

EFFECTOS DE UN ALIMENTO ENRIQUECIDO CON PROBIÓTICOS A BASE DE
LACTOBACILLUS RHAMNOSUS GG SOBRE EL RECuento DE *STREPTOCOCCUS*
MUTANS Y *LACTOBACILLUS* SP. Y LA PRESENCIA DE CARIES INCIPIENTE EN
NIÑOS DE 3 A 4 AÑOS EN CALI, COLOMBIA

LINA MARIA VILLEGAS TRUJILLO

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
2017

EFFECTOS DE UN ALIMENTO ENRIQUECIDO CON PROBIÓTICOS A BASE DE
LACTOBACILLUS RHAMNOSUS GG SOBRE EL RECuento DE
STREPTOCOCCUS MUTANS Y LACTOBACILLUS SP Y LA PRESENCIA DE
CARIES INCIPIENTE EN NIÑOS DE 3 A 4 AÑOS EN CALI, COLOMBIA

LINA MARIA VILLEGAS TRUJILLO
CÓDIGO: 1501330

Trabajo de Investigación como requisito parcial para optar por el título de Magíster en
Ciencias Biomédicas

Directora:
JUDY ELENA VILLAVICENCIO, Od., MSc.

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
SANTIAGO DE CALI
2017

Nota de aceptación

Presidente del Jurado

Jurado No. 1

Jurado No. 2

Jurado No. 3

Fecha de sustentación
(Ciudad, día, mes y año)

DEDICATORIA

A mi familia que aportaron alegría y motivación en cada día de mi vida, brindando los pilares de mi formación como persona con principios morales y éticos, a mi novio Ivan Alejandro por aportar alegría, asombro y expectativas que generan el nuevo conocimiento que se logra con el trabajo en equipo. También dedico este trabajo a los niños que son el futuro de nuestra sociedad y a todos los que trabajan con dedicación y entrega en pro de su bienestar.

AGRADECIMIENTOS

El conocimiento científico es la relación entre el conocimiento humano y el mundo físico, biológico y social, en el desarrollo de este conocimiento intervienen las virtudes humanas, valores y limitaciones, siempre a través de una retroalimentación de los investigadores, estudiantes y todas las personas que intervienen para que una hipótesis se pueda probar. La realización de este trabajo de investigación y mi formación como Magister en ciencias biomédicas fue posible por el equipo de trabajo que contribuyó cada día en el cumplimiento de los objetivos propuestos, basados en la integridad científica.

Agradezco al Grupo de investigación de Odontología Pediátrica y Ortopedia Maxilar de la Universidad del Valle, por la oportunidad de formarme en el campo de las ciencias básicas aplicadas a la odontología, en especial a mi directora Judy Elena Villavicencio, excelente docente que ha guiado mi formación como magister, con gran calidad humana me permitió ver en cada día un motivo más para seguir superando los obstáculos que se presentan habitualmente en la investigación científica, agradezco su ejemplo como líder en la dirección de un equipo interdisciplinario para lograr abordar con exactitud los temas propuestos.

Agradezco a mi asesora Maria Cristina Arango por su orientación en los temas relacionados a la cariológica, que con su empeño, persistencia y motivación hicieron de cada día una nueva experiencia en el aprendizaje basado en la evidencia. Agradezco a las Dras. Susana Arias y Francia Triana, quienes en su labor de odontopediatras mostraron el amor y dedicación a través de la investigación para encaminar el nuevo conocimiento y avances en la odontología por el bienestar de los niños. Un grupo de mujeres, docentes e investigadoras que marcaron mi proceso de formación en los aspectos académicos y personales.

Agradezco al Grupo de investigación de Medicina Periodontal dirigido por el Doctor Adolfo Contreras, que, con su calidez, excelencia y amplia trayectoria en la investigación me oriento a aplicar el método científico desde mi pregrado, por su ejemplo como investigador y docente me mostro el amplio conocimiento que se aborda desde la microbiología oral, para comprender el desarrollo de enfermedades sistémicas a lo largo de la vida.

Agradezco a los profesores Carlos Cruz y Adriana Jaramillo, que con sus aportes individuales permitieron que los resultados de este trabajo fueran evidenciables para la literatura científica. Agradezco a la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, en especial a Daniela Salinas y Patricia Liliana Palma por su entrenamiento en el Laboratorio

en Microbiología Oral y al Departamento de Microbiología de la Universidad del Valle por permitir el espacio para el desarrollo de las pruebas de laboratorio.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTOS	5
LISTA DE ABREVIATURAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABLAS	12
LISTA DE ANEXOS	13
RESUMEN.....	14
SUMMARY	15
1. INTRODUCCIÓN	16
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
2.1 Pregunta de investigación.....	17
2.2 Justificación	17
3. MARCO TEÓRICO	19
3.1 Caries dental	19
3.2 Factores etiológicos de la caries	20
3.3 Placa bacteriana oral.....	21
3.4 Clasificación de las lesiones de caries dental	23
3.4.1 Sistema internacional de clasificación y manejo de caries (ICCMSTM)	23
3.4.2 Índice ceo	25
3.5 Caries de la de la infancia temprana.....	25
3.5.1 Lesiones cariosas de la infancia temprana	26
3.5.2 Prevalencia de la caries en dentición temporal en colombia	26
3.6 Aspectos físicos y químicos de la saliva	27
3.6.1 Capacidad amortiguadora de la saliva y pH	29
3.7 Probioticos	30
3.7.1 Mecanismo de acción de los probióticos	32
3.7.2 Probióticos en la fórmula infantil	35
4. OBJETIVOS	36
4.1. Objetivo general	36

4.2. Objetivos específicos.....	36
5. MATERIALES Y METODOS.....	36
5.1 Tipo de estudio	36
5.2 Tipo de muestreo	37
5.2.1 Criterios de inclusión	37
5.2.2 Criterios de exclusión	37
5.3 Tamaño y distribución de la muestra:	37
5.4 Cegamiento y asignación de la intervención	37
5.5 Intervención.....	38
5.6 Consideraciones éticas.....	38
5.7 Trabajo de campo	38
5.7.1 Evaluación Clínica Odontológica	39
5.7.2 Recolección de saliva.....	40
5.7.3 Análisis microbiológico de la muestra de saliva	41
5.7.4 Análisis fisicoquímicos de la saliva.....	43
5.7.5 Análisis estadístico	43
6. RESULTADO.....	45
6.1 Unidades muestrales según el grupo aleatorizado y el tiempo de intervención	45
6.2 Cambios en aspectos clínicos de la caries dental	47
6.2.1 Cambios en el índice CEO según los criterios ICDAS.....	47
6.2.2 Cambios en el estado de severidad de la caries	48
6.2.3 Cambios en el índice de placa de Silness y Løe modificado	49
6.3 Describir las características fisicoquímicas de la saliva.....	50
6.3.1 Cambios en el pH salival	50
6.3.2 Cambios en la capacidad buffer.....	50
6.4 Perfil microbiológico de la saliva.....	51
6.4.1 Recuentos unidades formadoras de colonia de S. mutans	51
6.4.2 Cambios en la presencia de Lactobacillus sp.....	52
7. DISCUSION	54
8. CONCLUSIONES	61
9. RECOMENDACIONES.....	62

10.	BIBLIOGRAFÍA	63
11.	ANEXOS	72
	Anexo 1. Ficha técnica de las lechas usadas en la intervención.....	72
	Anexo 2. Aval de comité de ética humana.....	73
	Anexo 3. (POE) Procedimientos Operacionales Estandarizados para preparación de agar Man Rogosa Sharpe.....	75
	Anexo 4. (POE) Procedimientos Operacionales Estandarizados de la preparación de agar Mitis Salivarios Bacitracina	78
	Anexo 5. (POE) Procedimiento Operativo Estándar para Características fisicoquímicas de la saliva	82

LISTA DE ABREVIATURAS

ICDAS: Sistema Internacional de Detección y Evaluación de Caries

SM: *Streptococcus mutans*

Lb: *Lactobacillus sp.*

ENSAB: Estudio Nacional de Salud Bucal

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Toma de muestra de saliva a los niños por parte de una odontopediatra.
- Figura 2.** Agar Mitis Salibarius con colonias de *S. mutans*.
- Figura 2.** Agar MRS con colonias de *Lactobacillus*.
- Figura 4.** pH metro digital.
- Figura 5.** Flujograma del ensayo clínico controlado (Criterios del CONSORT 2010).

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Criterios ICDAS para detección de caries dental y evaluación de severidad.

Tabla 2. Estudios del efecto de probióticos en factores de riesgo de la caries dental en niños.

Tabla 3. Riesgo de presentar caries dental sobre la base de la densidad del crecimiento de UFC de *S. mutans*.

Tabla 4. Niños perdidos y presentes en el grupo intervención y en el grupo control al final del estudio.

Tabla 5. Distribución de las muestras en los análisis clínicos y microbiológicos en el grupo intervención y en el grupo control al final del estudio.

Tabla 6. Características demográficas al inicio del estudio en el grupo intervención y en el grupo control.

Tabla 7. Estado del índice Ceo modificado $C_{(2-6\text{ ICDAS})}$ eo en el grupo de intervención y en el grupo de control al inicio y al final del estudio.

Tabla 8. Incremento y disminución de caries (Δcoe) en el grupo de intervención y en el grupo de control al final del estudio.

Tabla 9. Promedio de dientes por niño en los cuatro estados de severidad de la caries de acuerdo al criterio ICDAS, en el grupo intervención y en el grupo control al inicio y al final del estudio.

Tabla 10. Mediana del índice de placa bacteriana (IPB) en el grupo intervención y en el grupo control al inicio y al final del estudio.

Tabla 11. Cambios en el valor de pH salival en el grupo de intervención y en el grupo de control al inicio y al final del estudio.

Tabla 12. Cambios en la capacidad buffer de la saliva en el grupo de intervención y en el grupo de control al inicio y al final del estudio.

Tabla 13. Cambios en la presencia de *S. mutans* en saliva en el grupo de intervención y en el grupo de control al inicio y al final del estudio.

Tabla 14. Distribución de *S. mutans* en el grupo de intervención y en el grupo de control al inicio y al final del estudio.

Tabla 15. Cambios en la presencia de *Lactobacillus* en saliva.

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Ficha técnica de las leches usadas en la intervención.

ANEXO 2. Aval de Comité Institucional de Revisión de Ética Humana de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle.

ANEXO 3. (POE) Procedimientos Operacionales Estandarizados para preparación de agar Man Rogosa Sharpe.

ANEXO 4. (POE) Procedimientos Operacionales Estandarizados de la preparación de agar Mitis Salivarios Bacitracina.

ANEXO 5. (POE) Procedimiento Operativo Estándar para Características fisicoquímicas de la saliva.

RESUMEN

El interés en la terapia probiótica para prevenir enfermedades orales ha crecido notablemente a lo largo de los años. La eliminación de los miembros patógenos de la cavidad oral se ha intentado manejar con enfoques preventivos, donde los probióticos son candidatos para combatir bacterias mediante bacterioterapia debido a que tienen una capacidad para sobrevivir en un entorno ácido donde están presentes especialmente el *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus* sp causantes de la caries dental. Se ha encontrado que los probióticos causan un efecto de inhibición en la colonización de patógenos cariogénicos, ayudando así a reducir la incidencia de caries en los niños.

El objetivo de este estudio fue comparar el efecto de un alimento enriquecido con probióticos a base de *Lactobacillus rhamnosus* GG, sobre el recuento de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus* sp y la presencia de lesiones cariosas en niños de 3 a 4 años en Cali, Colombia después de 9 meses de intervención.

El estudio fue un ensayo clínico controlado doble ciego. Los participantes eran niños de 3 y 4 años (n = 124) que asistían a Centros de Desarrollo Infantil del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar (ICBF), en la zona de ladera de la ciudad de Cali, pertenecientes a estratos socioeconómicos 1 y 2. Los niños fueron asignados por conglomerados a 2 grupos paralelos: los niños del grupo de intervención recibieron 200 g de leche suplementada con el probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG 5×10^6 UFC/g y *Bifidobacterium longum* 3×10^6 ® mientras que los niños del grupo de control recibieron leche estándar, las dos leches idénticas en sabor y apariencia. Las intervenciones ocurrieron los días laborables durante 9 meses. La evaluación clínica de los participantes se evaluó utilizando el Sistema Internacional de Detección y Evaluación de Caries (ICDAS) y el Índice de placa de Silness y Løe modificado. Los recuentos de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus* se evaluaron con cultivos microbiológicos de saliva, además de incluyeron análisis del pH salival y la capacidad amortiguadora de las muestras de saliva no estimulada.

En los resultados el grupo probiótico mostró una disminución en la prevalencia de la caries pasando del 61% al inicio del estudio al 53,3% al final de la intervención, el grupo control mantuvo una prevalencia muy similar, de 48,9 al 47,2% respectivamente. Se redujeron significativamente los conteos salivales de *S. mutans* después de la intervención, con conteos <10.000 UFC/ml en el 86% del grupo probiótico. No se observaron diferencias significativas en el recuento de *Lactobacillus*. En las características fisicoquímicas de la saliva, no se encontraron diferencias significativas en el pH.

En conclusión, la ingesta regular a largo plazo de leche suplementada con probióticos tiene un efecto inhibitor sobre los conteos de *S. mutans* y puede ser beneficioso en la prevención del desarrollo de la caries en niños en edad preescolar.

SUMMARY

Interest in probiotic therapy to prevent oral diseases has grown markedly over the years. The elimination of pathogenic members of the oral cavity has been attempted with preventive approaches, where probiotics are candidates to fight bacteria by bacteriotherapy, because they have a capacity to survive in an acidic environment where *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus sp* causing tooth decay. It has been found that probiotics cause an inhibitory effect on the colonization of cariogenic pathogens, thus helping to reduce the incidence of caries in children.

The objective of this study was to compare the effect of a feed enriched with probiotics based on *Lactobacillus rhamnosus GG*, on the counts of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus sp* and the presence of carious lesions in children aged 3 to 4 years in Cali, Colombia after 9 months of intervention.

The study was a double-blind controlled clinical trial. The participants were children aged 3 and 4 ($n = 124$) who attend children's homes of the Colombian Institute of Family Welfare in the hillside area of the city of Cali belonging to socioeconomic strata 1 and 2. The children were assigned by clusters A 2 parallel groups: the children in the intervention group were give 200 g of milk supplemented with the probiotic *Lactobacillus rhamnosus GG* 5×10^6 UFC/g y *Bifidobacterium longum* 3×10^6 ® whereas the children in the control group received the standard milk, the two milks had indentical flavor and appearance. The interventions occurred on monday to friday for 9 months. For the clinical evaluation of the participants was used the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) and the modified Silness and L  e Plate Index. The counts of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* were evaluated with microbiological cultures of saliva, and in addition were made analyzes of the salivary pH and the buffering capacity of the samples of unstimulated saliva.

In the results, the probiotic group showed a decrease in the prevalence of caries from 61% at the start of the study to 53, 3% at the end of the intervention, the control group maintained a very similar prevalence, from 48.9% to 47.2%, respectively. Salivary counts of *S. mutans* were significantly reduced after the intervention, with counts $< 10,000$ CFU / ml in 86% of the probiotic group. There were no significant differences in *Lactobacillus* counts. In the physicochemical characteristics of saliva, no significant differences in pH were found.

In conclusion, the regular long-term intake of milk supplemented with probiotics has an inhibitory effect on *Streptococcus mutans* which can be beneficial in preventing the development of caries in preschool children.

1. INTRODUCCIÓN

Los probióticos son microorganismos vivos que tras la ingestión en concentraciones suficientes pueden ejercer beneficios para la salud del huésped. Esta definición de probióticos fue derivada en el 2001 por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), y ha sido el término de referencia para la ciencia y la reglamentación posterior (FAO / OMS 2002). La demanda de alimentos que contienen probióticos se está expandiendo a nivel mundial debido a que continua la generación de evidencias de investigaciones que indican sus beneficios potenciales para la salud de los consumidores (1).

Entre las estrategias con potencialidad para el control de la caries dental, se encuentran las acciones de detección temprana, el minimizar los factores de riesgo, la higiene oral, el control de la dieta, la aplicación de fluoruros y sellantes y el control biológico, este último se ha venido estudiando recientemente con el efecto de diferentes alimentos enriquecidos con probióticos y su efecto sobre microorganismos cariogénicos, principalmente el *Streptococcus mutans* y la salud oral en general (2, 4, 6).

La caries dental es la enfermedad bucal más común en el mundo, siendo un importante problema de salud pública, por su alta prevalencia, impacto en los individuos y en la sociedad, con alto costo de tratamiento para los servicios. Se presenta desde los primeros años de vida y puede llegar a ser una enfermedad crónica compleja destructiva que repercute el bienestar humano. La caries dental, resulta de la interacción a través del tiempo de distintos factores, como las características de los dientes, la saliva, la dieta alta en carbohidratos, la higiene oral y la salud general del individuo, permitiendo así que algunos microorganismos de la placa bacteriana causen la desmineralización del esmalte dental con ácidos producidos en el metabolismo microbiano y los proceso de remineralización del diente que producen desequilibrio mineral, además de la pérdida del balance ácido de la boca, acidificándose el medio y contribuyendo a la proliferación de bacterias altamente cariogénicas, entre estas se encuentra *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus* sp. (7, 8, 9, 15, 16).

Los productos alimenticios funcionales con probióticos se asemejan a los alimentos convencionales en términos de apariencia, pero están compuestos de componentes bioactivos que pueden ofrecer beneficios fisiológicos para la salud más allá de las funciones nutritivas. Dentro de la odontología, estudios previos con probióticos de cepas de lactobacilus como *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus reuteri* con ingestas a corto plazo, han demostrado que pueden inhibir el crecimiento o una colonización reducida de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus* sp asociados a caries dental (2, 24, 22, 20, 19).

Por lo anterior, el propósito de esta investigación fue identificar el efecto de un alimento enriquecido con probióticos a base de *LGG*, sobre el recuento de Unidades Formadoras de Colonia de *Streptococcus mutans* y la presencia de lesiones de caries en niños de 3 a 4 años en Cali, Colombia.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 Pregunta de investigación

¿Cuáles son los efectos de un alimento enriquecido con probióticos a base de *Lactobacillus rhamnosus GG* sobre los recuentos de unidades formadoras de colonia de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus* sp. y la presencia de caries incipiente en niños de 3 a 4 años en Santiago de Cali?

2.2 Justificación

En el año 2001 la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), reconocen los probióticos con microorganismos vivos que tras la ingestión en concentraciones suficientes pueden ejercer beneficios para la salud del huésped, lo que ha sido el término de referencia para la ciencia y la reglamentación posterior (1). Entre los probióticos más evaluados en cavidad bucal se encuentran *L. rhamnosus GG*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus bulgaricus*, entre otros (2, 4, 3, 5). Como se mencionó, la ingesta de *L. rhamnosus GG* ha mostrado una disminución en el recuento de UFC de *Streptococcus mutans*, un efecto inhibitorio de la microbiota oral patógena, una reducción en la aparición de nuevas lesiones de caries dental y un efecto benéfico en la salud oral posterior al consumo (6, 4).

La formación de la placa bacteriana es un proceso natural, propio de la dinámica bucal; por tal motivo, hoy en día se considera que la caries dental es un proceso cambiante, ininterrumpido de desmineralización y remineralización del esmalte dental (7, 8). Aunque se acepta que la etiología de la caries dental es multifactorial, algunos microorganismos en la placa bacteriana son necesarios más no suficientes para el proceso, entre estos se encuentra *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus* sp (9).

En Colombia, el Plan Nacional de Salud Pública 2007-2010 destacó como prioridades nacionales en salud, la salud de los niños y la salud oral (10). El Plan Decenal de Salud Pública 2012-2021 (11), propone como metas del Componente de Condiciones crónicas

prevalentes para el 2021, "incrementar en el 20% la población del país sin caries, con énfasis en la primera infancia, niñez y adolescencia índice de Caries Dental (COP=0) (10).

La mención que hace el Ministerio de Salud y Protección Social se revela en varios estudios que han determinado una prevalencia de caries dental superior al 60% en niños menores de seis años (12, 13, 14). El desarrollo de estas lesiones clínicamente visibles puede controlarse mediante la aplicación de algunas estrategias entre las que se encuentran la detección temprana de los factores de riesgo, la educación en higiene oral, el control de la dieta, la aplicación de fluoruros y sellantes, y el control biológico (15).

Aunque en Colombia, hasta el momento no se encuentran publicaciones sobre el control biológico de los microorganismos en cavidad bucal, en otros países se ha investigado el efecto de diferentes alimentos enriquecidos con probióticos y su efecto sobre *Streptococcus mutans*, principalmente (2, 4, 6, 16). El periodo de seguimiento de estos estudios ha sido breve (dos semanas a siete meses) pero los resultados han mostrado una reducción en el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *Streptococcus mutans* tanto en niños como en adultos, al usar la cepa LGG (2, 17).

De acuerdo con los estudios de referencia, los ensayos clínicos controlados realizados en niños para evaluar el efecto de la administración probióticos en la colonización oral de *Streptococcus mutans*, encuentran que los sujetos recibieron bacterias probióticas utilizando diferentes vehículos (2, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24), sólo dos estudios no demostraron ningún cambio en los niveles de *S. mutans* (4). En un ensayo clínico en el que la cepa LGG estaba presente en la leche que consumían niños preescolares durante cinco días por siete meses, se encontró que el 6% de los niños de 3 a 4 años del grupo experimental presentaron nuevas lesiones de caries dental comparado con el 15% del grupo control (2). De acuerdo con Stecksen-Blicks (24) y Twetman (25), sería necesario tratar a once niños para que uno se encuentre libre de la enfermedad. Por lo tanto, esta es una alternativa de control del proceso de caries dental que merece atención puesto que podría ser una medida fácil de implementar y sus beneficios se reflejarían en una disminución de la prevalencia de caries dental en nuestro país, en un grupo etario especialmente vulnerable al daño dental.

