



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

TESIS

"Detección Genético Molecular y Diversidad Genética de
Streptococcus mutans de la cavidad oral en niños con caries"

PRESENTA

CDEE GABRIELA LÓPEZ TORRES

DIRECTORES DE TESIS:

D. en C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas
D. en C. Gerardo Vázquez Marrufo

Morelia, Michoacán, Junio 2009.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Genética Molecular Microbiana de la División de Estudios de Posgrado de la Fac. de Cs. Médicas y Biológicas y en el laboratorio de Conservación y Biotecnología Microbiana del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología del la Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH

DEDICATORIAS

A mis padres, Ana María y J. Jesús, como una manera más de agradecer **TODO** lo que he recibido de ustedes, pero sobretodo, agradecerles el que yo esté aquí y ahora, realizando mis sueños. **GRACIAS!**

A mis hijas, Fernanda y Mariana, por su cariño, su paciencia, por el tiempo sacrificado, por su compañía más de una vez en el laboratorio, y por ser ustedes, la razón principal de cada proyecto en mi vida...**LAS CORAZÓN!**

A tí Core, por escucharme siempre, por el ánimo que me das en los momentos más complicados, por tu comprensión, por la confianza que siempre tienes en mí para llegar a la meta y de manera muy especial por el amor que me brindas cuando más lo necesito. **T.A.**

A mis hermanos: Jesús, Hugo, Victor y Cuauhtémoc, por formar parte de mi vida, por ser las personas en las que puedo confiar **SIEMPRE** con los ojos cerrados.

**CON TODOMI CARIÑO,
GRACIAS A TODOS...LOS QUIERO MUCHO!!!**

AGRADECIMIENTOS

A la **UMSNH**, por mi formación académica, con toda mi lealtad y gran orgullo.

D.C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas y D.C. Gerardo Vázquez Marrufo, por brindarme su amistad, por su disposición en todo momento, por abrirme las puertas dándome la oportunidad de inmiscuirme en su territorio y permitirme llegar a la meta de este proyecto. Ha sido para mí un gran acierto y una satisfacción enorme el haberlos conocido!!! **GRACIAS!**

D.C. Virginia A. Robinson Fuentes, por las significativas propuestas a este trabajo, por ofrecerme su apreciable amistad y por ese espíritu de ánimo que siempre me contagia cuando más lo necesito!!! **GRACIAS!**

M.C. Ana Edith Higareda Mendoza, por la buena disposición y las excelentes aportaciones en este proyecto, pero igual de importante, por su desinteresada amistad...**GRACIAS!**

D.C. Martha Eva Viveros Sandoval, por las valiosas contribuciones para la realización de este trabajo, por toda la ayuda brindada en esta etapa de mi formación que está concluyendo...**GRACIAS!**

Q.F.B. Iliana Tafolla Muñoz, C. Araceli G. Inocencio Velázquez, Q.F.B. Saila Viridiana Cázares García y Q.F.B. Leticia Aguilar García, por su gran y sincera amistad, por todo el apoyo y enseñanzas que me dieron, por los buenos momentos (que fueron muchos!)...**GRACIAS AMIGUIS!!!**

CON TODO MI AFECTO Y SINCERIDAD...

GRACIAS POR HACER SUYO ESTE TRABAJO!!!

INDICE GENERAL

	PAGINA
ÍNDICE DE FIGURAS	1
ÍNDICE DE TABLAS	2
ÍNDICE DE ANEXOS	3
RESUMEN	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 La caries	5
1.1.1. Definición	5
1.1.2. Fisiopatología	5
1.1.3. Prevalencia	6
1.1.4. Etiología	6
1.1.5 Métodos de identificación bacteriana	11
2. JUSTIFICACIÓN	16
3 HIPÓTESIS	17
4. OBJETIVOS	17
4.1 Objetivo general	17
4.1.1 Objetivos específicos	17
5. MATERIAL Y MÉTODOS	18
5.1 Selección de la muestra:	18
5.2. Medios de cultivo:	19
5.2.1. Agar francés o stab agar	19
5.2.2 Medio Luria-Bertani (LB)	19
5.2.3 Agar Nutritivo	19
5.2.4 Agar Sangre	19
5.3 Toma de muestras	19
5.4 Obtención de aislados bacterianos	20
5.5. Técnicas de análisis genético molecular	20
5.5.1 Extracción de DNA bacteriano	20
5.5.2 Visualización de DNA en geles de agarosa	21
5.5.3 Amplificación de regiones específicas	21

5.5.4	Secuenciación	21
5.5.5	Elaboración de dendogramas a partir de las Secuencias	23
5.5.6	Ensayos RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)	23
5.5.7	Elaboración de Dendogramas a partir de los ensayos RAPD	24
5.6	Identificación de especies bacterianas mediante el sistema BIOLOG	24
5.6.1	Fluido de Inoculación	24
5.6.2	Obtención del preinóculo	24
5.6.3	Preparación de la suspensión	25
5.6.4	Inoculación e incubación de las microplacas BIOLOG	25
6.	RESULTADOS	26
6.1	Aplicación de encuestas	26
6.2	Muestras procesadas en el laboratorio	27
6.3	Tinción de Gram	29
6.4	Detección de <i>S. mutans</i>	29
6.4.1	En muestras directas	30
6.4.2	En aislados bacterianos	31
6.5	Diversidad genética de <i>S. mutans</i>	32
6.5.1	Secuenciación del gen <i>dexA</i>	32
6.5.2	Análisis de los polimorfismos de DNA amplificado al azar (RAPD)	32
6.6	Búsqueda de comunidad bacteriana alterna	36
6.6.1	Secuenciación del gen 16S RNAr	36
6.6.2	Ensayos de diversidad metabólica	37
7.	DISCUSIÓN	39
8.	RESÚMEN DE RESULTADOS	43
9.	CONCLUSIÓN	43

10. PERSPECTIVAS	43
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
1. Liberación de Ca y PO ₄	5
2. Estructuras dentales	7
3. Dentina	7
4. Esquema del procedimiento de las muestras en el laboratorio	27
5. Número de muestras obtenidas de las diferentes edades de la población de estudio.	29
6. Calidad y cantidad del DNA obtenido de aislados y muestras directas	30
7. Amplificación con iniciadores específicos para <i>S. mutans</i> con DNA de muestras directas.	30
8. Dendograma de muestras positivas a <i>S. mutans</i> .	32
9. Patrones de amplificación en los ensayos RAPD	33
10. Dendograma de aislados de <i>Streptococcus mutans</i> .	34
11. Patrón de agrupamiento de los aislados de <i>S. mutans</i> con secuencias de aproximadamente 950 nucleótidos.	35
12. Patrón de agrupamiento a partir de los ensayos RAPD correspondientes a los aislados de secuencias más largas.	35
13. Dendograma de aislados amplificados con iniciadores universales.	36
14. Microorganismos identificados a partir de las muestras mediante el sistema BIOLOG.	37

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
1. Iniciadores utilizados en la amplificación de regiones específicas	21
2. Iniciadores utilizados en los ensayos RAPD	24
3. Hábitos Dietético-Higiénicos de la población de estudio.	26
4. Número de aislados en los diferentes grupos de edad de la población de estudio.	29
5. Muestras directas positivas a <i>S. mutans</i> .	31
6. Aislados positivos a <i>S. mutans</i> con respecto al grupo de edad.	31
7. Fuentes Comunes de Aislamiento de las bacterias tipificadas en BIOLOG.	38

ÍNDICE DE ANEXOS

	PÁGINA
1. Consentimiento informado	49
2. Formato de encuesta	51
3. a) Fuentes de carbono de una microplaca GN2	56
4. b) Fuentes de carbono de una de microplaca GP2	57
5. a) Patrón de utilización de fuentes de carbono de los aislados Gram negativos.	58
b) Patrón de utilización de fuentes de carbono de los aislados Gram positivos.	58
6. Matriz dicotómica con los datos del ensayo RAPD obtenidos con el iniciador OPA 02	59
7. Matriz dicotómica con los datos del ensayo RAPD obtenidos con el iniciador OPA 03	60
8. Matriz dicotómica con los datos del ensayo RAPD obtenidos con el iniciador OPA 13	61
9. Matriz dicotómica con los datos del ensayo RAPD obtenidos con el iniciador OPA 18	62

RESUMEN

En la cavidad oral se encuentran comunidades de una gran variedad de especies de microorganismos a lo que se ha denominado biofilm, constituido por más de 700 especies bacterianas y que se ha relacionado con la iniciación de caries en esmalte. *Streptococcus mutans* es el microorganismo más frecuentemente asociado con este padecimiento (Li et al., 2007; Corby et al., 2005; Saxena y Caufield, 2005; Byun et al., 2004; Ellen et al., 1980; Klein et al., 2004; Granath et al., 1993; Koneman et al., 1999), ya que se ha encontrado aproximadamente en el 90% de los sujetos con caries activas (Corby et al., 2005). En México, existen reportes en algunos estados, como en Zacatecas (Aguilera et al., 2002) y San Luis Potosí (Loyola-Rodríguez et al., 2008), en los que han usado métodos moleculares para realizar la caracterización de la microbiota oral. Sin embargo, en el Estado de Michoacán, esta información es inexistente, sobre todo utilizando métodos de genética molecular. En este trabajo se identificó *S. mutans* en la cavidad oral de niños entre 1-12 años de edad provenientes de Morelia, Mich. Se incluyeron 270 muestras donde 129 niños pertenecieron al grupo con caries y 141 niños al grupo sin caries. Se tomaron dos muestras por cada niño a partir de la cavidad oral mediante un barrido con hisopo estéril. A una de las muestras (muestras directas, sin cultivar) se le extrajo el DNA con el que se realizó la amplificación del gen dexA, empleando iniciadores específicos para *S. mutans*. A partir de éstas, el 9.72 % de la población total dio amplificación positiva, así como el 12.97% de los niños con caries y el 6.47% de los niños sin caries. Las segundas muestras de cada niño fueron transportadas al laboratorio, de las que se obtuvieron 516 aislados bacterianos, los cuales fueron amplificados y secuenciados con los mismos iniciadores. De éstos, 12 correspondieron a *S. mutans*, los cuales se sometieron a ensayos RAPD con 4 iniciadores específicos para *S. mutans*. A partir de ambas muestras (aislados y muestras directas), se construyeron dendogramas, en los que se observa una gran diversidad genética de la población de estudio.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La caries

1.1.1. Definición

La caries es una enfermedad infecciosa multifactorial que se caracteriza por la destrucción de los tejidos duros del diente como consecuencia de una desmineralización provocada por los ácidos que generan la placa bacteriana a partir de los hidratos de carbono de la dieta (Barrancos, 2002).

1.1.2. Fisiopatología

En el medio bucal, los dientes están sometidos a procesos constantes y variables de desmineralización y remineralización, que se repiten con la ingesta de alimentos (carbohidratos). Se ha demostrado que existe un intercambio iónico activo y permanente entre el esmalte y el medio bucal, de tal forma que el diente está sano cuando la saliva posee un pH superior a 5.5 y la concentración de calcio y fosfato es mayor que el producto de solubilidad de la hidroxiapatita. Cuando el medio bucal es más ácido o cuando sobre la superficie dentaria se ha depositado una placa microbiana que ha hecho descender el pH por debajo de 5.5, el diente pierde minerales (Fig. 1). Si esta situación persiste, aparece una lesión cariosa incipiente (mancha blanca). Si la misma situación se revierte después de 30-45 minutos, el pH aumenta y el medio bucal se neutraliza, se produce un depósito de minerales que provienen de los fosfatos y otras sales presentes en la saliva sobre la superficie del diente (Monterde et al., 2002).

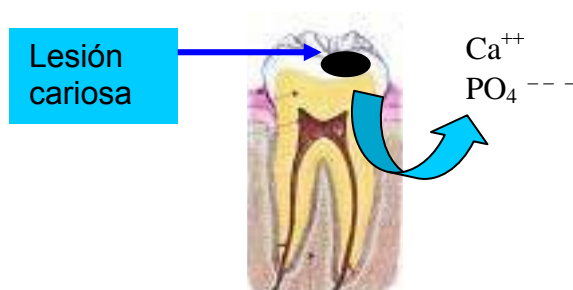


Figura 1 Liberación de Ca y PO_4

1.1.3. Prevalencia

A pesar de que la caries ha ido en descenso desde los años 70' en los países desarrollados (Touger-Decker y van Loveren, 2003), continua siendo un problema significativo de salud pública en muchas partes del mundo (Byun et al., 2004). En México, la encuesta nacional de caries dental (1988-2001) aplicada en niños de 6-12 años, reportan una prevalencia del 27.5 a 82.9% (Rodríguez et al., 2006).

1.1.4. Etiología

Existe una relación dinámica entre los azúcares y la salud dental. La dieta afecta la integridad dental, así como el pH, la composición y la cantidad de la saliva (Touger-Decker y van Loveren, 2003). Los azúcares y los carbohidratos fermentados después de su hidrólisis por la amilasa salival proveen un sustrato para las acciones de la bacteria oral, la cual disminuye el pH de la placa y la saliva (Touger-Decker y van Loveren, 2003; Koneman et al., 1999).

Una dieta rica en calcio puede favorecer la remineralización, que es un proceso natural que tiende a neutralizar las lesiones cariosas incipientes. Se trata de una deposición de minerales, después de una pérdida de los mismos o de un ataque ácido (Monterde et al., 2002). Este proceso debe reforzarse actuando sobre los factores locales del medio bucal, modificándolos para que la precipitación de fosfatos y otras sales se produzca en forma más intensa y el pH se modifique llegando a la neutralidad. En contraste, una dieta rica en azúcar y carbohidratos fermentables favorece el crecimiento de las bacterias acidógenas y acidúricas como el lactobacilo (*Lactobacillus acidophilus* y *L. casei*) (Touger-Decker y van Loveren, 2003; Barrancos et al., 2002).

Los mecanismos de la caries dental son muy complejos y son desencadenados a partir de varios niveles: genéticos, de comportamiento, ambientales y microbianos; por lo que es importante entender el papel de las bacterias como modelo completo de etiología de la caries (Saito et al., 2006).

La disolución de la superficie del esmalte por los ácidos generados por las bacterias, expone la línea avascular de la matriz del tejido conectivo mineralizado de dentina (Fig. 2 y 3) el cual es propenso a la invasión. Esto ocurre por la migración de las bacterias

en la red tubular ocupada por los procesos de los odontoblastos pulpares (Byun et al., 2004; Nadkarni et al., 2004).

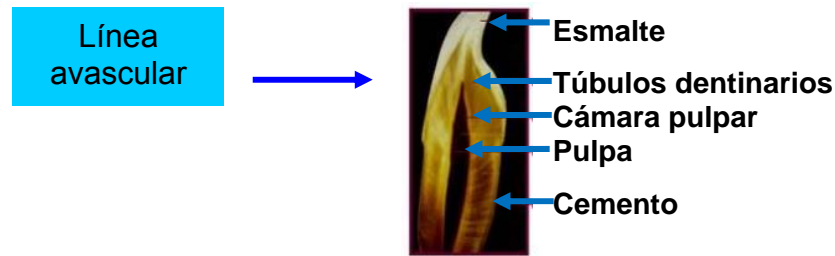


Figura. 2 Estructuras dentales



Figura 3 Dentina

a) Las bacterias como agente etiológico

La cavidad oral constituye un medio ideal para la proliferación de una variedad de más de 700 especies microbianas o filotipos (Aas et al., 2005; Kim-Ly et al., 2005). La mayor parte de ellas se encuentran en el crévice gingival y el dorso de la lengua. También son evidentes en la placa dental, donde interactúan y se comunican intra e inter-específicamente (Kolenbrander et al., 2002; Foster et al., 2003), mantienen una homeostasis entre bacterias patógenas y mutualistas, y constituyen una forma organizada de comunidades de multiespecies que se conoce como biofilm (Kolenbrander et al., 2002; Saito et al., 2006), a la que también se la ha asociado con la iniciación de caries en esmalte (Kim-Ly et al., 2005). Si existen puntos o fisuras en las superficies de los dientes y son inicialmente colonizadas por flora bacteriana no cariogénica, estos microorganismos pueden conferir protección al huésped por ocupar físicamente el espacio del nicho y, por lo tanto, bloquear la colonización de organismos cariogénicos como *S. mutans* (Saito et al., 2006).

Existen cambios secuenciales en las poblaciones bacterianas asociadas con la limpieza dental profesional, con el proceso de erupción de los dientes (González y Cameros, 1999), el desarrollo de caries, los estados de enfermedad periodontal, e incluso, durante los intervalos entre los tratamientos de higiene oral diaria normal (Kolenbrander et al., 2002).

El género *Streptococcus* constituye el 60%-90% de los tipos bacterianos que colonizan al diente en las primeras 4 horas después de una limpieza profesional. Se ha encontrado que *S. mutans* abunda en cerca del 90% de los sujetos con caries activas, aunque también se han encontrado con alta frecuencia distintas especies del género *Lactobacillus* (Corby et al., 2005). Otros colonizadores tempranos incluyen a *Actinomyces* spp., *Capnocytophaga* spp., *Eikenella* spp., *Haemophilus* spp., *Prevotella* spp., *Propionibacterium* spp. y *Veillonella* spp. (Kolenbrander et al., 2002).

Por otro lado, Becker et al., relacionaron la presencia de *S. sanguinis* con la salud oral. En su estudio obtuvo muestras de 4 sitios diferentes de la cavidad bucal de niños entre 2 y 8 años de edad con lesiones cariosas severas en por lo menos 6 dientes. Esta bacteria se adquiere durante la infancia y modula el pH por la producción de amonio; en niveles altos puede retrasar la adquisición del *S. mutans* (Becker et al., 2002).

