS	16
CAPÍTULO 5 DISCUSIÓN	19
CAPÍTULO 6 CONCLUSIÓN.....	23
CAPÍTULO 7 REFERENCIAS.....	25

Resumen

El objetivo de esta investigación fue identificar las bacterias presentes en la microbiota de lesiones cariosas dentinales en molares primarias de pacientes pediátricos costarricenses. El estudio se llevó a cabo en 15 niños que acudieron a la Clínica de Odontopediatría de la Facultad de Odontología de la Universidad de Costa Rica. Los criterios de inclusión fueron: infantes entre los 4 y 8 años que presentaran lesiones cariosas cavitadas en piezas primarias, que fueran atendidos por los estudiantes de la Facultad de Odontología de la Universidad de Costa Rica de manera activa y que contaran con la firma del consentimiento informado para la participación en la investigación. Los criterios de exclusión fueron: pacientes no colaboradores para la recolección de la muestra y con tratamientos farmacológicos crónicos o durante los últimos 3 meses. Las muestras se tomaron utilizando una cuchareta estéril, colocándolas en viales de almacenamiento y fueron sometidas a diversas técnicas de identificación microbiana convencionales y moleculares tales como: identificación por Tinción de Gram, pruebas catalasa, oxidasa, TSI, API 20E, API STAPH y VITEK. De las 60 cepas bacterianas sometidas a tinción de Gram se obtuvo: 28 bacterias Gram Positivas y 32 bacterias Gram Negativas. Los principales organismos aislados fueron: especies de *Staphylococcus epidermidis*, *Pasteurella pneumotropica*/ *Mannheimia haemolytica*, *Pantoea spp* y *Streptococcus mutans*.

Summary

The objective of this research was to identify the bacteria present in the microbiota of dental carious lesions in primary molars of Costa Rican pediatric patients. The study was carried out in 15 children from 4 to 8 years old who attended the Pediatric Dentistry Clinic of the Faculty of Dentistry of the University of Costa Rica. The inclusion criteria were: infants between the ages of 4 and 8 who present cavitated carious lesions in primary teeth, who are actively attended by students of the Faculty of Dentistry of the University of Costa Rica and who have the signature of the informed consent for participation in the research. The exclusion criteria were: non-cooperative patients for the collection of the sample and with chronic pharmacological treatments or during the last 3 months. Samples were taken using a sterile spoon, placing them in storage vials and subjected to various conventional and molecular microbial identification techniques such as: Gram stain identification, catalase, oxidase, TSI, API 20E, API STAPH and VITEK tests. Of the 60 bacterial strains subjected to Gram staining, the following was obtained: 28 Gram Positive bacteria and 32 Gram Negative bacteria. The main organisms isolated were: *Staphylococcus epidermidis* species, *Pasteurella pneumotropica*/ *Mannheimia haemolytica*, *Pantoea* spp and *Streptococcus mutans*.

Índice de figuras

Figura 1. CTS con muestra de tejido carioso	12
Figura 2. Cepas aisladas en Agar Sangre.....	13
Figura 3. Identificación API Staph	14
Figura 4. Identificación API 20E	14
Figura 5. Análisis de laboratorio	17

Índice de tablas

Tabla 1. Bacterias encontradas según la prueba de laboratorio empleada.....	18
---	----

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

La caries dental es una enfermedad de los tejidos duros dentales y se ha relacionado con una etiología multifactorial (1). Actualmente, se define como “enfermedad mediada por biofilm, modulada por la dieta, multifactorial, no transmisible y dinámica que produce una pérdida neta de minerales de los tejidos dentales duros. Está determinada por factores biológicos, conductuales, psicosociales y ambientales”(2). Para llegar a esta definición de la enfermedad, en el transcurso del tiempo se han modificado diferentes teorías.

Una de las teorías iniciales fue la química parasitaria o acidogénica expuesta por Miller (3), en la cual se define la caries como un proceso causado por los ácidos que producen los microorganismos, esta producción de ácidos hace que disminuya el pH del biofilm dental y así aumenta la proliferación de microorganismos y su actividad acidógena, lo que desmineraliza el esmalte y posteriormente, la dentina, además, disuelve los tejidos y crea cavidades (3).

Otra teoría aceptada fue la triada ecológica de Keyes (4) que identificó los factores de riesgo locales para la caries, con lo que cambió el pensamiento del origen unicausal a multicausal. La triada estaba compuesta por tres agentes: huésped, microorganismos y dieta, que debían interactuar entre sí. Asimismo, esta teoría identifica que la sacarosa favorece el proceso carioso, establece el carácter infectocontagioso de la enfermedad y responsabiliza al *Streptococcus mutans* como causante.

La teoría ecológica de Mars (5), por su parte se basó en la hipótesis tanto de biofilm inespecífico como específico, sostiene que los organismos asociados con la enfermedad pueden estar presentes también en los sitios sanos y que la enfermedad se expresará por los cambios ocurridos en el balance de la microbiota que reside en el biofilm que produce la caries dental.

