

Recuento en saliva de *Streptococcus mutans* en niños de 6 a 12 años con y sin tinciones cromógenas¹

Counting of Streptococcus mutans in saliva of 6 to 12 years old children with and without black stain

Velásquez Sáez C*, Salinas Villanueva I*, Godoy Martínez P**, Muñoz Martínez H***, Barría Pailaquilén RM****

RESUMEN

Introducción: Las tinciones cromógenas o “Black Stain” (BS) se han asociado a una baja experiencia de caries y un menor recuento de bacterias cariogénicas. El objetivo es determinar si existe diferencia en el número de pacientes que presenten un alto recuento de *S. mutans* ($> 10^5$ UFC/ml saliva) entre niños con BS y sin ellas.

Material y métodos: Estudio observacional analítico de corte transversal. Se incluyeron 158 escolares entre 6 y 12 años de establecimientos educacionales de la ciudad de Valdivia, Chile. Luego de un examen clínico se determinó la prevalencia de individuos con BS y se conformó un grupo con ausencia de tinciones para comparar el recuento de *S. mutans*. Se calculó la proporción del número de pacientes con valores $> 10^5$ UFC/ml en ambos grupos para establecer los sujetos con alto riesgo cariogénico, evaluando si las diferencias fueron significativas ($p < 0,05$) mediante el test exacto de Fisher.

Resultados: Se diagnosticó BS en 15 niños (6 hombres y 9 mujeres), estimando una prevalencia de 9,5% del total de examinados. De esta forma, los grupos de estudio se conformaron por 15 niños con BS y 30 sin la tinción. No hubo diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,538$) en la proporción de niños con recuento $> 10^5$ UFC/ml de *S. mutans* entre los grupos.

Discusión: La presencia de BS en pacientes de 6 a 12 años no se asocia a mayor o menor riesgo cariogénico.

Palabras clave: Tinción cromógena, decoloración de dientes, recuento de colonia microbiana, microbiota, niño, caries dental.

SUMMARY

Introduction: Chromogenic staining or “Black Stain” (BS) has been associated with a low caries frequency and less cariogenic bacteria count. The aim of the study was to determine the difference in the number of patients who have a high count of *S. mutans* ($> 10^5$ CFU/ml saliva) among children with BS and without them.

Material and methods: Analytical observational cross-sectional study. In this study were included 158 children between 6 and 12 years old, from educational establishments in the city of Valdivia, Chile. After clinical

* Escuela de Odontología. Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile.

** Profesor Asociado. Instituto de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile.

*** Profesor Adjunto. Biomateriales. Instituto de Odontoestomatología. Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile.

**** Profesor Auxiliar. Director Oficina de Salud Basada en Evidencia (OSBE). Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile.

¹ Esta investigación fue financiada por la Dirección de Investigación y Desarrollo de la Universidad Austral de Chile a través del Proyecto DID S2016-28.

examination, the prevalence of individuals with BS was determined and a group was formed with no stains to compare the count of *S. mutans*. We calculate the ratio of patients with values $> 10^5$ CFU/ml in the two groups to identify the patients with high cariogenic risk. Statistical differences were evaluated by Fisher's test ($p < 0.05$).

Results: BS was diagnosed in 15 children (6 men and 9 women), estimating a prevalence of 9.5% of all examined. Thus, the groups studied were formed by 15 children with BS and 30 without staining. There was no statistically significant difference ($p=0.538$) in the proportion of children with $>10^5$ CFU/ml of *S. mutans* between groups.

Discussion: The presence of BS in patients aged 6 to 12 years is not associated with cariogenic risk.

Key words: Black stain, tooth discoloration, microbial colony count, microbiota, child, dental caries.

Fecha de recepción: 27 de octubre de 2016.

Aceptado para publicación: 10 de noviembre de 2016.

Velásquez Sáez C, Salinas Villanueva I, Godoy Martínez P, Muñoz Martínez H, Barría Pailaquilén RM. Recuento en saliva de *Streptococcus mutans* en niños de 6 a 12 años con y sin tinciones cromógenas. *Av. Odontostomatol* 2017; 33 (2): 77-83.