En las bocas sanas de los adultos sin caries y sin enfermedad periodontal (encías), la microbiota oral es variada, abundante y mixta: con formas esféricas, cilíndricas, espirales, aerobios y anaerobios; móviles e inmóviles; Gram positivos y Gram negativos (González y Cameros, 1999). A pesar de que existe poca información sobre la microbiota en cavidad oral sana, Aas et al. (2005) realizaron en la Universidad de Oslo un análisis molecular detallado para determinar la flora bacteriana normal en diferentes sitios de la cavidad oral de individuos sanos. Las especies más comunes encontradas pertenecen al género *Gemella*, *Granulicatella*, *Streptococcus* y *Veillonella*. No se encontraron especies relacionadas con caries o periodontitis. Es importante destacar que el 60% de las especies encontradas no fueron cultivables y que el número total de muestras fue de 5 (Aas et al., 2005). Corby et al. (2005) encontraron además *S. parasanguinis*, *Abiotrophia defectiva*, *S. mitis/oralis* y *S. cristatus* como bacterias asociadas con la salud oral y menos común en sujetos con caries.

Existe un estudio interesante sobre la microbiota oral del hombre desde su nacimiento hasta la senilidad, en el que se reporta que *Streptococcus salivarius* se haya con cierta

regularidad, hasta en un 80 % de los infantes de un día de nacidos (González y Cameros, 1999). Este microorganismo parece residir primariamente en la lengua, por lo que no necesita dientes para establecerse (González y Cameros, 1999).

Después de la erupción dentaria, poco a poco se van instalando otras especies microbianas como *S. mutans*, espiroquetas y bacteroides (González y Cameros, 1999).

Estudios realizados previamente demuestran que la microflora asociada con caries está dominada inicialmente por bacterias Gram positivas (Corby et al., 2005). Esta etapa es seguida por la invasión de un grupo más diverso que incluye anaerobios Gram negativos (Byun et al., 2004) como *Prevotella* (Nadkarni et al., 2004). El género *Prevotella* fue separado del *Bacteroidiaceae* en 1990 y actualmente comprende diversos organismos que constituyen el grupo más grande e importante médicamente de anaerobios Gram negativos, ya que algunos miembros del género expresan marcada actividad proteolítica y de hemolisinas (Nadkarni et al., 2004).

Streptococcus mutans. En la flora cultivable predominante en dentina cariada se encuentra *S. mutans* (Li et al., 2007; Corby et al., 2005; Saxena et al., 2005; Byun et al., 2004; Ellen et al., 1980; Klein et al., 2004; Granath et al., 1993; Koneman et al., 1999).

La sacarosa facilita la colonización del diente por parte de *S. mutans* y su sobrecrecimiento. En experimentos de ratas con caries, se presentó un re-crecimiento de *S. mutans* después de una supresión por una terapia intensiva con clorhexidina y una dieta rica en sacarosa (Touger-Decker y van Loveren, 2003).

Métodos fenotípicos y genotípicos sugieren que las madres portadoras de cepas de *S. mutans* y/o *S. sobrinus* son la principal fuente primaria de infecciones para niños, y se ha demostrado la conservación de cepas en la pareja madre-hijo por un intervalo de 3 años. Sin embargo, también pueden ser adquiridos por otras fuentes. Los niños alojan uno de los cinco distintos genotipos de *S. mutans* en diferentes edades (3-8 años), indicando persistencia de algunas cepas (Klein et al., 2004).

No todos los individuos colonizados por *S. mutans* manifiestan la enfermedad, debido a que las cepas pueden diferir en la propensión a causar la enfermedad o la virulencia como una función de la adquisición y expresión de islas de patogenicidad u otros elementos genéticos. Algunas cepas de *S. mutans* expresan alteraciones en las propiedades de la vía metabólica por la presencia de una secuencia de inserción "río

arriba” del operón de la hidrolasa de sacarosa. La investigación del locus asociado con cepas identificadas como virulentas puede facilitar el entendimiento de por qué algunos niños tienen la enfermedad y otros no (Saxena et al., 2005).

Otros microorganismos. Además del *S. mutans*, se han cultivado fácilmente *Lactobacillus casei* (Saito et al., 2006; Corby et al., 2005; Byun et al., 2004) y algunas especies de *Actinomices* (Byun et al., 2004), que también fueron encontradas en sujetos libres de caries. En particular, *Actinomices* sp. se ha encontrado frecuentemente en sujetos con caries y libres de ella (Corby et al., 2005), y especies de *Veillonella* en orden descendente en cuanto a la cantidad (Munson et al., 2004; Byun et al., 2004). Becker et al. (2002) encontraron además, en orden decreciente especies de *Bifidobacterium*, *S. salivarius*, *S. constellatus*, *S. parasanguinis*. Byun et al. (2004) reportaron también *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* y *L. fermentum*; éstos sobretodo en caries profundas. También se ha documentado la presencia de *S. sobrinus* (Saxena et al., 2005; Klein et al., 2004; Koneman et al., 1999) la cual se puede encontrar agrupada con *S. mutans*. Incluso, en sujetos con caries activa, se han encontrado abundantes especies de bacterias asociadas a la salud oral (Corby et al., 2005). Becker y col. (2002) aseguran que no existen evidencias de la relación entre *A. gerencseriae* y caries temprana de la infancia, pero se cree que algún hallazgo al respecto puede ayudar a la prevención de iniciación de caries; sin embargo, encontraron que en las manchas dentales se presentan altos niveles de *Actinomyces gerencseriae*, por lo que puede estar involucrada en la iniciación de la formación de la caries. Se ha descrito que este microorganismo deja de habitar la cavidad oral de los niños una vez que los dientes han erupcionado, además de tener una estrecha relación con las especies de *Actinomices* que producen ácido láctico (Becker et al., 2002).

Las especies de *Actinomyces* han sido relacionadas con la formación temprana de la caries en la superficie radicular, aunque *S. mutans* es la especie más frecuentemente encontrada en lesiones más severas (Corby et al., 2005; Becker et al., 2002). *Actinomyces naeslundii* serotipo II (*A. viscosus*) también ha sido asociada con formación de lesión temprana (Becker et al., 2002).

Se cree que especies del género *Bifidobacterium* desempeñan un papel importante (aunque no el principal) en la evolución de la caries, ya que están presentes en la

dentina de las cavidades de las lesiones cariosas en un 50% de los casos (Becker et al., 2002).

Las especies de *Lactobacillus* han sido implicadas como patógenos secundarios en caries profunda, ya que se encuentran solo en la dentina y pulpa expuestas. (Becker, 2002; Corby et al., 2005; Byun et al., 2004).

Se han encontrado especies de *Veillonella* especialmente en caries profunda (Becker et al., 2002). A pesar de que metaboliza el ácido láctico que producen otras especies para formar ácido propiónico y acético (menos agresivos que el láctico) que disuelven en menor proporción el esmalte de los dientes, de tal manera que puede ser un factor importante en la disminución del proceso de caries. También ha sido detectada en lesiones incipientes progresivas. Es importante mencionar que estudios *in vitro* han demostrado que *Veillonella* en conjunto con *S. mutans* producen mayor cantidad de ácido y mayor desmineralización que sólo *S. mutans* (Becker et al., 2002).

Se ha ligado a *S. salivarius*, *S. constellatus* y *S. parasanguinis* con la caries profunda, aunque su papel no es importante (Becker et al., 2002).

Fusobacterium animalis fue la segunda especie más numerosa detectada en lesiones de manchas blancas. Algunas de sus especies producen lactato, por lo que desempeña un papel importante en la iniciación de caries (Becker et al., 2002).

Los microorganismos anaerobios facultativos y estrictos se les asocia básicamente con infecciones endodónticas (dentro del conducto radicular) (Saito et al., 2006).

Se ha observado que las distintas especies bacterianas encontradas en la cavidad oral ocupan preferencialmente distintos sitios de ésta. En muestras tomadas de la boca procedentes del surco gingival, dorso de la lengua, placa dental y saliva, se encontró a *Streptococcus salivarius* principalmente en la lengua, a *S. mutans* y *Streptococcus sanguis* en las superficies dentales y a *Bacteroides melaninogenicus* y espiroquetas en el surco gingival (González y Cameros, 1999).

1.1.5 Métodos de identificación bacteriana

a) Métodos Fenotípicos:

Se puede destacar el uso de sistemas automatizados, que contienen una batería de reactivos deshidratados los cuales, con la adición de inóculos estandarizados del microorganismo a identificar inicia la reacción (crecimiento, producción de actividad

enzimática, etc.). Las pruebas fenotípicas deben realizarse bajo condiciones perfectamente estandarizadas para obtener resultados reproducibles (Vandamme et al., 1996).

Los sistemas comerciales de identificación de microorganismos que se han utilizado comúnmente para detectar bacteria incluye al Sistema BIOLOG, que está basado en pruebas que logran identificar hasta un 90% de las bacterias presentes en diferentes tipos de muestras ambientales y clínicas (Klingler et al., 1992).

El sistema BIOLOG es considerado equipo de punta en sistemas de diagnóstico e identificación de microorganismos patógenos en animales, plantas, humanos, alimentos, ecología, etc. Su utilidad abarca muy diversas áreas relacionadas con servicios de laboratorio en distintas ramas de la salud pública, la agricultura y la industria. La Microestación BIOLOG es un sistema semiautomatizado, conformado por un lector de microplaca compatible, el cual puede leer automáticamente, en unos cuantos segundos los patrones de oxidación y de asimilación desarrollados en la microplaca, ya sea para microorganismos Gram Positivos (GP), Gram Negativos (GN), Anaerobios (AN), Levaduras (YT) u hongos filamentosos (FF), en la que se encuentran 95 diferentes fuentes de: carbohidratos, nitrógeno y azufre, y de esta manera, detectar el microorganismo así como crear una base de datos propia. Las reacciones positivas de las bacterias se ponen de manifiesto por el cambio de color de un indicador (Cloruro de tetrazolio); las reacciones positivas de hongos se ponen de manifiesto por una reacción de turbidez.

El sistema BIOLOG posee una base de datos sobre características fisiológicas de aproximadamente 2000 microorganismos tanto procariotes como eucariotes. En dicha base de datos se encuentran los registros de 500 especies de bacterias Gram negativas, 300 especies de bacterias Gram positivas, 350 especies de bacterias anaeróbicas, 500 especies de hongos filamentosos y 250 especies de levaduras. Dicha base de datos se expande año con año debido al interés de la casa comercial que fabrica y distribuye el BIOLOG por cubrir un intervalo de microorganismos cada vez más amplio.

Un aspecto clave del estudio microbiológico involucra la determinación de características fenotípicas de las células microbianas. El sistema BIOLOG es una tecnología apropiada para tales estudios, denominada Microarreglo de Fenotipos (MFs).

Con esta tecnología de punta se pueden analizar miles de fenotipos de manera simultánea en un formato bastante sencillo, eficiente y adecuadamente estandarizado. La tecnología de MFs ha sido desarrollada para ser utilizada en diversas células microbianas, incluyendo hongos y bacterias. Los MFs del sistema BIOLOG son capaces de analizar el metabolismo del carbono, del nitrógeno, del fósforo y del azufre en una cepa microbiana (Klingler et al., 1992).

Aunque por definición el fenotipo refleja genotipo, los métodos de biotipificación tienen problemas fundamentales que los hacen en ciertas instancias inadecuados para discriminar entre cepas de una misma especie. Los métodos de Odds y Abbot y el de asimilación de carbohidratos pueden ser muy sensibles a las condiciones de crecimiento, de aquí la diferencia entre los reportes de un laboratorio a otro (Odds y Abbot, 1983). Además, algunas especies sufren cambios espontáneos de alta frecuencia entre un limitado tipo de fenotipos generales que afectan una variedad de características fenotípicas incluyendo antigenicidad (Anderson et al., 1990).

Las tecnologías basadas en el DNA han producido avances reales para el cuidado del paciente generando métodos avanzados y de rutina para la identificación y tipificación de cepas. La detección de DNA bacteriano es un método de diagnóstico independiente del cultivo que requiere cierto refinamiento antes de que pueda ser utilizado de manera rutinaria (Odds, 2003). No obstante el uso cada vez más frecuente de técnicas genético- moleculares en diversas áreas de la Microbiología, el BIOLOG representa un complemento imprescindible a dichas técnicas en el área del diagnóstico y taxonomía de microorganismos, debido a que puede describir la diversidad fisiológica (uso de substratos), complementaria de la diversidad genética.

b) Métodos Genético Moleculares (Información Genotípica):

Se han desarrollado métodos moleculares para sobrellevar el problema de cultivo en medio artificial convencional en el laboratorio, ya que el 50% de la microbiota oral no crece en éste (Munson et al., 2004; Kim-Ly et al., 2005; Li et al., 2007). Estos métodos generalmente se refieren a técnicas que permiten subdividir a las especies en distinto número de tipos (Vandamme et al., 1996).

La búsqueda de huellas o marcadores genético moleculares consiste en la detección simultánea de loci altamente variables en el DNA. Las huellas de DNA se pueden

obtener por dos estrategias: las huellas basadas en la hibridación tipo Southern y las huellas basadas en la amplificación de regiones genéticas mediante PCR.

1. Amplificación selectiva de secuencias específicas

Para la aplicación de esta técnica es necesaria la presencia y el conocimiento de una secuencia de DNA específica del microorganismo en estudio y de la obtención de al menos una banda de amplificación que indique la presencia del microorganismo en la muestra analizada.

Este tipo de análisis todavía se utiliza para monitorear la presencia eventual de una bacteria en un campo y permite la tipificación mediante el uso de iniciadores que generan la amplificación selectiva de una secuencia como es el caso del ensayo REP (repetitive extragenic palindromic), o ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) (Singh et al., 2001), que se encuentran repetidas y dispersas en el genoma bacteriano o en el gen codificante RNAt (DNAt-PCR) e ITS (internal transcribed spacer) que consiste en la amplificación del DNAr 16S o de la región intergénica comprendida entre el gen 16S y el 23S de DNAr utilizando iniciadores universales.

En general el evento de PCR comprende la obtención de un producto único de amplificación de una cierta dimensión que por si solo no es suficiente para discriminar cepas de una misma especie. Una identificación más específica de un aislado bacteriano se puede obtener mediante la secuenciación del gen 16S de DNAr amplificado.

Mediante dicha estrategia se ha caracterizado la microflora asociada con abscesos dentoalveolares, periodontitis e infecciones endodónticas (Saito et al., 2006; Corby et al., 2005). Además, se han identificado nuevos filotipos en la microflora relacionada con la caries dental (Munson et al., 2004). Las bandas específicas de interés pueden ser extraídas a partir de los geles de agarosa y los fragmentos del gen 16S de RNAr (Byun et al., 2004; Nadkarni et al., 2004; Saito et al., 2006) pueden ser secuenciados y comparados con secuencias conocidas en una base de datos (Li et al., 2007). El campo de aplicación de esta metodología es amplio y va desde el diagnóstico de enfermedades infectivas a la epidemiología molecular y del control de alimentos, así como el análisis de poblaciones naturales.

2. Amplificación de secuencias anónimas

Diversos estudios han demostrado la existencia de diferentes genotipos de *S. mutans* en la cavidad oral (Gilmour et al., 1987). Además, varios marcadores basados en el método de PCR se han utilizado para identificarlos (Grönroos y Alaluusua, 2000; Igarashi et al., 2001; Li et al., 2001). Entre ellos, se incluyen metodologías que permiten la amplificación de uno o varios fragmentos de DNA anónimos, sin que sea necesario un previo conocimiento de las secuencias involucradas. Estas metodologías difieren entre sí sólo por alguna característica operativa, pero todas tienen la base común de la posibilidad de amplificar una secuencia anónima de DNA, utilizando un solo oligonucleótido como iniciador para la Taq polimerasa. Algunos ejemplos de amplificación de secuencias anónimas son: RAPD (random amplified polymorphic DNA), AP-PCR (arbitrarily primed-PCR), DAF (DNA amplification fingerprinting), AFLP (amplified fragment length polymorphism). De estos métodos, los marcadores RAPD han sido ampliamente usados en el estudio de los polimorfismos genéticos y en la distribución de poblaciones de *S. mutans* (Gonçalves et al., 2002; Kamiya, 2003; Klein et al., 2004; Napimoga et al., 2004).

3. Preguntas que requieren del DNA fingerprinting (huellas moleculares)

Para comprender la dinámica de un organismo complejo en una población humana, para descifrar la relación compleja entre comensalismo e infección, para identificar el origen de una infección, o para monitorear la emergencia de cepas resistentes a antibióticos se debe tener un método para determinar la relación genética. La tipificación de especies es un paso necesario en todos los estudios epidemiológicos, pero se debe tener una forma para determinar la relación entre aislados de una especie si se quiere entender muchas de las preguntas epidemiológicas que se plantean.

Un aislado es una clona colectada independientemente de otros aislados. Dos aislados colectados independientemente pueden no estar relacionados o bien ser genéticamente indistinguibles. En contraste, una cepa se refiere a una colección de aislados de la misma especie que están altamente relacionados o que son genéticamente indistinguibles. Para clasificar a dos aislados como pertenecientes a una misma cepa o como miembros de cepas diferentes, uno debe tener un método adecuado que pueda

realizar estas funciones. Para el caso de las bacterias, las diferencias en fenotipo reflejan diferencias genéticas entre especies.

La gran sensibilidad y la alta especificidad de las diversas herramientas de que dispone la biología molecular permiten la identificación o “tipificación” de especies mediante la generación de una “huella molecular”, así como la evaluación de la diversidad genética intra-específica de poblaciones de bacterias.

2. JUSTIFICACIÓN

Es indudable que durante la infancia se adquieren hábitos, tanto higiénicos como dietéticos, que perduran a lo largo de la vida del individuo. No obstante, la poca importancia que se proporciona a la dentición primaria por su corta estancia dentro de la cavidad oral, la falta de divulgación, la escasa educación sanitaria de la población (especialmente la rural) y la propia resistencia pública a la adquisición de herramientas para evitar el asentamiento de la caries, hacen que la misma ocupe el primer lugar de morbilidad en países en desarrollo (Fernández et al., 2006).

Existe escasa bibliografía con respecto a los microorganismos existentes tanto en la dentición primaria como en la dentición mixta de niños con presencia y ausencia de caries, y si ésta tiene alguna relación con la edad, procedencia y hábitos de las personas. En México, existen reportes en algunos estados, como en Zacatecas (Aguilera et al., 2002), San Luis Potosí (Loyola-Rodríguez et al., 2008) y Distrito Federal (Del Río, 1991). Sin embargo, en el Estado de Michoacán, esta información es inexistente, sobre todo utilizando métodos de genética molecular.