Se propuso también la teoría patogénica de Keystone (6), donde sostiene que ciertos microorganismos patógenos de baja abundancia pueden producir enfermedades inflamatorias al modificar una microbiota normalmente simbiótica en una alterada, principio que se cumpliría en la caries dental.

Gracias al avance en la investigación, actualmente, se ha determinado que la caries es una enfermedad multifactorial, azúcar dependiente y donde el biofilm en desequilibrio es clave para provocar una alteración en la microbiota oral y esa alteración de la simbiosis interviene en la aparición y evolución de las lesiones cariosas (3).

Las teorías antes mencionadas tienen una condición en común, la cual se centra en la participación de azúcares en la formación de las caries dentales. El exceso de azúcares agregados, particularmente en forma de bebidas endulzadas con azúcar, es una de las principales causas de caries en los niños (7). El consumo de azúcar y su relación con la caries dental ha sido investigado durante mucho tiempo y como muestra de ello los estudios de Vipeholm que datan desde 1954, analizaron cómo la frecuencia y consistencia en la ingesta de azúcares tenía un vínculo con las caries dentales (8). Actualmente la Organización Mundial de la Salud (9) ha realizado revisiones de literatura que respaldan esta asociación, reportaron que de 47 estudios analizados todos mostraron al menos una asociación entre el consumo de azúcar y la caries dental, de esos 47 estudios 42 fueron reportados exclusivamente en niños.

En Costa Rica el consumo de azúcares añadidos representa el 14,7 % de la energía consumida por la población urbana costarricense, es este porcentaje mayor en las mujeres y en las personas más jóvenes, donde las bebidas azucaradas, incluyendo las bebidas gaseosas, son la fuente principal de azúcares añadidos en la dieta costarricense (10).

El progreso de las lesiones cariosas está estrechamente relacionado con el consumo de azúcar, pero también a las bacterias que se encuentran presentes en la cavidad oral, los microorganismos y condiciones sistémicas de la persona. A las bacterias presentes en boca de cada individuo, se les conoce como microbiota oral (11).

Según Tanner et al. (12) esa microbiota es una “comunidad ecológica de microorganismos comensales, simbióticos o en equilibrio y patógenos que comparten un mismo sitio en el cuerpo, este coloniza sobre las superficies dentales de manera natural formando el biofilm”, sin embargo, al presentarse una disbiosis o desequilibrio por el consumo de azúcar se producen ácidos que superan la capacidad de amortiguación de una microbiota sana, por lo que el riesgo de desmineralización de las superficies dentales aumenta (13).

La forma en que se adquiere la microbiota es durante el embarazo, e inmediatamente después del nacimiento la cavidad oral del recién nacido es rápidamente colonizada por *Streptococcus* (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus epidermidis* y *Streptococcus salivarius*) y *Fusobacterium*, esa colonización de *Streptococcus spp.* (particularmente *Streptococcus salivarius*) se asocia con los primeros estímulos de oligosacáridos en la cavidad bucal del lactante por el consumo de leche materna o la fórmula para que prosperen otros comensales orales. Bacterias como *E.coli*, *Staphylococcus* y *Pseudomonas*, así como bacterias productoras de ácido láctico como *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri* y *Streptococcus* son frecuentes en los primeros meses de vida, incluso antes de la erupción dentaria. Por el contrario, *Fusobacteria*, *Tenericutes*, *Synergistetes* comienzan a dominar la microbiota oral hacia los primeros años de vida, mientras que *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Prevotella*, *Rothia*, *Treponema* y *Streptococcus mutans* están vinculados a microbiotas orales más maduras y con microbiotas potencialmente cariogénicos parecen emerger a medida que los bebés pasan a etapas maduras y probablemente, a una mayor exposición al entorno externo (14). La asociación entre el progreso de las lesiones cariosas de esmalte a dentina y las bacterias durante mucho tiempo se le atribuyó al *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, sin embargo, al investigar por medio de cultivos estrictamente en lesiones cariosas en dentina también se encuentran bacterias tales como *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Actinomyces*, *Eubacterium*, *Rothia*, *Arachnia*, *Micromonas*, *Pseudoramibacterium*, *Prevotella*, *Porphyromona* y *Selenomonas* (15,16).

Las bacterias anteriormente citadas como lo son los *Streptococcus* son conocidas por ser anaerobios facultativos, es decir, tienen la capacidad de desarrollarse tanto en ambientes con presencia de oxígeno y sin él. Los grupos *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* y otros se ven implicados como iniciadores de la caries, pero también pueden actuar como patógenos oportunistas en la infección odontogénica y en menos ocasiones como causantes de la endocarditis bacteriana subaguda (17). Por su parte, los bacilos Gram positivos anaerobios facultativos son un grupo formado por los géneros *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium* y *Actinomyces*; los *Lactobacilos* no se consideran patógenos, mientras que de los restantes merece destacarse sobre todo el género *Actinomyces* porque se trata de microorganismos de características intermedias entre bacterias y hongos que ven estimulado su crecimiento en atmósferas aerobias con un 5-10 % de CO₂ (17).

Las bacterias no sólo tienen diferencias en su forma de subsistir, sino que además difieren en su forma y tamaño. Existen métodos de identificación bacteriana que por lo general no se utilizan de manera aislada, sino que en ocasiones se utilizan simultáneamente (18).