Por lo anterior, esta investigación pretende evaluar el efecto de un alimento enriquecido con probióticos a base de LGG, sobre el recuento de Unidades Formadoras de Colonia de *Streptococcus mutans* y la presencia en lesiones de caries en niños de 3 a 4 años en Cali, Colombia, a partir de la evaluación clínica de la caries dental y análisis microbiológico de la saliva, en el inicio y con seguimientos durante el tratamiento a un grupo intervenido y un grupo control.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Caries dental

El término caries dental se usa para describir los signos y síntomas de la disolución de la superficie dental, con la destrucción localizada de los tejidos duros dentales, susceptibles a los subproductos ácidos formados por bacterias en el proceso de metabolismo de los azúcares derivados de la dieta (9). Los signos de la desmineralización cariosa se observan en los tejidos dentales duros, pero el proceso de la enfermedad se inicia dentro de la placa bacteriana que cubre la superficie del diente. La caries dental es una enfermedad crónica que progresa lentamente en la mayoría de las personas, en su etapa inicial es reversible y puede detenerse en cualquier etapa. (26).

Es una enfermedad compleja o multifactorial desde una perspectiva de causalidad, con la interacción a través del tiempo de factores microbiológicos, genéticos, inmunológicos, conductuales y ambientales que contribuyen a su riesgo y gravedad (27). El desarrollo de la caries requiere azúcares y bacterias, pero es influenciado por la susceptibilidad del diente, el perfil bacteriano, la cantidad y calidad de la saliva, los bajos niveles de fluoruro, el tiempo durante el cual los carbohidratos fermentables están disponibles para la fermentación bacteriana, es decir, la frecuencia de la ingesta de azúcar y los comportamientos preventivos como la limpieza de los dientes. La caries dental es el resultado de un desequilibrio ecológico entre los minerales del diente y los microbiológicos orales (9).

Las bacterias viven en los dientes en microcolonias que están encapsuladas en una matriz orgánica de polisacáridos, proteínas y ADN secretados por las células, protegidas contra la desecación, defensas del hospedero y depredadores, que proporciona mayor resistencia a los agentes antimicrobianos (28). Los mecanismos del proceso de caries son similares para todos los tipos de caries. Las bacterias endógenas (9, 29) como *Streptococcus* en gran parte mutans (*Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacillus* sp) producen ácidos orgánicos débiles como subproducto del metabolismo de los carbohidratos fermentables en la placa dental o biofilm. Este ácido hace que los valores de pH local caigan por debajo de un valor crítico que da lugar a la desmineralización de los tejidos dentales (30, 31, 29).

La desmineralización puede ser reversible en sus etapas iniciales mediante la absorción de calcio, fosfato y flúor, evitando que continúe la difusión del calcio, fosfato y carbonato propios del diente, y de este modo no llegar a estados severos de caries cavitada. El mecanismo de acción del flúor permite catalizar la difusión de calcio y fosfato en el diente, para remineralizar las estructuras cristalinas en la lesión (32).

3.2 Factores etiológicos de la caries

La caries dental es una enfermedad infecciosa producida por la biopelícula bacteriana que se expresa en un ambiente bucal predominantemente patológico. A pesar que las bacterias acidogénicas han sido aceptadas como el principal agente etiológico, la caries dental es considerada como multifactorial, ya que también participan factores dietéticos y del huésped (33).

Uno de los principales factores etiológicos de la caries es *S. mutans*, es particularmente eficaz en la formación de biofilms en los tejidos duros de la cavidad oral humana. El biofilm presente en la cavidad oral es una estructura tridimensional, que consisten en cepas bacterianas en fase fluida, que se anclan a superficies sólidas tales como esmalte de dientes, raíces de dientes o implantes dentales, que están recubiertas por una película de saliva, embebidos en una matriz de exopolisacáridos, esta superficie es reconocida por las bacterias que en fase fluida (planctónica) que se adhieren a esa película por medio de adhesinas especializadas de la superficie celular bacteriana que reconocen las proteínas de la película (34).

La estructura y composición de la matriz exopolisacárida está determinada por las condiciones existentes en la cavidad oral y cambia con el tiempo. Los polisacáridos extracelulares (EPS) también afectan las propiedades físicas y bioquímicas de la biofilm. Las fuentes primarias de EPS son glucosiltransferasa (Gtf) y fructosiltransferasa (Ftf), productos de interacción con sacarosa e hidrolizados de almidón. (35, 36). La adhesión de *S. mutans* a las superficies dentales es el primer paso en la formación de biofilms y está mediada por mecanismos dependientes de sacarosa y sin sacarosa. *S. mutans* expresa varias adhesinas superficiales que se pueden unir a las películas salivales formadas en los dientes, mientras que la adhesión dependiente de la sacarosa está mediada por las proteínas de unión al glucano (37, 38, 34).

La exposición a sacarosa o una combinación de sacarosa y almidón da lugar a la formación de glucano in situ que proporciona sitios de unión para una diversidad de microorganismos. La estructura y la arquitectura tridimensional de la matriz de polisacárido probablemente cambian con el tiempo como resultado de los desafíos ambientales encontrados en la cavidad oral, como la acción de mutanasa y dextranasa encontradas dentro de la placa (35, 36). El proceso de formación de biofilm comienza con el recubrimiento de la superficie del diente a través de la película salivar. Esta película está formada por componentes salivales, 80% agua, 13% proteínas salivares tales como proteínas ricas en prolina, amilasa, lisozima, histatina, peroxidasa, mucina, 5% glucanos y 2% fuctanos, que dan lugar a los componentes bacterianos, como Ftf, Gtf, ácido lipoteicoico, adsorbido específicamente en la lámina de esmalte adquirida (AEP), que es la base para la formación de biofilm inducida por microorganismos que coloniza la cavidad oral (35, 34).

La aparición de la caries dental no depende de manera exclusiva de los factores etiológicos primarios, sino que la generación de la enfermedad requiere de la intervención adicional de otros factores, llamados moduladores, los cuales contribuyen e influyen decisivamente en el surgimiento y evolución de las lesiones cariosas. Entre ellos se encuentran: el tiempo, la edad, la salud general, fluoruros, escolaridad, nivel socioeconómico, experiencia pasada de caries y grupo epidemiológico. Las variables de comportamiento son aquellas acciones individualizadas de carácter voluntario, relacionadas con las costumbres culturales inherentes a cada individuo, que también intervienen en la aparición y desarrollo de la enfermedad. Entre ellas son especialmente importantes las concernientes al cuidado de la salud bucal, como: cepillado, uso de hilo dental, consumo de azúcares y frecuencia de visitas al dentista. (9).

El desarrollo económico y la condición socioeconómica son factores fuertemente relacionados con la etiología de la caries dental puesto que los niños de estrato socioeconómico alto tienen mayor posibilidad de realizar su higiene bucal con pasta de dientes con flúor y de forma frecuente (39). Además, se ha encontrado una fuerte asociación entre la frecuencia del cepillado de los dientes y la prevalencia de caries dental (40). Para la ciudad de Cali, (41) se reportó que los estratos socioeconómicos con mayor proporción de caries dental fueron los de nivel bajo, correspondiente al uno y dos. Así mismo observaron que los niños que no se cepillaban los dientes antes de ir a la cama presentaban más lesiones de caries dental (41).

3.3 Placa bacteriana oral

La cavidad oral humana alberga un complejo ecosistema microbiano caracterizado por la variabilidad espaciotemporal en la composición de las especies, los microorganismos que la habitan se encuentran principalmente en forma de placa dental o biofilms, que se desarrollan progresivamente en 4 horas después de las comidas en ausencia de higiene oral (42). El proceso se inicia a través de una unión de baja afinidad de células en fase fluida a un sustrato, seguido por una adhesión de alta afinidad mediada por receptores específicos. Las microcolonias se desarrollan al crecer y dividir las células unidas, a veces denominadas película de unión. Posteriormente, el reclutamiento de células de la fase fluida conduce al desarrollo posterior de la comunidad. Además, el reclutamiento de múltiples especies en estrecha proximidad, conduce a la formación de comunidades multiespecíficas (polimicrobianas), lo que representa la situación más común en la naturaleza. La integridad de la comunidad de biofilm se mantiene mediante la adhesión inter-microbiana, la señalización celular mediante el contacto célula a célula y la comunicación metabólica (43).

Un biofilm completamente desarrollado contiene microorganismos, matriz extracelular y ADN extracelular, su desarrollo y mantenimiento es un factor esencial para la supervivencia y crecimiento microbiano, tanto en el medio ambiente como en el huésped. Las células experimentan una multitud de cambios en la transición de la fase fluida al biofilm de crecimiento. Estos comienzan con la detección de señales difusibles que son secretadas por un conjunto de células microbianas y reconocidas por otros. La adherencia célula a célula específica según lo dictado por los pares de adhesina-receptor sobre las respectivas superficies bacterianas también puede dirigir el desarrollo de la comunidad (44).

En la placa bacteriana oral o biofilm, los colonizadores primarios como los *Streptococcus* y los *Actinomyces*, se unen a la película salivar, que recubre el esmalte, posteriormente crecen junto con colonizadores secundarios como los *Lactobacillus* y desarrollan gradualmente comunidades. La secreción salival del huésped frustra la capacidad de las células en fase fluida de crecer antes de ser tragadas. Por lo tanto, las bacterias orales evolucionaron para formar biofilms en superficies de dientes duros y en tejidos epiteliales blandos, que a menudo contienen múltiples especies bacterianas. (45). Recientemente se ha apreciado la prevalencia de biofilms de especies mixtas y su implicación en diversas infecciones. Esta apreciación ha destacado la necesidad de una mejor comprensión de las interacciones y dinámicas dentro de las comunidades mixtas, lo cual es necesario para prevenir o tratar con éxito infecciones que involucran biofilms mixtos como la caries dental (46).

En esta patología infecciosa, las bacterias *Streptococcus* del grupo mutans, principalmente *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, son las que se han asociado con mayor frecuencia al desarrollo de lesiones cariosas (47). Estos microorganismos juegan un rol vital en la patogenia de la caries, debido a su capacidad para favorecer la desmineralización del diente. Sin embargo, es importante recordar que esta patología es multifactorial e intervienen tanto factores personales como ambientales, dentro de los que destacan la susceptibilidad genética individual, las características del diente y la saliva, la dieta, los hábitos higiénicos, el nivel educacional.

En la placa, cuando ciertas cepas dañinas crecen en mayor número, pueden contribuir y causar enfermedades bucales, como la caries dental. Los carbohidratos en la dieta tienen una influencia sobre el equilibrio de la microbiota oral residente, debido a la sustitución de los azúcares simples por una glucoproteína (mucina), metabolizados por bacterias cariogénicas como *S. mutans* y lactobacilos. Las personas que consumen frecuentemente azúcar en su dieta corren mayor riesgo de caries dental. En estudios con animales o estudios epidemiológicos de seres humanos, no se ha podido determinar si el aumento de las bacterias cariogénicas se debe a la súbita disponibilidad de azúcar en sí o es una respuesta a las inevitables condiciones bajas de pH después del catabolismo del azúcar, conduciendo a la degradación de la homeostasis microbiana en la placa dental. (48).

3.4 Clasificación de las lesiones de caries dental

El avance en el conocimiento y comprensión del proceso de formación de la caries dental, orienta a que se analice su magnitud y severidad a través de varios índices, que permitan evidenciar la progresión de la lesión desde los estadios incipientes (opacidad en superficie del esmalte) hasta la caries avanzada (con cavitación evidente), lo que permite la detección temprana y acciones en protección específica.

3.4.1 Sistema internacional de clasificación y manejo de caries (ICCMSTM)

La detección de caries dental en la etapa más temprana es de suma importancia. La caries dental es un proceso biológico reversible en las primeras etapas. Si se detecta caries dental en la fase no cavitada, puede ser posible aumentar la remineralización o inhibir la desmineralización mediante medidas preventivas apropiadas. Sin embargo, la mayoría de los métodos de detección de caries eran ambiguos y tenían en cuenta sólo las lesiones cavitadas (49). El Sistema Internacional de Detección y Evaluación de Caries (ICDAS), desarrollado método visual para la detección de caries dental, para clasificar las diversas etapas del proceso carioso que se extiende desde cambios clínicamente visibles en el esmalte a cavitaciones. La característica esencial de la ICDAS es la subdivisión de las etapas del desarrollo de la caries dental en un número variable de categorías discretas y predecibles basadas en la extensión histológica de la lesión dentro del diente (50).

El Sistema Internacional de Detección y Evaluación de Caries (ICDAS), sirve para la detección y evaluación de la caries dental en la investigación clínica y epidemiológica, así como la práctica clínica. Este nuevo énfasis en la medición y el tratamiento de la caries puede indicar que la comunidad odontológica en todo el mundo ha empezado a reconocer la necesidad de nuevos enfoques en la detección de caries, la evaluación y gestión.

ICDAS mide los cambios superficiales y la posible profundidad histológica de las lesiones cariosas dependiendo de las características de la superficie. El requisito primario para la aplicación del sistema ICDAS es realizar el examen en dientes limpios y secos. El instrumento usado es un explorador terminado bola para quitar cualquier placa o restos del alimento. Es muy recomendable que los dientes se limpien con un cepillo de dientes o una cabeza de profilaxis antes del examen clínico (51).

Los códigos ICDAS para la caries varían de 0 a 6 dependiendo del grado de la lesión (50). La clasificación de la caries coronal incluye la caries primaria y la caries cavitada como un solo sistema de clasificación (Tabla 1).

Tabla 1. Criterios ICDAS para detección de caries dental y evaluación de severidad

Superficies sanas (código ICDAS 0)		Superficie dental sana sin evidencia de caries visible (sin cambio o con cambio cuestionable en la translucidez del esmalte) cuando se observa la superficie limpia y después de secado prolongado con aire (5 segundos).
Estadío inicial de caries (códigos ICDAS 1 y 2)		Primer cambio visible o cambio detectable en el esmalte visto como una opacidad de caries o decoloración visible (lesión de mancha blanca y/o café) no consistente con el aspecto clínico del esmalte sano (código ICDAS 1 o 2) y que no muestran ninguna evidencia de ruptura de superficie o sombra subyacente en dentina.
Estadío moderado de caries (códigos ICDAS 3 y 4)		Una lesión de mancha blanca o café con ruptura localizada del esmalte, sin dentina expuesta visible (código ICDAS 3), o una sombra subyacente de dentina (código ICDAS 4), que obviamente se originó en la superficie que se está evaluando. (Para confirmar la ruptura localizada del esmalte, una sonda de la OMS, que tiene una bola en el extremo, se puede pasar suavemente a través del área del diente, se detecta una discontinuidad limitada si la bola cae en la micro-cavidad/discontinuidad).
Estadío severo de caries (códigos ICDAS 5 y 6)		Cavidad detectable en esmalte opaco o decolorado con dentina visible (códigos ICDAS 5 o 6). (Una sonda de la OMS puede confirmar si la cavidad se extiende dentro de la dentina).

*Editada de ICDAS fundation website www.icdas.org la Guía ICCMS™ para clínicos y educadores. Taller de implementación del Sistema de Clasificación y Manejo de Caries (ICCMS™), Junio 2013. (52)

3.4.2 Índice ceo

Fue desarrollado por Klein, Palmer y Knutson durante un estudio del estado dental y la necesidad de tratamiento de niños asistentes a escuelas primarias en Hagerstown, Maryland, EE. UU., en 1935 (53). Se ha convertido en el índice fundamental de los estudios odontológicos que se realizan para cuantificar la prevalencia de la caries dental. Señala la experiencia de caries tanto presente como pasada, pues toma en cuenta los dientes con lesiones de caries y con tratamientos previamente realizados.

Para la dentición temprana se consideran los 20 dientes y se calcula el ceo sumando los dientes temporales cariados, extraídos y obturados. (54). Para obtener el ceo de un grupo, la sumatoria se divide en el total de individuos examinados, por lo que es un promedio. Para su mejor análisis e interpretación se debe descomponer en cada una de sus partes y expresarse en porcentaje o promedio. Esto es muy importante al comparar poblaciones.

En los niños se utiliza el **ceo** (dientes temporales) en minúscula, las excepciones principales son, los dientes extraídos en niños por tratamiento de ortodoncia o perdidos por accidentes, así como coronas restauradas por fracturas. El ceo, no se incluyen los dientes extraídos con anterioridad, sino solamente aquellos que están presentes en la boca el (e) son extracciones indicadas por caries solamente, no por otra causa.

3.5 Caries de la de la infancia temprana

La caries de la infancia temprana (CIT) es un término reciente que describe la caries dental en los niños. Según la Academia Americana de Odontología Pediátrica (AAPD), la presencia de una o más lesiones cariadas (no cavitadas o cavitadas), dientes ausentes debido a caries o superficies dentales obturadas en cualquier diente primario en un niño menor a 71 meses de edad (9).

Se desarrolla en las superficies de los dientes anteriores y también puede afectar los molares primarios superiores o mandibulares. Comienza con lesiones de mancha blanca en los incisivos primarios superiores a lo largo del margen de la encía. Si la enfermedad continúa, la caries puede progresar y conducir a la destrucción completa de la corona (De 55). El microorganismo más importante en el proceso de la caries es *Streptococcus mutans*, es conocido por colonizar la cavidad oral tan pronto como el tejido dental duro está presente, estas bacterias son transmitidas verticalmente de la madre o el cuidador en general al niño (56).

3.5.1 Lesiones cariosas de la infancia temprana

La presencia de concentraciones localizadas y elevadas de ácidos en la superficie de fijación de biofilm tiene relevancia clínica, ya que podría explicar el patrón heterogéneo de lesiones cariosas durante el inicio de esta enfermedad en humanos. La caries dental se caracteriza por el aspecto temporal y localizado/punteado de las regiones de desmineralización en el esmalte de los dientes bajo la placa, clínicamente conocido como manchas blancas (57). Estas manchas blancas eventualmente se fusionan en una lesión más amplia, en lugar de una capa difusa y homogénea de erosión. De este modo, la aparición de las lesiones y el nivel de desmineralización pueden asociarse con el tamaño de los complejos de microcolonia bacterianas unidas a superficie (36).

La enfermedad es caracterizada por la presencia de lesiones en superficies lisas, con mayor frecuencia en los incisivos superiores y en los primeros molares deciduos; este patrón de enfermedad es importante debido al progreso rápido y destructivo. Se observan lesiones de mancha blanca desde que los incisivos aparecen en la boca, si no se realiza una intervención temprana en poco tiempo evolucionarán a lesiones cavitadas localizadas en el tercio gingival, aunque también puede presentarse en las superficies proximales expuestas. Los caninos y los segundos molares pueden afectarse a medida que erupcionan (9).

3.5.2 Prevalencia de la caries en dentición temporal en Colombia

El ENSAB IV (58), es una iniciativa del Ministerio de Salud y Protección Social en procura de caracterizar las condiciones de salud-enfermedad bucal de la población colombiana y aproximarse de manera comprensiva a los aspectos sociales que, al parecer, podrían determinar o influenciar estas condiciones a lo largo del curso de vida. La inclusión de la primera infancia da un panorama sobre la política de infancia que garantiza el desarrollo integral de los niños y de las niñas como un derecho universal, entendiendo la primera infancia como una etapa que inicia desde su gestación hasta los 6 años de vida, crucial para el desarrollo pleno en todos sus aspectos: biológico, psicológico, cultural y social. El abordaje de estas edades en un estudio de salud bucal poblacional se considera de gran importancia por el conocimiento del comportamiento de las condiciones de salud-enfermedad bucal a tempranas edades.

El ENSAB IV se consideró por primera vez en la valoración de la caries de la infancia temprana los niños de 1 y 3 años, encontrando que el 29,31% de los niños de 1 año ya presentaban experiencia de caries, es decir que en su corta vida ya han presentado al menos 1 diente con caries avanzada sin tratamiento, o dientes obturados por caries o perdidos por la misma causa. Continuando con la tendencia de la enfermedad, la experiencia de caries se incrementa hasta 83,03% a los 3 años y 88,83% a los 5 años. La experiencia de caries hace referencia a la proporción de niños que, al momento del examen en el estudio, presentan

evidencia de caries en alguna de sus fases (estadio incipiente o avanzado) y secuelas (obturados o perdidos por caries).

Cuando se identifica y clasifica la severidad de la caries desde los estadios incipientes que afectan las superficies del esmalte, hasta las lesiones avanzadas con presencia de cavitación que comprometen incluso la dentina. En la dentición temporal, los niños de 1, 3 y 5 años presentan en promedio 2,69 dientes con severidad 2 según criterios ICDAS, indicando los primeros cambios visibles en el esmalte. Esto es relevante en la medida en que al primer año, cuando hay en promedio 11 dientes presentes en boca, ya se presentan en promedio 0,86 dientes que dan señales de estadios incipientes de caries. Para los 3 y 5 años el índice para la severidad 2 (Caries incipiente), se incrementa a 3,62 y 3,63 respectivamente. En estas edades también se incrementa el promedio de dientes con severidad 5, es decir con cavidad detectable con dentina visible siendo de 0,15 en los niños con el primer año de vida, de 1,10 y de 1,23 a los 3 y 5 años respectivamente.

Los índices ceo, hacen referencia al promedio de dientes que en la población presentan al momento del examen con caries avanzada, obturaciones y pérdidas dentales por caries. El valor promedio del ceo modificado $C_{(2-6 \text{ ICDAS})eo}$ en la dentición temporal para el total de niños de 1, 3 y 5 años se encuentra en 4,57; solo para los niños de 1 año el $C_{(2-6 \text{ ICDAS})eo}$, se halla en 1,10 pasando a las edades de 3 y 5 años a 5,86 y 6,78 respectivamente (58) .

3.6 Aspectos físicos y químicos de la saliva

La saliva humana es un fluido bucal que tiene varias funciones implicadas en la salud oral y la homeostasis, con un papel protector activo en el mantenimiento de la salud bucal. La saliva es esencial para una conservación de toda la vida de la dentición. Varias funciones de la saliva están implicadas en el mantenimiento de la salud oral y la protección de los dientes:

- La superficie del diente está protegida contra el desgaste de forma continua mediante una capa de mucinas salivales y glicoproteína rica en prolina.
- Las proteínas tempranas peliculares, proteínas y estaterina ricas en prolina, promover la remineralización del esmalte mediante la atracción de los iones de calcio.
- La desmineralización es retardada por las proteínas peliculares, en concierto con los iones de calcio y fosfato en la saliva y en el fluido de la placa.
- Las glico proteínas salivales impiden la adherencia de microorganismos orales a la película de esmalte y inhiben su crecimiento.
- La capacidad amortiguadora de la saliva (bicarbonato/carbonato) es responsable de la rápida neutralización de los ácidos.