3. HIPÓTESIS

La flora bacteriana oral de niños con caries está formada principalmente por *S. mutans*.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Detectar *S. mutans* en la cavidad oral de una muestra de la población infantil en la ciudad de Morelia, Michoacán.

4.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conocer los hábitos dietético-higiénicos de la población de estudio.
- Detectar *S. mutans* en la cavidad oral de niños (as) con dentición primaria.
- Detectar *S. mutans* en la cavidad oral de niños (as) con dentición mixta.
- Determinar la Diversidad Genética de *S. mutans* en la población de estudio.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Selección de la muestra

El muestreo incluye a niños provenientes de: alumnos de la Escuela Primaria del sector privado “Instituto Gestalt” (mayo-diciembre 2008), pacientes que acudieron a consulta dental en el Diplomado de Odontopediatría de la Facultad de Odontología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo durante febrero-marzo del 2008, y niños que asistieron al parque de diversiones “Bosque Cuauhtémoc” en agosto del 2008, en la ciudad de Morelia, Michoacán. A los padres de la población en estudio se les pidió contestar una encuesta para conocer sus hábitos dietético-higiénicos, y los padres o tutores que aceptaron, otorgaron su consentimiento por escrito a través de la carta de consentimiento informado que les fue entregada antes de la toma de las muestras (Anexo 1).

Grupo sin caries:

Criterios de inclusión:

- Niños (as) entre 1 y 12 años.
- Niños (as) sin caries.
- Niños (as) sin restauraciones.

Criterios de exclusión:

- Niños (as) menores de 1 año o mayores de 12 años.
- Niños (as) con caries.
- Niños (as) con restauraciones.

Grupo con caries:

Criterios de inclusión:

- Niños (as) entre 1 y 12 años.
- Niños (as) con caries severas en por lo menos seis dientes.

Criterios de exclusión:

- Niños (as) menores de 1 año o mayores de 12 años.
- Niños (as) sin caries.

5.2. Medios de cultivo

5.2.1. Agar francés o stab agar

Se prepara agregando a un litro de agua desionizada, 10 g de caldo nutritivo (BD Bioxon^{MR}), 10 mg de cisteína (SIGMA[®]), 5g de NaCl (J.T. Baker[®]), 10 mg de timina (SIGMA[®]) y 6g de agar bacteriológico (BD Bioxon^{MR}). Posteriormente se esteriliza a 121°C/15lb /pulg² durante 15 min y se vacía en viales de 2 mL.

5.2.2 Medio Luria-Bertani (LB)

Se prepara agregando a 1 L de agua desionizada, 10g de Triptona (SIGMA[®]), 5g de Extracto de levadura (BD Bioxon^{MR}) y 10g de NaCl (J.T. Baker[®]). Se ajusta el pH a 7.0 con NaOH 5M (~0.2mL). Si el medio se prefiere sólido se le agrega 2% de agar bacteriológico (BD Bioxon^{MR}) y se esteriliza a 121°C/15lb/pulg², durante 15 min.

5.2.3 Agar Nutritivo

Se prepara agregando a 1 L de agua desionizada, 23 g de Agar nutritivo (BD Bioxon^{MR}). Posteriormente, se esteriliza a 121° c/15 lb/pulg² durante 15 min y se vacía en cajas de Petri estériles.

5.2.4 Agar Sangre

Se prepara agregando a 1 L de agua desionizada, 40 g de Agar Soya Tripticaseína (BD Bioxon^{MR}). Posteriormente, se esteriliza a 121° c/15 lb/pulg² durante 15 min y se deja enfriar a temperatura ambiente. Una vez atemperado, se adiciona 5% de sangre de carnero (50 mL) e inmediatamente se vacía en cajas de Petri estériles.

5.3 Toma de muestras

La toma de muestra se realiza a cada niño (a), tanto del grupo con caries como del grupo sin caries, al menos una hora después de la última comida. Las muestras se toman con un hisopo estéril, en: a) saliva del área sublingual, b) dorso de la lengua, c) surco gingival maxilar y mandibular y d) placa dental, tanto de dientes anteriores como posteriores. Se lleva a cabo realizando un barrido durante 10 segundos en cada zona. A cada niño se le toman dos muestras a partir de los diferentes sitios de la boca. Un

juego de muestras se coloca en un medio de transporte Stuart y BBL™ Culture Swab, para ser llevadas al laboratorio donde se procesan. El otro juego de muestras (directas) se introduce directamente en regulador de lisis para proceder a la extracción de DNA.

5.4 Obtención de aislados bacterianos

Las muestras colectadas en medio Stuart se siembran por estría masiva en agar nutritivo y se incuban a 37° C durante 12 h o hasta la aparición de colonias. Cada una de estas cepas se conserva inoculando cada una de las colonias por picadura en agar francés e incubando a 37° C durante 24 horas. Una vez que se desarrolla el crecimiento en la línea de picadura, los viales se guardan a temperatura ambiente.

5.5. Técnicas de análisis genético molecular

5.5.1 Extracción de DNA bacteriano

a) Aislados bacterianos: Las colonias bacterianas crecidas y cosechadas, con ayuda de una espátula esterilizada se colocan en 400 µL de regulador de lisis (Tris-HCl 100mM pH 8.0, SDS 2 %, NaCl 100 mM, EDTA 50 mM) en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, agitando vigorosamente durante 10 min. Después, se agregan 400 µL de cloroformo y se agita en el vórtex durante 5 min. Se centrifugan durante 10 min a 10,000 rpm y el sobrenadante (fase acuosa) se transfiere a otro tubo. El DNA es precipitado con 1 volumen de isopropanol frío, incubando 10 min a -20 °C y centrifugando durante 10 min a 10,000 rpm. El sobrenadante es desechado y la pastilla se lava con 250 µL de etanol al 70 % y se deja secar a temperatura ambiente para finalmente resuspender en un volumen mínimo de agua, aproximadamente 20 µL. La integridad del DNA obtenido se visualiza desarrollando una electroforesis en gel de agarosa al 1% de acuerdo a métodos convencionales (Sambrook et al., 2001). El DNA aislado se guarda a una temperatura de -20° C hasta su utilización.

b) Suspensión directa de la muestra con hisopo estéril: Las muestras se resuspenden en un buffer TE (Tris-HCl 100mM pH 8.0, NaCl 100 mM, EDTA 50 mM) y se hierven durante 10 min, se centrifugan durante 5 min a 3000 rpm y se hacen diluciones del sobrenadante para su posterior identificación por PCR (Klein et al., 2004).

5.5.2 Visualización de DNA en geles de agarosa

La calidad del ADN obtenido se visualizó por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio de acuerdo a métodos convencionales (Sambrook et al., 2001)

5.5.3 Amplificación de regiones específicas

Se utilizan los iniciadores que se muestran en la Tabla 1. La composición de la mezcla de incubación para la PCR es: 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 1.0 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada deoxinucleósido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.5 de cada iniciador, 0.5 U de Taq polimerasa y 25 ng de DNA en un volumen total de 25 µL. La amplificación por PCR se realiza en un termociclador GeneAmp® PCR System 2700 de Applied Biosystems bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94° C por 5 min, seguido por 35 ciclos: para los iniciadores (tabla1) ECA 75F/ECA 619R (universales) 45 seg a 94° C, 45 seg a 56° C y 45 seg a 72° C. Para los iniciadores (tabla 1) SD1/SD2 (*S. mutans*) 45 seg a 94° C, 45 seg a 55° C y 45 seg a 72° C. Después de completados los 35 ciclos para ambos iniciadores, se lleva a cabo una extensión final a 72° C por 7 min. Los productos obtenidos se visualizan en geles de agarosa al 1% empleando técnicas convencionales (Sambrook et al., 2001).

Tabla 1. Iniciadores utilizados en la amplificación de regiones específicas

Especificidad	Gen	Clave	Secuencia 5→3	Tamaño del fragmento	Referencia
<i>Eubacteria</i>	16S	ECA 75F	GGAAGAAGCTTGCTTCTTTGCTGAC	544	Sabat et al., 2000
		ECR619R	AGCCCGGGGATTTACATCTGACTTA		
<i>S. mutans</i>	dexA	SD1	TAT GCT GCT ATT GGA GGT TC	1272	Igarashi et al., 2001
		SD2	AAG GTT GAG CAA TTG AAT CG		

5.5.4 Secuenciación

a) Genclean

El producto de PCR amplificado con iniciadores específicos para *S. mutans* es extraído y limpiado a partir del gel de agarosa al 1 % de la siguiente manera: se lleva a cabo con el kit QIAEX® II de acuerdo a las instrucciones del proveedor, las cuales se describirán brevemente. Del gel de agarosa se extrae la banda deseada con una navaja

esterilizada para ser colocado en un microtubo de 1.5 mL donde se agregan 400 μ L de regulador QX1 y 15 μ L QIAEX II, se incuba a 50° C por 10 min agitando en vórtex cada 2 min. Una vez transcurrido el tiempo se centrifuga por 30s a 12,000 rpm, posteriormente se elimina cuidadosamente el sobrenadante para dar paso al lavado con el buffer QX1 agregando 500 μ L para resuspenderlo hasta obtener una mezcla homogénea. Se repite la centrifugación por 30s y, una vez que se desecha el sobrenadante se lava un par de veces con 500 μ L de buffer PE repitiendo el paso anterior. Ya sin sobrenadante, se deja secar la pastilla a temperatura ambiente alrededor de 20 min, para finalizar con la resuspensión de la misma con 20 μ L H₂O destilada estéril. El producto purificado obtenido se utiliza en la reacción de PCR de secuenciación.

b) Secuenciación de los productos de amplificación obtenidos

- PCR de secuenciación:

Para la PCR de secuenciación se utiliza el Kit BigDye® Terminator V3.1 (Applied Biosystems Inc, USA) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Brevemente, en un tubo de PCR de 50 μ L se mezclaron gentilmente los siguientes componentes: 6.0 μ L de la mezcla de reacción Terminator Reaction PreMix (2.5X), 5.0 μ L (20 ng) de DNA templado, 1.0 μ L (4.0 pmol) de primer y 3.0 μ L de agua desionizada para llevar la reacción a un volumen final de 15 μ L. Después de mezclar, se centrifuga 30 s y se realiza la reacción de PCR de secuenciación bajo los siguientes parámetros: un ciclo inicial de desnaturalización a 96° C por 40 s, 35 ciclos de amplificación a 96° C por 15 s, 50° C durante 20 s y 60° C por 2.20 min. La reacción de secuenciación se lleva a cabo en un RapidCycler (Idaho Technologies, Inc.)

- Purificación del producto de PCR de secuenciación:

Esta técnica se implementa transfiriendo el producto de GENCLEAN a un microtubo y agregando 2 μ L de EDTA (125 mM), 2 μ L de acetato de sodio (3 M, pH 4.8), 50 μ L de etanol (100 %). Se mezcla suavemente (vórtex) y se incuba 30 min a -20° C, una vez transcurrido el tiempo se centrifuga por 30 min a 13,000 rpm, se descarta el sobrenadante y se adiciona 250 μ L de etanol al 70 % mezclando suavemente; se

centrifuga por 15 min a 13,000 rpm, se descarta el sobrenadante y se lleva al condensador (LABCONCO, Kansas City, USA) por 7 min a 35° C. Una vez terminado el tiempo se resuspende en 15 µL de HD (formamida). La secuencia del producto obtenido se genera en un secuenciador ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

- Análisis de secuencias:

Las secuencias obtenidas son comparadas mediante el algoritmo BLAST con las secuencias depositadas en el GenBank.

5.5.5 Elaboración de dendogramas a partir de las secuencias obtenidas

Para generar un dendograma con las secuencias obtenidas primero se realizó un análisis de homología por comparación con las secuencias similares depositadas en el GenBank. Se utilizó el software de comparación entre secuencias BLAST (Altschul *et al.*, 1997) disponible en el sitio de Internet del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, USA). Se seleccionaron las secuencias que presentaron la mayor identidad con cada una de las secuencias obtenidas en el presente trabajo y se realizó un alineamiento múltiple empleando el algoritmo ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) editando las secuencias para la optimización del alineamiento mediante el programa BioEdit (Hall, 1999). A partir del alineamiento múltiple generado se construyeron los dendogramas empleando el paquete MEGA 4.0 (Kumar *et al.*, 2004) calculando las distancias genéticas con el algoritmo de Jukes-Cantor y generando los patrones de agrupamiento mediante el criterio Neighbor-Joining.

5.5.6 Ensayos RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

En un tubo de microcentrífuga de 0.2mL (*MicroAmp Reaction Tubes*, USA) se prepara una mezcla para ensayo RAPD de 25 µl totales con la siguiente composición: 5 µl de DNA (aproximadamente 25 ng), 10 mM Tris-HCl pH 8.5, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM de cada nucleótido (A, G, T, C), 0.7 µM de iniciador (tabla 2) y 0.5U de *Taq* DNA polimerasa recombinante (*Gibco-BRL*®, *Life Technologies*, USA). Después de mezclar perfectamente, los tubos se centrifugan a 12,000 rpm durante 20 segundos, desarrollando el siguiente programa de amplificación en un termociclador GeneAmp® PCR System 2700 de Applied Biosystems: 5 minutos a 94 °C, seguido por 40 ciclos 1

minuto a 94 °C, 1 minuto a 36 °C y 2 minutos a 72 °C. Completados los 40 ciclos se realiza una extensión final a 72 °C por 7 minutos. Los productos de amplificación obtenidos se visualizan en un gel de agarosa al 1.5% como se describió con anterioridad.

Tabla 2. Iniciadores utilizados en los ensayos RAPD

Especificidad	Iniciador	Secuencia 5→3	Referencia
<i>S.mutans</i>	OPA 02	TGC CGA GCT G	Li et al., 1998
<i>S. mutans</i>	OPA 13	CAG CAC CCA C	Saarela et al., 1996
<i>S. mutans</i>	OPA 18	AGG TGA CCG T	Truong et al., 2000
<i>S. mutans</i>	OPA 3	AGT CAG CCA C	Ménard et al., 1992

5.5.7 Elaboración de dendogramas a partir de los ensayos RAPD

A partir del patrón de amplificación obtenido en los ensayos RAPD para cada uno de los aislados de estudio se generó una matriz dicotómica asignando un valor de 1 cuando una banda estaba presente y de 0 cuando no había banda de amplificación de un tamaño determinado. Con la matriz dicotómica generada se generó un dendograma utilizando el software FreeTree (Hampl *et al.*, 2001), calculando las distancias genéticas mediante el algoritmo de Nei y Li y construyendo el patrón de agrupamiento mediante el criterio de Neighbor-Joining. El análisis bootstrap se realizó mediante el mismo software utilizando 1000 réplicas. El dendograma generado se visualizó y editó empleando el software TreeView (Page, 1996).

5.6 Identificación de especies bacterianas mediante el sistema BIOLOG

5.6.1 Fluido de Inoculación

El sistema BIOLOG utiliza el fluido GN Inoculating Fluid, el cual es proporcionado por BIOLOG (Hayward, CA 94545) y que contiene Cloruro de sodio (NaCl): 0.40%; Pluronic F-68 (Sigma #P7061): 0.03% y Gellan Gum (Phytigel™, Sigma #P8169), 0.02%. Este fluido se prepara agregando Gellan Gum (Phytigel), (0.2 g) a un litro de agua, se hierve agitando constantemente, hasta que el Gellan Gum esté completamente disuelto y se retira del calor continuando con la agitación; se agregan 4 g de NaCl, y se continúa agitando; se agrega 0.3 g de ácido plurónico. Se deja atemperar a 45 °C y se distribuye

el volumen apropiado (16mL) en tubos de 20 x 150 con tapa de rosca. Se esteriliza con calor húmedo a 121°C/15lb/pulg² de presión durante 15 min.

5.6.2 Obtención del preinóculo

Se siembra la cepa de interés en medio LBA, estriando por cuadrantes para obtener colonias aisladas; se incuba 24 h a 37 °C. Posteriormente se resiembra en el medio de crecimiento universal de Biolog, BUG™ Agar (Biolog, Inc.), se estría nuevamente por cuadrantes y se incuba durante 24 h a 37 °C.

5.6.3 Preparación de la suspensión

Se prepara un inóculo líquido, usando el fluido de inoculación (FI) designado por el fabricante como GN/GP-IF. A dicho fluido se le agregaron 3 gotas de tioglicolato de sodio concentrado (7.6%) quedando a una concentración final de 5mM: ésto sirve como agente anticapsulante lo que permite el desarrollo de patrones más consistentes. El inóculo líquido se ajusta a una densidad de 61% de transmitancia (T) como se indica a continuación: el turbidímetro que viene con el sistema BIOLOG se calibra a 0% T con un estándar de turbidez designado como GN-ENT & AN, posteriormente se humedeció un hisopo estéril en el FI y se levantaron las colonias bacterianas del agar mediante un desplazamiento por rotación, cuidando de no arrastrar agar; el hisopo se sumergió en el FI para resuspender las colonias. Se tapó el tubo y se invirtió cuidadosamente para homogenizar el inóculo y no producir burbujas. Este procedimiento se repite hasta tener una densidad de 61% T ($\pm 2\%$).