Uno de los principales métodos de identificación son los criterios morfológicos, estos se centran en el tamaño, forma, color, opacidad y textura de las colonias. Las bacterias tienen rasgos anatómicos diferentes, pero bajo el microscopio se pueden observar la forma, tamaño celular y movilidad (19).

Existen también métodos que permiten la diferenciación celular por medio de tinción, el principio de la tinción de Gram se basa en las diferencias en la estructura y composición de la pared celular de algunas bacterias, no todas las bacterias se pueden teñir con esta técnica ya sea porque carecen de pared celular o que esta tenga una composición diferente, las bacterias positivas se tiñen de violeta mientras que las negativas de rosa. Este método es altamente sensible debido a la variación técnica y a errores en la interpretación. La calidad depende de las habilidades del personal técnico la cual puede variar en el tiempo y entre personas (20).

Una vez realizados los métodos de tinción y morfología, por lo general se utilizan pruebas bioquímicas, estas se centran en demostrar si el microorganismo es capaz de fermentar azúcares, degradar o producir compuestos. Estos métodos también se conocen como sistemas miniaturizados que permiten realizar varias pruebas bioquímicas simultáneamente y así realizar la identificación del microorganismo en un tiempo más corto (21).

Existen estudios más avanzados a los bioquímicos como los basados en biología molecular donde, a través de procedimientos y reactivos se pueden detectar secuencias de ADN que son propias de una determinada bacteria. Cuando un microorganismo no puede ser cultivado por métodos comunes, se opta por la prueba Polymerase Chain Reaction (PCR). La principal dificultad para la implementación de una PCR es el manejo adecuado de posibles contaminaciones que, de producirse, no permitirían llegar a un resultado certero (22).

La identificación bacteriana, actualmente, se ha centrado en el genoma, es decir, en el estudio y caracterización del conjunto de genes del microorganismo. Para lograr esto se utiliza la espectrometría de masas, donde la identificación se realiza a través de la comparación del resultado de una bacteria con todos los espectros de masas que contiene el archivo comercial proporcionado por el fabricante, el software empleado brinda datos con menos margen de error (23).

CAPÍTULO 2

PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 Justificación

Los profesionales en odontología se han interesado en profundizar su conocimiento sobre la microbiota oral, dado la amplia gama de microorganismos o cepas bacterianas que se han podido encontrar en él por medio de diferentes sistemas de identificación bacteriana, sin embargo, actualmente sólo se cuenta con los resultados reportados en la literatura proveniente de poblaciones de otros países. En Costa Rica existe una falta significativa de evidencia científica que brinde un panorama más específico sobre cuáles son las cepas bacterianas que predominan en las lesiones cariogénicas de los pacientes pediátricos de una población en específico.

La realización de esta investigación generará conocimiento a nivel nacional acerca de las cepas bacterianas que se encuentran específicamente en lesiones cariogénicas en una población pediátrica costarricense, lo cual permite obtener un material de referencia para futuras investigaciones basadas en la realidad nacional porque actualmente no existe información al respecto en el país.

2.2 Pregunta de Investigación

¿Cuáles microorganismos se encuentran en las lesiones cariosas de piezas primarias de pacientes que asisten a la clínica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Costa Rica?

2.3 Objetivo General

Identificar los microorganismos presentes en lesiones cariosas de piezas primarias de pacientes que asisten a la clínica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Costa Rica

2.4 Objetivos específicos

- Aislar los microorganismos de lesiones cariosas en dientes primarios de la población en estudio.
- Caracterizar los microorganismos presentes en lesiones cariosas en dientes primarios de la población en estudio por medio de Tinción Gram.
- Identificar mediante pruebas bioquímicas los microorganismos presentes en lesiones cariosas de dientes primarios de la población en estudio.

2.5 Hipótesis

Hipótesis nula: Los microorganismos encontrados en lesiones cariosas de piezas primarias en pacientes que asisten a la Clínica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Costa Rica son iguales a lo reportado en estudios previos.

Hipótesis alternativa: Los microorganismos encontrados en lesiones cariosas de piezas primarias en pacientes que asisten a la Clínica de la Facultad de Odontología de la Universidad Costa Rica son diferentes a lo reportado en estudios previos.

2.6 Diseño del estudio

Estudio biomédico observacional.

2.7 Lugar de realización

Universidad de Costa Rica. Los procedimientos clínicos se realizarán en la Clínica de Odontopediatría de la Facultad de Odontología, mientras que los procedimientos de laboratorio en el Laboratorio de Bacteriología Médica de la Facultad de Microbiología.

2.8 Determinación de la muestra

En el estudio participarán 15 pacientes con edad entre los 4 y 8 años con dentición primaria y mixta con lesiones cariosas en dentina que acudan a la consulta en la Clínica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Costa Rica.

2.9 Criterios de selección

Criterios de inclusión:

- Infantes entre los 4 y 8 años que presenten lesiones cariosas cavitadas en piezas primarias y que sean atendidos por estudiantes de la Facultad de Odontología de la Universidad de Costa Rica.
- Pacientes que cuenten con la firma del consentimiento informado para la participación en la investigación.