INTRODUCCIÓN

Las tinciones cromógenas o Black Stain (BS) son descritas como la presencia de puntos oscuros, de diámetro inferior a 0,5 mm, que forman una decoloración lineal, paralela al margen gingival, en superficies lisas dentales de al menos dos dientes diferentes sin cavitación de la superficie del esmalte (1). Su prevalencia varía desde 2,4% a 18% (2). La coloración negra se asocia al sulfuro férrico formado por la reacción entre el sulfuro de hidrógeno producido por las bacterias y el hierro presente en la saliva o en el exudado gingival (3,4). La placa dental que produce BS es diferente a la del común de los pacientes, ya que predominan bacilos gram positivos, anaerobios o anaerobios facultativos, mayoritariamente actinomicetos; *Actynomicesis raelii*, *Actynomices naeslundii*, que producen hidrógeno, bajo recuento de *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella melaninogénica* (5), con tendencia a la calcificación debido a sus altas concentraciones de calcio además de fosfatos inorgánicos, cobre, sodio y proteína total (2).

La saliva de sujetos con BS presenta un pH significativamente más alto, mayor capacidad tamponadora, menor cantidad de glucosa y un flujo salival similar en comparación con pacientes sin BS (3,6). Su importancia clínica radica en que la presencia de estas

tinciones se ha asociado a una baja experiencia de caries, por lo que podría considerarse factor protector contra el desarrollo de lesiones de caries (7,8). No existe evidencia disponible para explicar el bajo índice de lesiones de caries en pacientes que presentan BS. Se atribuye en parte a las características de la saliva y a la microbiota oral de estos pacientes, que sugiere un menor recuento de bacterias cariogénicas, sin embargo, los estudios no han sido concluyentes (2). *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) se ha asociado como bacteria determinante en el inicio de la caries por sus factores de patogenicidad (9).

Actualmente existe una clara tendencia en cariología a identificar probióticos que sean capaces de controlar la enfermedad de caries, estableciendo relaciones ecológicas que puedan mermar la actividad de aquellas bacterias cariogénicas, es por esto que resulta importante reconocer las relaciones que pudieran existir entre ciertos productos del metabolismo bacteriano, como las BS, con la disminución de microorganismos como *S. mutans*, *Lactobacillus* u otros asociados al desarrollo y mantención de lesiones de caries (10).

Consecuentemente, el objetivo del estudio fue determinar si existe diferencia en la proporción de sujetos que presenten un alto recuento de *S. mu-*

tans ($> 10^5$ UFC/ml saliva) entre niños con BS y sin ellas y así dilucidar en parte la compleja relación entre esta microbiota y el bajo índice de caries, ya que este fenómeno puede aportar información para el desarrollo de un modelo de terapia ecológica, utilizando microorganismos benéficos en el control de bacterias cariogénicas y modulación del proceso de caries.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Estudio analítico de corte transversal, para lo cual se realizó un recuento de UFC/ml saliva de *S. mutans*, en escolares con y sin BS. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación del Servicio de Salud de Valdivia, Región de los Ríos, Chile (Ord. N° 076, 15 de marzo de 2016).

Población objetivo y muestra

La población objetivo la constituyeron niños y niñas entre 6 y 12 años, matriculados en establecimientos educacionales municipales de la comuna de Valdivia, que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión: edad entre 6 y 12 años, estar matriculado en establecimiento educacional municipal de Valdivia, estar libre de enfermedad sistémica, consentimiento informado del padre, madre o tutor, y asentimiento informado de las y los escolares. Fueron excluidos los niños con antibioterapia y/o suplementos de hierro en los últimos 6 meses y quienes recibieron profilaxis odontológica dentro del último mes a la fecha de realizado el examen.

El cálculo de tamaño de muestra se realizó en el programa Epidat 4.1, considerando una población de 4.547 escolares entre 6 y 12 años (registro de matrícula entregado por el Departamento de Administración de Educación Municipal, Ord. N° 1045, 29 de marzo de 2016), una proporción esperada (prevalencia) de BS de 11,6% obtenida de un estudio de 2012 (11) realizado en una zona geográficamente próxima, homologable en rango etario y nacionalidad; un nivel de confianza de 95% y precisión de 5%, obteniendo una muestra de 152 sujetos de

investigación. Finalmente se incluyó en el estudio a 158 escolares.