En la saliva humana se presenta en los principales sistemas de antimicrobianos. No sólo los conocidos grandes glicoproteínas salivales, incluyendo mucinas, glicoproteína rica en prolina e inmunoglobulinas, sino también una serie de glicoproteínas salivales menores, incluyendo aglutinina, lactoferrina, cistatinas y lisozima, participan en la primera línea de defensa en la cavidad oral. Además, los pequeños péptidos antimicrobianos catiónicos, por ejemplo, defensinas, catelicidina y las histatinas, han entrado en el foco. Estos son potencialmente adecuados como plantillas para el diseño de una nueva generación de antibióticos, ya que matan un amplio espectro de microorganismos. Los análisis de saliva se han utilizado principalmente en odontología y para estudios en enfermedades bucales para ayudar a evaluar el riesgo de caries, midiendo la capacidad del buffer salival y el contenido bacteriano (59)

La saliva ayuda a la formación de bolo al humedecer los alimentos, protege la mucosa oral contra los daños mecánicos y desempeña un papel en la digestión preliminar de los alimentos mediante la presencia de α -amilasa y otras enzimas. También facilita la percepción del gusto y también tiene un papel en el mantenimiento de la mineralización del esmalte de los dientes. Los estudios de saliva es un área cada vez mayor de investigación con implicaciones para fines básicos y clínicos. Aunque este fluido biológico es fácil de manipular y recoger, una cuidadosa atención debe ser dirigida a limitar la variación en la integridad de la muestra (60).

La saliva desempeña un papel muy importante en la salud oral. Basándose en los componentes de la saliva, adopta propiedades tales como lubricación, eliminación de sustancias no deseadas, digestión, neutralización de ácidos o bases, protección contra la desmineralización y también un papel antimicrobiano (61). La saliva controla el equilibrio entre la desmineralización y la remineralización en un ambiente cariogénico. La capacidad amortiguadora de la saliva puede revertir el pH bajo de la placa y permitir la depuración oral, evitando así la desmineralización del esmalte (62).

La saliva bañando constantemente los dientes y la mucosa oral, funciona como una solución limpiadora, un lubricante, un amortiguador y un depósito de iones de calcio y fosfato que son esenciales para la remineralización de las lesiones cariosas iniciales. Los desequilibrios en los niveles de radicales libres, especies de oxígeno reactivo y antioxidantes en la saliva pueden jugar un papel importante en el inicio y desarrollo de la caries dental (63). Se ha reconocido desde hace tiempo que la saliva sirve como un espejo de la salud del cuerpo, ya que contiene proteínas, hormonas, anticuerpos y otras moléculas que se miden con frecuencia en los análisis de sangre estándar para controlar la salud y la enfermedad. Sin embargo, a diferencia de la sangre entera, la saliva es fácil de recoger, menos dolorosa para el paciente y es menos infecciosa para el proveedor de atención médica. Los individuos sanos producen alrededor de un litro y un cuarto de saliva por día. (59)

3.6.1 Capacidad amortiguadora de la saliva y pH

Bajo condiciones de reposo sin la estimulación exógena que está relacionada con la alimentación, hay un flujo lento de saliva que mantiene la boca húmeda y lubrica la membrana mucosa. Este flujo no estimulado, es lo que es secretado por las glándulas salivales la mayoría del tiempo. La saliva no estimulada es esencial para la salud y el bienestar de la cavidad oral y también otorga un fuerte efecto protector a la cavidad oral contra la caries dental.

La eliminación de la placa facilita la eliminación de la caries, dando como resultado menos bacterias cariogénicas, menos acumulación de carbohidratos y, en última instancia, menos producción de ácido. En muchos estudios, la presencia de placa se atribuyó a la disminución del pH salival. (64, 65). Las observaciones en poblaciones humanas sobre la relación entre el caudal total de saliva y la experiencia de caries de un individuo no han sido concluyentes. Estudios anteriores indicaron que una alta tasa de flujo se asocia con niveles bajos de caries. Sin embargo, ha surgido una correlación más clara entre el poder de amortiguación de la saliva total y la experiencia de la caries, con una mayoría de estudios que muestran la relación inversa predicha (66).

La capacidad amortiguadora de ácidos (buffer) de la saliva se cumple a través de los siguientes componentes: bicarbonato, fosfato, urea y proteínas anfóteras y enzimas. El bicarbonato es el sistema de amortiguamiento más importante. Se difunde en placa y actúa como un tampón neutralizando ácidos. Además, genera amoníaco para formar aminas, que también sirven como un tampón neutralizando ácidos. Más del 90% de la capacidad tampón de la saliva no proviene de bicarbonato, se atribuye a péptidos ricos en histidina de bajo peso molecular. La urea es otro tampón presente en la saliva, libera amoníaco después de ser metabolizado por la placa y por lo tanto aumenta el pH de la placa (67). La acción amortiguadora de la saliva funciona más eficientemente durante los altos caudales estimulados, pero es casi ineficaz durante los períodos de bajo flujo de saliva no estimulada, donde se evidencia principalmente la acción tampón del fosfato (68).

La saliva que está sobresaturada con calcio y fosfato actúa como reservorio para iones esenciales (69). En un ambiente propicio, el proceso de remineralización supera a la desmineralización. Los valores más altos de antioxidantes totales se han encontrado en niños con caries activa (70). En otros estudios Se ha encontrado que pH y la capacidad de amortiguación tienen una correlación débil con la actividad de caries (70), independientemente de la edad y el sexo (69). Por lo tanto, se puede especular que otros factores como la microbiota, la dieta y la retención de alimentos pueden dominar en el inicio de la caries, que es una enfermedad multifactorial.

3.7 Probióticos

Alrededor de 1900, se sugirió por primera vez administrar bacterias «sanas» para restaurar la composición microbiana y de este modo, inducir un efecto terapéutico (71). Los probióticos pueden definirse como microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades adecuadas, confieren un efecto sobre la salud del huésped. (1). Una bacteria probiótica puede mejorar la microbiota oral y competir con bacterias patógenas en los primeros años de vida (72). Marsh (48) afirmó que "las bacterias potencialmente cariogénicas pueden encontrarse naturalmente en la placa dental, pero a pH neutro, estos organismos son débilmente competitivos y están presentes sólo como una pequeña proporción de la comunidad total de placas". En este punto los probióticos podrían ser candidatos para combatir estas bacterias en la placa dental mediante bacterioterapia. Estudios a corto y largo plazo sobre el consumo de probióticos en niños, han demostrado propiedades favorables en el mantenimiento de la salud oral (2, 20).

Los probióticos tienen un efecto potencial sobre la composición microbiana salival, promoviendo la inhibición de la caries dental debido a su contenido de caseína, calcio y fósforo (73). Se ha documentado que el pH ácido y el contenido de sacarosa de los productos lácteos permiten la formación de biopelículas y facilitan la adhesión de *Lactobacillus* a la superficie dental y el desarrollo de la caries (74). En este punto, la relación entre los productos lácteos y las bacterias cariogénicas en la placa dental es un tema importante. Las especies acidogénicas y acidúricas de productos lácteos pueden inhibir otros organismos competidores y hacer que su ambiente local, sea aún más ácido. Algunas especies de probióticos pueden desempeñar un papel en el mantenimiento de la salud mediante la promoción de un equilibrio microbiológico en la cavidad oral y factores de defensa oral, como el sistema de peroxidasa salival que puede inhibir la acidogenicidad de las bacterias (75). Algunos estudios encontraron que la producción de polisacáridos extracelulares insolubles en el biofilm derivado de un producto de leche probablemente se redujo debido a la acción probiótica sobre la actividad bacteriana, probablemente alterando el metabolismo específico de *Streptococcus mutans* (76).

Estudios in vitro involucraron la importancia del mecanismo de coagregación, un factor clave en la formación de biofilm y el desarrollo de placas dentales, entre los probióticos y la *S. mutans* (77, 25), lo cual puede explicar parcialmente la reducción de los recuentos de *S. mutans*. Asumieron que las habilidades de coagregación de las cepas probióticas podrían haber permitido la formación de una barrera que impida la colonización por bacterias patógenas. Un estudio in vitro señaló la actividad antimicrobiana dependiente del pH de los probióticos, en la que también se obstaculizó la actividad de adhesión de *S. mutans* (78). Aunque los altos recuentos de *S. mutans* no necesariamente significan un aumento del riesgo de caries, disminuir la *S. mutans* sin afectar a la flora normal debería hacer que la placa sea menos virulenta (79).

L. rhamnosus GG (LGG), es la bacteria probiótica más estudiada. Fue originalmente aislado del intestino humano en 1985 y nombrado después del descubrimiento (80). Los efectos benéficos de LGG sobre la salud humana se documentaron pronto en muchos estudios experimentales y clínicos (81). Partiendo de los estudios realizados in vitro, Ahola *et al* (4) reveló que LGG podría inhibir la colonización de patógenos cariogénicos, ayudando así a reducir la incidencia de caries en los niños. Haukioja *et al* (82) también reveló que es capaz de modificar la composición proteica de la película salival, específicamente evitar la adhesión de *S. mutans*.

Se han realizado diferentes estudios in vivo para probar el efecto de la administración de probióticos en el desarrollo de lesiones de caries y en el control de factores de riesgo de caries como la microbiota cariogénica, pH y capacidad buffer de la saliva, todos estos ensayos clínicos aleatorios varían en su diseño, las cepas de probióticos usada, la duración de las intervenciones y las dosis utilizadas. Los estudios que han usado como única o parte del tratamiento probiótico la cepa LGG han mostrado efectos positivos en los factores de riesgo de la caries dental (Tabla 2).

Tabla 2. Estudios del efecto de probióticos en factores de riesgo de la caries dental en niños

Autor	sujetos	Cepa probiótica (Concentración) Vehículo de Entrega / Duración	Grupo	Resultados
Juneja <i>et al</i> 2012 (19)	40 niños (12–15 años)	<i>L. rhamnosus</i> hct 70 (2.34×10^9 UFC/día). Leche dos veces al día / 3 semanas	A: Leche B: Leche + Probiótico	Reducción estadísticamente significativa de SM después de la intervención con probiótico.
Aminabadi <i>et al</i> , 2011 (20)	105 niños (6–12 años)	<i>L. rhamnosus</i> GG (2×10^8 UFC/mL). Yogurt/3 semanas (Enjuague bucal con clorhexidina 2 semanas)	A: Chlorhexidina B: Probiótico C: Chlorhexidina, con probiótico	Reducción estadísticamente significativa de SM después de la intervención con probiótico (B y C).
Jindal <i>et al</i> , 2011 (21)	150 niños (7–14 años)	<i>L. rhamnosus</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (1.25×10^8) <i>Bacillus coagulans</i> (150×10^6). Administrado en polvos (disueltos en agua y utilizados como enjuague bucal) / 14 días.	A: Placebo B: <i>L. rhamnosus</i> , <i>B. longum</i> and <i>S. cerevisiae</i> C: <i>B. coagulans</i>	Reducción estadísticamente significativa de SM después de la intervención con probiótico

Tabla 2. (Continuación) Estudios del efecto de probióticos en factores de riesgo de la caries dental en niños

Autor	sujetos	Cepa probiótica (Concentración) Vehículo de Entrega / Duración	Grupo	
Stecksén- Blicks <i>et al.</i> 2009 (24)	248 niños (1–5 años)	<i>L. rhamnosus</i> LB21 (10^7 UFC/mL). Leche /21 meses	A: Probiótico/ fluor B: Placebo	Sin reducción estadísticamente significativa de SM y Lb. Reducción estadísticamente significativa de SM después de la intervención con probiótico
Näse <i>et al.</i> , 2001 (2)	594 niños (1–6 años)	<i>L. rhamnosus</i> GG, ATCC 53103 ($5-10 \times 10^5$ UFC/mL). Leche /7 meses	A: Leche + Probiótico B: Leche	Los recuentos de SM y Lb disminuyeron significativamente después de la intervención, diferencias significativas en los recuentos de SM, no hubo diferencias significativas en los recuentos de Lb.
Tehrani <i>et al.</i> 2016 (83)	53 niños (3–6 años)	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 15820 (1×10^{10} colony- forming unit (UFC/mL), <i>L. reuteri</i> ATCC 55730 (2×10^9 UFC/mL), and <i>Bifidobacterium longum</i> <i>subsp. infantis</i> ATCC 15697 (1.5×10^9 UFC/mL). Gotas /2 semanas	A: gotas con probiótico B: Placebo	Diferencias significativas en los recuentos de SM no para Lb.
Glavina <i>et al.</i> , 2012 (84)	25 niños (6–10 años)	<i>L. rhamnosus</i> ATCC53103 - LGG . consumo 14 días.	A: Yogurt B:Placebo	

*Editada de 122. (SM: *Streptococcus mutans*, Lb: *Lactobacillus*)

3.7.1 Mecanismo de acción de los probióticos

La diversidad de condiciones que pueden beneficiarse de la ingestión de probióticos ilustra la variedad de mecanismos que pueden estar involucrados en sus acciones y que algunos efectos son sistémicos y no sólo locales. Es probable que estos mecanismos varíen según la cepa o combinaciones específicas de cepas utilizadas, la presencia de prebióticos y la afección que se está tratando, así como la etapa del proceso de enfermedad en la que se administra el probiótico (85).

La ingesta de probióticos se puede realizar utilizando diferentes productos lácteos, que llegan a restaurar el equilibrio fisiológico microbiano en el tracto digestivo, de este mismo modo es posible que tenga un papel similar en la restauración de la homeostasis microbiana en la placa dental que ha sido interrumpido por la ingesta frecuente de carbohidratos fermentables. Los mecanismos por los que los probióticos pueden ejercer este efecto beneficioso sobre la salud oral son en gran parte desconocidos, pero pueden implicar una actividad competitiva de los microorganismos del yogur y la producción de sustancias con actividad antimicrobiana (5)

Hay temas comunes que emergen en los estudios de los modos de acción de los probióticos y se han propuesto numerosos mecanismos que incluyen acciones directas e indirectas: Las interacciones directas están relacionadas con la interferencia de la formación de biofilm, compitiendo con microorganismos orales por el sustrato disponible y producción de sustancias antimicrobianas; entre las acciones indirectas incluyen modulación de la función inmune sistémica, Inmunidad local, efecto en mecanismos de defensa no inmunológicos, regulación de la permeabilidad de la mucosa y colonización oral por especies menos patógenas. (85, 86, 87, 88)

La estimulación y modulación del sistema inmune mucosal, contribuye a la integridad de la barrera intestinal y regulación de la producción de mucina, la reducción de la producción de citocinas pro-inflamatorias a través de acciones en las vías NFkB, aumentando la producción de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 y péptidos de defensa del hospedador como la β -defensina 2, mejorando las defensas IgA e influyendo en la maduración de las células dendríticas (89). La modulación en los mecanismos de la inmunidad local incluye la proliferación celular y apoptosis a través de respuestas celulares como la producción microbiana de los ácidos grasos de cadena corta. Eliminación o inhibición del crecimiento de patógenos a través de la producción de bacteriocinas u otros productos, tales como ácido o peróxido, que son antagonistas hacia las bacterias patógenas. (89)

La mayoría de las evidencias indican que los probióticos no son capaces de convertirse permanentemente en parte de la microbiota gastrointestinal residente del intestino y desaparecen de las heces muy pronto después de que la ingesta probiótica termine. Estudios de la microbiota oral indican que es muy difícil alterar la composición microbiana establecida en la placa, debido a rasgos genéticos de cada individuo (90). Una serie de estudios de colonización oral después de la ingestión de probióticos han encontrado patrones similares de falta de colonización a los del intestino, ya que los lactobacilos ingeridos colonizan sólo transitoriamente y desaparecieron poco después de la administración del probiótico (5, 91, 92).

Se ha encontrado una colonización estable y prolongada por probióticos lactobacilos solamente en un individuo que recibió tratamiento probiótico con LGG a la edad de 10 años durante 1 año de intervención (92). La microbiota residente de los niños parece ser menos estable y más susceptible a cambios que las comunidades microbianas residentes en adultos (90), y tal vez sea en la niñez que se lograrán influencias a largo plazo sobre las poblaciones residentes.

Estudios en neonatos y niños de la primera infancia han evaluado la influencia y asimilación de probióticos a largo plazo para la creación de una flora intestinal saludable. La justificación de la suplementación probiótica de los neonatos prematuros se basa en datos que demuestran diferencias en el establecimiento de la microbiota intestinal. En comparación con los lactantes sanos a término, la microbiota intestinal en recién nacidos prematuros presenta un bajo número de especies, y hay una colonización significativamente retrasada con anaerobios, especialmente bifidobacterias (93, 94). Además, los recién nacidos prematuros a menudo son atendidos en unidades de cuidados intensivos y reciben antibióticos de amplio espectro, lo que contribuye a las diferencias en los patrones de colonización. No se han reportado consecuencias de patrones anormales de colonización en neonatos en los estudios con probióticos, para tratar no solo una falta de alimentación balanceada sino también como un agente preventor de diferentes trastornos (95).

El interés en la terapia probiótica para prevenir enfermedades orales ha crecido notablemente a lo largo de los años. La eliminación de los miembros patógenos de la cavidad oral se puede intentar en el enfoque probiótico, ya que tienen una capacidad para sobrevivir en un entorno ácido que estará presente especialmente en la caries dental (96). Los lactobacilos y las bifidobacterias son los organismos probióticos más utilizados y estudiados. El reemplazo de bacterias cariogénicas por bacterias no patógenas mejoró la salud oral en los niños, lo que se puede hacer con el uso de probióticos, alimentos lácteos como el queso, el yogur y la leche se consideran vehículos útiles para las bacterias probióticas (97).

En los estudios que evalúan las superficies cariosas y no cariosas, la mayor diferencia en términos de aislamiento de *Lactobacillus* se encontraron en la última parte del período de estudio, cuando disminuye la tasa de aparición de nuevas caries. En los estudios que realizan la detección de *Lactobacillus* en ausencia de *S. mutans* se han considerado como un pobre predictor del riesgo de caries por superficie, mientras que la detección de *S. mutans* solo o junto con *Lactobacillos* produjo un riesgo relativo tres a cinco veces más alto. Los hallazgos más exitosos en la evaluación efecto de los probióticos sobre el riesgo de caries por superficie, se encontraron cuando se consideraron todas las superficies, incluyendo aquellas de sujetos que no experimentaron nuevas lesiones (98). Todavía existe cierta controversia con respecto a la eficacia de los probióticos, ya que los estudios reportan resultados inconsistentes. Esto podría atribuirse a diferentes poblaciones de estudio y condiciones, cepas probióticas, dosis y duración del estudio (99).

3.7.2 Probióticos en la fórmula infantil

El comité de nutrición (CoN) de la Sociedad Europea de Pediatría, Gastroenterología, Hepatología y Nutrición (ESPGHAN) en 2010 (100), revisó sistemáticamente las pruebas publicadas relacionadas con los efectos sobre la seguridad y la salud de la administración de fórmulas suplementadas con probióticos en comparación con las fórmulas no suplementadas (101). Los estudios variaron en los tipos de probióticos utilizados, principalmente fueron *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum* y *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus salivarius*. Las dosis de probióticos variaban considerablemente. Además, los períodos de suplementación variaron de 15 días a 8 meses.

El comité de nutrición (CoN) de ESPGHAN, evaluó las siguientes dos formas de administrar la fórmula probiótica suplementada: (1) la administración que se inició en bebés de 4 meses de edad ($0 \leq 6$ meses de edad, siempre que no hallan comenzado la alimentación complementaria) y (2) administración de lacteos suplementados con probióticos o fórmula de seguimiento en cualquier otra edad después de la primera infancia e independientemente de la duración de la intervención. Los datos científicos disponibles sugieren que la administración de fórmula probiótica suplementada a los lactantes no plantea problemas de seguridad con respecto al crecimiento y los efectos adversos y la administración de fórmula infantil suplementada con probióticos durante la primera infancia (≤ 4 meses de edad) no da lugar a efectos clínicos consistentes (101).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Identificar los efectos de un alimento enriquecido con *Lactobacillus rhamnosus GG* sobre los recuentos de unidades formadoras de colonia de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus sp.* y la presencia de caries incipiente en niños de 3 a 4 años en Santiago de Cali.

4.2. Objetivos específicos

- Evaluar los aspectos clínicos de la presencia de caries dental según los criterios ICDAS y el índice de placa de Silness y Løe modificado en el grupo intervenido y control, al inicio y a los nueve meses.
- Describir las características fisicoquímicas de la saliva con mediciones del pH salival y la capacidad buffer en el grupo intervenido y control, al inicio y a los nueve meses.
- Determinar el perfil microbiológico de la saliva con los recuentos de las unidades formadoras de colonia de *Streptococcus mutans* y la presencia de *Lactobacillus sp* en el grupo intervenido y en el grupo control, al inicio y a los nueve meses.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Tipo de estudio

Ensayo clínico controlado aleatorizado doble ciego. Registro Clinical Trial ACTRN12616001363471. La naturaleza del estudio fue experimental, con temporalidad longitudinal, la unidad de análisis fueron los niños de 3 y 4 años, la asignación al tratamiento fue por conglomerado, el número de observaciones por individuo fue una por cada tiempo de evaluación en la línea de base y seguimiento a los 9 meses y los criterios de selección de la población de estudio fueron por conveniencia.

5.2 Tipo de muestreo

El muestreo fue por conglomerados, donde el marco muestral correspondió a tres Centros de Desarrollo Infantil de ICBF de la ciudad de Cali. De forma aleatoria se seleccionaron los participantes por cada hogar para un tamaño estimado de 120 niños. El cálculo de la muestra se hizo con base al cálculo de la proporción de una población con precisión absoluta específica, manejando un nivel de confianza del 90% y una potencia de 0.80 (80% de potencia para un buen muestreo).

5.2.1 Criterios de inclusión

Niños sistémicamente sanos, entre los 3 y 4 años vinculados en jornada completa a Centros de Desarrollo Infantil del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar de las ciudades de Cali, de estrato socioeconómico 1 y 2.