5.6.4 Inoculación e incubación de las microplacas BIOLOG

El inóculo preparado se vierte en un reservorio de pipeta multicanal estéril y se toma, por medio de una pipeta de ocho canales, colocando 150 μ L en cada uno de los 96 pozos de una microplaca Biolog, tanto para bacterias aeróbicas Gram negativas como Gram positivas, designadas como GN2 (Anexo 3) o GP2 (Anexo 4)) respectivamente. Se incuba a 37 °C, realizando un análisis con el lector y el software del aparato entre las 4 y 6 h posteriores a la incubación y una última lectura entre las 16 y 24 h posteriores a la incubación, de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

6. RESULTADOS

6.1 Aplicación de encuestas

Con la finalidad de conocer tanto los hábitos dietéticos como higiénicos de la población en estudio, se aplicaron 346 encuestas (Anexo 2) a los padres o tutores de los niños y niñas que participaron en el estudio, en el que se incluyeron las variables de la tabla 3. El 38.7% de los niños presentó caries en el momento de la aplicación de la encuesta, el 60.4% de las madres trabajan fuera del hogar; el 39.3% de ellas manifestó haber tenido de 1 a 2 caries en los últimos 5 años. A pesar de que el 69.3% de los niños se cepillan los dientes de 2 a 3 veces al día, el 53.1% consumen golosinas varias veces a la semana. Por otro lado, se cuestionó a los padres sobre la percepción que tenían respecto a la satisfacción de vida de sus hijos, de los cuales el 54% los catalogaron como niños muy felices (Tabla 3).

Tabla 3. Hábitos Dietético-Higiénicos de la población de estudio

Variables	% del total (346)
Caries Dental	38.7 %
Ocupación de la madre fuera del hogar	60.4 %
1-2 Caries de la madre (5 años antes)	39.3 %
Higiene oral del hij@ (2-3 veces/día)	69.3 %
Consumo dulces (niñ@) varias veces/semana	53.1 %
Satisfacción de vida (Muy Feliz)	54 %

6.2 Muestras procesadas en el laboratorio

La metodología que se llevó a cabo en el laboratorio con las muestras obtenidas fue efectuada como se describe a continuación en la figura 4.

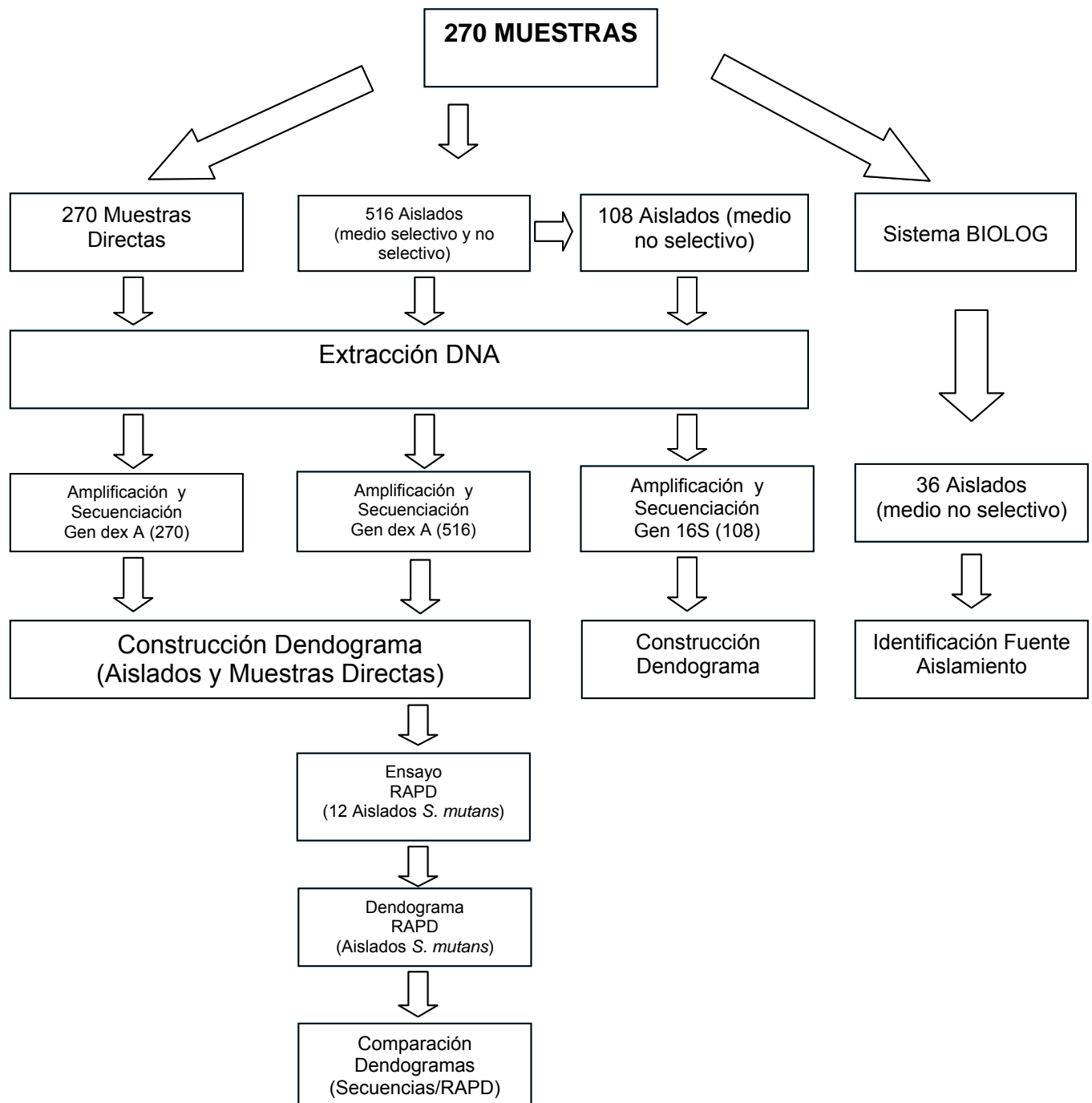


Figura 4. Esquema del procedimiento de las muestras en el laboratorio.

Las 270 muestras obtenidas de la población de estudio, fueron sometidas a cuatro diferentes procedimientos. A las muestras directas (sin cultivar), se les extrajo DNA y se llevó a cabo la amplificación y secuenciación del gen dexA con iniciadores específicos para *S. mutans*.

Por otro lado, de las 270 muestras, se obtuvieron 516 aislados, a partir, tanto de medio selectivo como no selectivo, a los cuales se les extrajo DNA y se realizó amplificación y secuenciación del mismo gen (dexA). Una vez que se obtuvieron las secuencias de las muestras amplificadas, se construyó un dendograma en el que se incluyeron ambas, tanto muestras directas como aislados de *S. mutans*.

Adicional a ello, los aislados positivos de *S. mutans* (12) fueron sometidos a ensayos RAPD con 4 diferentes iniciadores, cuyos patrones de bandeo fueron utilizados para la construcción de un dendograma (solo de aislados de *S. mutans*).

A la par, se construyó otro dendograma, en el que incluyeron las secuencias de los aislados de *S. mutans* para llevar a cabo la comparación de los mismos (dendograma de secuencias y dendograma de ensayos RAPD de los aislados de *S. mutans*).

De los 516 aislados, 108 fueron obtenidos en medio no selectivo, a los cuales, después de la extracción de DNA, se realizó amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA con iniciadores universales para eubacterias y se llevó a cabo la construcción del respectivo dendograma.

Finalmente, 36 de los aislados (del grupo con caries) cultivados en medio no selectivo, fueron identificados a partir del Sistema BIOLOG y se ubicó la fuente común de aislamiento de los mismos.

Del total de muestras obtenidas a partir de las poblaciones de estudio (270), fueron divididas en un grupo con caries (129) y uno sin caries (141). Con el fin de identificar el número de muestras a partir de las diferentes edades que se incluyeron en el estudio, se realizó la figura 5, en la que se puede observar que el mayor número de muestras se obtuvo entre los 4 y los 8 años de edad.

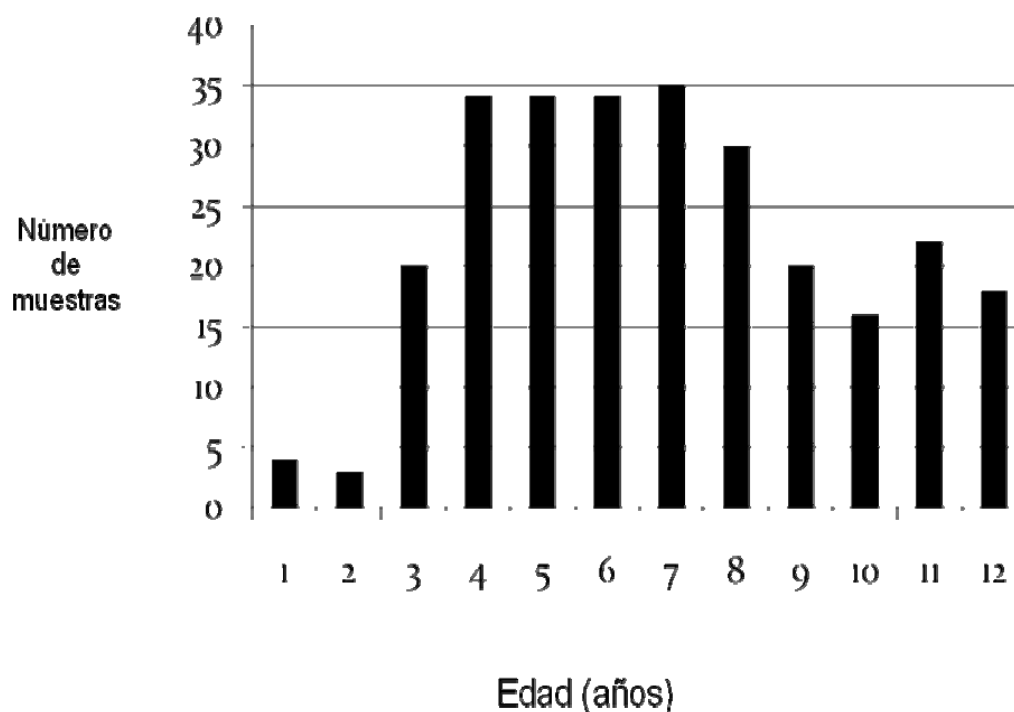


Figura 5. Número de muestras obtenidas de las diferentes edades de la población de estudio.

Se observó un número mayor de aislados en el grupo de 7-12 años (175 sin caries y 198 con caries) con respecto del grupo de 1-6 años (67 sin caries y 76 con caries) (tabla 4).

Tabla 4. Número de aislados en los diferentes grupos de edad de la población de estudio.

Grupo de Edad	Número de Aislados
1-6 sin caries	67
1-6 con caries	76
7-12 sin caries	175
7-12 con caries	198

6.3 Tinción de Gram

Con el propósito de realizar una primera aproximación a la identificación bacteriana de los 516 aislados obtenidos del total de la población de estudio (270 muestras) a partir de diferentes zonas de la ciudad de Morelia, Mich., se les practicó tinción de Gram (Koneman et al., 2003), obteniéndose 27 Gram negativos y 489 Gram positivos.

6.4 Detección de *S. mutans*

La calidad y cantidad del DNA obtenido de aislados y muestras directas fue suficiente y de alto peso molecular para llevar a cabo el análisis de PCR (Fig 6)

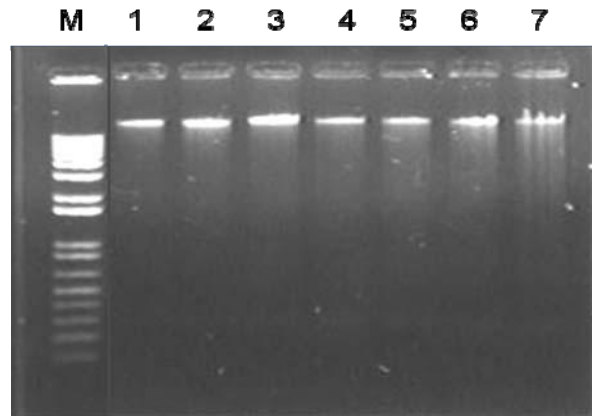


Figura 6. Calidad y cantidad del DNA obtenido de aislados y muestras directas, visualizados en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y fotografiado con luz UV.

6.4.1 Detección de *S. mutans* en muestras directas

Para determinar la presencia de *S. mutans* en las muestras directas, una vez extraído el DNA de las mismas, se amplificó el gen dexA utilizando los iniciadores SD1-SD2, específicos para *S. mutans* (Tabla 5). Se obtuvieron tanto amplificaciones positivas (fragmento de 1272 pb) como negativas en muestras de todos los intervalos de edad, (Fig. 7)

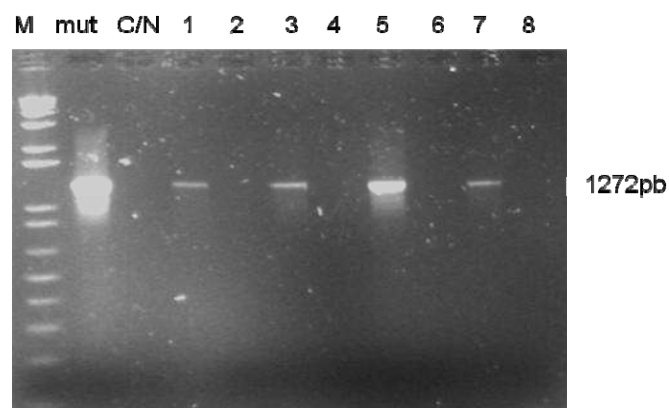


Figura 7. Amplificación con iniciadores específicos para *S. mutans* con DNA de muestras directas. Las bandas fueron visualizadas en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y fotografiado con luz UV. Carriles: 1. marcador de peso molecular 1kb Leader Plus; 2. *S. mut* ATCC; 3. Control Negativo (agua); 4. y 5.: grupo 1-6 caries; 6. y 7.: grupo 1-6 s/caries; 8. y 9.: grupo 7-12 caries; 10. y 11: grupo 7-12 s/caries.

En la tabla 5 se observa que 26 muestras directas dieron amplificación positiva para *S. mutans* y se distribuyó como sigue: del grupo de 1-6 años sin caries, 5 casos; del grupo de 1-6 años con caries, 14 casos; del grupo de 7-12 años sin caries, 2 casos; del grupo de 7-12 años con caries, 5 casos. El grupo en el que se obtuvo un mayor número de amplificaciones fue en el de 1-6 años con caries (14 casos). En el grupo sin caries de ambos intervalos de edad hubo 7 casos que dieron amplificación positiva a *S. mutans*.

Tabla 5. Muestras directas positivas a *S. mutans*.

Intervalos de edad	Instituto Gestalt	Diplomado Odontopediatría	Bosque Cuauhtémoc	Totales	%
1-6 sin caries	3		2	5	1.85
1-6 con caries	10	2	2	14	5.18
7-12 sin caries	1		1	2	0.74
7-12 con caries	4		1	5	1.85
Totales	18	2	6	26	9.72

6.4.2 Detección de *S. mutans* en aislados bacterianos

Para detectar si alguno de los aislados obtenidos de los muestreos, tanto de medio selectivo como no selectivo, se trataba de *S. mutans*, se llevó a cabo la amplificación con los iniciadores específicos y se encontró que de los 516 aislados obtenidos a partir del medio selectivo, 12 pertenecieron a *S. mutans*,

De los aislados de *S. mutans*, 6 formaron parte del grupo de 1-6 años sin caries y 6 del grupo de 1-6 años con caries (tabla 6).

Tabla 6. Aislados positivos a *S. mutans* con respecto al grupo de edad.

Grupo de edad	Amplificaciones positivas
1-6 sin caries	6
1-6 con caries	6
Totales	12

6.5 Diversidad genética de *S. mutans*

6.5.1 Secuenciación del gen *dexA*

Con el propósito de analizar la diversidad genética de *S. mutans*, detectada tanto en las muestras directas como en los aislados que dieron amplificación positiva a dicha bacteria con los iniciadores SD, se llevó a cabo la secuenciación de los fragmentos obtenidos y se construyó el patrón de agrupamiento (figura 8) como se indicó en Materiales y Métodos (Elaboración de dendogramas a partir de las secuencias).

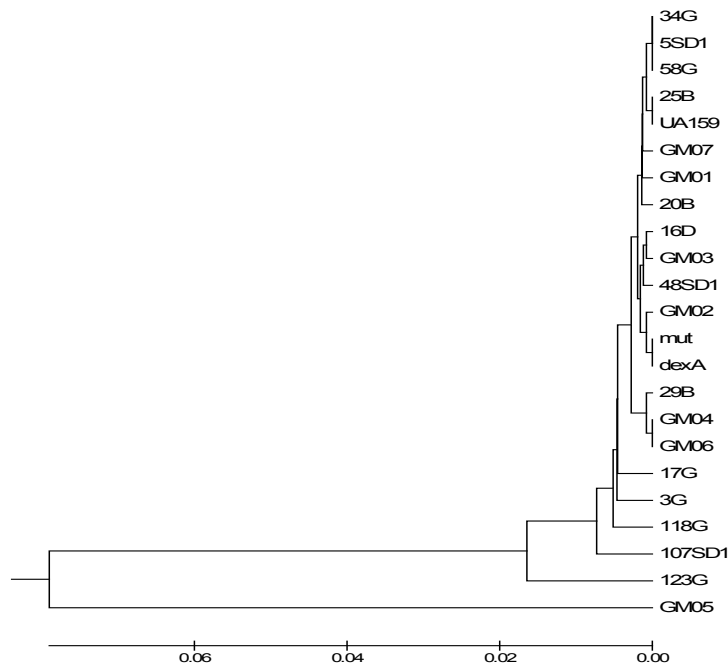


Figura 8. Dendrograma de muestras positivas a *S. mutans*. mut: *S. mutans* ATCC; *dexA*: gen de dextrinasa de *S. mutans*; UA159: genoma completo de *S. mutans*; SD1, G, B, D: muestras directas; GM: aislados.

En el patrón de agrupamiento, se observa una gran homología a partir de la mayoría de las secuencias analizadas. Sin embargo, algunas de ellas se separan, como es el caso de la 107SD1, 123G y de manera particular, el aislado GM05, que es totalmente distante del resto.

6.5.2 Análisis de los polimorfismos de DNA amplificado al azar (RAPD)

Para corroborar la presencia de polimorfismos genéticos entre los aislados de *S. mutans*, se realizaron ensayos RAPD utilizando los iniciadores OPA 13 (Saarela et al., 1996), OPA 3 (Ménard et al., 1992), OPA 18 (Truong et al., 2000) y OPA 02 (Li, et al.