Se realizó un muestreo aleatorio estratificado con afijación proporcional. Para ello se seleccionaron aleatoriamente 10 de los 16 establecimientos educacionales municipales urbanos de la comuna de Valdivia con estudiantes del rango etario en foco; luego se aleatorizaron los cursos pertenecientes a los establecimientos seleccionados, y finalmente los niños dentro de cada curso, de manera proporcional a la matrícula.

Una vez que se contó con la autorización administrativa de los directivos de los establecimientos el contacto con los padres o tutores se realizó en las reuniones de curso informando sobre las implicancias del estudio e invitándolos a participar de la investigación. La firma del consentimiento informado y el asentimiento del niño o niña se realizaron antes del examen clínico.

Examen clínico

A los escolares seleccionados se les efectuó un examen clínico realizado por dos observadores entrenados y calibrados, usando espejos dentales y luz artificial para diagnosticar la presencia de BS según los criterios descritos por Koch (1), y el índice COP-D (sumatoria de dientes cariados, obturados y perdidos en dentición permanente), y ceo-d (sumatoria de dientes cariados, extraídos y obturados en dentición temporal) bajo los criterios de la OMS para el diagnóstico de caries. Se registró sexo, edad, COP-D, ceo-d y la presencia o ausencia de BS. A partir de este examen, se formó un grupo con los pacientes que presentaron BS y una contraparte con el doble de participantes sin tinciones que fueron seleccionados al azar.

Recolección de muestras y análisis de laboratorio

En la segunda etapa, a los pacientes previamente seleccionados se les estimuló el flujo salival mediante la masticación de láminas de parafina y se les tomó muestras salivales de 5 ml, recolectadas en tubos para centrifuga de 15 ml; se realizaron dilucio-

nes seriadas con factor de dilución 1000, en solución PBS 1X, se sembraron con rastrillo 100 µL de la dilución final en placas de agar TYCSB selectivo para *S. mutans*, en anaerobiosis. Posteriormente se incubaron durante 48 h en estufa de cultivo bacteriológico a 37° C, y se realizó el recuento de UFC/ml de *S. mutans* en base a la morfología colonial (macroscópica) característica y adherencia de las colonias al agar, observadas bajo lupa estereoscópica Motic dm 39b.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo para caracterizar la edad, sexo, índice ceo-d COP-D y recuento de UFC/ml de *S. mutans* por grupos y de manera global usando medidas de tendencia central (media y mediana) y de dispersión (desviación estándar [DE] y rango intercuartílico [RIC]). Para establecer si hubo diferencias estadísticamente significativas en el recuento de UFC/ml de *S. mutans* entre los grupos, se aplicó el Test no paramétrico Wilcoxon Mann-Whitney dado que la variable no tuvo una distribución normal tanto en su evaluación gráfica (histograma) como al aplicar el test de ShapiroWilk ($p=0,00050$). Finalmente, se configuró la variable nominal dicotómica *riesgo cariogénico* categorizada en alto riesgo y bajo riesgo según recuento $>10^5$ o $\leq 10^5$ UFC/ml para *S. mutans*, respectivamente y se determinó diferencias de proporciones entre el grupo con BS y sin BS mediante el test exacto de Fisher. Se fijó como nivel de significancia estadística un valor $p < 0,05$. El análisis se efectuó usando el programa Stata v.11.1 (Stata Corp, College Station, TX, 2009).

RESULTADOS

La muestra global estudiada se caracterizó por una edad media de $8,8 \pm 1,8$ años. Según sexo, la mayor proporción de escolares fueron hombres, 52,5% ($n=83$). El índice COPD en 93% fue cero ($n=147$) con una media de $0,12 \pm 0,5$ y un rango que osciló entre 0 y 3. Por su parte, el índice ceo-d en 61,4% fue cero ($n=97$), con una media de $0,87 \pm 1,4$ oscilando entre 0 y 7 (Tabla 1).