Criterios de exclusión:

- Pacientes no colaboradores para la recolección de la muestra.
- Pacientes con tratamientos farmacológicos crónicos o durante los últimos 3 meses.

CAPÍTULO 3 METODOLOGÍA

3.1 Recolección de las muestras.

La recolección de las muestras se dio entre el 10 y el 20 de enero de 2023 en la Clínica de Odontopediatría y Ortodoncia de la siguiente forma: en cada paciente se seleccionó la molar con caries avanzada, el operador aplicó una técnica anestésica según la molar elegida y se colocó aislamiento absoluto con dique de goma. Mediante una cuchareta estéril la investigadora removió una porción de la dentina cariada y se depositó directamente en un tubo de centrifuga estéril con 2 cc de caldo soya tripticasa (CTS) (Figura 1) y se transportó al laboratorio. Posterior a la toma de la muestra, el operador continuó con el tratamiento restaurador de la molar cariada.



Figura 1. CTS con muestra de tejido carioso

Posterior a la recolección de la muestra, en un tiempo menor a 3 horas se realizó el traslado de la muestra al laboratorio de microbiología de la Universidad de Costa Rica, donde se incubó por 24 horas en CTS en agitación a 37 ° C, para garantizar un líquido homogéneo. Tras la incubación se sembró el caldo en Agar Sangre y se almacenaron las placas por 24 y 48 horas en la cámara de Dióxido de Carbono (CO₂) a 37°C para fomentar el crecimiento bacteriano (Figura 2).

Una vez transcurrido este tiempo se realizó la caracterización macroscópica de las diferentes colonias bacterianas para determinar su forma, tamaño y color. Se aisló cada cepa bacteriana en una nueva placa de Agar Sangre y se almacenó por 24 horas en la cámara de CO₂ a 37°C al igual que en el estudio de Elbing et Brend (24).



Figura 2. Cepas aisladas en Agar Sangre

Al pasar un lapso de 24 horas se optó por realizar pruebas Gram siguiendo el procedimiento empleado por Coico (25) para confirmar la pureza de cada cepa, se utilizaron líquidos como el tinte de cristal violeta, lugol, acetona y safranina. Al finalizar el secado de la tinción Gram se observó la muestra al microscopio, donde se visualizaron de color violeta las bacterias Gram positivas y de color rosa-rojizo las bacterias Gram negativas como Cassasola lo indica en su investigación (20).

A las cepas bacterianas identificadas como Gram positivas se les realizó la prueba de catalasa mencionada por Taylor en 1972 (26), cuando el resultado fue negativo se realizó la prueba VITEK descrita por Vargas et al. (27).

Cuando el resultado de prueba catalasa fue positiva se formó una efervescencia rápida con desprendimiento de burbujas, luego se realizó la prueba de identificación bacteriana API STAPH (Figura 3) mencionada por Holmes et al. y Biomerux (28,29).

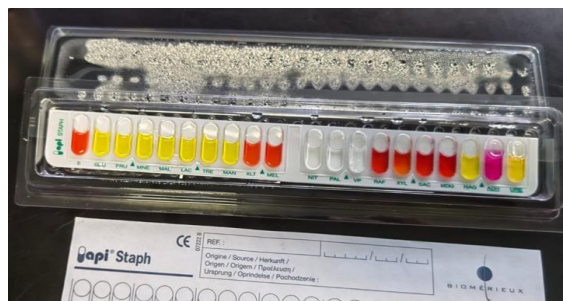


Figura 3. Identificación API Staph

A las cepas bacterianas identificadas como Gram negativas se realizó la prueba oxidasa en el método descrito por Bou (21), con tiras de papel impregnadas con el reactivo para-amino-N-dimetil-anilina, también la prueba Triple Sugar Iron Agar (T.S.I Agar) como lo realizó en su estudio González (30) para determinar la capacidad de fermentación de las bacterias con la lactosa, glucosa o sacarosa. Cuando el resultado de prueba oxidasa fue negativa se realizó la identificación bacteriana mediante las pruebas API 20 E (Figura 4) mencionada por Holmes et al. y Biomerux (28,29), pero cuando la prueba oxidasa fue positiva o no hubo más de un 85 % de probabilidad de identificación se realizó la prueba de identificación bacteriana VITEK descrita por Vargas et al. (27).