5.2.2 Criterios de exclusión

Niños con intolerancia a la lactosa. Niños que se encuentren bajo tratamiento antibiótico o que tomaron antibioticos durante el estudio.

5.3 Tamaño y distribución de la muestra:

Se invitó a todos los niños matriculados en tres Centros de Desarrollo Infantil del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar (ICBF) de Cali, Valle del Cauca, Colombia, ubicados en zona de ladera pertenecientes a un estrato socioeconómico 1 y 2, en una escala de 1 a 6. Los criterios de inclusión para la muestra fueron niños de 3 a 4 años institucionalizados, que sus padres firmaron el consentimiento informado. Como criterio de exclusión se consideró el uso de antimicrobianos sistémicos a la fecha de la inclusión y los niños con trastornos sistémicos que necesitan cuidados especiales o que tuvieran intolerancia a las bebidas lácteas. De acuerdo a los anteriores criterios, se incluyeron finalmente en el estudio 124 niños, los cuales se distribuyeron por conglomerado a los grupos intervención y placebo.

5.4 Cegamiento y asignación de la intervención

Se realizó un triple enmascaramiento de tal manera que, ni la persona intervenida, ni sus padres o cuidadores, ni el operador o investigador conociera el grupo al que pertenece el participante. El enmascaramiento fue desde la asignación y durante todo el período de seguimiento. A ambos grupos se les suministró leche en el desayuno con el mismo sabor y color. Para la asignación de la intervención se contrató una persona externa encargada de realizar la selección de los participantes y asignación por conglomerado del tratamiento, ya sea al grupo de intervención o al grupo control.

5.5 Intervención

La leche enriquecida con probiótico contenía principalmente la cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* GG 5×10^6 UFC/g y en menor proporción *Bifidobacterium longum* 3×10^6 ® esta carga probiótica está en el rango de estudios previos que han mostrado resultados positivos (2, 20). La leche con probióticos y placebo, ambas idénticas en sabor y apariencia, se suministraron en envases separados por los colores "Blanco" o "Amarillo". La leche fue administrada por los manipuladores de los alimentos encargados en cada Hogar Infantil de ICBF, quienes suministraron la leche a los niños en el desayuno en cantidades de 200 gramos de leche, administrados oralmente diariamente durante cinco días a la semana por un período de nueve meses. El tiempo y el cumplimiento se verificó y se registró con un seguimiento diario durante el desayuno. Los padres no reportaron efecto secundario o adverso percibido durante el estudio al personal responsable del proyecto, por lo cual no fue necesario detener la ingesta en ningún caso.

- Grupo intervención: se administrará leche enriquecido con *Lactobacillus rhamnosus* GG 5×10^6 UFC/g y *Bifidobacterium longum* 3×10^6 ®.
- Grupo control: se administrará leche sin contenido probiótico (placebo).

Las marcas comerciales de las leches administradas corresponden a leche de fórmula Nan pro desarrollo con probióticos 3 y la leche sin probiótico utilizada para el grupo control fue Alpina baby 3 plus. (Ver Anexo 1. Ficha técnica de las lechas usadas en la intervención).

5.6 Consideraciones éticas

El Comité Institucional de Revisión de Ética Humana de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, aprobó el protocolo de este proyecto por medio del Acta No. 009-015 (Ver Anexo 2. Aval de Comité de Ética Humana). Los padres de los niños firmaron el consentimiento informado en el cual se obtuvo el permiso para la participación en el estudio. Este estudio fue financiado por Colciencias en la Convocatoria 657 para proyectos de ciencia, tecnología e innovación en salud 2014. El protocolo fue registrado en el ClinicalTrials.gov como parte del cumplimiento de los requisitos CONSORT de Ensayos Clínicos Controlados y para garantizar la calidad, código ACTRN12616001363471.

5.7 Trabajo de campo

El trabajo de campo diario se realizó al inicio del estudio para obtener la caracterización de los participantes en la línea de base hasta completar el tamaño de muestra, posteriormente se evaluaron los mismos aspectos clínicos y microbiológicos a los 9 meses de estar recibiendo la intervención.

En los Centros de Desarrollo Infantil:

- Evaluación clínica odontológica de la presencia de placa bacteriana a través del índice de placa de Silness y Løe modificado.
- Acompañamiento en el cepillado dental de los niños.
- Evaluación clínica odontológica de presencia de lesiones de caries dental mediante los criterios ICDAS tomando los códigos del 2 al 6.
- Toma de muestra de saliva a los niños.

Laboratorio de Microbiología Oral de la Universidad del Valle.

- Análisis microbiológico de la muestra de saliva.
- Análisis fisicoquímico de la muestra de saliva.

Para el registro de la información de cada variable se usó una base de datos diseñada para el estudio en el programa Microsoft Excel®.

5.7.1 Evaluación Clínica Odontológica

Todos los niños pertenecientes al estudio recibieron una valoración clínica en compañía del cuidador del Hogar Infantil. Un odontopediatra examinador calibrado (Kappa intraexaminador 0,85 e interexaminador 0,72) realizó los exámenes odontológicos a los niños, usando una unidad portátil y luz de lámpara, materiales e instrumental básico para el examen, material desechable de protección y bioseguridad del personal.

Inicialmente se tomaron los datos del Índice de placa de Silness y Løe modificado (102) (IPB), incluyendo como valores 0 la superficie libre de placa, 1 placa visible solo al paso del instrumento y 2 placa visible a simple vista. Seguidamente se les realizó a los niños el retiro de placa bacteriana minuciosamente con un cepillo dental nuevo y acompañados de odontólogos del equipo de trabajo de campo.

Para continuar con la revisión de caries dental cumpliendo las condiciones del criterio ICDAS (49); con la superficie dental limpia y aislada con rollos de algodón en la zona vestibular para poder remover el exceso de saliva y así detectar las lesiones precavitacionales, se usó un explorador redondeado cuando era necesario verificar alguna discontinuidad en la superficie del diente para evaluar la severidad de la caries, tomando como componente cariado, todo tipo de lesión de caries desde 2 al 6, donde se está considerando tanto los estadios incipientes como los avanzados de la caries (Tabla 1).

Al presentar dentición temporal los niños de 3 y 4 años, se utilizaron 20 dientes en el diagnóstico, cada resultado fue diligenciado en la base de datos de acuerdo al diagnóstico dictado por el examinador al anotador que estaba entrenado para el diligenciamiento del

formato, el examinador y anotador fueron las mismas personas al inicio y durante los tres seguimientos.

Se determinó excluir las lesiones 1 de ICDAS por su dificultad en el diagnóstico en estas etapas, y se valoraron todos los dientes y superficies empezando desde el primer cuadrante, terminando por el cuarto cuadrante. Los dientes que no estuvieran completamente erupcionados, no se evaluaban. Si en un diente presentaba dos tipos de diagnósticos, se reportaba el de mayor grado de severidad.

5.7.2 Recolección de saliva

Las muestras de saliva no estimulada fueron colectadas por un odontopediatra, quien le solicitó a cada niño incluido en el estudio una muestra de saliva una hora después del desayuno durante las primeras horas de la mañana (9:00 – 10:00) donde los niños consumen leche del grupo intervención o grupo control, los niños no se cepilla antes de tomar la muestra y se colecta entre 1 y 2 ml de saliva sin estimular (Figura 1).

Debido a las diferentes velocidades de flujo de la saliva, el tiempo de colecta de las muestras de saliva varió entre 1 y 10 min como tiempo máximo en cada niño, la muestra fue depositada en un tubo plástico estéril cónico de 50 ml marcado con código de ingreso al estudio de cada niño. Los tubos fueron guardados en una nevera de icopor con pila congelada entre una y dos horas a 2-8°C para ser transportadas al Laboratorio de Microbiología Oral de la Universidad del Valle donde se realizó el análisis microbiológico y análisis físico químicos de la muestra de saliva.



Figura 1. Recolección de muestra de saliva en viales por parte de una odontopediatra.

5.7.3 Análisis microbiológico de la muestra de saliva

Para el análisis microbiológico se usaron los medios de cultivo como método cuantitativo para el aislamiento y la estimación de los niveles de unidades formadoras de colonia (UFC), en el caso de *Streptococcus mutans* se usó el medio selectivo Agar Mitis salivarius con telurito y bacitracina (MSTB) y el Agar MRS (de Man, Rogosa y Sharpe) para *Lactobacillus sp.* Los medios se prepararon 2 días previos al día de toma de muestras, siguiendo los Procedimientos Operacionales Estandarizados (Ver Anexo 3. POE de la preparación de agar Mitis Salivarius Bacitracina y Anexo 4. POE de la preparación de agar Man Rogosa Sharpe).

En una cabina de flujo laminar Biological Safety Cabinet® se procesaron las muestras de saliva el mismo día en que se tomó la muestra con el fin de preservar la viabilidad de las bacterias, realizando dilución de 0,1 ml de saliva con 0,9 ml de solución salina normal estéril, con diluciones decimales hasta 10^{-3} en tubos ependorff, las muestras y las diluciones se sometieron a vórtex durante 30 segundos utilizando un Vortex maxi mix II Thermo Scientific®. Los cultivos se realizaron por duplicado por cada uno de los dos medios Agar Mitis salivarius con telurito y bacitracina (MSTB) y el Agar MRS (de Man, Rogosa y Sharpe), se cultivó 0,1 ml de la muestra diluida previamente a 10^{-3} , se extendió uniformemente con asas de vidrio. Los medios se incubaron utilizando un sistema de anaerobiosis (jarras gas-pack) con una mezcla de 95% N₂, 5% CO₂, durante 48 horas a 37°C, en una Incubadora de CO₂ Precisión® Automatic M1020.

Las colonias se identificaron por sus características morfológicas (103, 104), característica para *S. mutans*, con formas redonda, esférica, color azul, variación de milimétrica en tamaño, cabeza de alfiler con una superficie áspera y desmontable de la superficie de agar (Figura 2) y para *Lactobacillus sp.* formas redondas, lisa, color blanco brillante, con variación milimétrica en tamaño (Figura 3). Los recuentos de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml) se observaron y contaron bajo un estereomicroscopio de luz marca ZEISS® MC80.

El número de unidades formadoras de colonia (UFC) se multiplicó por el número de veces que se diluyó originalmente la muestra 10^{-3} y se expresó como el número de unidades formadoras de colonias por mililitro de saliva (UFC/ml). Los valores fueron asignados a categorías de riesgo de presentar caries dental sobre la base de la densidad del crecimiento de UFC de *S. mutans* (Tabla 3). Para los conteos de *Lactobacillus*, se registró presencia ausencia con valores < 0 y ≥ 1 (105).

Riesgo	UFC/ml <i>S. mutans</i>
Riesgo muy bajo	<10.000
Riesgo bajo	10.000 - 100.000
Riesgo medio	100.000 - 500.000
Riesgo alto	> 500.000

Tabla 3. Riesgo de presentar caries dental sobre la base de la densidad del crecimiento de UFC de *S. mutans*. (106, 107, 108).

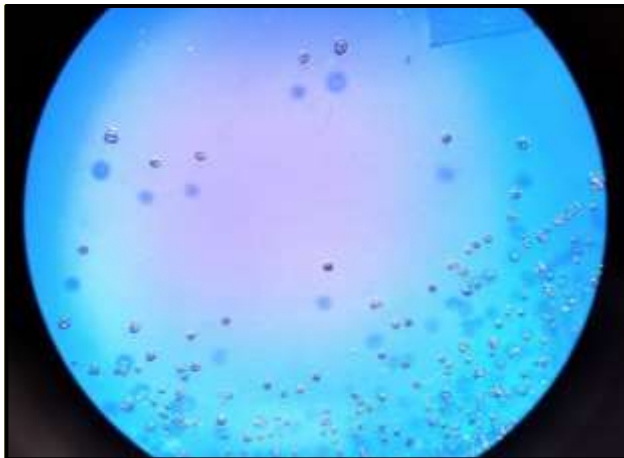


Figura 2. Agar Mitis Salivarius con colonias de *S. mutans*



Figura 3. Agar MRS con colonias de *Lactobacillus*

5.7.4 Análisis fisicoquímicos de la saliva

En el laboratorio los valores de pH de la saliva se midieron con un pH metro digital Orion® Start A211 (Figura 4), asegurando que el área de contacto del electrodo sensible al pH quedara en contacto con la saliva (109). A continuación, la capacidad amortiguadora de la saliva se obtuvo agregando a la saliva ácido clorhídrico (HCl), en relación 1:3, con una pipeta graduada se midió 1,0 ml de volumen de saliva y el restante se descartó, posteriormente se añadieron 3,0 ml de HCl 0,0033 N a la saliva, se agitó en vortex durante 20 minutos, después de lo cual se midió nuevamente el pH en el pH metro digital (Ver Anexo 5. POE para Características fisicoquímicas de la saliva).



Figura 4. pH metro digital

5.7.5 Análisis estadístico

Con el uso del programa Stata 13.0 y SPSS inicialmente se desarrolló un análisis exploratorio de los datos registrados en las tablas de variables en el programa Microsoft Excel® identificando los grupos de variables a analizar, las frecuencias de las variables cualitativas y la distribución en las variables cuantitativas con sus respectivas medidas de tendencia central y dispersión.

El análisis bivariado se hizo teniendo en cuenta los tiempos de evaluación y grupos de estudio, para la presencia de caries, índice de placa bacteriana, pH salivar, capacidad buffer, conteos de Unidades formadoras de colonia de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus*. Se realizó un análisis bivariado, para comparar las variables categóricas dependientes entre los grupos mediante la prueba estadística de χ^2 con nivel de significancia $p < 0,05$ Alpha=0,05, Intervalo de confianza 95%.

El cálculo de Indicador de $C_{(2-6 \text{ ICDAS})EO}$, es el promedio de dientes cariados (tomados del formato de ICDAS: código 2 al 6) + dientes obturados por caries + dientes extraídos o perdidos por caries dividido el número de personas evaluadas.

Debido a desviaciones del protocolo en lo que se refiere a la administración de las intervenciones, para evitar una subestimación del efecto, se incluyó en el análisis solamente los casos en que se administró la intervención tal como estaba previsto en el protocolo, lo que se denomina a veces análisis por protocolo. De acuerdo con la academia europea de pacientes, el análisis por protocolo es un análisis de los datos de un ensayo clínico relacionados únicamente con los participantes que han completado el plan de tratamiento y que han seguido exactamente las instrucciones del protocolo del ensayo. Por consiguiente, se trata tan solo de un análisis del efecto de un tratamiento.

Por lo anterior, se usó el análisis por protocolo, excluyendo a los niños que no estuvieron disponibles para todas las pruebas clínicas y microbiológicas previstas durante el estudio y los que abandonaron el estudio, teniendo en cuenta que no se retiraron por efectos adversos sino por cambio de vivienda o de jardín infantil.

6. RESULTADOS

Los resultados encontrados en el ensayo clínico controlado doble ciego, con los análisis clínicos y microbiológicos de 124 niños participantes, los cuales fueron aleatorizados en dos grupos paralelos, con asignación de 77 niños al grupo intervenido (GI) y 47 al grupo control (GC). Antes de realizar la evaluación de los niños al final de la intervención se presentaron retiros por motivos ajenos al estudio. El siguiente diagrama ilustra el flujo de niños participantes desde el reclutamiento, la asignación de la intervención, el seguimiento y finalmente el análisis (Figura 5).

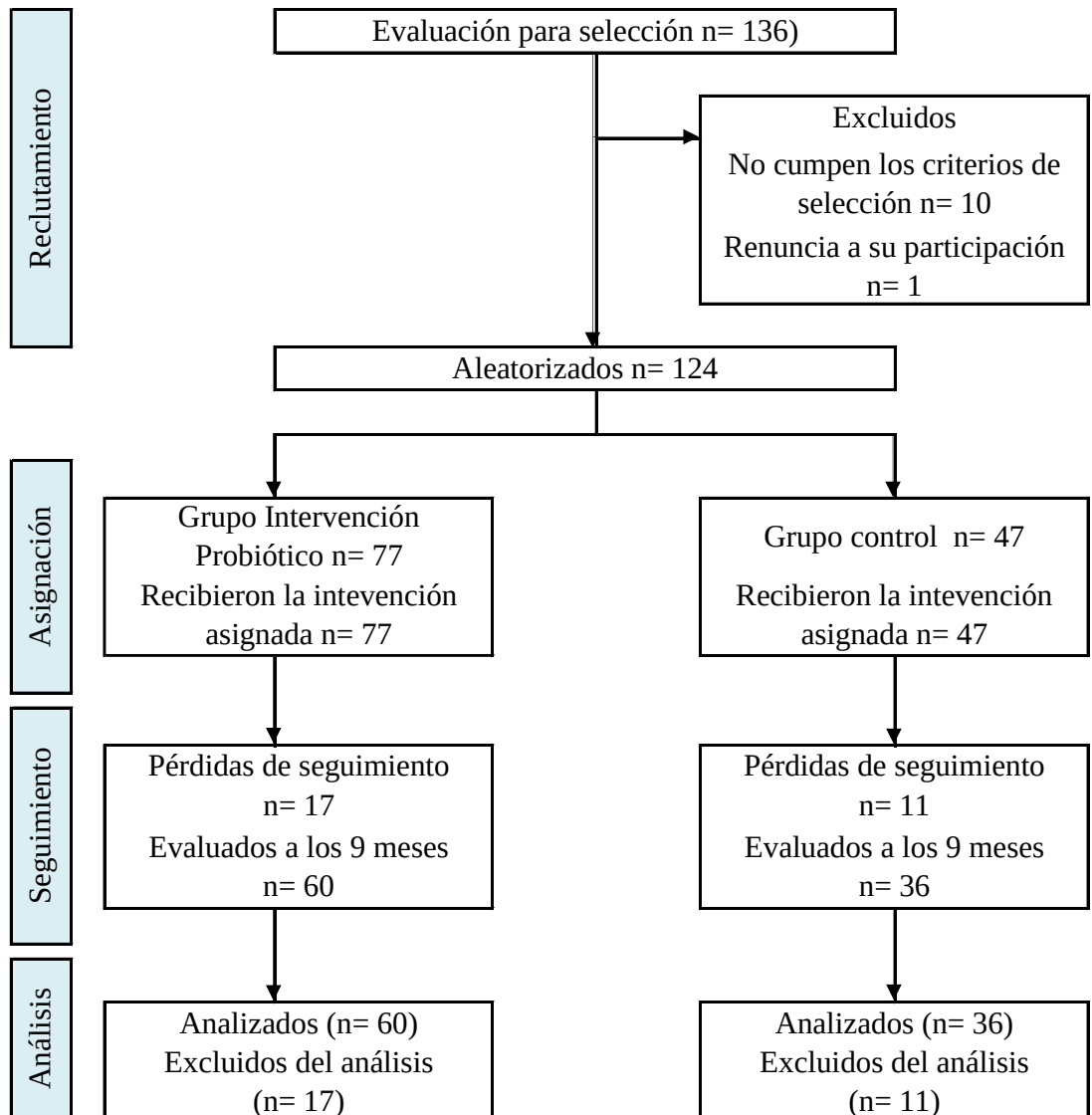


Figura 5. Flujograma del ensayo clínico controlado (Criterios del CONSORT 2010).

6.1 Unidades muestrales según el grupo aleatorizado y el tiempo de intervención

La tasa de deserción al finalizar el estudio fue del 22,5%, relacionada con cambios de vivienda de los niños, traslado a otros jardines, los niños de los Centros de Desarrollo Infantil de ICBF al cumplir 5 años de edad pasan al colegio y pérdida del cupo en el hogar infantil por faltas de asistencia (Tabla 4).

Tabla 4. Niños perdidos y presentes en el grupo intervención y en el grupo control al final del estudio.

Tiempo	9 meses		
Grupo	Grupo Probiótico n (%)	Grupo Control n (%)	Total n (%)
Presentes hasta los 9 meses	60 (77,9)	36 (76,6)	96 (77)
Perdidos	17 (22,1)	11 (23,4)	28 (23)
Total	77 (100)	47 (100)	124 (100)

Los 96 niños evaluados al final de la intervención, se les realizó diagnóstico clínico en su totalidad, debido a la corta edad de 3 a 4 años, no todos los niños permitieron que se les tomara el volumen de saliva necesarios para todos los análisis de laboratorio, en la Tabla 5 se indican el número de muestras obtenidas y procesadas en cada una de las variables analizadas en el laboratorio para los dos grupos al final de la intervención.

Tabla 5. Distribución de las muestras en los análisis clínicos y microbiológicos en el grupo intervención y en el grupo control al final del estudio.

Variable	9 meses		
	Grupo Probiótico	Grupo Control	Total
Índice C _(2-6 ICDAS) eo	60	36	96
Índice de Placa	60	36	96
pH	49	31	80
Capacidad buffer	48	30	78
<i>S. mutans</i> (UFC/ml)	50	31	81
<i>Lactobacillus</i> (UFC/ml)	50	31	81

De los 124 niños que participaron en el estudio, la distribución por género fue equilibrada, 64 eran niños (52%) y 60 eran niñas (48%), sin embargo, en la distribución por grupos aleatorizados no se conservó el equilibrio entre los géneros, presentándose menor número de niñas en el grupo control. La edad promedio de los niños fue de 3,80 años, con un rango de 3 años cumplidos a los 4 años y ocho meses. El peso y la talla de los niños aleatorizados

se encontró dentro de los rangos promedio normales correspondientes a la edad de 3 y 4 años de acuerdo a los patrones de crecimiento infantil de la Organización Mundial de la Salud (OMS) implementados en Colombia (MPS, INS, ICBF 2011) (Tabla 6).

Tabla 6. Características demográficas al inicio del estudio en el grupo intervención y en el grupo control.