Se detectaron 15 participantes (6 niños y 9 niñas) con BS, y consecuentemente se estimó una preva-

lencia de 9,5% (15/158). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución por sexo entre los grupos ($p=0,417$), ni en la media de los valores de los índices COPD ($p=0,2993$) y ceo-d ($p=0,7066$).

La segunda parte del análisis se enfocó a evaluar y comparar los recuentos de UFC/ml saliva de *S. mutans* entre el grupo de niños con BS ($n=15$) y el grupo sin BS ($n=30$). De manera global, los recuentos se concentraron entre 50.000 y 370.000 (rango intercuartílico), con un valor mediano de 130.000 UFC/ml saliva. Al comparar los recuentos medianos de UFC/ml de *S. mutans* entre los grupos (Fig. 1), se observó una diferencia no significativa ($p=0,4623$) de mayor recuento mediano para el grupo sin BS (150.000; RIC=60.000-380.000 vs. 110.000; RIC=30.000-370.000).

TABLA 1.- CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS DE LOS NIÑOS PARTICIPANTES (N=158)

Variable		
Edad (media±DE)	8,8	1,8
Sexo (n, %)		
• Hombre	83	52,5
• Mujer	75	47,5
Índice COPD (n, %)		
• 0	147	93,1
• 1	4	2,5
• 2	6	3,8
• 3	1	0,6
Índice COPD (media±DE)	0,12	0,5
Índice ceo-d (n, %)		
• 0	97	61,4
• 1	21	13,3
• 2	18	11,4
• 3	12	7,6
• 4	7	4,4
• ≥5	3	1,9
Índice ceo-d (media±DE)	0,87	1,4

DE: Desviación estándar; COPD: Dientes cariados, obturados y perdidos en dentición permanente; ceo-d: Dientes cariados, extraídos y obturados en dentición temporal.

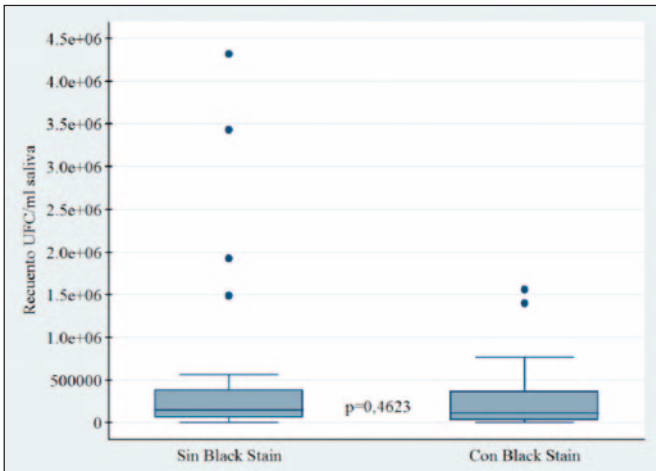


Fig. 1. Comparación del recuento de UFC/ml de *S. mutans* entre los grupos.

Por último, se categorizó y comparó a los grupos según riesgo cariogénico dado el límite $>10^5$ UFC/ml de *S. mutans* (Fig. 2). Un recuento $>10^5$ UFC/ml de *S. mutans* (alto riesgo) se observó en 8 niños (53,3%) en el grupo con BS, en tanto en los que no presentaron la tinción totalizó 19 (63,3%). Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,538$).