1998), reportados anteriormente para *S. mutans*, obteniéndose los patrones de bandas que se muestran en las figuras correspondientes (9A a 9D).

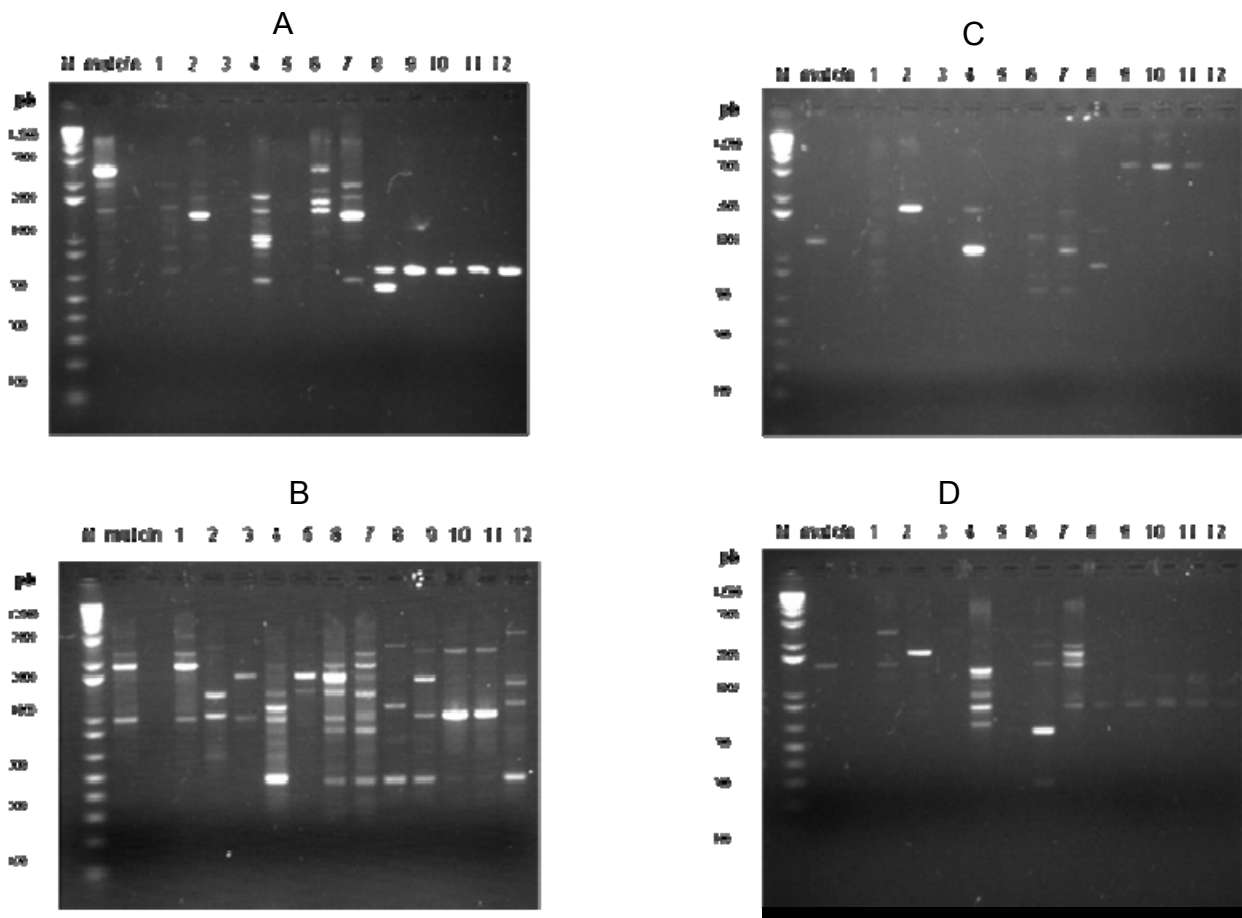


Figura 9. Patrones de amplificación en los ensayos RAPD. Las bandas fueron visualizadas en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio y fotografiado con luz UV, que muestra los patrones de amplificación obtenidos con el ADN de los aislados de *S. mutans*, utilizando los iniciadores: **A:** OPA 13, **B:** OPA18, **C:** OPA 3, **D:** OPA 02.

El patrón de bandeo con el iniciador OPA 13 (A), permite formar un grupo de aislados que comparten bandas. Para el iniciador OPA 18 (B), se obtuvo un patrón de bandas relativamente complejo en donde algunos aislados (10 y 11) comparten bandas del mismo peso. Para el caso del iniciador OPA 3 (C), hubo aislados que presentaron de 1 hasta 5 bandas; algunas de ellas comunes entre varios aislados, como el 9, 10 y 11. Finalmente, con el iniciador OPA 02 (D) se obtuvieron un mínimo de 1 y un máximo de 9 bandas por aislado, con pesos que van desde 3121 hasta 289 pb. Se calcularon los tamaños de las bandas obtenidas con los cuatro iniciadores y se elaboraron las matrices que se muestran en los anexos 5 a 8.

Elaboración y construcción de dendogramas RAPD

El dendograma de la figura 10 se construyó según se mencionó en Materiales y Métodos con los datos de las matrices de los anexos (4, 5, 6 y 7), en donde se puede observar que genotípicamente se pueden formar 3 grandes grupos; el primero con el aislado GM05, que está totalmente separado del resto de los aislados; un segundo grupo con los aislados GM03, GM04, GM06, GM07, GM02, GM01 y la cepa Smut ATCC; y un tercer grupo con los aislados GM12, GM08, GM09, GM10 Y GM11. Por otro lado, en el caso de una de las muestras a partir del grupo de 1-6 años sin caries se obtuvieron tres aislados los cuales dieron amplificación positiva para *S. mutans*. Estos corresponden a los aislados GM04, GM05 y GM06. Los valores de bootstrap indican que hay una gran similitud entre los aislados GM04 Y GM06.

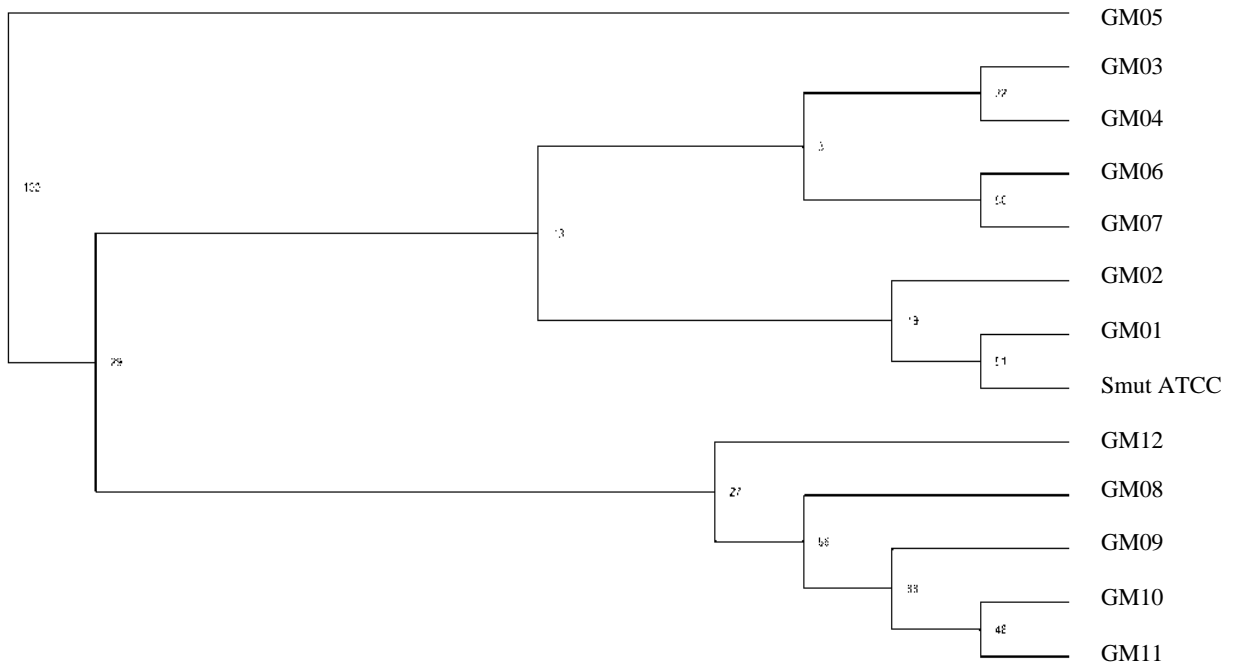


Figura 10. Dendograma de aislados de *S. mutans*.

Con el fin de verificar la congruencia de los dendogramas, se construyeron nuevamente, incluyendo solo los aislados con las secuencias más largas del gen *dexA*, para ambos patrones de agrupamiento (figura 11).

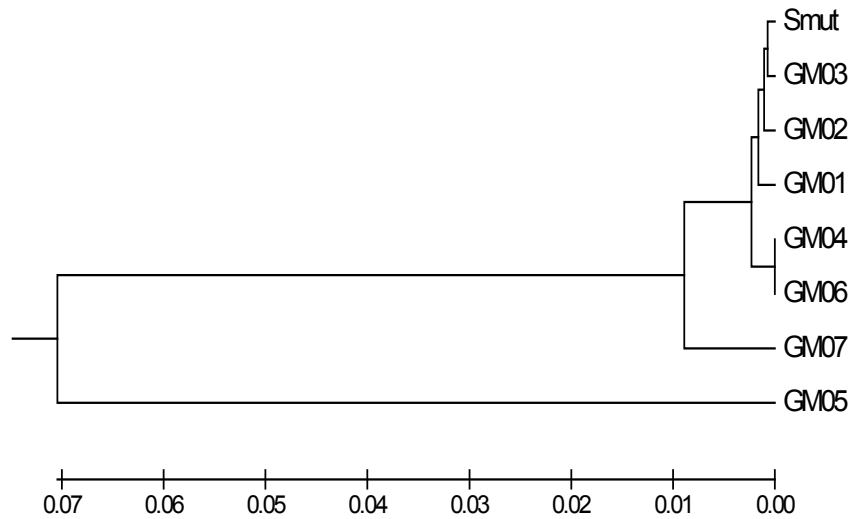


Figura 11. Patrón de agrupamiento de los aislados de *S. mutans*. Se incluyeron en la construcción del dendrograma solo las secuencias de aproximadamente 950 nucleótidos.

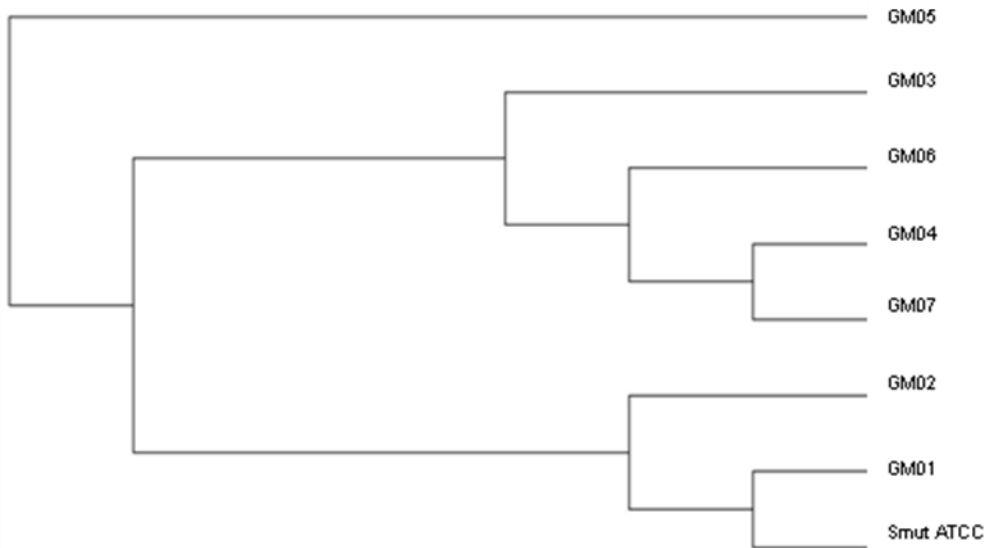


Figura 12. Patrón de agrupamiento a partir de los ensayos RAPD. Se incluyeron solo los aislados de secuencias más largas.

Haciendo la comparación de ambos dendogramas (figs. 11 y 12), se puede observar que hay congruencia entre los dos árboles filogenéticos, ya que el aislado GM05 se separa del resto, los aislados GM04 y GM06 permanecen agrupados en la misma rama terminal (*dexA*) o subterminal (RAPD). *S. mutans* ATCC se mantiene agrupado con GM01 y GM02.

6.6 Búsqueda de comunidad bacteriana alterna

6.6.1 Secuenciación del gen 16S RNAr

Con el fin de identificar qué otras especies bacterianas estaban presentes en las muestras y que pudieran estar involucrados en el proceso cariioso, se identificaron los 108 aislados obtenidos a partir del medio de cultivo no selectivo (agar nutritivo), mediante la amplificación del gen 16S rRNA. Para tal efecto, se utilizó el par de iniciadores universales ECA 75F/ECR 619R, bajo las condiciones ya mencionadas en la metodología (Amplificación de regiones específicas). Una vez obtenidos los productos de amplificación de PCR, se llevó a cabo el GENCLEAN para su posterior secuenciación. De las secuencias obtenidas a partir de la amplificación, solamente tres fueron comparables en el Gen Bank (6b, 8b y 10c), debido a que el resto las secuencias fueron demasiado cortas. Los datos obtenidos, se compararon mediante el algoritmo BLAST con las secuencias depositadas en el GenBank. A partir de la comparación, se construyó el siguiente dendograma (figura 13):

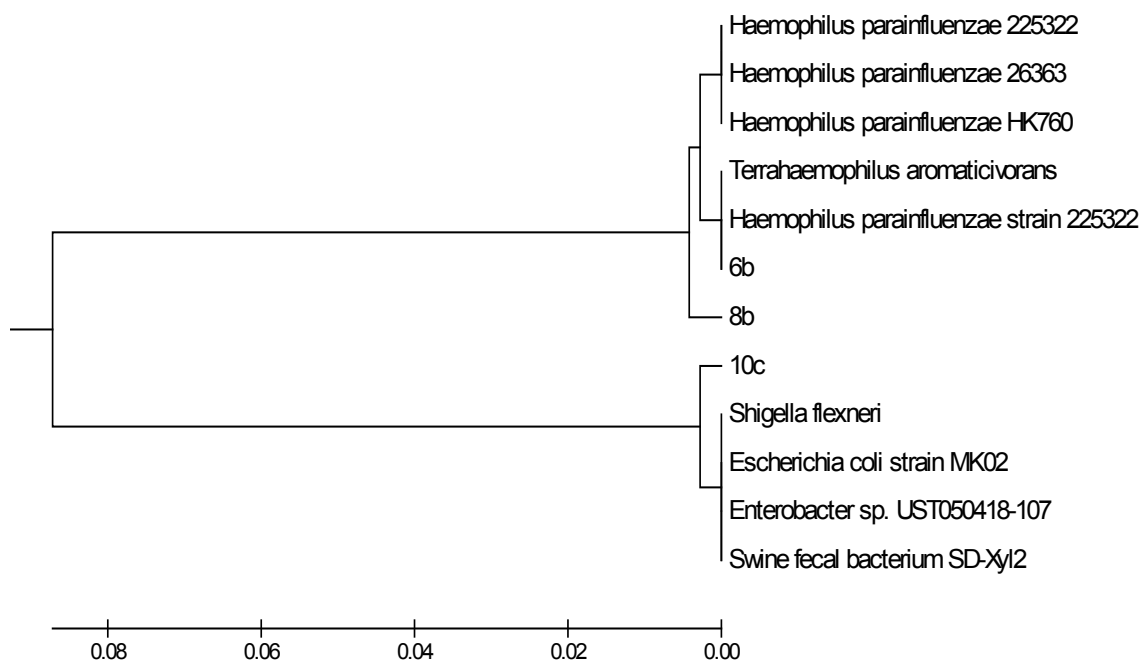


Figura 13. Dendograma de aislados amplificados con iniciadores universales.

El dendograma muestra que hay homología entre las secuencias comparadas en donde se forman dos grupos. Los aislados 6b y 8b se agrupan con microorganismos que se encuentran en vías respiratorias. En contraste, el aislado 10c se encuentra con un grupo de enterobacterias.

6.6.2 Ensayos de diversidad metabólica

Con la finalidad de identificar otras bacterias presentes en las muestras colectadas se llevó a cabo el análisis con el sistema BIOLOG de 10 aislados Gram negativos y 16 Gram positivos seleccionados al azar de niños (as) con caries.

En las tablas del anexo 4, se encuentra el número de aislado que logró utilizar cada sustrato específico. El Sistema BIOLOG arrojó los siguientes resultados: *Flavobacterium ferrugineum* se identificó en 6 de los aislados, *Clavibacter agropyri* en 5, *Corynebacterium urealyticum* en 4, *Burkholderia gladioli* en 2 y *Cellulomonas flavigena* en 2; *Corynebacterium jeikeium*, *Cellulomonas cellasea*, *Cellulomonas turbata*, *Lactococcus lactis*, *Sanguibacter keddie*, *Brevibacterium mcbellner*, *Mycobacterium flavensces*, *Sphingomonas capsulata*, *Gordonia sputi*, *Pseudomona syringae*, *Leuconostoc citreum*, *Bacillus megaterium A*, *Streptococcus hiovaginalis*, *Staphylococcus arlettae*, *Streptococcus sobrinus*, *Corynebacterium xerosis* y *Enterococcus faecalis* fueron identificados en un solo caso. (Fig. 14).