Variables	Grupo Probiótico 77 (100%)	Grupo Control 47 (100%)
Edad (años)	3,78±0,82	3,92±0,95
Genero		
Masculino	34 (44,2)	30 (63,8)
Femenino	43 (55,8)	17 (36,2)
Talla (cm)	100,49	100,84
Peso (Kg)	15,49	16,19

6.2 Cambios en aspectos clínicos de la caries dental

6.2.1 Cambios en el índice ceo según los criterios ICDAS

Los datos de la evaluación clínica odontológica según el Sistema Internacional para la Detección y Evaluación de la Caries (ICDAS), permitieron calcular el índice $C_{(2-6 \text{ ICDAS})EO}$, el cual es el promedio de dientes cariados (Código ICDAS 2 al 6) + dientes obturados por caries + dientes extraídos o perdidos por caries dividido el número de personas evaluadas. De este modo, el índice $C_{(2-6 \text{ ICDAS})EO}$ de los niños examinados al inicio del estudio y al final de la intervención permitió clasificarlos de acuerdo a la presencia de caries, donde el índice $C_{(2-6 \text{ ICDAS})EO}=0$ representa los niños libres de caries y $C_{(2-6 \text{ ICDAS})EO} \geq 1$ los niños con caries dental (Tabla 7).

Tabla 7. Estado del índice ceo modificado $C_{(2-6 \text{ ICDAS})EO}$ en el grupo de intervención y en el grupo de control al inicio y al final del estudio.

Grupo	Grupo Probiótico	Grupo Control	Odds Ratio
Índice $C_{(2-6 \text{ ICDAS})EO}$, línea de base n(%)			
$C_{(2-6 \text{ ICDAS})EO} = 0$	30 (39)	24 (51,1)	0,612 (0,294-1,273)
$C_{(2-6 \text{ ICDAS})EO} \geq 1$	47 (61)	23 (48,9)	
Total	77 (100)	47 (100)	
Índice $C_{(2-6 \text{ ICDAS})EO}$, nueve meses n(%)			
$C_{(2-6 \text{ ICDAS})EO} = 0$	28 (46,7)	19 (52,8)	0,783 (0,342-1,792)
$C_{(2-6 \text{ ICDAS})EO} \geq 1$	32 (53,3)	17 (47,2)	
Total	60 (100)	36 (100)	

Al inicio del estudio en el grupo intervención, la proporción de los niños con Caries de la Infancia Temprana (CIT) ($C_{(2-6 \text{ ICDAS})eo} \geq 1$) fue del 61% y el 39% estaban libres de caries ($C_{(2-6 \text{ ICDAS})eo} = 0$), lo que mejoró al final de la intervención con disminución en la presencia de caries con el $C_{(2-6 \text{ ICDAS})eo} \geq 1$ en el 53,3% de los niños y aumento de los niños libres de caries con el 46,7% del grupo intervención, los análisis de Odds Ratio no muestran diferencias estadísticamente significativas. Por su parte el grupo control mantuvo porcentajes similares de presencia de caries al inicio y final de la intervención. El promedio del índice $C_{(ICDAS \ 2-6>0)eo}$ fue de $3,03 \pm 4,47$ y $2,30 \pm 3,94$ después de 9 meses para el grupo probiótico y el grupo control respectivamente.

El incremento de las lesiones de caries dentro de los grupos se expresa como Δcoe ($C_{(2-6 \text{ ICDAS})eo \ 9 \text{ meses}} - C_{(2-6 \text{ ICDAS})eo \ \text{línea de base}}$) donde se encontró que el grupo probiótico disminuyó en un 15% la presencia de al menos una caries al final del estudio, frente al grupo control que disminuyó un 8,3%. En el caso de aumentar la presencia de caries los dos grupos tienen resultados similares 5% y 5,6% para el grupo tratamiento y grupo control respectivamente. (Tabla 8). Con la prueba de χ^2 no hubo diferencias en el aumento o disminución del $C_{(2-6 \text{ ICDAS})eo}$ en los grupos después de 9 meses ($p=0,63$).

Tabla 8. Incremento y disminución de caries (Δcoe) en el grupo de intervención y en el grupo de control al final del estudio.

Incremento de caries	Grupo Probiótico	Grupo Control
< 1 caries	9 (15)	3 (8,3)
0	48 (80)	31 (86,1)
> 1 caries	3 (5)	2 (5,6)
Total	60 (100)	36 (100)

6.2.2 Cambios en el estado de severidad de la caries

El promedio de dientes por niño que presentaron los diferentes estados de severidad de caries de acuerdo al criterio ICDAS, en la línea de base y 9 meses para los dos grupos, con la prueba de χ^2 no se observó diferencias significativas (Tabla 9).

Tabla 9. Promedio de dientes por niño en los cuatro estados de severidad de la caries de acuerdo al criterio ICDAS, en el grupo intervención y en el grupo control al inicio y al final del estudio.

Grupo	Grupo Probiótico	Grupo Control
Estado caries, línea de base (Media±DE)		
Sano (ICDAS 0)	16,97±4,04	17,10±4,68
Inicial (ICDAS 2)	1,57±1,97	1,65±2,36
Moderado (ICDAS 3-4)	0,35±0,87	0,17±0,37
Severo (ICDAS 5)	0,83±1,71	0,93±2,92
Estado caries, nueve meses (Media±DE)		
Sano (ICDAS 0)	16,88±4,47	17,27±4,28
Inicial (ICDAS 2)	1,11±1,97	1,16±1,74
Moderado (ICDAS 3-4)	0,30±0,74	0,16±0,44
Severo (ICDAS 5)	0,75±1,86	0,83±2,47

6.2.3 Cambios en el índice de placa de Silness y Løe modificado

El índice de placa bacteriana (IPB) de Silness y Løe modificado, que refleja la presencia de placa bacteriana en tres categorías, la primera categoría es 0 si no hay presencia de placa (IPB=0), en aquellos dientes que es fácilmente notoria la placa por ser de espesor considerable o si al pasar una sonda suavemente evidencia placa delgada categoría 1 (IPB=1) y con categoría 2 si en la superficie dental examinada existe evidencia de placa gruesa. Con la evaluación de la presencia de placa de cada diente, se obtuvo una mediana que representa el índice de placa por niño (Tabla 10). Con la prueba de Chi² no hubo diferencias significativas en los cambios del índice de placa entre los grupos a los 9 meses.

Tabla 10. Mediana del índice de placa bacteriana (IPB) en el grupo intervención y en el grupo control al inicio y al final del estudio.

Grupo	Grupo Probiótico	Grupo Control	p valor
Mediana IPB, línea de base n(%)			
IPB=0	40 (51,3)	20 (42,6)	p=0,546
IPB=1	28 (36,8)	22 (46,8)	
IPB=2	9 (11,8)	5 (10,6)	
Total	77 (100)	47 (100)	
Mediana IPB, nueve meses n(%)			
IPB=0	46 (76,7)	28 (77,8)	p=0,715
IPB=1	11 (18,3)	5 (13,9)	
IPB=2	3 (5,0)	3 (8,3)	
Total	60 (100)	36 (100)	

*Test Chi²

6.3 Características fisicoquímicas de la saliva

6.3.1 Cambios en el pH salival

En los dos grupos aleatorizados se observaron valores ácidos de pH ($\text{pH} < 7$) principalmente, en el grupo control el porcentaje de niños con pH ácido fue más altos a los 9 meses comparado con el estado del pH al inicio del estudio, por su parte el grupo tratado mejoro los valores de pH al comparar el inicio con el final del estudio, presentando mayor porcentaje los niños con valores de pH mayores a 7 (Tabla 11). El valor de p de la prueba Chi^2 indica que no hubo diferencias en el pH entre los dos grupos probiótico ni en el grupo control al inicio y final de la intervención.

Tabla 11. Cambios en el valor de pH salival en el grupo de intervención y en el grupo de control al inicio y al final del estudio.

Grupo	Grupo Probiótico	Grupo Control	p valor
pH, línea de base n(%)			
<7	65 (84,0)	42 (88,6)	$p=0,485$
≥ 7	12 (16,0)	5 (11,44)	
Total	77 (100)	47 (100)	
pH, nueve meses n(%)			
<7	39 (79,3)	28 (90,3)	$p=0,142$
≥ 7	10 (20,7)	3 (9,7)	
Total	49 (100)	31 (100)	

*Test Chi^2

6.3.2 Cambios en la capacidad buffer

Los valores obtenidos con las pruebas de capacidad buffer de la saliva se clasificaron en cuatro rangos, de acuerdo a los criterios de Ericsson, teniendo que los valores menores a 3.5 representan una capacidad buffer muy baja, los valores entre 3.50 y 4.24 baja, entre 4.24 y 4.75 normal y mayores a 4.75 alta. Se observó que la prueba de Chi^2 fue estadísticamente significativo a los 9 meses, entre los grupos intervención y control (Tabla 12).

Tabla 12. Cambios en la capacidad buffer de la saliva en el grupo de intervención y en el grupo de control al inicio y al final del estudio.

Grupo	Grupo Probiótico	Grupo Control	p valor
Capacidad Buffer, línea de base n(%)			
<3.5	20 (26,0)	15 (31,9)	p=0,698
3.50 - 4.24	17 (22,1)	9 (19,1)	
4.24 - 4.75	11 (14,3)	9 (19,1)	
>4.75	29 (37,7)	14 (29,8)	
Total	77 (100)	47 (100)	
Capacidad Buffer, nueve meses n(%)			
<3.5	16 (33,3)	20 (66,7)	p=0,006*
3.50 - 4.24	16 (33,3)	4 (3,3)	
4.24 - 4.75	8 (16,7)	6 (20,0)	
>4.75	8 (16,7)	0 (0,0)	
Total	48 (100)	30 (100)	

*Test Chi²

6.4 Perfil microbiológico de la saliva

6.4.1 Recuentos unidades formadoras de colonia de *S. mutans*

En el grupo probiotico disminuyó la presencia de *S. mutans*, pasando del 57,5% al inicio a un 36,8% al final de la intervención, por su parte el grupo control aumento del 42,5% al inicio a un 63,2%. Aplicando la prueba de chi² el valor de *p* indica que las diferencias en la presencia de *S. mutans* son significativas a los 9 meses después de la intervención entre el grupo prebiótico y el grupo control (p=0,011) (Tabla 13).

Tabla 13. Cambios en la presencia de *S. mutans* en saliva en el grupo de intervención y en el grupo de control al inicio y al final del estudio.

Grupo	Grupo Probiótico	Grupo Control	p valor
UFC/ml de <i>S. mutans</i> , línea de base n(%)			
Ausencia	54 (64,3)	30 (35,7)	0,467
Presencia	23 (57,5)	17 (42,5)	
Total	77 (100)	47 (100)	
UFC/ml de <i>S. mutans</i> , nueve meses n(%)			
Ausencia	43 (69,4)	19 (30,6)	0,011*
Presencia	7 (36,8)	12 (63,2)	
Total	50 (100)	31 (100)	

* Test chi²

Con los rangos asignados a los recuentos de unidades formadoras de colonia de *S. mutans*, la mayoría de los niños tenían un riesgo muy bajo de presencia de caries dental, con recuento microbiano < 10.000 UFC/ml, de los cuales al inicio del estudio en el grupo probiótico correspondía al 74% y en el grupo control el 63,8%, este porcentaje aumento al final de la intervención donde el 86% del grupo probiótico presentaron conteos < 10.000 UFC/ml y en el caso del grupo control 61,3%, aumentando el porcentaje de niños con riesgo muy bajo de caries (Tabla 14).

Tabla 14. Distribución de *S. mutans* en el grupo de intervención y en el grupo de control al inicio y al final del estudio.

Grupo	Grupo Probiótico	Grupo Control	p valor
UFC/ml de <i>S. mutans</i> , línea de base n(%)			
<10.000	57 (74,0)	30 (63,8)	$p=0,356$
10.000 - 100.000	9 (11,7)	10 (21,3)	
100.000 - 500.000	7 (9,1)	6 (12,8)	
> 500.000	4 (5,2)	1 (2,1)	
Total	77 (100)	47 (100)	
UFC/ml de <i>S. mutans</i> , nueve meses n(%)			
<10.000	43 (86,0)	19 (61,3)	$p=0,038^*$
10.000 - 100.000	4 (8,0)	9 (29,0)	
100.000 - 500.000	2 (4,0)	3 (9,7)	
> 500.000	1 (2,0)	0 (0,0)	
Total	50 (100)	31 (100)	

* Test χ^2

Al finalizar la intervención sólo el 2% presentó riesgo alto de presentar caries dental debido a la colonización de *S. mutans*, y 4% riesgo medio en el grupo intervención. El valor de p indica que hay diferencias significativas entre el grupo probiótica y el grupo control para el riesgo cariogénico por colonización de *S. mutans* los 9 meses ($p=0,038$).

6.4.2 Cambios en la presencia de *Lactobacillus* sp.

La presencia de *Lactobacillus* antes y después de la intervención fue similar en los dos grupos. La prueba de χ^2 no reveló diferencias estadísticamente significativas en la presencia de *Lactobacillus* a los 9 meses después de la intervención entre el grupo probiótico y el grupo control en los recuentos (Tabla 15).

Tabla 15. Cambios en la presencia de *Lactobacillus* en saliva

Grupo	Grupo Probiótico	Grupo Control	p valor
UFC/ml de <i>Lactobacillus</i> , línea de base n(%)			
Ausencia	1 (1,3)	2 (4,3)	0,299
Presencia	76 (98,7)	45 (95,7)	
Total	77 (100)	47 (100)	
UFC/ml de <i>Lactobacillus</i> nueve meses n(%)			
Ausencia	2 (4,0)	2 (6,5)	0,621
Presencia	48 (96,0)	29 (93,5)	
Total	50 (100)	31 (100)	

* Test χ^2

7. DISCUSIÓN

La caries dental es la enfermedad oral crónica más común de la humanidad, que afecta a todas las personas independientemente de su sexo, raza y edad. (110). La caries dental es una enfermedad infecciosa bacteriana que se caracteriza por la desmineralización del esmalte dental (27), está asociada con varios factores biológicos, dietéticos, de higiene y sociales, y a pesar de los avances en su conocimiento, continúa siendo uno de los problemas mundiales de salud pública más importantes que afectan a los niños (111). Debido a la prioridad de tratar esta enfermedad, se ha implementado un enfoque preventivo a partir de tratamientos con microorganismos vivos llamados probióticos, por sus posibles beneficios en la salud oral, especialmente en la caries dental (24).

El uso de un producto lácteo (leche, queso, yogurt y helados) como vehículo de administración de los probióticos, además de ser un producto no azucarado posee efectos preventivos para la caries relacionados con un alto contenido natural en calcio (112), neutralización de condiciones ácidas en la boca e interferencia con las bacterias cariogénicas (113) y los contenidos de fosfopéptidos de caseína (CPP) los cuales son ricos en fosfoserina y tienen efecto inhibidor sobre la desmineralización y promoción de la remineralización del esmalte dental (114). En el presente estudio se usó como vehículo leche de fórmula suplementada con probióticos, diseñada para niños a partir de los 12 meses de edad hasta los 3 años (NanPro3®), como parte líquida de su alimentación complementaria, lo que ha demostrado en otros estudios a largo plazo, que no tiene efectos clínicos consistentes, por el contrario está asociada con algunos beneficios clínicos, como una reducción del riesgo de uso de antibióticos, una menor frecuencia de cólico y/o irritabilidad y una reducción del riesgo de infecciones gastrointestinales inespecíficas (101).

Este ensayo clínico se realizó con el objetivo de probar si el consumo diario de una leche enriquecida con el probiótico a base de *LGG* y tiene efectos sobre los recuentos de unidades formadoras de colonia de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus* sp. y la presencia de caries incipiente en niños de 3 a 4 años en comparación con la ingesta diaria de leche estándar sin probióticos como control. La aleatorización fue por conglomerado donde a los diferentes grupos de niños de los hogares infantiles se le asignó la intervención con probiótico o control, pero las observaciones se realizaron a cada individuo; esta asignación proporcionó protección contra la combinación entre grupos de tratamiento dentro del estudio (115, 116).

El protocolo propuesto se logró cumplir durante los 9 meses de intervención, donde los niños del grupo de probióticos asistieron en promedio el 73% del tiempo y los niños del grupo control asistieron al 69%, contando con dos semanas de vacaciones en el mes de junio. El seguimiento diario del consumo de leche y asistencia fue considerada alta, se actualizaba diariamente y contaba con el apoyo de un observador externo que controlaba el registro. Los datos de las variables clínicas fueron observados por un solo examinador

odontopediatra, quien previo al inicio del estudio fue sometida a calibración intraexaminador e interexaminador, con valores del coeficiente Kappa (k) intraexaminador 0,85 e interexaminador 0,72, de acuerdo a la clasificación de los valores Kappa (117) el examinador del estudio presentó un acuerdo casi perfecto intraexaminador al estar en el rango de 0,81-1,00 y bueno dentro del rango 0,61-0,8 para el acuerdo interexaminador.

La tasa de deserción al finalizar el estudio fue del 22,5%, relacionada con cambios de vivienda de los niños, traslado a otros jardines, los niños de los hogares infantiles de ICBF al cumplir 5 años de edad pasan al colegio y pérdida del cupo en el hogar infantil por faltas de asistencia. Al analizar el estado de caries y recuentos de UFC de los niños que abandonaron el estudio con los que permanecieron, no encontraron diferencias estadísticamente significativas y los abandonos fueron equivalentes en los dos grupos (23,4% para el grupo control y 22% para el grupo experimental), conservando la proporción inicial. El porcentaje de deserción coincide con otros estudios donde se ha evaluado el consumo a largo plazo de productos lácteos que contiene probióticos en niños menores de 6 años, en Chile Rodríguez (118) presentó una deserción del 21% después de 10 meses, en el estudio de Näse (2) en Finlandia fue del 24% después de 7 meses y Stecksén en Suecia presentó una deserción del 25% luego de 21 meses de intervención.

La selección de la cepa probiótica utilizada en este estudio se basa en hallazgos previos que demuestran que *LGG* exhibe actividad antagonista contra las bacterias cariogénicas *S. mutans* y *Lactobacillos* (118, 120), además de su potencial para la prevención de la caries dental y el hecho de que se considera seguros para la administración oral en los seres humanos (121). Se han realizado varios ensayos de control clínico controlados y la mayoría de ellos demostró efectos positivos de los probióticos en la reducción de la *S. mutans* (122). Sin embargo, la mayor parte de los estudios evalúa el efecto de los probióticos en la salud oral de los niños son a corto plazo con tiempo menores a 6 semanas, presentándose la necesidad de estudios a largo plazo que ratifiquen el efecto de los probióticos y su permanencia en el tiempo. Por lo anterior el presente estudio evalúa el efecto del probiótico a base de *LGG* a largo plazo contribuyendo así a la evidencia de los cambios microbiológicos y clínicos en el desarrollo de la caries, generando otro aporte importante a la evidencia científica del efecto de los probióticos en la salud oral, debido a que la mayoría de los estudios evalúan el recuento de *S. mutans*, sin presentar resultados sobre el desarrollo de la caries dental.

La concentración del probiótico *LGG* en el presente estudio fue 5×10^6 UFC/g que está en el rango usados en estudios previos con esta cepa de probiótico 5×10^5 a 2.34×10^9 (2, 24, 22, 20, 19). Se ha reportado la concentración pueden disminuir en los productos lácteos con el tiempo y el proceso de preparación de alimentos pueden afectar a la viabilidad de las bacterias y reducir el número de bacterias viables por debajo de los niveles recomendados. (123, 124). Debido a que el presente estudio usó una fórmula láctea en polvo que ya contenía la especie probiótica de estudio, con los estándares de viabilidad para productos

que contienen bacterias probióticas, con este método no fue necesario cumplir los requisitos de la cadena de frío que sería esencial para mantener otras presentaciones de probióticos y la administración a los niños estuvo a cargo de profesionales en manipulación de alimentos, este estudio muestra una ventaja sobre otros estudios que administraron bacterias probióticas aisladas que deben ser agregadas a otros productos lácteos, requiriendo condiciones estrictas de preparación que podían disminuir su efecto.

El presente estudio demostró que el uso de leche enriquecida con probióticos a base de *LGG* en concentración de 5×10^6 UFC/g y *Bifidobacterium longum* 3×10^6 , 5 días a la semana durante 9 meses, disminuyó los recuentos salivales de *S. mutans* significativamente. Estos resultados son consistentes con los estudios de Näse en 2001, luego de un tiempo prolongado de 7 meses de consumo del probiótico *LGG* con un vehículo lácteo, en niños de 1 a 6 años, encontraron una disminución significativa de los recuentos salivales de *S. mutans*. Es probable que se necesite una ingesta diaria casi regular, al igual que se ha encontrado con otros productos profilácticos eficaces en la prevención de caries como el fluoruro y clorhexidina (122). Debido a que cuando se ha evaluado el efecto de leche que contiene *L. rhamnosus* en el recuento de *S. mutans* a corto plazo (22, 19), con duración de 2 o 3 semanas y no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo experimental y el control. La administración del probiótico *LGG* en yogur (20, 23), durante 3 semanas, muestra disminución significativa en el recuento *S. mutans* inmediatamente después del consumo del probióticos, pero recolonización en las cinco semanas de interrumpir la ingesta de probiótico (20).

Además de evaluar los recuentos salivales de *S. mutans*, se evaluó la presencia de *Lactobacillus sp.* donde en el grupo intervención se observó presencia en el 96% y en el grupo control en el 93% al final de la intervención, sin encontrar diferencia estadísticamente significativa. Pocos estudios han evaluado el efecto de *LGG* y *Bifidobacterium longum* sobre los recuentos salivales de *Lactobacillus sp.* Sin embargo, estos resultados coinciden con los de Glavina (6), donde se evaluó el consumo de yogur que contenía *LGG* sobre los recuentos de *S. mutans* y *Lactobacillus sp.* en niños, encontrando disminución significativa en los recuentos salivales de *S. mutans* después de 30 días, pero no observó diferencias significativas en los recuentos de *Lactobacillus*.

No encontrar disminución en la presencia de *Lactobacillus* y si en *S. mutans*, este hallazgo sugiere que el probiótico *LGG* tiene efectos en los colonizadores primarios como los *S. mutans* que recubren inicialmente el esmalte para dar paso a la formación de placa bacteriana, y no tiene efecto en los colonizadores secundarios que posteriormente se adhieren como *Lactobacillus sp.* (45, 35). Los altos recuentos encontrados de *Lactobacillus* pueden corresponder a especies bacterianas en fase fluida presentes en la saliva, que para dar paso a la formación de placa, se deben anclar a receptores de adhesinas especializadas de la superficie celular bacteriana de colonizadores primarios en la superficie del diente (34).