DISCUSIÓN

Este estudio ha permitido establecer, por un lado, la prevalencia de BS (9,5%) la que es concordante con cifras reportadas previamente a nivel mundial que

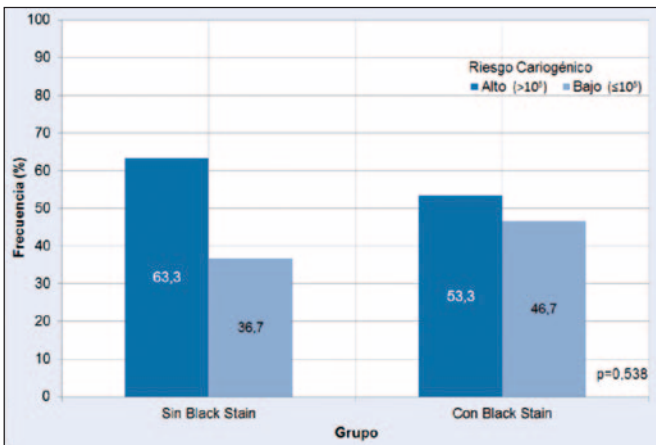


Fig. 2. Comparación de riesgo cariogénico entre los grupos.

oscilan entre 2,4 y 18% (2). Además, se pudo constatar que no existen diferencias en la presencia de BS por sexo, tal como ha sido demostrado en estudios previos (3,12,13). Por último, no se encontró diferencias en la presencia de BS y el riesgo cariogénico dado el recuento de *S. mutans*.

Para los padres la presencia de tinciones en los dientes de sus hijos puede principalmente significar un problema estético, motivo por el cual pudieran consultar al odontólogo y es, por esto, que el profesional debe tener conocimientos sobre BS, tanto en su etiología como en su tratamiento. Se debe esclarecer su inocuidad y su amplia asociación con una baja prevalencia de caries (1,6,7). Esto se atribuye principalmente a que los pacientes con BS presentan una microbiota oral diferente, en la cual se registra una baja microflora oral cariogénica (6,14). Además, se sugiere que la baja tendencia de caries observada puede estar asociada con una composición salival con altos niveles de calcio y con mayor capacidad buffer (15). Sin embargo, en este estudio no se encontraron diferencias significativas de ceod entre el grupo con BS y el que no presentaba la tinción. Por su parte, el COP-D fue mayor a cero en solo 11 pacientes de los grupos de estudio, esta baja experiencia de caries la atribuimos al corto tiempo de exposición al medio oral de estos dientes permanentes, ya que la edad media de los examinados fue $8,8 \pm 1,8$ años. Por lo tanto, se sugiere observar las diferencias en experiencia de caries en dentición permanente de niños mayores de 10 años (6).

El mecanismo de interacción biológica entre la microbiota relacionada con BS y la microbiota cariogénica no se entiende completamente (16). Se cree que las bacterias relacionadas con BS podrían establecer un entorno desfavorable para las bacterias relacionadas con el desarrollo de la caries, afectando la adhesión de estas bacterias a las superficies dentales o cambiando el ecosistema de la biopelícula dental, reduciendo el potencial de desarrollo de la lesión de caries (8). Recuentos menores de *S. mutans* se han observado en pacientes que presentan la tinción (6,17) pero también existen estudios microbiológicos que revelan igual cantidad de *S. mutans* en pacientes con y sin BS (4,18). Los recuentos elevados ($>10^5$ UFC/ml) de *S. mutans*, que presentan una asociación a riesgo cariogénico alto, en nues-

tros cultivos fueron menores para el grupo con BS pero la diferencia no fue estadísticamente significativa respecto del grupo sin la tinción. Estos resultados sugieren que en lugar de una ausencia total de *S. mutans* en el biofilm dental, tal vez hay un equilibrio oral menos complaciente para que sus niveles sean más bajos en los pacientes con BS (3).

La discordancia entre los resultados puede estar relacionada con la naturaleza multifactorial de la enfermedad de caries (18) y, por lo tanto, la hipótesis de que la composición microbiana de BS es causante de una menor prevalencia de caries en los niños resulta cuestionable (4).

Algunas limitaciones de este trabajo para interpretar consistentemente sus resultados consideran el acotado número de participantes con BS, potenciales diferencias en higiene oral y en los hábitos alimentarios que podrían constituir factores que influyen en los resultados, por lo tanto, se propone realizar estudios futuros con mayor tamaño muestral para alcanzar mayor número de sujetos con BS y mayor estandarización en los criterios de inclusión. Sin embargo, aún con las limitaciones comentadas, este es un estudio pionero en Chile que considera a escolares de distintas características con un criterio de base poblacional y forja un punto de inicio para la investigación microbiológica en la odontología en nuestro medio. Mientras tanto, los hallazgos permiten exponer que la presencia de BS en pacientes de 6 a 12 años no se asocia a mayor o menor riesgo cariogénico determinado por recuento de *S. mutans*.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación está basada en parte de los requerimientos de Ivania Paz Salinas Villanueva y Carla Noemí Velásquez Sáez para su titulación de Cirujano-Dentista en la Escuela de Odontología de la Universidad Austral de Chile.