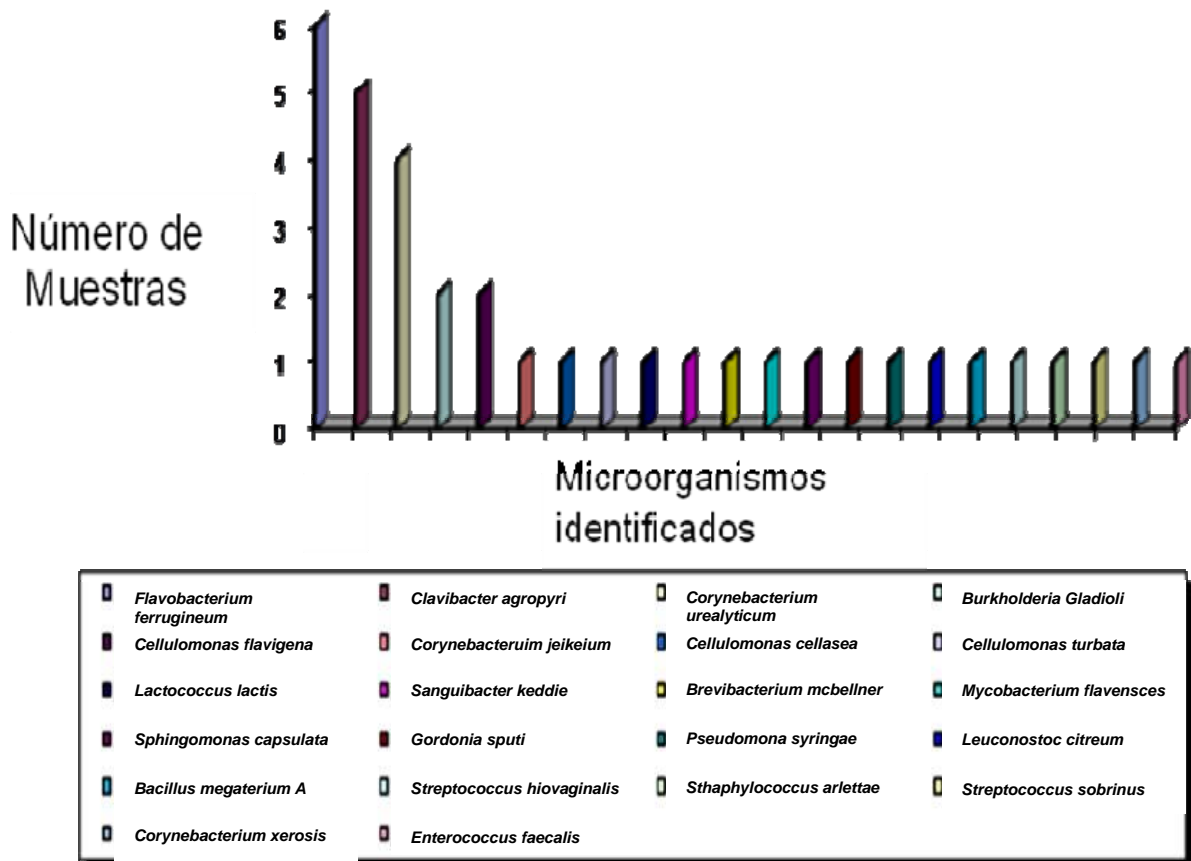


Figura 14. Microorganismos identificados a partir de las muestras mediante el sistema BIOLOG.

El origen de los microorganismos identificados con el sistema BIOLOG fue el siguiente: 8 se encuentran en suelo, 4 en tracto digestivo de humanos, 5 en sustancias que pueden llegar al tracto digestivo con relativa facilidad, 3 en vías respiratorias y 2 que se encuentran en piel, mucosas y en la placa dental bacteriana (tabla 7).

Tabla 7. Fuentes Comunes de Aislamiento de las bacterias tipificadas en BIOLOG.

Bacteria	Sitio de Aislamiento
<i>Flavobacterium ferrugineum</i>	Suelo
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	Suelo
<i>Cellulomonas cellasea</i>	Suelo
<i>Brevibacterium mcbrellner</i>	Suelo
<i>Cellulomonas turbata</i>	Suelo
<i>Bacillus megaterium A</i>	Suelo
<i>Corynebacterium xerosis</i>	Suelo
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	Suelo
<i>Cellulomonas flavigena</i>	Tracto digestivo
<i>Lactococcus lactis</i>	Tracto digestivo
<i>Enterococcus faecalis</i>	Tracto digestivo
<i>Leuconostoc citreum</i>	Tracto digestivo
<i>Sphingomonas capsulata</i>	Agua
<i>Clavibacter agropyri</i>	Plantas
<i>Pseudomonas syringae</i>	Vegetales
<i>Sanguibacter keddie</i>	Leche y sangre de vaca
<i>Streptococcus hiovaginalis</i>	Genitales
<i>Burkholderia gladioli</i>	Vías respiratorias
<i>Gordonia sputi</i>	Vías respiratorias
<i>Mycobacterium flavescens</i>	Vías respiratorias
<i>Streptococcus sobrinus</i>	Placa dental
<i>Staphylococcus arlettae</i>	Piel y mucosas

7. DISCUSIÓN

Los resultados de investigaciones realizadas en otros países como Brasil, en los que se incluye también a México, el porcentaje de infección por *S. mutans*, oscila entre 56-100% aproximadamente de las poblaciones estudiadas (Herrera et al., 2007; Aguilera et al., 2002; Loyola-Rodríguez et al., 2008; Del Río, 1991). En contraste, en este estudio la bacteria fue encontrada en el 9.72 % (26 casos) de la población total, que incluye a los 270 niños. 12.97% de los niños con caries, dio amplificación positiva del gen dexA con iniciadores específicos para *S. mutans*, así como el 6.47% de los niños sin caries. Esto significa por un lado, que en la población de estudio, el *S. mutans* posiblemente pudiera no ser un determinante para que el proceso carioso inicie, ya que solo 17 niños con caries, lo presentan.

Por otro lado, en los 139 niños sin caries analizados, también fue posible identificar la presencia del *S. mutans* (9 casos). Lo anterior confirma los hallazgos reportados sobre la mayor o menor capacidad de virulencia y propensión a la caries, que seguramente está relacionado también con las posibles mutaciones que puede presentar la bacteria en la vía metabólica de la sacarosa (Saxena et al., 2005). Por otro lado, no se debe dejar del lado otros factores como la influencia de los hábitos tanto dietéticos como higiénicos, ya que, si algunos individuos pueden estar infectados con *S. mutans*, llevando a cabo una limpieza bucal adecuada, puede evitarse la proliferación del microorganismo y como consecuencia la iniciación del proceso carioso. Otro factor importante, es la resistencia que puede presentar el huésped ante la colonización de la bacteria, por lo que puede ser importante el tamaño del inóculo presente para la presencia de caries

Con lo que respecta a la presencia del *S. mutans* en los diferentes intervalos de edad, llama la atención el hecho de que el grupo de 1-6 años con caries fue el más numeroso en cuanto a la presencia de *S. mutans*, ya que se identificó en 14 niños. En este sentido, es importante mencionar que a estas edades los niños frecuentemente reciben muestras de afecto por parte de sus madres ya sea, besándolos en la boca o bien compartiéndoles alimentos. A este respecto, han surgido publicaciones en donde se ha demostrado que la fuente principal de contagio de *S. mutans* hacia los niños son precisamente sus madres (Lindquist y Emilson, 2004; Mattos-Graner et al., 2001).

Por otro lado, algunos niños de esta misma edad tienen aún el hábito de dormir con el biberón dentro de la boca, que a su vez frecuentemente está preparado con bebidas azucaradas. Este panorama se empeora debido a que estos niños comúnmente no llevan a cabo la limpieza oral nocturna, quedando los carbohidratos en la misma y agregando además a ello, que hay una disminución de la salivación, de los movimientos de los labios, lengua y carrillos que en conjunto, durante el día, llevan a cabo la autooclisis.

Lo anterior se refuerza con los datos encontrados a partir de las encuestas, en los que se resalta el hecho de que la mayoría de los niños que participaron en el estudio consumen golosinas varias veces en una semana; sin embargo, a pesar de que reportan llevar a cabo el cepillado dental más de una vez al día, probablemente esta actividad no se realiza de manera correcta, debido a que normalmente y en el mejor de los casos, los padres son los que enseñan a sus hijos como cepillarse, pero los padres mismos desconocen una técnica adecuada de cepillado. Esto se refleja en que más de una tercera parte de los encuestados (38.7%) manifestaron que sus hijos presentaban caries dental en el momento de la aplicación de la encuesta. En otros casos, los padres no hacen hincapié con sus hijos en cuanto a darles a conocer la importancia sobre un estilo de vida enfocado a la salud, que va encaminado a realizar prácticas de higiene personal, pero sobretodo oral, y del que se ha reportado que los padres que lo enfatizan en sus hijos, se refleja en la disminución de la aparición de caries en sus primeros 7 años de vida (Mattila et al., 2005). En el caso en el que ambos padres laboran fuera del hogar, en donde la convivencia con sus hijos es escasa o nula, las personas a las que se delega esta responsabilidad pudieran no tener el interés suficiente para llevar a cabo este tipo de actividades, en donde además, las consecuencias se pueden manifestar en la autoestima de los niños: la falta de confianza en sí mismos y el escaso rendimiento escolar, provocando que los niños presten poca atención a su salud oral, o viceversa, que los niños con problemas orales tengan repercusiones en su autoestima, convirtiéndose en un círculo vicioso (Honkala et al., 2007), por lo que es importante que también los educadores pongan atención en ese sentido. Según Honkala et al. (2007), cuando los padres desempeñan un rol dominante en la educación de sus hijos (hasta la adolescencia), los hábitos de higiene oral tienden a ser estables, por lo que debe fomentarse esta práctica.

Retomando las técnicas genético-moleculares y con el propósito de conocer la posible diversidad genética de *S. mutans* en la población de estudio, se emplearon iniciadores que han sido utilizados exitosamente con anterioridad en los ensayos RAPD obteniendo huellas de *S. mutans* (Li et al., 1998; Saarela et al., 1996; Truong et al., 2000; Ménard et al., 1992). En este trabajo, los resultados de análisis RAPD utilizando cuatro diferentes iniciadores, permitieron distribuir a los aislados en tres grandes grupos, uno de los cuales está claramente separado del resto. Es importante resaltar, que a partir de una de las muestras del grupo de 1-6 años sin caries, se lograron obtener tres subpoblaciones de *S. mutans*, ya que estos se encuentran en diferentes ramas terminales. Este resultado es similar al reportado por Jiarong et al. (2004), en el cual, a partir de 17 pacientes con tratamiento ortodóncico, en 10 se encontró un genotipo de *S. mutans*, en 6 pacientes obtuvo dos y en 1 caso detectó 3 diferentes cepas de *S. mutans*. En el mismo estudio, reporta haber encontrado variación al comparar antes, durante y después del tratamiento ortodóncico en cuanto a la presencia del *S. mutans* en un mismo paciente. Así pues, los hallazgos a partir del presente estudio, nos habla de la gran diversidad genética de *S. mutans* que existe en la población de estudio. Una forma de obtener más confiabilidad en este tipo de estudio es aumentando el número de iniciadores para llevar a cabo los ensayos RAPD.

Resulta interesante subrayar el hecho de que fue posible detectar *S. mutans* mediante la amplificación del gen *dexA* a partir de muestras directas, sin necesidad de cultivarlo, no obstante la complejidad de la misma.

Se sabe que existe una homeostasis entre bacterias patógenas y mutualistas en la cavidad oral y que constituyen una forma organizada de comunidades de multiespecies, conocida como biofilm (Kolenbrander et al., 2002; Saito et al., 2006). A ese respecto, en este trabajo se encontró mediante las secuencias obtenidas de las amplificaciones con los iniciadores universales y que fueron comparadas en el Gen Bank, que algunas de las bacterias presentes en la población estudiada muestran cierta identidad tanto con bacterias que habitan vías respiratorias, como con algunas enterobacterias; estas últimas, posiblemente debido a que, para este estudio, no se tomó como un criterio de exclusión a los niños que presentaran algún tipo de padecimiento gastrointestinal. Sin embargo las bacterias identificadas con esta estrategia incluyen bacterias tanto viables como no viables, es por esto que resultan importantes los resultados obtenidos con

BIOLOG en donde se identificaron a las bacterias viables que pudieran ser las más importantes en el proceso carioso.

Referente a los aislados procesados en el sistema BIOLOG, la mayoría de ellos fueron identificados como microorganismos que habitan normalmente en tracto digestivo o respiratorio. Algunos de los microorganismos se aíslan a partir del suelo, como es el caso de *Flavobacterium ferrugineum*, identificado en 6 de los aislados, *Corynebacterium urealyticum* y *Brevibacterium mcbrellneri*. Esto se puede explicar debido a que los niños frecuentemente juegan en jardines y no tienen la precaución de asearse las manos antes de llevarse algún alimento a la boca. Entre los microorganismos identificados en más de un caso están: *Clavibacter agropyri*, se identificó en 5 casos (plantas); *Corynebacterium urealyticum*, identificado en 4 casos, aislado normalmente a partir de suelo; *Burkholderia gladioli*, identificado en 2 casos y que se puede aislar de vías respiratorias, y *Cellulomonas flavigena*, encontrado en 2 casos y que habita el tracto digestivo. En uno de los casos fue identificado *Streptococcus sobrinus*, aislado a partir de placa dental y que es uno de los microorganismos comúnmente asociados con la iniciación de la caries (Okada, 2002). En otro caso en particular, fue identificado *Enterococcus faecalis*, el cual está involucrado en muchos de los fracasos del tratamiento endodóntico, por su difícil erradicación a partir del canal radicular, ya que esta bacteria resiste un pH muy alcalino, como el del hidróxido de calcio (pH 12.4), comúnmente usado en este tipo de tratamientos para llevar a cabo la desinfección del conducto. El resto de los microorganismos identificados a partir del sistema BIOLOG, se encuentran normalmente en agua (*Sphingomonas capsulata*), vegetales (*Pseudomonas syringae*) y piel y mucosas (*Staphylococcus arlettae*).

Con los datos analizados anteriormente, los hallazgos a partir de este estudio con respecto a la presencia de *S. mutans* arrojan datos interesantes, desde el punto de vista epidemiológico que difieren a los publicados en la literatura. Ha sido frecuentemente reportada una estrecha relación *S. mutans*-Caries, sin embargo, a partir de estos resultados, existe la posibilidad de que otros factores u otros microorganismos estén mayormente implicados en el proceso carioso y que puedan ser el común denominador de la caries en esta población.

8. RESUMEN DE RESULTADOS

1. Esta especie fue encontrada en el 9.72 % de la población estudiada (270 niños).
2. El grupo en el que se encontró con mayor frecuencia *S. mutans* fue en el grupo de 1-6 años con caries.
3. 6.47% de los niños sin caries presentaron *S. mutans*.
4. El análisis del gen dexA muestra claramente polimorfismos en la secuencia de nucleótidos entre los aislados de *S. mutans* de estudio.
5. El análisis RAPD sugiere una población compleja de *S. mutans*, formada por tres o más genotipos (subpoblaciones).
6. En la población de estudio, los hábitos tanto dietéticos como higiénicos, pueden tener un rol importante en la cariogénesis.
7. La mayoría de los aislados procesados en el sistema BIOLOG fueron identificados como microorganismos que habitan normalmente en tracto digestivo o respiratorio.
8. En un caso fue identificado *Streptococcus sobrinus*.
9. En un caso fue identificado *Enterococcus faecalis*.

9. CONCLUSIÓN

S. mutans no estuvo presente en más del 50% de la población de estudio

10. PERSPECTIVAS

- Ampliar la población de estudio.
- Tipificar la Comunidad Microbiana Oral con métodos de Genética-Molecular.
- Determinar el número de bacterias viables de cada especie mediante RT-PCR y PCR tiempo real
- Relacionar los hábitos dietéticos e higiénicos de manera individual en la población de estudio con los Microorganismos encontrados en la misma.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Aas** J.A., Paster B.J., Stokes L.N., Olsen I., Dewhirst F.E. (2005). Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *J. Clin. Microbiol.* 43: 5721-5732
- **Aguilera** Galaviz LA, Aceves Medina M del C, Estrada García IC. (2002). Detection of potentially cariogenic strains of *Streptococcus mutans* using the polymerase chain reaction. *J Clin Pediatr Dent.* 1:47-51
- **Altschul**, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, Z. Zhang, W. Miller y D. J. Lipman. 1997. Gapped Blast and PSI-BLAST: a new generation of protein database search program. *Nucleic Acids Research.* 25: 3389-3402
- **Anderson** JM., Mihalik K., Soll DR. "Ultrastructure and antigenicity of the unique cell wall pimple of the Candida opaque phenotype. 1990. *J Bacteriol* 172, pp. 224-235.
- **Barrancos** M. (1999). Cariología. P. 239-279. En: *Operatoria Dental*. (Tercera edición. Editorial Médica Panamericana). Buenos Aires, Argentina. ISBN 950-06-0233-4.
- **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. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1001-1009
- **Byun** R., Nadkarni M.A., Chhour K.-L., Martin F.E., Jacques N.A., Hunter N. (2004). Quantitative Analysis of Diverse *Lactobacillus* Species Present in Advanced Dental Caries. *J. Clin. Microbiol.* 42: 3128-3136
- **Caufield** P.W., Walker T.M. (1989). Genetic Diversity within *Streptococcus mutans* Evident from Chromosomal DNA Restriction Fragment Polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* 27: 274-278
- **Chen** L., Ma L., Park No-Hee, Shi W. (2001). Cariogenic *Actinomyces* Identified with a β -Glucosidase-Dependent Green Color Reaction to *Gardenia jasminoides* Extract. *J. Med. Microbiol.* 39: 3009-3012
- **Corby** P.M., Lyons-Weiler J., Bretz W.A., Hart T.C., Aas J.A., Boumenna T., Goss A.L. Corby A.L., Junior H.M., Weyant R.J., Paster B.J. (2005). Microbial Risk Indicators of Early Childhood Caries. *J. Clin. Microbiol.* 43: 5753-5759
- **Coykendall** A.L. (1989). Classification and Identification of the *Viridans Streptococci*. *J. Clin. Microbiol.* 2: 315-328
- **Dams** E., Hendricks L., Van de Peer Y., Neefs J., Smits G., Vandembemt I., De Wachter R. 1988. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Research.* 16, supplement: r87-r175.
- **Del Río GI.** (1991). Dental caries and mutans Streptococci in selected groups of urban and native Indian schoolchildren in Mexico. *Community Dent Oral Epidemiol.* 19:98-100
- **Ellen** R. P., Fillery E. D., Banting D. W. (1980). Comparison of Selective Broth and Plating Methods for Isolation of *Streptococcus mutans* from Root Surface Dental Plaques. *J. Clin. Microbiol.* 11: 205-208
- **Fernández** R.M.I., Ramos de F. I.C., Alvarado. (2007). Riesgo de aparición de caries en preescolares. *Acta Odontológica Venezolana.* Vol. 45. www.actaodontologicavenezolana.com