Debido a que en el presente estudio fueron usados los métodos microbiológicos clásicos, no fue posible identificar al final de la intervención si la presencia de *Lactobacillus* correspondía a cepas patógenas o a la cepa probiótica LGG. Dado que muchas de las especies de *Lactobacillus* tienen requerimientos nutricionales y de crecimiento similares, a menudo es difícil identificar con precisión con la aplicación de métodos microbiológicos clásicos. Varios estudios de investigación se han centrado en la aplicación de técnicas de biología molecular para lograr la rápida detección y la diferenciación de esta especie. El uso de cebadores y sondas de las secuencias de ADN que codifican el rRNA 16S y 23S ha sido validado como medio de identificación. (125).

En los últimos años, se han desarrollado diversos métodos microbiológicos para detectar cepas con potencial cariogénico, estimando además el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), lo que ha permitido evaluar el grado de colonización y establecer el riesgo de desarrollar caries dental desde el punto de vista microbiológico (126). Otras metodologías también usadas para lograr diferenciar especies bacterianas con potencial cariogénico, se basan en la morfología que presentan las colonias en agar, pruebas bioquímicas, inmunológicas y métodos genético-moleculares (127). Todas estas técnicas, presentan buena sensibilidad y especificidad, pero tienen un costo económico elevado.

Sin embargo, las metodologías basadas en cultivos tradicionales, utilizadas para la cuantificación de *Streptococcus* del grupo *mutans* tienen una sensibilidad similar a la de técnicas moleculares como el PCR en tiempo real (Real time-PCR). La investigación realizada por Yano et al. (128), determinó que la sensibilidad de la metodología de PCR en tiempo real es capaz de detectar 10^2 UFC por ml, valor similar a la sensibilidad del cultivo microbiológico que utiliza el medio MSTB (Mitis-Salivarius-Bacitracina) el cual fue usado en el presente estudio. No obstante, es necesario señalar que, en ambas metodologías, la sensibilidad varía dependiendo del volumen de muestra aplicado a la placa de cultivo o a la mezcla de reacción de PCR.

Salazar en 2008 (106), demuestra que es factible detectar bacterias cariogénicas directamente de muestras de saliva, y que además se pueden identificar *S. mutans* y *S. sobrinus* de forma rápida a partir de muestras clínicas, sin la necesidad de utilizar medios de cultivo, ya que los procedimientos tradicionales para la identificación de bacterias cariogénicas pueden demorar hasta una semana, a diferencia del PCR que puede tener resultados dentro de un día y con mayor exactitud en la determinación de especies, lo que sin duda reporta beneficios para la realización de futuras investigaciones.

En los análisis de las características físico químicas de la saliva, no se encontraron diferencias significativas en el pH salival entre los grupos de estudio. Sin embargo, el aumento de los valores de pH por encima de 7 después de los 9 meses en el grupo probiótico indica una mejoría en las condiciones ácidas en la boca. Los hallazgos del estudio no son comparables con otros estudios, debido al corto plazo de los estudios que evalúan el pH salival y la especie de probiótico, en los estudios donde se evaluó los

cambios de pH por efecto del consumo de probióticos, el vehículo de administración fue queso y contenía *Lactobacillus acidophilus* (129), helado y queso con mezclas de probióticos (130), en los cuales se ha revelado un aumento significativo en el pH salival y una reducción significativa en el recuento de *S. mutans* en saliva durante un período de 7 días.

Es posible que el efecto en el pH sea a corto plazo, sin embargo, la mejoría de las condiciones ácidas de la boca puede interferir con las bacterias cariogénicas (113). No obstante, no se han encontrado evidencias clínicas sobre la acción directa del pH en la presencia de caries dental. Preethi et al. en 2010 (110) mostró que no hay correlación entre los valores de pH y la actividad de caries, independientemente de la edad y el sexo, sugiere que dependían de variaciones individuales y ambientales. no encontró diferencias significativas en el pH salival y la presencia de caries.

La baja capacidad del buffer salivar influye en el crecimiento de la microbiota cariogénica salival y el desarrollo de la caries (131), al igual que en los recuentos de unidades formadoras de colonia de *S. mutans*, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la capacidad buffer. Lo que concuerda con estudios en niños donde han encontrado un aumento significativo en la capacidad buffer de la saliva 30 días después del consumo de yogur con probiótico LGG (6). La capacidad buffer es un factor del huésped, que puede mejorar con el tiempo (27), sin embargo, el efecto de los probióticos sobre la capacidad buffer, evaluado en adultos no ha demostrado diferencia estadísticamente significativa (133, 4).

Los hallazgos relacionados con la caries de la Infancia Temprana (CIT) mostraron una disminución del 7,7% de la presencia de caries, pasando de 61% al 53,3% en el grupo intervención ($C_{(2-6\text{ ICDAS})EO} \geq 1$) sin encontrar diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, el porcentaje de niños con caries al final del estudio se encuentra por debajo de lo reportado en el IV Estudio nacional de salud bucal (58), donde se encontró que el 83,03% de los niños de 3 años a nivel nacional presentan caries en su dentición temporal (DT). Teniendo en consideración la región, Cali se encuentra en la región pacífica, donde el ENSAB IV (58) reportó que el 55,94% de los niños con dentición temporal presentan caries, siendo la región del país con menor presencia de Caries de la Infancia Temprana, igualmente el grupo intervención presentó un menor porcentaje. Los anteriores resultados que muestran una disminución de la caries, pero sin diferencias significativas, concuerdan con lo encontrado por Taipale et al. (133) y Hasslöf et al. (134), ya que la suplementación temprana de diferentes cepas probióticas no produjo una reducción significativa de caries medida a los 4 y 9 años de edad, respectivamente.

Debido a que las bacterias probióticas no son capaces de colonizar la cavidad oral de forma permanente (135). Los efectos locales y sistémicos de los probióticos descritos, incluyen la

adhesión, coagregación, la inhibición competitiva, la producción de ácidos orgánicos y compuestos similares a bacteriocina e inmune-modulación (136). Estos efectos en la salud oral se pueden evidenciar con el consumo continuo y regular, de acuerdo al concepto en el que estos microorganismos beneficiosos pueden habitar una biopelícula y proteger el tejido oral, adhiriéndose a los tejidos dentales para establecer un efecto cariostático e inhibir la caries dental, haciendo parte de la biopelícula para combatir las bacterias cariogénicas (137). Los anteriores conceptos se ven reflejados en el presente estudio, debido a que se observó una disminución en los recuentos de *S. mutans* que es la principal bacteria cariogénica colonizadora primaria, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la presencia de caries dental.

Lo resultados observados en el índice $C_{(ICDAS\ 2-6>0)OE}$ muestran un promedio de dientes con caries de $3,03\pm4,47$ y $2,30\pm3,94$ después de 9 meses para el grupo probiótico y el grupo control respectivamente en cada niño, estos resultados concuerdan con los encontrados en Chile por Rodríguez (118), donde la prevalencia media de caries $C_{(ICDAS\ 2-6>0)OE}$ fue $2,86\pm3,64$ para el grupo probiótico y $3,58\pm3,66$ para el grupo control después de 12 meses de intervención. Los anteriores resultados incluyen los estadios incipientes del proceso de caries, los cuales evidencian el progreso de la enfermedad (9), en el presente estudio los hallazgos no muestran diferencias significativas entre los grupos intervención y control, sin embargo, ocurrió una disminución en el número de dientes con caries incipiente en el grupo probiótico al finalizar la intervención, con $1,11\pm1,97$ dientes con caries inicial (Icdas 2) por niño, lo cual es bajo para el rango de edad de 3 a 4 años, según lo reportado en otros estudios en Colombia (12, 138, 139).

Es posible que en el estudio se encontrara sesgos relacionados con la obtención de información, debido a que los niños participantes en el estudio a largo plazo, estaban susceptibles a presentar sesgo de atención, que se presenta cuando los participantes de un estudio pueden alterar su comportamiento al saber que están siendo observados (140), partiendo desde el momento en que se informa a los padres en el proceso de consentimiento informado, es posible que los padres y/o cuidadores mejoren los hábitos de higiene oral de los niños, visiten el odontólogo o cambien los componentes de la dieta, factores que están asociados a los cambios en la presencia de caries dental, sin embargo en el presente estudio no se evaluaron, pero de acuerdo a lo reportado por Arango (41) en la Ciudad de Cali, en niños de 1 a 5 años, se encontró asociación estadísticamente significativa entre la presencia de caries dental y el estrato socioeconómico, la afiliación al servicio de salud y el acostar al niño sin realizar cepillado dental.

Otro posible sesgo es el de membresías, que ocurre cuando entre los sujetos en estudio se presentan subgrupos de individuos que comparten algún atributo en particular, relacionado de forma positiva o negativa con la variable en estudio (140). La asignación por conglomerados a los dos grupos intervención y control, no permitió tener igual número de niños en cada grupo, teniendo un mayor número de niños en el grupo tratamiento con

probióticos, es posible que compartieran atributos particulares. Respecto al flujo salivar que interfirió en la toma de la muestra y cantidad de la misma para cumplir con la evaluación de todas las variables físico químicas y microbiológicas, aunque el rango de edad fue estrecho, de 3 a 4 años, los niños menores presentaron dificultad en dar la muestra y en ocasiones fue necesario obtenerla con gotero.

El principal sesgo que se presentó fue la pérdida de seguimiento, que puede ocurrir especialmente en grupos de cohortes cuando sujetos de una de las cohortes en estudio se pierde total y parcialmente, más o menos al 20%, y no se pudo terminar el seguimiento preestablecido, generando de esta forma una alteración relevante en los estudios (140). La pérdida en el seguimiento fue de 22,1% en el grupo probiótico y 23,4% en el grupo control, aunque las características iniciales de los individuos perdidos fueron proporcionales para los dos grupos, los individuos que abandonaron el estudio pueden tener características diferentes en el efecto del probiótico de las que permanecieron en el estudio, lo que representa una limitación en la evaluación final y cumplimiento estricto del protocolo.

Los estudios disponibles que evalúan el efecto de los probióticos en la salud oral de los niños, varían en calidad metodológica, las cepas de probióticos estudiados, la duración de las intervenciones y las dosis utilizadas. El presente estudio al tener una duración de largo plazo, presenta una ventaja sobre la mayoría de los estudios que son a corto plazo, se requieren mas estudios a largo plazo donde se evalúe el efecto de los probióticos en la cavidad oral, debido a que aun no hay consistencia sobre la colonización y acción de los probióticos en la placa bacteriana del tejido duro del diente (92, 141), lo anterior sugiere que se deben implementar métodos que permitan diferenciar especies de *Lactobacillus* para confirmar la presencia en la cavidad oral de las bacterias probióticas y su efecto a largo plazo.

8. CONCLUSIONES

- La leche enriquecida con el probiótico *L.rhamnosus GG* se pueden utilizar como parte de la modificación dietética en niños para disminuir factores de riesgo de la caries dental, con la disminución de los recuentos de unidades formadoras de colonia de *S. mutans*, uno de los principales microorganismos cariogénicos presentes en la cavidad oral de los niños.
- Mejorar la capacidad amortiguadora de la saliva en la infancia temprana con el consumo a largo plazo de leche enriquecida con el probiótico *L. rhamnosus GG*, se puede aplicar como una medida preventiva para reducir el riesgo de caries, lo que permitiría que los niños tengan mejor respuesta a los ácidos producidos por el metabolismo de los carbohidratos de la dieta.
- La microbiota microbiana de la cavidad oral de los niños es potencialmente modificable debido a su inestabilidad, lo que permite que si se incluye en la dieta probióticos como *L. rhamnosus GG* se presente efecto en la disminución de la presencia de *S. mutans* significativamente, sin embargo, los hallazgos no logran la disminución significativa en la presencia de *Lactobacillus sp*, lo que puede tener un efecto indirecto sobre estos colonizadores secundarios, debido a la eliminación de los receptores de adhesina de los colonizadores primarios como lo es *S. mutans*.

9. RECOMENDACIONES

Con los hallazgos del presente estudio, se propone continuar la línea de investigación del efecto de los probióticos en la salud oral de la primera infancia, incluyendo análisis posteriores a la suspensión del consumo del probiótico, con el fin de identificar el efecto posterior a la suspensión del consumo, y además identificar si existe una colonización permanente en la cavidad oral.

El efecto del probiótico en estudio se observó solo sobre los recuentos de *S. mutans* que es un colonizador primario, se recomienda en futuros estudios evaluar otros colonizadores primarios como *Actinomyces spp.* Además, incluir en la evaluación de los recuentos de microorganismos cariogénicos análisis de muestras de saliva y de placa bacteriana de los mismos sujetos de estudio, debido a que los microorganismos se encuentran en el estado en fase fluida, antes de formar parte de la placa bacteriana.

Para aumentar la especificidad del efecto de los probióticos en los microorganismos cariogénicos, es recomendable además de aplicar los métodos microbiológicos clásicos, usar técnicas de biología molecular para lograr la rápida detección y la diferenciación de esta especie y su permanencia en la cavidad oral.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO). Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. 2002;1–11.
2. Näse L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Pönkä A, Poussa T, et al. Effect of Long-Term Consumption of a Probiotic Bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in Milk on Dental Caries and Caries Risk in Children. *Caries Res.* 2001;35(6):412–20.
3. Çağlar E, Sandalli N, Twetman S, Kavaloglu S, Ergeneli S, Selvi S. Effect of yogurt with Bifidobacterium DN-173 010 on salivary mutans Streptococci and Lactobacilli in young adults. *Acta Odontol Scand.* 2005;63:317–20.
4. Ahola AJ, Yli-Knuuttila H, Suomalainen T, Poussa T, Ahlstrom A, Meurman JH, et al. Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. *Arch Oral Biol.* 2002 Nov;47(11):799–804.
5. Petti S, Tarsitani G, D’Arca AS. A randomized clinical trial of the effect of yoghurt on the human salivary microflora. *Arch Oral Biol.* 2001 Aug;46(8):705–12.
6. Glavina D, Gorseta K, Skrinjaric I, Vranic DN, Mehulic K, Kozul K. Effect of LGG yoghurt on Streptococcus mutans and Lactobacillus spp. salivary counts in children. *Coll Antropol.* 2012 Mar;36(1):129–32.
7. Ekstrand KR, Ricketts DN, Kidd EA. Occlusal caries: pathology, diagnosis and logical management. *Dent Update.* 2001 Oct;28(8):380–7.
8. Kidd E, Fejerskov O. Changing concepts in cariology: forty years on. *Dent Update.* 2013 May;40(4):277-278-282-286
9. Fejerskov O. Changing Paradigms in Concepts on Dental Caries : Consequences for Oral Health Care. 2004;182–91.
10. Ministerio de Protección Social. Plan Nacional de Salud Pública 2007-2010. Bogotá: 2007;1.
11. Ministerio de Salud y Protección Social. Plan Decenal de Salud Pública 2012 - 2021. Bogotá: 2013
12. Ramirez-Puerta BS, Escobar-Paucar G, Castro-Aguirre JF, Franco-Cortés ÁM. Necesidades de tratamiento en dentición primaria en niños de uno a cinco años con caries dental no tratada en una comunidad de bajos ingresos, Moravia, Medellín, 2006. *Rev FacOdontUnivAntioq* 2009;(20): 129 - 137.
13. González-Martínez F, Sánchez-Pedraza R, Carmona-Arango L. Indicadores de riesgo para caries dental en niños preescolares de La Boquilla, Cartagena. *Rev Salud Pública* 2009;(11): 620 - 630.
14. Ramírez-Puerta Blanca S, Franco-Cortés Angela M, Ochoa-Acosta Emilia, Escobar-Paucar Gloria. Experiencia de caries en dentición primaria en niños de 5 años, Medellín, Colombia. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública.* 2015;33(3):345-352.
15. Sciences RD, Francisco S. The Continuum of Dental Caries — Evidence for a Dynamic. 2004;(3):2002–5.
16. Singh RP, Damle SG, Chawla A. Salivary mutans streptococci and lactobacilli modulations in young children on consumption of probiotic ice-cream containing

- Bifidobacterium lactis Bb12 and Lactobacillus acidophilus La5. Acta Odontol Scand. 2011 Nov;69(6):389–94.
17. Pohjavuori S, Ahola AJ, Yli-Knuuttila H, Piirainen L, Poussa T, Meurman JH et al. Effect of consumption of Lactobacillus rhamnosus GG and calcium in carrot-pineapple juice on dental caries risk in children. Int J Probiotics and Prebiotics 2010;5: 221 - 228.
 18. Campus G, Cocco F, Carta G, Cagetti MG, Simark-Mattson C, Strohmenger L, et al. Effect of a daily dose of Lactobacillus brevis CD2 lozenges in high caries risk schoolchildren. Clin Oral Investig. 2014;18(2):555–61.
 19. Juneja A, Kakade A. Evaluating the effect of probiotic containing milk on salivary mutans streptococci levels. J Clin Pediatr Dent. 2012;37(1):9–14.
 20. Aminabadi NA, Erfanparast L, Ebrahimi A, Oskouei SG. Effect of chlorhexidine pretreatment on the stability of salivary lactobacilli probiotic in six- to twelve-year-old children: a randomized controlled trial. Caries Res. 2011;45(2):148–54.
 21. Jindal G, Pandey RK, Agarwal J, Singh M. A comparative evaluation of probiotics on salivary mutans streptococci counts in Indian children. Eur Arch Paediatr Dent. 2011 Aug;12(4):211–5.
 22. Lexner MO, Blomqvist S, Dahlen G, Twetman S. Microbiological profiles in saliva and supragingival plaque from caries-active adolescents before and after a short-term daily intake of milk supplemented with probiotic bacteria - a pilot study. Oral Health Prev Dent. 2010;8(4):383–8.
 23. Cildir SK, Germec D, Sandalli N, Ozdemir FI, Arun T, Twetman S, et al. Reduction of salivary mutans streptococci in orthodontic patients during daily consumption of yoghurt containing probiotic bacteria. Eur J Orthod. 2009 Aug;31(4):407–11.
 24. Steckslen-Blicks C, Sjöström I, Twetman S. Effect of long-term consumption of milk supplemented with probiotic lactobacilli and fluoride on dental caries and general health in preschool children: a cluster-randomized study. Caries Res. 2009;43(5):374–81.
 25. Twetman L, Larsen U, Fiehn N-E, Steckslen-Blicks C, Twetman S. Coaggregation between probiotic bacteria and caries associated strains: an in vitro study. Acta Odontol Scand; 67: 284–288. 2009.
 26. Marsh P, Martin MV. Oral Microbiology. 4th edn. Oxford: Wright, 1999.
 27. Selwitz RH, Ismail A, Pitts NB. Dental caries. Lancet 2007; 369: 51-59.
 28. Dalmaso M, De Haas E, Neve H, Strain R, Cousin FJ, Stockdale SR, et al. Isolation of a novel phage with activity against streptococcus mutans biofilms. PLoS One. 2015;10(9):1–18.
 29. Caufield PW, Griffen AL. Dental caries. An infectious and transmissible disease. Pediatr Clin North Am. 2000;47(5):1001–19.
 30. Featherstone JD. The science and practice of caries prevention. J Am Dent Assoc. 2000;131(7):887–99.
 31. Featherstone JDB. The continuum of dental caries--evidence for a dynamic disease process. J Dent Res. 2004;(83):C39-42.
 32. Seow WK. Biological mechanisms of early childhood caries. Community Dent Oral Epidemiol 1998; 26(suppl 1): 8–27.
 33. Jurczak A, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of Streptococcus mutans and

- the ability to form biofilms. 2014;499–515.
34. Zijnga V, Leeuwen MBM Van, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmu R. Oral Biofilm Architecture on Natural Teeth. *PloSt One*. 2010;5(2):1–9.
 35. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*- Derived Glucosyltransferases: Role in Extracellular Matrix Formation of Cariogenic Biofilms. 2011;69–86.
 36. Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Lu B, Delahunty CM, Yates JR, et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *PLoS Pathog*. 2012;8(4):7–9.
 37. Cvitkovitch DG, Li Y, Ellen RP. Quorum sensing and biofilm formation in *Streptococcal* infections. 2003;112(11).
 38. Ahn S, Ahn S, Wen ZT, Brady LJ, Burne RA. Characteristics of Biofilm Formation by *Streptococcus mutans* in the Presence of Saliva. *Infection and Immunity*. 2008;76(9):4259–68.
 39. Schamschula RG, Sugár E, Un PS, Tóth K, Barmes DE, Ad- kins BL. Physiological indicators of fluoride exposure and utilization: an epidemiological study. *Community Dent Oral Epidemiol* 1985;13:104-107.
 40. King NM, Wu II, Tsai JS. Caries prevalence and distribution, and oral health habits of zero to four year old children in Macau, China. *J Dent Child* 2003;70:243-249.
 41. Arango MC, Jaramillo A, Cruz CA. Prevalencia de caries de la infancia temprana y factores de riesgo asociados en niños de 1 a 5 años en la ciudad de Santiago de Cali. *Ustasalud* 2013;12:108–115.
 42. Nada H.A. Mudallal Al, Essam F.A. Al-Jumaily, Nidhal.A. A.Muhimen. Isolation and identification of mutan's streptococci bacteria from human dental plaque samples. *Journal of Al_Nahrain University* 2008;11(3),98–105.
 43. Blango, M.G., and Mulvey, M.A. Bacterial landlines: contact-dependent signaling in bacterial populations. *Curr Opin Microbiol*. 2009;12:177–181.
 44. Wright CJ, Burns LH, Jack AA, Back CR, Dutton LC, Nobbs AH, et al. Microbial interactions in building of communities. *Mol Oral Microbiol*. 2013;28(2):83–101.
 45. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(7):471-480.
 46. Elias S, Banin E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev*. 2012;36(5):990–1004.
 47. Napimoga, M. H., R. U. Kamiya, R. T. Rosa, E. A. R. Rosa, J. F. Höfling R. de Oliveira Mattos-Graner, and R. B. Gonccalves. Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals. *J. Med. Microbiol*. 2004;53:697–703.
 48. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes?. *Microbiology*. 2003;149(Pt 2):279-94.
 49. Ismail AI, Sohn W, Tellez M, Amaya A, Sen A, Hasson H. The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol* 2007; 35: 170 - 178.
 50. Pitts NB, Ekstrand KR; International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) and its International Caries Classification and Management System