Figura 4. Identificación API 20E

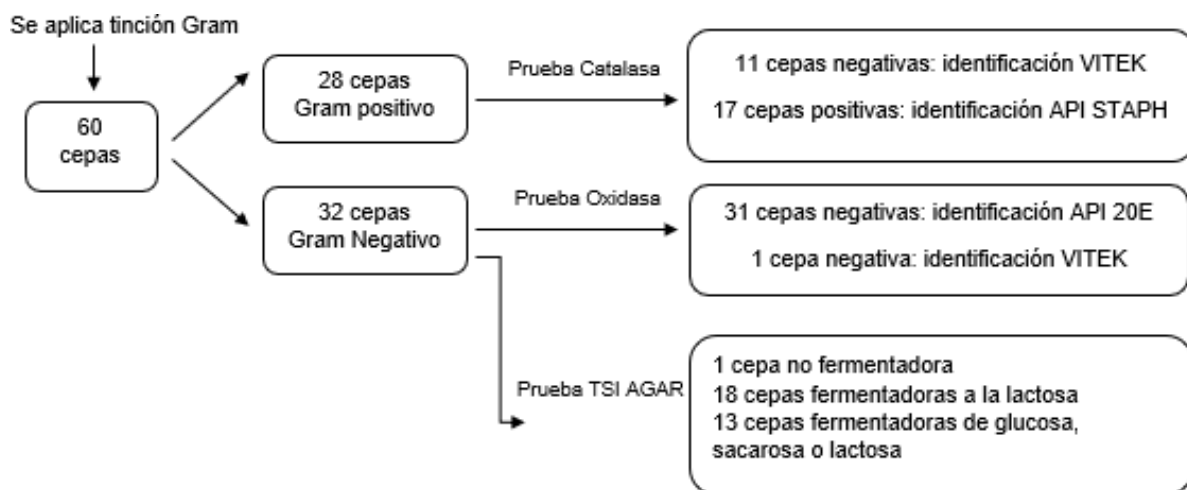
3.2 Consideraciones Éticas

Esta investigación fue aprobada por el Comité Ético Científico de la Universidad de Costa Rica (CEC-311-2022) y por el Consejo Nacional en Salud (CONIS-390-2022).

CAPÍTULO 4 RESULTADOS

De las 15 muestras de lesiones cariosas en piezas primarias se aislaron 60 cepas bacterianas. De cada muestra se obtuvo un número diferente de cepas porque el crecimiento en las 24 y 48 horas fue variable en cada placa, debido a que existen bacterias que tardan más tiempo en crecer.

De las 60 cepas bacterianas sometidas a tinción Gram se obtuvo: 28 cepas Gram Positivas y 32 Gram Negativas. De las cepas Gram Positivas, 11 fueron positivas a la prueba catalasa y se les realizó la prueba VITEK, mientras que en las 17 cepas negativas se utilizó la prueba API STAPH para identificación bacteriana. A todas las 32 cepas bacterianas Gram Negativas, se le realizó la prueba TSI y los resultados fueron: solo 1 no fermentador al no cambiar de color, 18 sólo fermentadoras de glucosa y 13 fermentaron glucosa, sacarosa o lactosa. Además, a las 32 se les aplicó la prueba oxidasa, de las cuales se obtuvieron 31 negativas y se utilizó la prueba API 20E y la única cepa positiva a la oxidasa fue identificada por medio de la prueba VITEK (Figura 5).



Elaboración propia

Figura 5. Análisis de laboratorio

Luego de obtener las pruebas preliminares de identificación bacteriana, se determinaron, por medio de los métodos bioquímicos API 20E, API STAPH y VITEK, los microorganismos presentes en las muestras de la caries dental (Tabla 1).

Tabla 1. Bacterias encontradas según la prueba de laboratorio empleada

Prueba	Bacterias encontradas	Gram positiva	Gram negativa	# de cepas
API STAPH	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	✓		6
	<i>Staphylococcus sciuri</i>	✓		2
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	✓		2
	<i>Staphylococcus aereus</i>	✓		2
API 20E	<i>Pasteurella pneumotropica/Mannheimia haemolytica,</i>		✓	6
	<i>Photobacterium damsela</i>		✓	1
	<i>Serratia marcescens</i>		✓	2
	<i>Pantoea spp</i>		✓	10
	<i>Klebsiella pneumoniae spp azaenae</i>		✓	1
	<i>Pseudomonas fluorescens putida</i>		✓	1
	<i>Shigella spp</i>		✓	1
VITEK	<i>Streptococcus mutans</i>	✓		5
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	✓		2
	<i>Streptococcus thoraltensis</i>	✓		2
	<i>Streptococcus sobrinus</i>	✓		2
	<i>Streptococcus salivarius spp salivarius</i>	✓		2
	<i>Streptococcus mitis Streptococcus oralis</i>	✓		2
	<i>Vibrio alginolyticus</i>		✓	1
	<i>Enterococcus faecalis</i>	✓		1
	<i>Sphingomonas paucimobillis</i>		✓	5
	<i>Rothia mucilaginosa</i>	✓		1
	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis / Kytococcus sedentarius</i>	✓		1
	No identificadas			✓

Elaboración propia

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

La diversidad de la microbiota bacteriana es un tema muy relevante (13,31,32) y esta investigación robustece la evidencia de que no solo los *Streptococcus mutans* son aislados de lesiones de caries avanzadas, sino que existen diferentes cepas bacterianas que actúan en conjunto para realizar una destrucción de los tejidos dentales.