- **Foster** J. S., Palmer Jr. R. J., Kolenbrander P.E. (2003). Human Oral Cavity as a Model for the Study of Genome-Genome Interactions. *Biol. Bull.* 204: 200-204
- **Gilmour**, M.N., Whittam,T.S., Kilian M., Selander R.K. (1987). Genetic relationships among the oral streptococci. *J. Bacteriol.* 69:5247-5257
- **Gonçalves** R.B., Rosa R.T., Stipp R.N., Napimoga N.H. Rosa E.A.R., Höfling J.F. (2002). Genetic diversity and cariogenic potential of *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res.*81:281-286
- **González** F., Cameros F. 1999. Ecología Bucal. P. 165-181. En: Microbiología Bucal. (Tercera Edición. Méndez Editores S.A. de C.V.) México. ISBN 968-6596-75-5.
- **González** F., Cameros F. (1999). Microorganismos en algunas infecciones bucales. P. 211-253. En: Microbiología Bucal. (Tercera Edición. Méndez Editores S.A. de C.V.) México. ISBN 968-6596-75-5.
- **Granath** I., Cleaton-Jones P., Fatti L.P., Grossman Elly S. (1993). Prevalence of Dental Caries in 4- to 5- Year-Old Children Partly Explained by Presence of Salivary *Mutans Streptococci*. *J. Clin. Microbiol.* 31: 66-70
- **Grönroos** L., Alaluusua, S., (2000). Site-specific oral colonization of mutans streptococci detected by arbitrarily primed PCR fingerprinting. *Caries Res.* 34:474-480
- **Hall**, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series.* 41: 95-98
- **Hamada** S., Toril M, Tsuchitani Y., Kotani S. (1980). Isolation and Immunobiological Classification of *Streptococcus sanguis* from Human Tooth Surfaces. *J. Clin. Microbiol.* 12: 243-249
- **Hamp** V., A. Parlicek and J. Flegr. 2001. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to *trichomonad* parasites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 51:731-735
- **Herrera** G., Pantoja F., Sanhueza c., Salazar N. (2007). Diagnostico Microbiologico y molecular de bacterias cariogenicas en mujeres embarazadas de la Region de La Araucania, Chile. *Rev Chilena Infectol.* 24:270-275
- **Honkala** S., Honkala E., Al-Sahli N. (2007). Do life- or school-satisfaction and self-esteem indicators explain the oral hygiene habits of schoolchildren? *Community Dent Oral Epidemiol.* 35: 337-347
- **Igarashi** T., Ichikawa, K., Yamamoto A., Goto N. (2001). Identification of mutans streptococcal species by the PCR products of the dex genes. *J. Microbiol. Methods.* 46:99-105
- **Igarashi** T, Yamamoto A, Goto N. (1996). Direct detection of *Streptococcus mutans* in human dental plaque by polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 5: 294–298.
- **Jiarong**, Zhuan B., Mingwen F., Hong H., Min N., Bing F., Bin P., Zhi Ch. (2004). Typing of Mutans Streptococci by Arbitrarily Primed PCR in Patients Undergoing Orthodontic Treatment. *Caries Res.* 38: 523-529
- **Kamiya** R.U. (2003). *Análise genotípica e mutacinotipagem de Streptococcus mutans isolados de indivíduos cárie-ativos e livres de cárie.* Thesis, Piracicaba, São Paulo:UNICAMP

- **Kim-Li** Chhour., Nadkarni M. A., Byun R., Martin F. E., Jacques N. A., Hunter Neil. (2005). Molecular Analysis of Diversity in Advanced Caries. *J. Clin. Microbiol.* 43: 843-849
- **Klein** M.I., Flório F.M., Pereira A.C., Höfling J.F., Gonçalves R.B. (2004). Longitudinal Study of Transmission, Diversity and Stability of *Streptococcus sobrinus* Genotypes in Brazilian Nursery Children. *J. Clin. Microbiol.* 42: 4620-4626
- **Klingler** JM., Stowe RP, Obenhuber DC. Groves TO, Mishra SK., Pierson DL. 1992 "Evaluation of the BIOLOG automated microbial identification system". *Appl Environ Microbiol.* 58: 2089-2092.
- **Kolenbrander** P.E., Andersen R.N., Blehert D.S., England P.G., Foster J. S., Palmer Jr. R. J. (2002). Communication among Oral Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 486-505
- **Koneman** E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Winn W.C. 1999. Introducción a la microbiología. Parte I. En: Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas Color. P. 67-112 (Quinta Edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Argentina). ISBN 950-06-1250-X.
- **Koneman** E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Winn W.C. 1999. Los cocos Grampositivos: Parte II: Estreptococos, Enterococos y Bacterias similares a Estreptococos. En: Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas Color. P. 563-630 (Quinta Edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Argentina). ISBN 950-06-1250-X.
- **Kumar**, S., K. Tamura y M. Nei. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics.* 5:150-163
- **Lane** D.J. (1991). *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, Wiley, New York. pp. 115-175.
- **Lane** D., Pace B., Olsen G., Stahl D., Sogin M., Pace N. (1985). Rapid determination of 16s Ribosomal RNA Sequences for Phylogenetic Analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82: 6955-6959.
- **Lindquist** B, Emilson C G. (2004). Colonization of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes and caries development in children to mothers harboring both species. *Caries Res;* 38: 95-103
- **Li**, Y., Caufield P. W. (1998). Arbitrarily primed chain reaction fingerprinting for the genotypic identification of mutans streptococci from humans. *Oral Microbiol. Immunol.* 13:17–22.
- **Li** Y, Caufield W, Redmo EI, Thornqvist E. (2001). Differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* via genotypic and phenotypic profiles from three different populations. *Oral Microbiol Immunol:* 16: 16–23.
- **Li** Xiaojing, Kolltveit K.M., Tronstand L., Olsen I. (2000). Systemic Diseases Caused by Oral Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 547-558
- **Li** Y., Ge Y., Saxena D., Caufield P.W. (2007). Genetic Profiling of the Oral Microbiota Associated with Severe Early-Childhood Caries. *J. Clin. Microbiol.* 45: 81-87
- **Li** Y.H., Lau, P.C.Y., Lee J.H., Ellen R.P., Cvitkovitch, D.G. (2001). Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. *J. Bacteriol.* 183:897-908

- **Loyola-Rodriguez** JP, Martinez-Martinez RE, Flores-Ferreyra BI, Patiño-Marin N, Alpuche-Solis AG, Reyes-Macias JF.(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. *J Clin Pediatr Dent.* 2:121-6.
- **Mattila** M. L., Päivi R., Ansa O., Päivi P., Liisa H., Hans H., Matti S. (2005). Will the role of family influence dental caries among seven-year-old children? *Acta Odontologica Scandinavica*, 63:73-84
- **Martin** F.E., Nadkarni M.A., Jacques N.A., Hunter Neil. (2002). Quantitative Microbiological Study of Human Carious Dentine by Culture and Real Time PCR: Association of Anaerobes with Histopathological Changes in Chronic Pulpitis. *J. Med. Microbiol.* 40: 1698-1704
- **Masashi** G. and F. Shoji. (1999). a method of Profiling Microbial Communities Based on a Most-Probable-Number Assay That Uses BIOLOG Plates and Multiple Sole Carbon Sources. *Applied and Environmental Microbiology.* 65:4419-4424.
- **Mattos-Graner** R O, Li Y, Caufield P W, Duncan M, Smith D J. (2001) .Genotypic diversity of mutans streptococci in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. *J Clin Microbiol*; 39: 2313-6.
- **Ménard** C, Brousseau R, Mouton C. (1992). Application of polymerase chain reaction with arbitrary primer (AP-PCR) to strain identification of *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett.* 95: 163–168.
- **Monterde** C.M.E., Delgado R.J., Guzmán F.C., Espejel M.M. (2002). Desmineralización-Remineralización del Esmalte Dental. *ADM.* 6: 220-222
- **Munson** M.A., Banerjee A., Watson T. F. Wade W. G. Molecular Analysis of the Microflora Associated with Dental Caries. (2004). *J. Clin. Microbiol.* 42: 3023-3029
- **Nadkarni** M.A. Caldon C.E., Chhour Kim-Li, Fisher I.P., Martin F.E., Jacques N.A., Hunter N. (2004). Carious Dentine Provides a Habitat for Complex Array of Novel *Prevotella*-Like Bacteria. *J. Med. Microbiol.* 42: 5238-5244
- **Napimoga** M.H., Kamiya R.U., Rosa R.T., Rosa A.R., Höfling J.F., Mattos-Graner R.O., Gonçalves R.B. (2004) Genotyping diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals. *Journal of medical Microbiology.* 53:697-703
- **Odds** FC, Abbot AB. (1983). Modification and extension of test for differentiation of *Candida* sp and strains. *Sabouraudia* 21. pp. 79-81.
- **Odds** FC. (2003) Reflections on the question: what does molecular mycology have to do with the clinician treating the patient? *Med Mycol.* 41, pp.1-6.
- **Okada** M., Soda Y., Hayashi F., Doi T., Suzuki J., Miura K., Kosai K. (2002). PCR detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in dental plaque samples from Japanese Pre-school children. *J. Med. Microbiol.* 55:443-447
- **Page**, R.D.M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12: 357-358
- **Pierce** K.M., Rozier R.G., Vann, Jr. W.F. (2002). Accuracy of Pediatric Primary Care Providers' Screening and Referral for Early Childhood Caries. *Pediatrics.* 109: 1-7

- **Poyart C**, Quesne G, Coulon S, Berche P, Trieu-Cuot P. (1998). Identification of *streptococci* to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *J. Clin. Microbiol.* 36: 41-7
- **Rodríguez V.**, Contreras B., Arjona S., Soto M. (2006). Prevalencia de caries y conocimientos sobre salud-enfermedad bucal de niños (3-12años) en el Estado de México. *Revista ADM.* 63 : 170-175
- **Saarela M**, Hannula J, Mättö J, Asikainen S, Alaluusua S. (1996). Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Arch Oral Biol* 41:821–826.
- **Sabat, G.**, Rose, P., Hickey, W.J., Harkin, J.M. (2000). Selective and Sensitive Method for PCR Amplification of *Escherichia coli* 16S rRNA Genes in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:844-849
- **Saito D.**, De Toledo L.R., Massa R. J.L., Tsai S.M., Höfling J.F., Gonçalves R.B. (2006). Identification of bacteria in endodontic infections by sequence analysis of 16S rDNA clone libraries. *J. Med. Microbiol* 55:101-107
- **Sambrook, J**, Maniatis, T., and Frisch, E. F. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual.* New York, Cold Spring Harbor, USA.
- **Saxena D.**, Li Y., Caufield P.W. (2005). Identification of Unique Bacterial Gene Segments from *Streptococcus mutans* with Potential Relevance to Dental Caries by Subtraction DNA Hybridation. *J. Med. Microbiol.* 43: 3508-3511
- **Shibata Y.**, Ozaka K., Seki M., Kawato T., Tanaka H., Nakano Y., Yamashita Y. (2003). Analysis of Loci Required for Determination of Serotype Antigenicity in *Streptococcus mutans* and Its Clinical Utilization. *J. Med. Microbiol.* 41: 4107-4112
- **Singh, D.V.**, Matte, M.H., Matte, G.R., Jinag, S., Sabeena, F. Shukla, B.N., Sanyal, S.C., Huq, A. and Colwell, R.R. (2001). Molecular analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1 and non-O139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolates. *Appl. Environ. Microbiol.:* 67: 910-921.
- **Smalla K.**, U. Wachtendorf, H. Heuer, W. T. Liu, and L Forney. (1998). Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1220-1225.
- **Thompson, J. D.**, T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin y D. G. Higgins. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research.* 24: 4876-4882
- **Touger-Decker R.** y van Loveren C. (2003). Sugars and dental caries. *Am. J. Clin. Nutr.* 78: 881S-892S
- **Truong TL**, Ménard C, Mouton C, Trahan L. (2000). Identification of mutans and other oral streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Med Microbiol* 49: 63–71.
- **Truu J.**, Talpsep E., Heinaro E., Stottmeister U., Wand H, Heinaru A. (1999). Comparison of API ZONE and BIOLOG GN identification systems assessed by techniques of multivariate analyses. *J Microbiol Methods.* 36(3), pp. 193-201.
- **Vandamme P.**, Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K. And Swings J. (1996). Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. *Microbiological Reviews.* 60 2:407-438.

ANEXO 1



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

Título del protocolo: COMUNIDAD MICROBIANA DE LA CAVIDAD ORAL DE NIÑOS CON CARIES.

Investigador principal: **D.enC. MA. SOLEDAD VÁZQUEZ GARCIDUEÑAS**

Sede donde se realizará el estudio: **División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencia Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”**. Fecha: _____

Nombre del paciente: _____

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

OBJETIVO DEL ESTUDIO:

La investigación tiene como finalidad conocer el tipo de microorganismos que se encuentran en la boca, principalmente los involucrados en la formación de caries, de los niños entre 1-12 años de edad de una población en la ciudad de Morelia, Mich. De ahí que se pueda trabajar en conjunto para crear algún método preventivo para la caries.

PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

En caso de aceptar participar en el estudio se le realizará toma de muestra mediante un barrido con un hisopo estéril a partir de diferentes sitios de la boca. Las muestras serán llevadas al laboratorio para aplicar los procedimientos de análisis. La toma de muestra no implica ningún tipo de molestia ni efecto adverso.

ACLARACIONES

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- No tendrá que hacer gasto alguno para el estudio.
- Se entiende que conserva el derecho de retirarse del estudio en cualquier momento que lo considere conveniente.
- No recibirá pago por su participación.
- La información obtenida en este estudio será confidencial.
- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado anexa a este documento.



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

CONSENTIMIENTO INFORMADO

En la ciudad de Morelia Michoacán a _____ del mes de _____ del año 200__.

Yo Sr(a)._____ siendo el padre, madre o tutor del niño (a) _____.

Autorizo a la Dra. Gabriela López Torres para que realice una toma de muestra a partir de la cavidad oral de mi hijo (a), para llevar a cabo el análisis de la misma.

De la misma forma, autorizo se apliquen las diferentes técnicas de manejo de conducta que se requieran. Todo lo anterior se me explicó con un lenguaje sencillo y claro.

Además, afirmo que todos los datos que proporcioné en la historia clínica son verídicos y me hago responsable de alguna contradicción o dato no proporcionado.

Nombre y Firma de autorización
PADRE, MADRE O TUTOR

TESTIGO

ANEXO 2



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA-FACULTAD DE MEDICINA

ENCUESTA

Este documento tiene un objetivo de investigación. La información recabada en el mismo es confidencial y sólo para dicho fin.

DEBE LLENARSE CON DATOS DEL NIÑ@:

Edad: _____ Sexo: _____

Lugar donde vive: _____

A) PROBLEMAS ORALES QUE PRESENTA

- | | |
|----------------------|-------------------------------|
| a) Dolor dental | e) Sensibilidad dental |
| b) Caries dental | f) Dientes primarios perdidos |
| c) Encías sangrantes | g) Respiración bucal |
| d) Otros problemas | h) Ninguno |

B) VALORACIÓN DE LA SALUD ORAL DEL NIÑ@ Y NECESIDADES QUE TIENE

1. Satisfacción con la salud oral:
 - a) No satisfecho
 - b) Satisfecho
2. Problemas en la boca:
 - a) Sin problemas
 - b) Algunos problemas
 - c) Muchos problemas
4. Percepción de las necesidades de tratamiento oral:
 - a) No necesidades
 - b) Existen necesidades
 - c) No lo sé
5. Actitud hacia su salud oral:
 - a) Positiva
 - b) Negativa
6. Evaluación global de la salud oral:

- a) Muy mala
- b) Mala
- c) Más o menos mala

- d) Más o menos buena
- e) Buena
- d) Muy buena

C) VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS

1. Ubicación de la escuela:

- a) Zona rural
- b) Zona semiurbana
- c) Zona urbana

2. Lugar de nacimiento de la madre:

- a) México
- b) Otro país

3. Número de niños en la familia:

- a) Uno
- b) Dos
- c) Tres
- d) Cuatro o más

4. Lugar que ocupa en la familia:

- a) Primero
- b) Segundo
- c) Tercero
- d) Cuarto o más

5. Escolaridad del padre:

- a) Primaria
- b) Secundaria
- c) Bachillerato
- d) Licenciatura
- e) Posgrado

6. Ocupación del padre:

- a) Dentro del hogar
- b) Fuera del hogar

7. Caries previas del padre:

- a) Sin caries en los últimos 5 años
- b) 1-2 caries en los últimos 5 años
- c) 1-2 caries en el último año

8. Higiene oral del padre:

- a) Más de una vez al día
- b) Una vez al día

c) Cada dos días

d) Una vez por semana o menos

9. Edad de la madre: _____

10. Escolaridad de la madre:
- a) Primaria
 - b) Secundaria
 - c) Bachillerato
 - d) Licenciatura
 - e) Posgrado
11. Ocupación de la madre:
- a) Ama de casa
 - b) Fuera del hogar
12. Caries previas de la madre:
- a) 1. Sin caries en los últimos 5 años
 - b) 1-2 caries en los últimos 5 años
 - c) 1-2 caries en el último año
13. Higiene oral de la madre:
- a) Más de una vez al día
 - b) Una vez al día
 - c) Cada dos días
 - d) Una vez por semana o menos
14. Nivel socio-económico:
- a) Alto
 - b) Medio
 - c) Bajo
15. Higiene personal del niño@:
- a) Adecuada
 - b) Regular
 - c) Inadecuada
16. Inicio de higiene oral del niño@:
- a) Menor de 2 años
 - b) Mayor de 2 años
17. Higiene oral del niño@:
- a) Más de una vez al día
 - b) Una vez al día
 - c) Cada dos días
 - d) Una vez por semana o menos
18. Consumo de dulces del niño@:
- a) Casi nunca
 - b) Una vez por semana
 - c) varias veces en una semana
19. Visitas previas a consulta dental del niño@:
- a) 6 meses
 - b) 1 año