- (ICCMS)- methods for staging of the caries process and enabling dentists to manage caries; *Community Dent Oral Epidemiol*; 2013; 41:e41-e52.
51. Shivakumar KM, Prasad S, Chandu GN; International Caries Detection and Assessment System: A new paradigm in detection of dental caries; *J Conserv Dent*; 2009; 12:10- 16.
 52. ICDAS Foundation. Website <http://www.icdas.org/home> (Ultimo acceso el 1 de Marzo de 2017).
 53. Klein, H.; Palmer, C. E. & Knutson, J. W. Studies on Dental Caries, I, Dental status and Dental Needs of elementary school. *Pub. Health Rep.*, 53:751- 65, 1938.
 54. Gruebhel, A. O. A measurement of dental caries prevalence and treatment service for deciduous teeth. *J. Dent. Res.*, 23:163-8, 1944.
 55. De Grauwe A, Aps JK, Martens LC. Early Childhood Caries (ECC): what's in a name? *Eur J Paediatr Dent* 2004; 5: 62–70.
 56. Tinanoff N, Kanellis MJ, Vargas CM. Current understanding of the epidemiology mechanisms, and prevention of dental caries in preschool children. *Pediatr Dent* 2002; 24: 543–51.
 57. Osuji OO, Leake JL, Chipman ML, Nikiforuk G, Locker D, Levine N. Risk factors for dental fluorosis in a fluoridated community. *J Dental Res* 1988; 67: 1488–92.
 58. Ministerio de Salud y de la Protección Social. IV Estudio Nacional de Salud Bucodental (ENSAB IV) Situación en Salud Bucal. Bogotá-Colombia; 2012.
 59. Van Nieuw Amerongen A, Bolscher JG, Veerman EC. Salivary proteins: Protective and diagnostic value in cariology? *Caries Res.* 2004;38:247–53.
 60. Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, De Palo EF. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin Chim Acta.* 2007;383:30–40.
 61. Pannunzio E, Amancio OM, Vitalle MS, Souza DN, Mendes FM, Nicolau J. Analysis of the stimulated whole saliva in overweight and obese school children. *Rev Assoc Med Bras.* 2010;56:32–36.
 62. Shaw L, Murray J, Burchell C, Best J. Calcium and phosphorus content of plaque and saliva in relation to dental caries. *Caries Res.* 1983;17(6):543-8.
 63. Battino M, Ferreior MS, Gallardo I, Newman HN, Bullon P. The antioxidant capacity of saliva. *J Clin Periodontol.* 2002;29: 189–94.
 64. Pradhan D, Jain D, Gulati A, Kolhe SJ, Baad R, Rao BS. Effect of the presence of dental plaque on oral sugar clearance and salivary pH: an in vivo study. *J Contemp Dent Pract.* 2012;13, 753-755.
 65. Kumar A, Hedge R, Dixit U. Role of plaque in the clearance of salivary sucrose and its influence on salivary pH. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2011;29, 310-314.
 66. Edgar, W. M, Highman, S. M, Manning, R. H. Saliva Stimulation and Caries Prevention. *Advances. Dental Research* 1994;8(2):239 – 245.
 67. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent* 2001; 85: 162-9.
 68. Lagerlöf, F, Oliveby, A. Caries – protective Factors in Saliva. *Advances in Dental Research* 1994;8(2):229 – 238.
 69. Tulunoglu O, Demirtas S, Tulunoglu I. Total antioxidant levels of saliva in children related to caries, age and gender. *Int J Paed Dent.* 2006;16:186–91.

70. Prabhakar AR, Dodawad R, Raju OS. Evaluation of flow rate, pH, buffering capacity, calcium, total proteins and total antioxidant capacity levels of saliva in caries free and caries active children: An in vivo study. *Int J Clin Pediatr Dent* 2009;2:9-12.
71. Metchnikoff E. Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. In: Chalmers Mitchell P, Ed. *The prolongation of life: optimistic studies*. London: Heinemann, 1907; 161–183.
72. Caglar E., Kusu O.O., Selvi Kuvvetli S., Kavaloglu Cildir S., Sandalli N., Twetman S. Short-term effect of ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb-12 on the number of salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Acta Odontol. Scand.* 2008;66:154–158.
73. Levine RS. Milk, flavoured milk products and caries. *Br Dent J*; 191: 20. 2001.
74. Matsumoto M, Tsuji M, Sasaki H, Fujita K, Nomura R, Nakano K, et al. Cariogenicity of the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* in rats. *Caries Res*; 39: 479-483. 2005.
75. Çaglar E, Sandalli N, Kusu OO, Kargul B. The buffering capacity of probiotic yogurt. *Acta Stomatol Croat*; 45: 41-45. 2011.
76. Lodi CS, Manarelli MM, Sasaki KT, Fraiz FC, Delbem ACB, Martinhon CCR. Evaluation of fermented milk containing probiotic on dental enamel and biofilm: In situ study. *Arch Oral Biol*; 55: 29-33. 2010.
77. Lang C, Bottner M, Holz C, Veen M, Ryser M, Reindl A, et al. Specific *Lactobacillus/mutans streptococcus* co-aggregation. *J Dent Res*; 89: 175–179. 2010.
78. Söderling E, Marttinen A, Haukioja A. Probiotic lactobacilli interfere with *Streptococcus mutans* biofilm formation in vitro. *Curr Microbiol*; 62: 618–622. 2011.
79. Marttinen A, Haukioja A, Karjalainen S, Nylund L, Satokari R, Öhman C, et al. Short-term consumption of probiotic lactobacilli has no effect on acid production of supragingival plaque. *Clin Oral Invest*; 16: 797–803. 2012.
80. Gorbach SL. The discovery of *Lactobacillus GG*. *Nutr Today* 1996; 31: 2S–4S.
81. Saxelin M. *Lactobacillus GG* – a human probiotic strain with thorough clinical documentation. *Food Rev Int* 1997; 13: 293– 313.
82. Haukioja A, Loimaranta V and Tenovuo J. Probiotic bacteria affect the composition of salivary pellicle and streptococcal adhesion in vitro. *Oral Microbial Immunology*. 2008; 23(4): 336–343.
83. Tehrani, M. H., Akhlaghi, N., Talebian, L., Emami, J., & Keyhani, S. E. (2016). Effects of probiotic drop containing *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium infantis*, and *Lactobacillus reuteri* on salivary *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* levels. *Contemporary Clinical Dentistry*, 7(4), 469–474.
84. Glavina D, Gorseta K, Skrinjaric II, VranicDN, Mehulic K, Kosul K. Effect of LGG yogurt on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. Salivary counts in children. *CollAntropol* 2012; 36: 129 - 132.
85. Geier MS, Butler RN, Howarth GS. Inflammatory bowel disease: current insights into pathogenesis and new therapeutic options; probiotics, prebiotics and synbiotics. *Int J Food Microbiol* 2007; 115: 111.

86. Marco ML, Pavan S, Kleerebezem M. Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Curr Opin Biotechnol* 2006; 17: 20410.
87. Tagg JR, Dierksen KP. Bacterial replacement therapy: adapting 'germ warfare' to infection prevention. *Trends Biotechnol* 2003; 21: 21723.
88. Picard C, Fioramonti J, Francois A, Robinson T, Neant F, Matuchansky C. Review article: bifidobacteria as probiotic agents physiological effects and clinical benefits. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 495512.
89. Devine DA, Marsh PD. Prospects for the development of probiotics and prebiotics for oral applications. *Journal of Oral Microbiology*. 2009;1-11.
90. Kilian M, Frandsen EVG, Haubek D, Poulsen K. The etiology of periodontal disease revisited by population genetic analysis. *Periodontol* 2000 2006; 42: 158–79.
91. Busscher HJ, Mulder A, van der Mei HC. In vitro adhesion to enamel and in vivo colonization of tooth surfaces by lactobacilli from a bio-yoghurt. *Caries Res* 1999; 33: 403–4.
92. Yli-Knuuttila H, Snall J, Kari K, Meurman JH. Colonization of *Lactobacillus rhamnosus* GG in the oral cavity. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21: 129–31.
93. Gewolb IH, Schwalbe RS, Taciak VL, et al: Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1999;80:F167– F173.
94. Blakey JL, Lubitz L, Barnes GL, et al: Development of gut colonisation in pre- term neonates. *J Med Microbiol* 1982;15:519– 529.
95. Lin PW, Nasr TR, Stoll BJ: Necrotizing enterocolitis: recent scientific advances in pathophysiology and prevention neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol* 2008;32:70– 82.
96. Meurman JH. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry?. *Eur J Oral Sci* 2005; 113: 188 - 196.
97. Sameer A. The synergism of Probiotics in dentistry .*Saudi dental journal*. 2007;17:3.
98. Van den Nieuwboer, M., Claassen, E., Morelli, L., Guarner, F. and Brummer, R.J., Probiotic and synbiotic safety in infants under two years of age. *Beneficial Microbes* 2014;5: 45-60.
99. Sanders ME, Levy DD. The science and regulations of probiotic food and supplement product labeling. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1219(Suppl 1):E1–E23.
100. Van Goudoever H, Guandalini S, Kleinman RE (eds): *Early Nutrition: Impact on Short- and Long- Term Health*. Nestlé Nutr Inst Workshop Ser Pediatr Program, vol 68, pp 65–82, Nestec Ltd., Vevey/S. Karger AG, Basel, 2011.
101. Braegger Ch, Chmielewska A, Decsi T, et al: ESPGHAN Committee on Nutrition: Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: a systematic review and comment by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011;52:238– 250.
101. Szajewska H, Wanke M, Patro B. Meta-analysis: the effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation for the prevention of healthcare-associated diarrhoea in children. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011; 34:1079–87. Research.
102. Silness J, Loe H. Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand* 1964; 22: 121-135.
103. Hamada, S. and Slade, H.D. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* 1980; 44: 331–384.

104. Linke B, Harald A. New Medium for the Isolation of Streptococcus mutans and its differentiation from other oral Streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 1977; 5(6):604-609.
105. Parisotto TM, Steiner-Oliveira C, Silva CM, Rodrigues LK, Nobre-dos-Santos M. Early childhood caries and mutans streptococci: a systematic review. *Oral Health Prev Dent.* 2010;8:59–70.
106. Salazar LA, Vásquez C, Almuna A, Oporto G, Detección A. Detección Molecular de Streptococcus Cariogénicos en Saliva. *Int. J. Morphol.* 2008;26(4):951–8. 32.
107. Linossier, A.; Vargas, A.; Zillmann, G.; Arriagada, M.; Rojas, R. & Villegas, R. Streptococci mutans: a semi- quantitative method to assess the risk to oral infection in preschool Chilean children. *Rev. Med. Chil.*, 2003;131:412-8,.
108. Jensen B, Bratthall D. A new method for the estimation of mutans streptococci in human saliva. *J Dent Res.* 1989;68:468–71.
109. Heintze U, Birkhed D, Bjorn H. Secretion rate and buffer effect of resting and stimulated whole saliva as a function of age and sex. *Swed Dent J* 1983;7:227-38.
110. Preethi BP, Reshma D, Anand P. Evaluation of flow rate, pH, buffering capacity, calcium, total protein and total antioxidant capacity levels of saliva in caries free and caries active children: An in vivo study. *Indian J Clin Biochem.* 2010;25:425–8.
111. Marja-Leena M, Paivi R, Sirkka J, Ansa O, Matti S. Childhood caries is still in force: a 15-year follow-up. *Acta Odontol Scand* 2008;66:189– 192.
112. Twetman S., Keller M.K. Probiotics for caries prevention and control. *Adv. Dent. Res.* 2012;24:98–102.
113. Dhawan R, S. Dhawan papel de los probióticos en la salud bucal: Un estudio aleatorizado controlado con placebo, doble ciego. *Journal of Interdisciplinary Odontología.* 2013; 3 (2): 71-78.
114. Ferrazzano GF, Cantile T, Tipo M, Ingenito A, L Chianese, Addeo F. Efecto protector del extracto de yogur en la desmineralización del esmalte dental in vitro. *Australian Dental Journal.* 2008; 53 : 314-19.
115. Puffer S, Torgerson D, Watson J. Evidence for risk of bias in cluster randomised trials: review of recent trials published in three general medical journals. *BMJ* 2003; 327:785-9.
116. Campbell MK, Elbourne DR, Altman DG, for the CONSORT Group. CONSORT statement: extension to cluster randomised trials. *BMJ.* 2004; 328:702-8.
117. Landis JR, Koch GG. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 33(1):159–17.
118. Rodríguez G., Ruiz B., Faleiros S., Vistoso A., Marró M.L., Sánchez J., Urzúa I., Cabello R. Probiotic Compared with Standard Milk for High-caries Children: A Cluster Randomized Trial. *J Dent Res.* 2016;95(4):402-7.
119. Simark-Mattson C, Emilson CG, Håkansson EG, Jacobsson C, Roos K, Holm S: Lacto- bacillus-mediated interference of mutans streptococci in caries-free vs. caries-active subjects. *Eur J Oral Sci* 2007; 115: 308–314.
120. Teanpaisan, R., Piwat, S. and Dahlen, G. Inhibitory effect of oral Lactobacillus against oral pathogens. *Lett Appl Microbiol* 2011;53: 452–459.
121. Adams, M.R., Marteau, P. On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int J Food Microbiol* 1995;27, 263–264.

122. Cagetti, M. G., Mastroberardino, S., Milia, E., Cocco, F., Lingström, P., & Campus, G. The Use of Probiotic Strains in Caries Prevention: A Systematic Review. *Nutrients*, 2013;5(7), 2530–2550.
123. Twetman S, Stecksén-Blicks C. Probiotics and oral health effects in children. *Int J Paediatr Dent* 2008;18:3-10.
124. Moeiny P, Jamei N, Mohamadi M, Shafizadeh N, Valaei N, Rahbar M, et al. Effect of a probiotic yogurt produced in Iran on the salivary counts of *Streptococcus mutans*. *Res Dent Sci* 2013;10:73-82.
125. Dubernet S, Desmaures N, Guéguen M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol Lett* 2002;214:271-275.
126. Hildebrandt, G.H. & Bretz, W.A. Comparison of culture media and chairside assays for enumerating mutans streptococci. *J. Appl. Microbiol.*, 100:1339-47, 2006.
127. Oho, T.; Yamashita, Y.; Shimazaki, Y.; Kushiya, M. & Koga T. Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. *Oral. Microbiol. Immunol.*, 15:258-62, 2000.
128. Yano, A.; Kaneko, N.; Ida, H.; Yamaguchi, T. & Hanada N. Real-time PCR for quantification of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol. Lett*, 2002;217:23-30.
129. Srivastava S., Saha, S.; Kumari M.; Mohd S.; Effect of Probiotic Curd on Salivary pH and *Streptococcus mutans*: A Double Blind Parallel Randomized Controlled Trial. *J Clin Diagn Res*. 2016 Feb;10(2):ZC13-6.
130. Chinnappa A, Konde H, Konde S, Raj S, Beena JP. Probiotics for future caries control: A short-term clinical study. *Indian Journal of Dental Research*. 2013;24(5):547-49.
131. Gudkina J., Brinkmane A. Caries experience in relation to oral hygiene, salivary cariogenic microflora, buffer capacity and secretion rate in 6 year olds and 12 year olds in Riga Stomatologija, *Baltic Dental and Maxillofacial Journal*, 2008;10:76-80.
132. Chuang LC, Huang CS, Ou-Yang LW, Lin SY. Probiótico *Lactobacillus paracasei* efecto sobre la flora bacteriana cariogénicos. *Clin Oral Investig*. 2011; 15:471-6.
133. Taipale T., Pienihäkkinen K., Alanen P., J. Jokela, Söderling E. Administración de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 en la primera infancia: Un efecto posterior al juicio sobre la caries ocurrencia a los cuatro años de edad. *Caries Res*. 2013; 47 : 364-372.
134. Hasslöf P, West CE, Videhult FK, Brandelius C, Stecksén-Blicks C. Early intervention with probiotic *Lactobacillus paracasei* F19 has no long- term effect on caries experience. *Caries Res*. 2013;47(6):559–565.
135. Caglar E., Kuscu O.O., Selvi Kuvvetli S., Kavaloglu Cildir S., Sandalli N., Twetman S. Short-term effect of ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb-12 on the number of salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Acta Odontol. Scand*. 2008;66:154–158.
136. Teughels W., van Essche M., Sliepen I., Quirynen M. Probiotics and oral healthcare. *Periodontol*. 2000. 2008;48:111–147.
137. Saraf K, Shashikanth MC, Priya T, N Sultana, Chaitanya CSK. Probiotics- ¿Tienen un papel en la medicina y de la odontología? *Revista de la Asociación de Médicos de la India*. 2010; 58 : 488-91.

138. Escobar G, Ramírez B, Franco A, Tamayo A, Castro J. Experiencia de caries dental en niños de 1-5 años de bajos ingresos. *Revista CES Odontología*. Medellín. Colombia., 2009;22(1):21-28.
139. Saldarriaga A, Arango CM, Cossio M. Dental caries of a primary dentition of a Colombian population according to ICDAS criteria. *Braz Oral Research* 2010; 24: 211-216.
140. Manterola, C. & Otzen, T. Los sesgos en investigación clínica. *Int. J. Morphol.*, 33(3):1156-64, 2015.
141. Ravn, I.; Dige, I.; Meyer, R.L.; Nyvad, B. Colonization of the oral cavity by probiotic bacteria. *Caries Res.* 2012, 46, 107–112.

11. ANEXOS

Anexo 1. Ficha técnica de las leches usadas en la intervención.

Leche con probiótico (Intervención): NAN® PRO 3. NESTLE

Es una fórmula de continuación diseñada para bebés a partir de los 12 meses de edad hasta los 3 años, como parte líquida de su alimentación complementaria. NAN® PRO 3 está diseñada para sustituir la leche de vaca. NAN® PRO 3 proporciona los nutrientes necesarios para el desarrollo y estimula las defensas inmunológicas naturales del bebé durante el periodo de alimentación complementaria, con adición de probióticos *Lactobacillus Rhamnosus GG*, para extender los beneficios de la inmunoactivación durante el periodo crítico de la ablactación y así brindar un efecto protector al bebé.

Ingredientes: Leche descremada de vaca, Maltodextrina, Oleína de Palma, Lactosa, Suero desmineralizado de leche, Aceite de Canola, Aceite de Girasol, Minerales [Citrato de Calcio, Sulfato Ferroso (15 mg/100 g), Sulfato de Zinc, Sulfato de Cobre y Yoduro de Potasio], Emulsificante (Lecitina de Soya), Ácido graso poliinsaturado de cadena larga (DHA), Vitaminas [Vitamina C (Ascorbato de Sodio), Taurina, Niacina (Nicotinamida), Vitamina E (Acetato de Tocoferol), Pantotenato de Calcio, Vitamina A (Acetato de Retinol), Vitamina B6 (Clorhidrato de Piridoxina), Vitamina B1 (Tiamina), Vitamina B2 (Riboflavina), Ácido Fólico (Folacina), Vitamina K1 (Filoquinona), D-Biotina, Vitamina D (Colecalciferol), Vitamina B12 (Cianocobalamina)], Nucleótidos, [Uridina, Citidina, Adenosina y Guanosina], Cultivo de *Bifidus* (3×10^6 UFC/g), Cultivo de *Lactobacillus* (5×10^6 UFC/g).

Presentación: Lata por 800 g. (Reg. San. RSiA16I87907).

Leche sin probiótico (Control): ALPINA BABY 3 PLUS ® ALPINA

Para niños a partir de 1 año. Adecuado aporte de proteínas, grasas, carbohidratos, vitaminas y minerales que contribuyen a un adecuado crecimiento y desarrollo. Además, contiene prebióticos, que brindan satisfacción y tranquilidad al bebé; nucleótidos, para la protección de su sistema de defensas y adición de DHA y ARA, para el progreso del niño.

Presentación: Lata por 900 g.

Anexo 2. Aval de Comité Institucional de Revisión de Ética Humana de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle.



Comité Institucional de Revisión de Ética Humana
Facultad de Salud

ACTA DE APROBACIÓN N° 009 - 015

Proyecto: EFECTOS DE UN ALIMENTO ENRIQUECIDO CON PROBIÓTICOS A BASE DE LACTOBACILLUS RHAMNOSUS GG, SOBRE EL RECuento DE STREPTOCOCCUS MUTANS Y LACTOBACILLUS SP Y LA PRESENCIA DE CARIES INCIPIENTE EN NIÑOS DE 4-6 AÑOS EN CALI, COLOMBIA"

Sometido por: ADOLFO CONTRERAS, JUDY VILLAVICENCIO, JESÚS HERNÁNDEZ, MARÍA CRISTINA ARANGO, FRANCIA TRIANA, LINA MARÍA GARCÍA, SUSANA ARIAS, DANIEL VÁSQUEZ, LINA MARÍA VILLEGAS.

Código Interno: 071 - 015 **Fecha en que fue sometido:** 9 / 6 / 2015

El Consejo de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, ha establecido el Comité Institucional de Revisión de Ética Humana (CIREH), el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión en 2002; y el Código de Regulaciones Federales, título 45, parte 46, para la protección de sujetos humanos, del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos 2000.

Este Comité certifica que:

- Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:

☒ Resumen del proyecto	☒ Protocolo de investigación
☒ Formato de consentimiento informado	☒ Instrumento de recolección de datos
☐ Folleto del investigador (si aplica)	☒ Cartas de las instituciones participantes
☐ Resultados de evaluación por otros comités (si aplica)	
- El presente proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité.
- Según las categorías de riesgo establecidas en el artículo 11 de la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, el presente estudio tiene la siguiente **Clasificación de Riesgo:**

☐ SIN RIESGO	☐ RIESGO MÍNIMO	☒ RIESGO MAYOR DEL MÍNIMO
-------------------------------------	--	---
- Que las medidas que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas.
- La forma de obtener el consentimiento informado de los participantes en el estudio es adecuada.
- Este proyecto será **revisado nuevamente** en la próxima reunión plenaria del Comité, sin embargo, el Comité puede ser convocado a solicitud de algún miembro del Comité o de las directivas institucionales para revisar cualquier asunto relacionado con los derechos y el bienestar de los sujetos involucrados en este estudio.
- Informará** inmediatamente a las directivas institucionales:
 - Todo descasto de los investigadores a las solicitudes del Comité.
 - Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.
- Informará** inmediatamente a las directivas institucionales toda información que reciba acerca de:
 - Lesiones a sujetos humanos.