En esta investigación se encontraron bacterias Gram Positivas, de las cuales, el *Streptococcus mutans* ya identificado previamente como bacteria específica de caries dentinal en piezas primarias (33), estuvo presente en algunas muestras, este resultado coincide con un estudio realizado por Quidemat et al. (34) donde reportaron que algunos sujetos con caries activas tenían niveles detectables de bacterias *Streptococcus mutans*, sin embargo, los investigadores también destacaron una alta cantidad de bacterias anaerobias como *Leptotrichia shahii* y *Prevotella melaninogenica*, situación que no se dio en el presente estudio porque solo se identificaron bacterias aerobias. Otros *Streptococcus* identificados fueron el *Streptococcus sanguinis* y el *Streptococcus salivarius* situación que también se presentó en la investigación de Bansal (35).

Respecto a los *Staphylococcus*, la subvariante que estuvo más presente fue el *Staphylococcus epidermidis*, al igual que en la investigación de Devang et al. (36), donde indicaron que este microorganismo posee una capacidad de adaptación alta que le permite obtener, perder o regular elementos genéticos que proporcionan mejores ambientes para la colonización en el hospedero y es gracias a esta característica que es tan prevalente en la caries dental.

Un hallazgo importante en esta investigación fue la presencia de *Enterococcus faecalis*, la cual es una bacteria coco Gram positivo, anaerobio facultativo que posee numerosos factores de virulencia, según Carrero et al.(37) este puede encontrarse transitoriamente en cavidad oral y lesiones de tejidos blandos, principalmente en poblaciones expuestas a ambientes hospitalarios o con infecciones nosocomiales, razón por la cual, podría suponerse que los niños estuvieron expuestos a dichos ambientes previos a la cita de toma de la muestra.

Otra bacteria Gram positiva hallada en un número reducido de muestras en este estudio fue la *Rothia mucilaginosa* que se aloja en el tracto respiratorio superior, esta no se encontró en la investigación De Jesus et al. (38) que en su lugar reportaron la presencia de bacterias como *Mycosphaerella*, *Cyberlindnera*, and *Trichosporon* en muestras de lesiones cariosas profundas. Otras investigaciones también refuerzan la heterogeneidad de la microbiota oral porque no reportan el hallazgo de *Rothia*, pero sí identificaron *Veillonella* y *Actinomyces*, dichas investigaciones fueron realizadas en Estados Unidos y Alemania en poblaciones de edades variables por lo que no comparten ni la ubicación geográfica, ni el rango de edad (39,40).

Respecto a las bacterias Gram negativas, se identificó la presencia de la *Pantoea* la cual es una enterobacteria aislada frecuentemente en plantas, frutas y vegetales, según Segado et al. (41), por lo que la presencia de esta bacteria podría deberse a que alguno de los sujetos antes de recibir la atención dental, no se realizó una correcta higiene oral y por lo tanto, es posible que en una cavidad abierta de caries se hayan alojado residuos alimenticios.

Se identificaron también las cepas *Sphingomonas paucimobilli* y *Pasteurella pnuemotropica*, ambas Gram Negativas, esto se considera un hallazgo por resaltar en esta investigación porque la *Sphingomonas paucimobilli* es una bacteria ubicada en medios acuosos y es rara de encontrar en humanos, su subsistencia se relaciona con infecciones y fiebres en pacientes pediátricos (42). Por otra parte, la *Pasteurella pnuemotropica*, que es un patógeno oportunista que se encuentra presente en la cavidad oral de roedores, perros y gatos, que además se han reportado casos de mortalidad por septicemia y largas estadías en centros hospitalarios (43–45), por lo que lo hallado en esta investigación podría considerarse un evento aislado aún no relacionado con lesiones cariosas en dentina, sin embargo, se puede suponer que los niños han estado expuestos a ambientes con alguno de los animales antes mencionados y por eso la presencia de esta bacteria.

La heterogeneidad bacteriana que se identificó en esta investigación concuerda con estudios donde se ha logrado establecer que la microbiota varía según su localización en diferentes estructuras dentales, lo que indica que la destrucción en tejidos desde el esmalte hasta la dentina involucra distintos microorganismos en cada zona; en lesiones cariosas de esmalte se han identificado bacterias como: *Streptococcus*, *Veilonella* y *Actinomyces*, mientras que conforme aumenta la destrucción y la caries se aloja en la dentina se pueden detectar otras bacterias como *Prevotella denticolens* y *Lactobacillus* (33,39,46).

Uno de los beneficios de este estudio es que fue la primera vez que se identificó la microbiota de las lesiones cariosas en dentina de dientes primarios de niños costarricenses que establece similitudes y diferencias en relación con investigaciones realizadas en otros países (33,35,40). Sin embargo, una de las limitaciones fue que no se utilizaron los mismos métodos de identificación. En Umea Suecia la detección se realizó por Reacción en Cadena de Polimerasa de las muestras obtenidas en 13 niños y las principales especies asociadas con caries fueron *Actinobaculum*, *Atopobium*, *Aggregatibacter* y *Streptococcus mutans* (40). Por su parte Ribeiro et al. (47) utilizaron la identificación por medio de la metagenómica ARNr 16S en 13 niños de Río de Janeiro, Brasil y se encontraron *Streptococcus*, *Corynebacterium matruchotii*, *Actinomyces viscosus*, *Prevotella nigrescens* y *Dialister microaerophilus*. En dichos estudios se emplearon sistemas de identificación más actualizados que proveen mayor rapidez e identifican bacterias no cultivables o anaerobias.