- c) 2 años o más
 - d) Nunca
20. La mejor manera de proporcionar educación en salud a los niñ@s es:
- a) Dar un ejemplo en la vida diaria con una detallada explicación
 - b) Hablando y explicando
21. Actividades del padre con su hij@ fuera de casa:
- a) Menos de tres veces por semana
 - b) Tres veces o más frecuente
22. Hora de ir a dormir del niñ@:
- a) Antes de las 21:00 hrs.
 - b) Después de las 21:00 hrs.
23. Tipo de escuela:
- a) Pública
 - b) Privada

D) INDICADORES AUTOESTIMA:

1. Desempeño escolar:
 - a) Malo
 - b) Regular
 - c) Bueno
 - d) Muy bueno
2. Satisfacción de vida:
 - a) Felicidad
 - b) No feliz
 - c) Feliz
 - d) Muy feliz
3. Soledad
 - a) Frecuentemente
 - b) Algunas veces
 - c) Nunca
4. Satisfacción escolar:
 - Disfruto estar con mis compañeros de clase:
 - a) Algunas veces/Nunca
 - b) Frecuentemente
 - c) Siempre
5. Otros compañeros me aceptan:
 - a) Algunas veces/Nunca
 - b) Frecuentemente
 - c) Siempre

6. Ir a la escuela es aburrido:
 - a) Frecuentemente
 - b) Algunas veces
 - c) Rara vez/Nunca

7. Falta a clases:
 - a) Algunas veces
 - b) Nunca

8. Autoestima:
Nervios:
 - a) Diariamente
 - b) Semanalmente
 - c) Raro/Nunca

9. Confianza en sí mismo:
 - a) Algunas veces/Nunca
 - b) Frecuentemente
 - c) Siempre

10. Imagen personal:
 - a) Demasiado delgado/obeso
 - b) No piensa en eso
 - c) Talla adecuada

11. Apariencia:
 - a) No luce bien
 - b) No piensa en eso
 - c) Luce aceptable
 - d) Luce muy bien

12. Hace amigos:
 - a) Difícilmente
 - b) Fácilmente
 - c) Muy fácil

ANEXO 3

a) Fuentes de carbono de una microplaca GN2

A1	Water	A2	α -Cyclodextrin	A3	Dextrin	A4	Glycogen	A5	Tween 40	A6	Tween 80	A7	N-Acetyl-D-Galactosamine	A8	N-Acetyl-D-Glucosamine	A9	Adonitol	A10	L-Arabinose	A11	D-Arabinol	A12	D-Cellobiose
B1	D-Erythritol	B2	D-Fructose	B3	L-Fucose	B4	D-Galactose	B5	Gentiobiose	B6	α -D-Glucose	B7	m-Inositol	B8	α -D-Lactose	B9	Lactulose	B10	Maltose	B11	D-Mannitol	B12	D-Mannose
C1	D-Melibiose	C2	β -Methyl-D-Glucoside	C3	D- Psicose	C4	D-Raffinose	C5	L-Rhamnose	C6	D-Sorbitol	C7	Sucrose	C8	D-Trehalose	C9	Turanose	C10	Xytilol	C11	Pyruvic Acid Methyl Ester	C12	Succinic Acid Mono-Methyl-Ester
D1	Acetic Acid	D2	Cis-Aconitic Acid	D3	Citric Acid	D4	Formic Acid	D5	D-Galactonic Acid Lactone	D6	D-Galacturonic Acid	D7	D-Gluconic Acid	D8	D-Glucosaminic Acid	D9	D-Glucuronic Acid	D10	α -Hydroxybutyric Acid	D11	β -Hydroxybutyric Acid	D12	γ -Hydroxybutyric Acid
E1	β -Hydroxy Phenylacetic Acid	E2	Itaconic Acid	E3	α -Keto Butyric Acid	E4	α -Keto Glutaric Acid	E5	α -Keto Valeric Acid	E6	D,L-Lactic Acid	E7	Malonic Acid	E8	Propionic Acid	E9	Quinic Acid	E10	D-Saccharic Acid	E11	Sebacic Acid	E12	Succinic Acid
F1	Bromosuccinic Acid	F2	Succinamic Acid	F3	Glucuronamide	F4	L-Alaninamide	F5	D-Alanine	F6	L-Alanine	F7	L-Alanyl-glycine	F8	L-Asparagine	F9	L-Aspartic Acid	F10	L-Glutamic Acid	F11	Glycyl-L-Aspartic Acid	F12	Glycyl-L-Glutamic Acid
G1	L-Histidine	G2	Hydroxy-L-Proline	G3	L-Leucine	G4	L-Ornithine	G5	L-Phenylalanine	G6	L-Proline	G7	L-Pyroglutamic Acid	G8	D-Serine	G9	L-Serine	G10	L-Threonine	G11	D,L-Carnitine	G12	γ -Amino Butyric Acid
H1	Urocanic Acid	H2	Inosine	H3	Uridine	H4	Thymidine	H5	Phenethylamine	H6	Putrescine	H7	2-Aminoethanol	H8	β -3-Butanedial	H9	Glycerol	H10	D,L- α -Glycerol Phosphate	H11	α -D-Glucose-1-Phosphate	H12	D-Glucose-6-Phosphate

ANEXO 4.

b) Fuentes de carbono de una de microplaca GP2

A1	Water	A2	α -Cyclodextrin	A3	β -Cyclodextrin	A4	Dextrin	A5	Glycogen	A6	Inulin	A7	Mannan	A8	Tween 40	A9	Tween 80	A10	N-Acetyl-D-Glucosamine	A11	N-Acetyl- β -D-Mannosamine	A12	Amalgalin	
B1	L-Arabinose	B2	D-Arabinitol	B3	Arbutin	B4	D-Cellobiose	B5	D-Fructose	B6	L-Fucose	B7	D-Galactose	B8	D-Galacturonic Acid	B9	Gentiobiose	B10	D-Gluconic Acid	B11	α -D-Glucose	B12	m-Inositol	
C1	α -D-Lactose	C2	Lactulose	C3	Maltose	C4	Maltotriose	C5	D-Mannitol	C6	D-Mannose	C7	D-Melezitose	C8	D-Melibiose	C9	α -Methyl-D-Galactoside	C10	β -Methyl-D-Galactoside	C11	3-Methyl Glucose	C12	α -Methyl-D-Glucoside	
D1	β -Methyl-D-Glucoside	D2	α -Methyl-D-Mannoside	D3	Palaftinose	D4	D-Psicose	D5	D-Rafinose	D6	L-Rhamnose	D7	D-Ribose	D8	Salicin	D9	Sedoheptulosan	D10	D-Sorbitol	D11	Stachyose	D12	Sucrose	
E1	D-Tagatose	E2	D-Trehalose	E3	Turanose	E4	Xylitol	E5	D-Xylose	E6	Acetic Acid	E7	α -Hydroxybutyric Acid	E8	β -Hydroxybutyric Acid	E9	γ -Hydroxybutyric Acid	E10	β -Hydroxy-Phenylacetic Acid	E11	α -Ketoglutaric Acid	E12	α -Ketovaleric Acid	
F1	Lactamide	F2	D-Lactic Acid Methyl Ester	F3	L-Lactic Acid	F4	D-Malic Acid	F5	L-Malic Acid	F6	Pyruvic Acid Methyl Ester	F7	Succinic Acid Mono-methyl Ester	F8	Propionic Acid	F9	Pyruvic Acid	F10	Succinamic Acid	F11	Succinic Acid	F12	N-Acetyl-L-Glutamic Acid	
G1	L-Alaninamide	G2	D-Alanine	G3	L-Alanine	G4	L-Alanyl-Glycine	G5	L-Asparagine	G6	L-Glutamic Acid	G7	Glycyl-L-Glutamic Acid	G8	L-Pyroglutamic Acid	G9	L-Serine	G10	Putrescine	G11	2,3-Butanediol	G12	Glycerol	
H1	Adenosine	H2	2-Deoxy Adenosine	H3	Inosine	H4	Thymidine	H5	Uridine	H6	Adenosine-5'-Monophosphate	H7	Thymidine-5'-Monophosphate	H8	Uridine-5'-Monophosphate	H9	D-Fructose-6-Phosphate	H10	α -D-Glucose-1-Phosphate	H11	D-Glucose-6-Phosphate	H12	D-L- α -Glycerol Phosphate	

ANEXO 5.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			14a, 16a, 19a, 19b, 21a, 23a,	16a, 19b	6b, 14a,	14a, 16a, 21a	6b, 14a, 16a, 19a, 19b, 21a, 23a,	14a, 16a, 18c, 19a, 19b, 21a, 23a	14a, 16a, 18c, 21a	3a, 6b, 6c, 14a, 16a, 19a, 19b, 21a, 23a, 36b	14a, 16a, 21a	14a, 16a, 19a, 21a, 23a,
B	18c,	14a, 16a, 19a, 19b, 21a, 23a,	14a, 16a, 19a, 21a, 23a,	14a, 16a, 19a, 19b, 21a, 23a,	14a, 16a, 19a, 21a, 23a,	14a, 16a, 18c, 19a, 19b, 21a, 23a,	19b	14a, 16a, 19b, 21a, 23a,	19a, 21a, 23a,	14a, 16a, 19a, 19b, 21a, 23a,	14a, 16a, 18c, 19a, 19b, 21a, 23a,	3a, 14a, 16a, 19a, 19b, 21a, 23a,
C	6c, 14a, 16a, 19a, 19b, 21a, 23a,	14a, 16a, 19a, 19b, 21a, 23a,	14a, 19b, 21a	14a, 16a, 19a, 19b, 21a, 23a,	14a, 16a, 19a, 19b, 21a, 23a,	6c, 14a, 16a, 18c, 19a, 19b, 21a, 23a,	14a, 16a, 19a, 19b, 21a, 23a,	14a, 16a, 19a, 19b, 21a, 23a,	14a, 16a, 19a, 21a, 23a,		14a, 16a, 18c, 19a, 19b, 21a, 23a,	36b, 19b, 21a
D	14a, 18c, 19a, 23a,	14a, 16a, 21a	14a, 19a, 21a, 23a, 16a,		14a, 16a, 19a, 21a, 23a,	14a, 16a, 18c, 19a, 19b, 21a, 23a,	14a, 16a, 18c, 19a, 19b, 21a, 23a,	19b	14a, 16a, 19a, 19b, 21a, 23a,		19a,	
E	14a, 16a, 19a, 21a, 23a,		16a,	19b	16a, 18c,	14a, 16a, 19a, 19b, 21a, 23a,	14a, 19a, 21a, 23a,	19b		14a, 16a, 19a, 19b, 21a, 23a,		14a, 16a, 19a, 19b, 21a, 23a, 36b
F	14a, 16a, 19a, 19b, 21a, 23a,		14a, 16a, 19a, 19b, 21a, 23a,	3a, 14a, 19a, 21a, 23a, 36b,	14a, 16a, 19a, 19b, 21a, 23a,	14a, 16a, 19a, 19b, 21a, 23a,	3a, 14a, 16a, 19b, 21a, 23a, 19a,	14a, 16a, 19a, 19b, 21a, 23a,	14a, 16a, 19a, 19b, 21a, 23a,	14a, 16a, 19a, 21a, 23a,	3a, 19b	16a, 19b,
G						16a, 19a,	3a, 23a,	14a, 16a, 19b	14a, 16a, 19a, 19b, 23a,	21a	21a	16a,
H	14a,	14a, 16a, 19a, 19b, 21a, 23a,	14a, 19a, 19b, 21a, 23a,	14a, 16a, 9a, 19b, 21a, 23a,			16a,		14a, 16a, 19a, 19b, 21a, 23a,	14a, 16a, 19a, 19b, 21a, 23a,	14a, 16a, 19a, 19b, 21a, 23a, 36b	14a, 16a, 19a, 19b, 21a, 23a, 36b

a) Patrón de utilización de fuentes de carbono de los aislados Gram negativos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	16c	13a,	13a, 16b, 16c, 32b	3c, 4b, 14b, 16b, 17b, 18a, 28b, 32b	13a, 14b, 17b		14b	4a, 4b, 6a, 13a, 14b, 16b, 16c, 17a, 18a, 18a,	4a, 13a, 14b, 16b, 16c, 17a, 28b,	4b, 13a, 14b, 16b, 16c, 17b, 28b, 34b	13a, 14b	13a, 16c, 27c
B	3c, 4a, 7a, 9a, 13a, 14b, 16b, 17a, 17b, 18b, 28b, 28c, 32b	14b,	3c, 3b, 14b, 17a, 17b	3c, 13a, 14b, 16b, 16c, 18a, 28b, 28c, 32b	6a, 13a, 14b, 16b, 16c, 17b, 18a, 28b, 28c, 32b	3b, 14b,	3c, 14b, 16b, 27c, 28a, 28b, 32b	14b,	3c, 13a, 14b, 16b, 16c, 32b	13a, 14b, 16b,	3c, 6a, 13a, 14b, 16b, 17a, 18a, 28b, 32b	13a, 16b,
C	7a, 14b,	28b,	14b, 28b, 32b	14b, 16b, 18a, 28b, 32b	13a, 14b, 16b, 18a,	3c, 14b, 17b, 32b	13a, 14b, 16b, 28a, 28b,	4a, 14b, 16b,	14b, 16b	13a, 14b	7a, 14b, 16b, 18b, 32b	12a, 13a, 14b
D	3c, 7a, 14b, 16b, 27c, 32b	27c	3c, 7a, 13a, 14b, 16b, 16c, 18a, 27c, 28b, 32b	3c, 9a, 14b, 16b, 27c, 28b,	12a, 13a, 14b, 16b	7a,	3b, 3c, 4a, 6a, 7a, 9a, 12a, 13a, 14b, 16b, 17a, 18b, 27c, 28a, 28b, 28c, 32b, 34b	3c, 14, 17a, 18a, 27c, 32b	14b, 18a	13a, 14b, 16b, 27c	13a, 14b, 18a	13a, 14b, 16b, 27c
E	14b, 28b,	3c, 7a, 9a, 14b, 17b, 18a, 27c, 28b, 32b	3c, 13a, 14, 16b, 16c, 27c, 32b		3b, 4a, 6a, 7a, 12a, 13a, 14b, 16b, 17a, 17b, 18b, 27c, 28a, 28b, 28c, 32b, 34b	4a, 13a, 14b, 32b, 34b	14b,	7a, 16b	14b	13a, 14b	13a, 16b	13a
F			14b		4a, 13a, 14b, 16b, 17b,	3c, 13a, 14b,	14b, 27c	12a, 14b, 27c	3c, 6a, 12a, 13a, 14b, 17b, 18a, 28c, 32b	13a, 14b	13a, 14b, 16b	13a, 27c
G	6a, 14b	14b	14b, 16b	14b	6a, 13a, 14b, 16b	13a, 14b, 16b	14b	14b	16b, 18b,	14b	6a,	12a, 13a, 14b, 16b, 17b, 18a
H	6a	13a, 14b, 16b,	13a, 14b, 16b,	13a, 14b, 16b, 16c, 18a, 27c, 28b, 32b	6a, 14b, 16b, 17b, 27c, 28c, 32b	14b	6a, 14b, 16b	6a, 14b	14b,	14b, 19b,	13a, 14b	13a, 14b, 16b, 18a, 27c

b) Patrón de utilización de fuentes de carbono de los aislados Gram positivos

ANEXO 6.

Matriz dicotómica con los datos del ensayo RAPD obtenidos con el oligo **OPA 02**

Tamaño de banda (pb)	Mut ATCC	c/n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3121	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
3040	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
2531	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2465	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
2220	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2163	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
2107	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
1968	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
1845	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1759	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
1584	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
1542	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1521	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1365	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
1310	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
1293	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
1275	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1225	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
1208	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
1176	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1160	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1114	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
1099	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1070	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
1041	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
1013	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
975	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
927	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1
882	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
807	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
738	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
684	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
650	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
623	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
543	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
415	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
289	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

0. Ausente 1. Presente

ANEXO 7.

Matriz dicotómica con los datos del ensayo RAPD obtenidos con el oligo **OPA 03**

Tamaño de banda (pb)	Mut ATCC	c/n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
9250	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5627	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
1806	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
1396	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1325	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
1297	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1219	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1121	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
1053	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
931	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
867	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
826	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
739	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
699	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0. Ausente 1. Presente

ANEXO 8.

Matriz dicotómica con los datos del ensayo RAPD obtenidos con el iniciador **OPA 13**

Tamaño de banda (pb)	Mut ATCC	c/n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
10370	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
9501	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4291	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
3694	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3684	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
3465	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2125	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2062	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1977	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1911	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
1765	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1706	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1687	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1615	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
1533	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1502	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1471	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
1396	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1367	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1297	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1271	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1258	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1169	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
1157	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
1133	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1098	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
1053	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
1000	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
944	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
908	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
891	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
874	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
858	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
762	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
710	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0
636	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
567	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

0. Ausente 1. Presente

ANEXO 9.

Matriz dicotómica con los datos del ensayo RAPD obtenidos con el oligo **OPA 18**

Tamaño de banda (pb)	Mut ATCC	c/n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
4458	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4357	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
4068	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3712	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
3387	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
3090	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2952	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
2632	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
2347	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
2191	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2093	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
2000	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1750	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
1674	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
1630	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
1593	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1574	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
1434	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
1369	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
1277	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1204	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
1136	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1072	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0
1023	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
897	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
850	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
812	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
786	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
743	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
710	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
679	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0
583	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
556	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
521	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
493	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0

0. Ausente

1. Presente