Calle 4B 36 -00 edificio Decanato Teléfono: 5165677 email: eticasalud@univalle.edu.co

- Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
- b. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que no haya sido revisado y aprobado por el Comité.
9. El presente proyecto ha sido **aprobado** por un periodo de **1 año** a partir de la fecha de aprobación. Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente con todos los documentos para revisión actualizados.
10. El **investigador principal** deberá informar al Comité:
- Cualquier cambio que se proponga introducir en este proyecto. Estos cambios no podrán iniciarse sin la revisión y aprobación del Comité excepto cuando sean necesarios para eliminar peligros inminentes para los sujetos.
 - Cualquier problema imprevisto que involucre riesgos para los sujetos u otros.
 - Cualquier evento adverso serio dentro de las primeras 24 horas de ocurrido, al secretario(a) y al presidente (Anexo 1).
 - Cualquier conocimiento nuevo respecto al estudio, que pueda afectar la tasa riesgo/beneficio para los sujetos participantes.
 - cualquier decisión tomada por otros comités de ética.
 - La terminación prematura o suspensión del proyecto explicando la razón para esto.
 - El investigador principal deberá presentar un informe al final del año de aprobación. Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente con todos los documentos para revisión actualizados.

Firma:

Nombre:

M^{te} Florencia Velasco de Martínez
**MARIA FLORENCIA VELASCO DE
MARTINEZ
PRESIDENTA**

Fecha:

14

07

2015

Capacidad representativa:

Teléfono: 5185677

CERTIFICACIÓN DE LA FACULTAD DE SALUD DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE

Por medio de la presente, certifico que la Facultad de Salud de la Universidad del Valle aprueba el proyecto arriba mencionado y respeta los principios, políticas y procedimientos de la Declaración de Helsinki de la Asamblea Médica Mundial, de la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud y de la reglamentación vigente en investigación de la Universidad del Valle.

Firma:

Nombre:

Hernán J. Pimiento
HERNAN J. PIMIENTO J

Fecha:

14

07

2015

Capacidad representativa:

VICEDECANO DE LA FACULTAD DE SALUD

Teléfono: 5185680

Anexo 3. (POE) Procedimientos Operacionales Estandarizados para preparación de agar Man Rogosa Sharpe

 Universidad del Valle	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)	Número:	Versión:
		Página: 75 de 86	
Fecha de Emisión: Febrero 2016	Título: Procedimiento Operativo Estándar para el aislamiento de <i>Lactobacillus spp</i> a partir de saliva		
Elaborado por: Lab. Microbiología Oral- Área de Virología	Revisado por: Coordinador del área Coordinador del laboratorio	Aprobado por: Jefatura Departamento de Microbiología	

1. FUNDAMENTO

Esta técnica permite determinar la presencia o ausencia y cuantificación de células viables de bacterias del genero *Lactobacillus* a partir de saliva.

2. DEFINICIONES

Los *Lactobacillus* o **bacterias del ácido láctico** son un género de bacterias Gram positivas anaerobias aerotolerantes, denominadas así debido a que la mayoría de sus miembros convierte la lactosa y algunos monosacáridos en ácido láctico.

3. OBJETIVO

Aislar, recuperar y cuantificar a partir de saliva, células viables de *Lactobacillus spp*.

4. ALCANCE

Este procedimiento está dirigido a todo el personal que realice labores técnicas dentro del laboratorio de bacteriología: Microbiólogos, bacteriólogos, analistas, asistentes de investigación, pasantes y estudiantes.

5. RECURSOS

5.1. Materiales

- Agar MRS (Man Rogosa Sharpe)
- Puntas sin filtro 100-1000µL
- Ependdorff 2.0 mL
- Sobres generadores anaerobiosis (Anaerogen)
- Indicadores de anaerobiosis
- Jarras anaerobiosis
- Asa de vidrio en L

5.2. Reactivos

- Solución NaCl al 0.9% (v/v)

6. EQUIPOS

- Estereomicroscopio (CARL ZEISS)

7. PROCEDIMIENTO

- Homogenizar muestra de saliva en vortex durante 30 segundos.
- Tomar 100 µL de la muestra y dispensar en tubo eppendorff de 2.0 mL con 900 µL de NaCl al 0.9%. Este tubo correspondería a la dilución 10^{-1} .
- Realizar diluciones seriadas repitiendo el proceso anterior hasta la dilución 10^{-3}
- A partir de la última dilución (10^{-3}), tomar 100 µL y dispensar en caja de agar MRS.
- Sembrar por superficie con asa de vidrio en L de tal forma que sea homogéneo en la totalidad de la caja.
- Incubar a 37°C por 2 días en condiciones de anaerobiosis.

8. INTERPRETACION DE RESULTADO

9. INFORME DE RESULTADO

Realice el recuento de UFC sospechosas de *Lactobacillus* y registre el promedio de las cajas de agar (donde se visualice crecimiento).

10. DOCUMENTACION

11. BIOSEGURIDAD

- Todas las muestras clínicas deberán ser manipuladas como positivas, y siempre se deben usar barreras protectoras tales como bata de laboratorio, guantes y careta en los procedimientos que forman aerosoles. La exposición de la mano desnuda con material infeccioso (muestras clínicas, cultivos bacterianos) es considerada una exposición ocupacional.
- Todo el personal que labora en el laboratorio deberá lavar sus manos antes de iniciar el trabajo, después de usar los guantes y antes de abandonar el laboratorio.
- Las batas de laboratorio, gorros, tapabocas, guantes se deben emplear mientras se esté trabajando en el laboratorio. Esta ropa de protección es de uso exclusivo en el laboratorio, y se debe remover al salir de él.
- No pipetear con la boca, usar los pipeteadores automáticos a su disposición.
- Trabajar en la cabina de seguridad biológica siempre al manipular las muestras clínicas o biológicas. Bajo ninguna circunstancia destapar muestras clínicas fuera de la cabina de flujo laminar.
- Todas las superficies de trabajo deberán ser descontaminadas al iniciar el trabajo y al finalizar el día y después de ocurrir derrames o salpicaduras de material biológico.
- Evitar tocarse los ojos, nariz o la cara mientras este trabajando en el laboratorio.
- Todos los desechos sólidos contaminados o potencialmente contaminados se deben descartar en bolsa roja (desechos hospitalarios). Aquellos desechos biológicos líquidos (saliva), se deben descartar en vasijas autoclavables conteniendo hipoclorito de sodio.
- No se desvíe del protocolo a cada procedimiento que esta realizando, cualquier modificación al protocolo debe ser consultado y previamente autorizado por el coordinador del Laboratorio.
- Todo el material desechable y guantes, independientemente de que se haya usado o no con material contaminado o muestras clínicas se debe descartar en los residuos hospitalarios y tratarse como material contaminado.

Anexo 4. (POE) Procedimientos Operacionales Estandarizados de la preparación de agar Mitis Salivarius Bacitracina

	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)	Número:	Versión:
		Página: 78 de 86	
Fecha de Emisión: Febrero 2016	Título: Procedimiento Operativo Estándar de la preparación de agar Mitis Salivarius Bacitracina		
Elaborado por: Lab. Microbiología Oral- Área de Virología	Revisado por: Coordinador del área Coordinador del laboratorio	Aprobado por: Jefatura Departamento de Microbiología	

1. FUNDAMENTO:

El agar Mitis Salivarius fue descrito por Chapman para el aislamiento de Streptococcus. Contiene hidrolizado de caseína enzimática y digerido péptico de tejido animal como fuentes de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales. La dextrosa y sacarosa son las fuentes de hidratos de carbono fermentables y el fosfato dipotásico es la sustancia tampón y el azul de tripán es un colorante ácido responsable del color azul de las colonias.

El cristal violeta y el telurito de potasio (1%) inhiben la mayoría de bacilos gramnegativos y la mayoría de las bacterias gram positivas, excepto los Streptococcus. El suplemento con bacitracina a una concentración de 200U/ml se usa para inhibir el crecimiento de algunos Streptococcus sensibles y seleccionar *S. mutans* resistente a esta concentración.

2. DEFINICIÓN:

No aplica

3. OBJETIVO:

Describir detalladamente el procedimiento estándar para la preparación del agar Mitis Salivarius suplementado con Bacitracina, Sacarosa y Telurito de potasio para el aislamiento selectivo de *S. mutans* a partir de una muestra de saliva.

4. ALCANCE:

Este procedimiento está dirigido a todo el personal que realice labores técnicas dentro del laboratorio de bacteriología: Microbiólogos, bacteriólogos, analistas, asistentes de investigación, pasantes y estudiantes.

5. RECURSOS:

5.1 . Materiales

- Espátula
- Erlenmeyer de 2 litros
- Papel aluminio para cubrir
- Puntas sin filtro 100-1000 µL
- Filtros de 0.2 micrones
- Jeringa 5 mL
- Cajas de Petri
- Guantes Termoresistentes

5.2. Reactivos y soluciones: Proporciones para 800 mL de medio

1. Agar base

- | | |
|---|--------|
| ○ Mitis Salivarius (DIFCO) | 72g |
| (Seguir instrucciones del medio según casa comercial) | |
| ○ Sacarosa 10%(Carlo Erba) | 80g |
| ○ Agua destilada | 1000ml |

2. Solución de Bacitracina (200U/ml)

- | | |
|--|-------|
| ○ Bacitracina 200U/ml (almacenada a 2- 8°C) | 40 mg |
| (Puede cambiar dependiendo de las U/g del frasco según casa comercial) | |
| ○ Agua destilada estéril | 10 ml |

3. Solución Telurito de potasio 1%

- | | |
|---|--------|
| ○ Telurito de potasio 1% (almacenado en viales a 2-8°C) | 0,8 ml |
|---|--------|

6. EQUIPO:

- Plancha calentadora con agitador
- Balanza
- Autoclave

- Cabina de flujo laminar clase II

7. PROCEDIMIENTO:

7.1 . Preparar la solución de Bacitracina (10 ml)

- Pesar 40 mg de Bacitracina
- Añadir la Bacitracina a 10 ml de agua destilada estéril y mezclar.
- Adherir un filtro de 0.2 micrones a una jeringa y filtrar la solución para esterilizarla.
- NOTA: Se puede preparar una solución de mayor volumen de Bacitracina y luego alicuotar en volúmenes de 5 mL en sus respectivos tubos para evitar contaminación del reactivo.

7.2 . Preparación del Agar Base de Mitis Salivarius (para 800 mL)

- Pesar 72 g de Agar Mitis Salivarius.
- Pesar 80 g de Sacarosa EXTRA PURE (DIKSON)
- Disolver la sacarosa y el agar en 800 mL de agua destilada estéril pH 7.0 y calentar hasta disolver (No dejar hervir la solución)
- Autoclavar 10 min , 15 lb, 121°C
- Dejar enfriar (aproximadamente 52-55°C).
- Luego, añadir 800 µL de Telurito de Potasio al 1% (almacenado en alícuotas a 8°C) al agar previamente enfriado.
- Añadir también 800 µL de la solución filtrada de Bacitracina (200U/mL).
- Mezclar bien, sin formar burbujas y servir en las cajas de Petri (20-25 ml por caja)
- Flamear las cajas con cuidado para remover burbujas si es necesario.
- Dejar secar las cajas con la tapa levemente levantada.
- Tapar las cajas y colocarlas invertidas en papel kraft o contenedor plástico, al interior del refrigerador.
- Marcarlas con el nombre, fecha de preparación, fecha de expiración y condiciones de almacenamiento.
- Dejar dos cajas en control de esterilidad, una a temperatura ambiente (22-25°C) y otra a 37°C.

8. INTERPRETACION DE RESULTADO

No aplica

9. INFORME DE RESULTADO

No aplica

10. DOCUMENTACION

No aplica

11. BIOSEGURIDAD

- Uso profesional exclusivo.
- No utilizar el producto si al recibirlo su envase está abierto o dañado.
- No utilizar el producto si existen signos de contaminación o deterioro, así como tampoco si ha expirado su fecha de vencimiento.
- Utilizar guantes y ropa protectora cuando se manipula el producto.
- Considerar las muestras como potencialmente infecciosas y manipularlas apropiadamente siguiendo las normas de bioseguridad establecidas por el laboratorio.
- Las características del producto pueden alterarse si no se conserva apropiadamente.
- Descartar el producto que no ha sido utilizado y los desechos del mismo según reglamentaciones vigentes.

12. CONTROL DE CALIDAD

Control positivo: *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Inocular las cajas con el organismo de acuerdo al manual de control de calidad. Colonias de color azul oscuro, con márgenes irregulares, bien adheridas al medio y a veces rodeadas con un halo como gotas de agua debido a la producción de polisacáridos extracelulares

Control negativo: *Escherichia coli*

Inocular las cajas con el organismo de acuerdo al manual de control de calidad. No debe haber crecimiento de éstos después de un tiempo de incubación de 48 horas.

13. REFERENCIAS

L.F. Gomez O.L. Gomez M. Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. (2006).

Syed S. and Loesche W. Efficiency of various growth media in recovering oral bacteria flora from human dental plaque. *American Society for Microbiology*. 2000; 26 (4). p. 459-465.

Anexo 5. (POE) Procedimiento Operativo Estándar para Características fisicoquímicas de la saliva

	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)	Número:	Versión:
		Página: 82 de 86	
Fecha de Emisión: Febrero 2016	Título: Procedimiento Operativo Estándar para Características fisicoquímicas de la saliva		
Elaborado por: Lab. Microbiología Oral- Área de Virología	Revisado por: Coordinador del área Coordinador del laboratorio	Aprobado por: Jefatura Departamento de Microbiología	

12. FUNDAMENTO

La saliva y sus características fisicoquímicas desempeñan un papel fundamental en la salud oral del ser humano debido a sus funciones de re-mineralización del esmalte dental, dilución de azúcares y amortiguamiento del pH; por tanto determinar y evaluar el pH salival, la capacidad buffer de la saliva y la tasa de flujo saliva resulta importante.

13. DEFINICIONES

La saliva es un fluido que se origina en las glándulas salivales mayores y menores, el cual se produce de manera constante permitiendo una acción limpiadora sobre las superficies de los tejidos duros y blandos de la cavidad bucal. Es también una fuente constante de calcio y fósforo, necesarios para la re-mineralización del esmalte.

Capacidad Amortiguadora o Buffer: La capacidad amortiguadora es la habilidad de la saliva para contrarrestar los cambios de pH. La función amortiguadora de la saliva se debe principalmente a la presencia del bicarbonato ya que la influencia del fósforo es menos extensa..

La tasa de flujo salival, es uno de los puntos más importantes para determinar la salud oral. Se puede obtener en condiciones de estimulación o no y se calcula dividiendo el volumen salival entre el tiempo de recolección. El promedio de la tasa de flujo salival en reposo de la saliva completa o mixta es de 0.4 ml/min; mientras que para la saliva mixta estimulada con parafina es de 2 ml/min. Una tasa de flujo salival adecuada es esencial para que la salud bucal se mantenga pero este equilibrio puede interrumpirse al

alterarse el balance entre el huésped y los microorganismos, dando lugar al crecimiento excesivo de las bacterias.

14. OBJETIVO

Determinar las características fisicoquímicas de la saliva como un factor de riesgo importante en el desarrollo de caries.

15. ALCANCE

Este procedimiento está dirigido a todo el personal que realice labores técnicas dentro del laboratorio de bacteriología: Microbiólogos, bacteriólogos, analistas, asistentes de investigación, pasantes y estudiantes.

16. RECURSOS

16.1. Materiales

- Cinta indicadora de pH
- Tubo Falcon 50 mL
- Cronometro
- Pipeta de vidrio 10 mL
- Pinza metálica estéril

16.2. Reactivos

- HCL (0.0033 N)
- Agua destilada estéril.

17. EQUIPOS

- pH metro

18. PROCEDIMIENTO

7.1 Determinación pH saliva

- Cortar un fragmento aproximadamente de 2 cm de largo de cinta indicadora de pH y sujetar un extremo del fragmento con una pinza estéril.
- Introducir con cuidado en la boca del voluntario y medir el pH de saliva bajo la lengua. Inicialmente el voluntario no debe de haber ingerido el probiótico (alimento enriquecido).
- Registrar el resultado de acuerdo al cambio de color de la cinta y su respectivo patrón que corresponde a un valor de pH específico.
- Después de que el voluntario ingiere el probiótico, esperar 10 minutos.

- Con un nuevo fragmento de cinta indicadora, registrar el pH de saliva repitiendo el proceso descrito anteriormente.
- Una vez llega la muestra al laboratorio debidamente sellada, rotulada y refrigerada según el POE de muestra de saliva.
- Homogenizar la muestra, introducir el electrodo del pH metro previamente calibrado y registrar el pH de la saliva nuevamente.

7.2 Evaluación tasa flujo salivar

- Tener en cuenta el tiempo total de recolección de muestra y registrarlo.
- Medir con una pipeta calibrada de vidrio el volumen final de saliva colectado sin tener en cuenta la espuma.
- Registrar los datos de volumen.

7.3 Evaluación capacidad buffer saliva

- Inicialmente medir el pH basal (Ver punto 7.1)
- Tomar 1 mL de saliva
- Adicionar en 3,0 mL de HCL (0.0033 N)
- Mezclar durante 20 minutos
- Registrar el valor del pH
- Comparar el valor de pH obtenido con los rangos de la tabla 1 (ver punto 8) y evaluar la capacidad buffer de la saliva según corresponda.

19. INTERPRETACIÓN DE RESULTADO

No aplica

8.3 pH SALIVAL

El pH normal de la saliva se encuentra entre 6,8 y 7,2 ya que en este rango actúa la enzima amilasa o ptialina.

8.2 TASA FLUJO SALIVAL

La tasa de flujo salival se calcula dividiendo el volumen salival entre el tiempo de recolección. El promedio de la tasa de flujo salival estimulada con parafina es de 2 ml/min y el de no estimulada es de 0,4 ml/min.

Cuando el flujo salival en reposo es inferior a 0,1 – 0,2 ml/min, o el estimulado es menor de 0,5-0,7 ml/min, se considera que existe una disminución patológica de secreción salival.

8.3 CAPACIDAD BUFFER

Tabla 1. Evaluación capacidad buffer de la saliva estimulada y NO estimulada.

	Valor pH	Evaluación
Capacidad buffer de saliva estimulada	Más de 6.50	Alto
	6.50 - 5.75	Normal
	5.74 - 4.00	Bajo
	Menos de 4.00	Muy bajo
	Valor pH	Evaluación
Capacidad buffer de saliva NO estimulada	Más de 4.75	Alto
	4.25 - 4.75	Normal
	3.50 - 4.24	Bajo
	Menos de 3.50	Muy bajo

20. INFORME DE RESULTADO

21. DOCUMENTACIÓN

22. BIOSEGURIDAD

- Todas las muestras clínicas deberán ser manipuladas como positivas, y siempre se deben usar barreras protectoras tales como bata de laboratorio, guantes y careta en los procedimientos que forman aerosoles. La exposición de la mano desnuda con material infeccioso (muestras clínicas, cultivos bacterianos) es considerada una exposición ocupacional.
- Todo el personal que labora en el laboratorio deberá lavar sus manos antes de iniciar el trabajo, después de usar los guantes y antes de abandonar el laboratorio.
- Las batas de laboratorio, gorros, tapabocas, guantes se deben emplear mientras se esté trabajando en el laboratorio. Esta ropa de protección es de uso exclusivo en el laboratorio, y se debe remover al salir de él.
- No pipetear con la boca, usar los pipeteadores automáticos a su disposición.
- Trabajar en la cabina de seguridad biológica siempre al manipular las muestras clínicas o biológicas. Bajo ninguna circunstancia destapar muestras clínicas fuera de la cabina de flujo laminar.

- Todas las superficies de trabajo deberán ser descontaminadas al iniciar el trabajo y al finalizar el día y después de ocurrir derrames o salpicaduras de material biológico.
- Evitar tocarse los ojos, nariz o la cara mientras este trabajando en el laboratorio.
- Todos los desechos sólidos contaminados o potencialmente contaminados se deben descartar en bolsa roja (desechos hospitalarios). Aquellos desechos biológicos líquidos (saliva), se deben descartar en vasijas autoclavables conteniendo hipoclorito de sodio.
- No se desvíe del protocolo a cada procedimiento que esta realizando, cualquier modificación al protocolo debe ser consultado y previamente autorizado por el coordinador del Laboratorio.
- Todo el material desechable y guantes, independientemente de que se haya usado o no con material contaminado o muestras clínicas se debe descartar en los residuos hospitalarios y tratarse como material contaminado.

23. CONTROL DE CALIDAD

24. REFERENCIAS

- Acosta A. Agudelo C.M. Barrientos S. Chavez M. Cuellar A. Duran C. Gamboa F. Gamboa L.F. Gomez O.L. Gomez M. Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. (2006).
- Ericsson Y. Clinical investigations of the salivary buffering action. *Acta Odontol Scand* 1959; 17:131-65.
- Lagerlöf F, Oliveby A. Caries-Protective factors in saliva. *Adv Dent Res* 1994; 8(2): 229-238.
- Loyo K. Balda R. Gonzáles O. Solórzano A. Gonzáles M. Actividad cariogénica y su relación con el flujo salival y la capacidad amortiguadora de la saliva. *Acta Odontológica Venezolana*. 1999; 37(3): 10-17.
- Martínez M. Martínez C. López A. Patiño Lina. Arango E. Características fisicoquímicas y microbiológicas de la saliva durante y después del embarazo. *Rev. salud pública*. 2014; 16 (1): 128-138.
- Sreebny LM, Valdin A, Yu A. Xerostomia. Part II: Relationship to nonoral symptoms, drugs, and diseases *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1981; 68:419-27.