Una de las proyecciones de esta investigación es continuar con la caracterización de la microbiota utilizando pruebas más modernas y relacionar la presencia de los diferentes tipos de bacterias con variables tales como el tipo de dieta y la higiene oral.

CAPÍTULO 6
CONCLUSIÓN

Las bacterias de la microbiota oral que estuvieron presentes en mayor número de cepas en una población de pacientes pediátricos costarricenses con estadios avanzados de las lesiones cariosas dentinales en dentición primaria fueron *Staphylococcus epidermidis*, *Pasteurella pneumotropica*/ *Mannheimia haemolytica*, *Pantoea spp* y *Streptococcus mutans*.

CAPÍTULO 7
REFERENCIAS

1. Mathur VP, Dhillon JK. Dental Caries: A Disease Which Needs Attention. *Indian J Pediatr.* 2018 Mar 23;85(3):202–6.
2. Machiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A, et al. Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Res.* 2020;54(1):7–14.
3. Calle Sánchez MJ, Baldeón Gutiérrez RE, Curto Manrique J, Céspedes Martínez DI, Góngora León IA, Molina Arredondo KE, et al. Teorías de caries dental y su evolución a través del tiempo: Revisión de literatura. *Rev Científica Odontológica.* 2018 Jun;06(01):98–105.
4. Tanzer JM. Dental Caries is a Transmissible Infectious Disease: The Keyes and Fitzgerald Revolution. *J Dent Res.* 1995 Sep 8;74(9):1536–42.
5. Pérez Luyo AG. La Biopelícula : una nueva visión de la placa dental. *Rev Estomatológica Hered.* 2014;15(1).
6. Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. Surf the Storm: Global Trends Survey Results. *Natl Inst Heal.* 2012;10(10):2–17.
7. Chi DL, Scott JM. Added Sugar and Dental Caries in Children. *Dent Clin North Am.* 2019 Jan;63(1):17–33.
8. HOJER JA, MAUNSBACH AB. The Vipeholm dental caries study: purposes and organisation. *Acta Odontol Scand.* 1954 Sep 2;11(3–4):195–206.
9. Organización Mundial de la Salud. Metas mundiales de nutrición 2025: resumen de políticas sobre el sobrepeso infantil. 2015;8. Available from: http://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/sugars_intake/es/
10. Salas GG, Quesada DQ, Chinnock A, Previdelli AN, ELANS G. Consumo de azúcar añadido en la población urbana costarricense: estudio latinoamericano de nutrición y salud ELANS-Costa Rica. *Acta Med Costarric.* 2020 Jul 16;61(3).

11. Conrads G, About I. Pathophysiology of Dental Caries. *Monogr Oral Sci.* 2018;27:1–10.
12. Tanner ACR, Kressirer CA, Rothmiller S, Johansson I, Chalmers NI. The Caries Microbiome: Implications for Reversing Dysbiosis. *Adv Dent Res.* 2018 Feb 22;29(1):78–85.
13. Fakhruddin KS, Ngo HC, Samaranayake LP. Cariogenic microbiome and microbiota of the early primary dentition: A contemporary overview. *Oral Dis.* 2019 May 19;25(4):982–95.
14. Gomez A, Nelson KE. The Oral Microbiome of Children: Development, Disease, and Implications Beyond Oral Health. *Microb Ecol.* 2017 Feb 14;73(2):492–503.
15. Liu G, Wu C, Abrams WR, Li Y. Structural and Functional Characteristics of the Microbiome in Deep-Dentin Caries. *J Dent Res.* 2020 Jun 20;99(6):713–20.
16. Obata J, Takeshita T, Shibata Y, Yamanaka W, Unemori M, Akamine A, et al. Identification of the Microbiota in Carious Dentin Lesions Using 16S rRNA Gene Sequencing. *Ratner AJ, editor. PLoS One.* 2014 Aug 1;9(8):e103712.
17. Berini L, Garatea J GC. La infección odontogénica: concepto, etiopatogenia, bacteriología y clínica. *Infecc Odontogénicadontogénica.* 2015;2(18):1–21.
18. López-hontangas MGJL, Microbiología S De, La H, Valencia F. Identificación bacteriana. 2003;21:54–60.
19. Vizcarrondo M de, Gutiérrez S, Lopardo HA, Predari S, Vay C, Castro-Orozco R, et al. Bacterias de Importancia Clínica. *Identificacion Microbiana.* 2009;11(6):11–73.
20. Casasola M. La importancia de realizar una correcta tinción de Gram en la identificación bacteriana. *Rev Col Microbiol y Química Clínica Costa Rica.* 2022;27(2):89–98.

21. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011 Oct;29(8):601–8.
22. Poggi H, Guzmán AM, García P, Lagos M. “ PCR universal o de amplio espectro ”: Un aporte a la detección e identificación de bacterias y hongos en la práctica clínica Universal or broad-range polymerase chain reaction (PCR): A contribution to the detection and identification of bacteria and f. *Rev Med Chil*. 2009;(137):1122–5.
23. García P, Allende F, Legarraga P, Huilcaman M, Solari S. Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: Una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI. *Rev Chil infectología*. 2012 Jun;29(3):263–72.
24. Elbing KL, Brent R. Growth in Liquid or Solid Media. In: *Current Protocols in Protein Science*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 1998. p. A.4B.1-A.4B.3.
25. Coico R. Gram Staining. *Curr Protoc Microbiol*. 2006 Feb 15;00(1):3–4.
26. Taylor WI, Achanzar D. Catalase Test as an Aid to the Identification of Enterobacteriaceae. *Appl Microbiol*. 1972;24(1):58–61.
27. Vargas LJ, Vila A, Lanza A, Bonvehi P, Nazar J, Mikietuk A, et al. Utilidad del sistema VITEK en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad antimicrobiana. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 2005 Mar;39(1):19–25.
28. Holmes B, Willcox WR, Lapage SP. Identification of Enterobacteriaceae by the API 20E system. *J Clin Pathol*. 1978 Jan 1;31(1):22–30.
29. BioMérieux. Sistemas Miniaturizados API ®. *ApiWeb*. 2010. p. 5.
30. González J. Reacciones En El Agar Hierro-Triple Azúcar . *Universidad Central De Venezuela*. 2011. p. 1–3.

31. Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res.* 2013 Mar;69(1):137–43.
32. Agnello M, Marques J, Cen L, Mittermuller B, Huang A, Chaichanasakul Tran N, et al. Microbiome Associated with Severe Caries in Canadian First Nations Children. *J Dent Res.* 2017 Nov 14;96(12):1378–85.
33. Zhang JS, Chu C-H, Yu OY. Oral Microbiome and Dental Caries Development. *Dent J.* 2022 Sep 30;10(10):184.
34. Qudeimat MA, Alyahya A, Karched M, Behbehani J, Salako NO. Dental plaque microbiota profiles of children with caries-free and caries-active dentition. *J Dent.* 2021 Jan;104(November 2020):103539.
35. Bansal K, Chaudhary R, Mathur V, Tewari N. Comparison of oral micro-flora in caries active and caries free Indian children using culture techniques and PCR analysis. *Indian J Dent Res.* 2020;31(3):420.
36. Devang Divakar D, Muzahed, Aldeyab SS, Alfawaz SA, AlKheraif AA, Ahmed Khan A. High proportions of *Staphylococcus epidermidis* in dental caries harbor multiple classes of antibiotics resistance, significantly increase inflammatory interleukins in dental pulps. *Microb Pathog.* 2017 Aug;109:29–34.
37. Carrero Martínez C, Cristina M, Gilbert G, Alexandra M, Lapiolo M, Serna Varona F, et al. Baja frecuencia de *Enterococcus faecalis* en mucosa oral de sujetos que acuden a consulta odontológica. *Rev Fac Odontol Univ Antioq.* 2015;26(2):261–70.
38. De Jesus VC, Shikder R, Oryniak D, Mann K, Alamri A, Mittermuller B, et al. Sex-Based Diverse Plaque Microbiota in Children with Severe Caries. *J Dent Res.* 2020 Jun 28;99(6):703–12.

39. Grier A, Myers JA, O'Connor TG, Quivey RG, Gill SR, Kopycka-Kedzierawski DT. Oral Microbiota Composition Predicts Early Childhood Caries Onset. *J Dent Res*. 2021 Jun 24;100(6):599–607.
40. Lif Holgerson P, Öhman C, Rönnlund A, Johansson I. Maturation of Oral Microbiota in Children with or without Dental Caries. Wen Z, editor. *PLoS One*. 2015 May 28;10(5):e0128534.
41. Segado Arenas A. *Pantoea agglomerans*: ¿Un nuevo patógeno en la unidad de cuidados intensivos neonatales? *Arch Argent Pediatr*. 2012 Aug 1;110(4):e77–9.
42. Benevides GN, Hein N, Lo DS, Ferronato AE, Ragazzi SLB, Yoshioka CRM, et al. Otomastoiditis caused by *Sphingomonas paucimobilis*: case report and literature review. *Autops Case Reports*. 2014;4(3):13–20.
43. Scharmann W, Heller A. Survival and transmissibility of *Pasteurella pneumotropica*. *Lab Anim*. 2001 Apr 1;35(2):163–6.
44. Nimri LF. Bacteremia in Children: Etiologic Agents, Focal Sites, and Risk Factors. *J Trop Pediatr*. 2001 Dec 1;47(6):356–60.
45. Porter RS, Hay CM. *Pasteurella* Endocarditis: A Case Report and Statistical Analysis of the Literature. *Case Rep Infect Dis*. 2020 Jul 20;2020:1–10.
46. García-Castro L, Tello-Guerrero G, Álvaro-Ordoñez L, Perona-Miguel de Priego GA. Caries dental y microbiota. Revisión. *Rev cient odontol*. 2017;668–78.
47. Ribeiro AA, Azcarate-Peril MA, Cadenas MB, Butz N, Paster BJ, Chen T, et al. The oral bacterial microbiome of occlusal surfaces in children and its association with diet and caries. Nascimento M, editor. *PLoS One*. 2017 Jul 5;12(7):e0180621.