Nuestros agradecimientos a los profesionales del Laboratorio de Microbiología de la Universidad Austral de Chile por su colaboración en este estudio, en particular al Sr. Mario González y Srta. Yanibel Moraga.

BIBLIOGRAFÍA

1. Koch MJ, Bove M, Schroff J, Perlea P, García-Godoy F, Staehle HJ. Black stain and dental caries in schoolchildren in Potenza, Italy. *ASDC J Dent Child*. 2001;68(5-6):353-5.
2. Zyla T, Kawala B, Antoszezewska-Smith J, Kawala M. Black stain and dental caries: A review of the literature. *Biomed Res Int*. 2015;469392. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/469392>.
3. Akyuz S, Garan A, Kaya M. Prevalence of black stain and dental caries in children attending a university pediatric dentistry clinic in Istanbul. *J Marmara Univ Inst Heal Sci [Internet]*. 2015 [acceso 3 Nov 2015];5(2):109-14. Disponible en: <http://www.clinexphealthsci.com/eng/makale/280/113/Full-Text>.
4. Li Y, Zhang Q, Zhang F, Liu R, Liu H, Chen F. Analysis of the microbiota of black stain in the primary dentition. *PLoS One*. 2015;10(9):1-2.
5. Bandon D, Chabane-Lemboub A, Le Gall M. Les colorations dentaires noires exogènes chez l'enfant: Black-stains. *Arch Pediatr*. 2011; 18(12):1348-52.
6. Heinrich-Weltzien R, Bartsch B, Eick S. Dental Caries and Microbiota in Children with Black Stain and Non-discoloured Dental Plaque. *Caries Res*. 2014; 48(2):118-25.
7. Boka V, Trikaliotis A, Kotsanos N, Karagiannis V. Dental caries and oral health-related factors in a sample of Greek preschool children. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2013;14(6):363-8.
8. França-Pinto CC, Cenci MS, Correa MB, Romano AR, Peres MA, Peres KG, et al. Association between black stains and dental caries in primary teeth: Findings from a Brazilian population-based birth cohort. *Caries Res*. 2012;46(2):170-6.
9. Figueroa-Gordon M, Alonso G, Acevedo A. Microorganismos presentes en las diferentes etapas de la progresión de la lesión de caries dental. *Acta Odontol Venez (Internet)*. 2009. (Acceso 12 de octubre de 2015);47(1):1-13. Disponible en: http://www.actaodontologica.com/ediciones/2009/1/microorganismos_progresion_lesion_caries_dental.asp.
10. Teughels W, Van Essche M, Sliepen I, Quirynen M. Probiotics and oral healthcare. *Periodontol* 2000. 2008; 48(1):111-47.
11. Guzmán N, Super S, Pinochet, Maiza P, Vieira N. Frecuencia de tinciones dentales en escolares de San Juan de la Costa, Chile, 2012. *Rev Cubana Estomatol*. 2015;52(1):2-10.

12. Paredes V, Paredes C. Tinción cromógena: un problema habitual en la clínica pediátrica. *An Pediatría (Barc)*. 2005;62(3):258-60.
13. Chen X, Zhan JY, Lu HX, Ye W, Zhang W, Yang WJ, et al. Factors associated with black tooth stain in Chinese preschool children. *Clin Oral Investig*. 2014;18(9):2059-66.
14. Saba C, Solidani M, Berlutti F, Vestri A, Ottolenghi L, Polimeni A. Black stains in the mixed dentition: a PCR microbiological study of the etiopathogenic bacteria. *J Clin Pediatr Dent [Internet]*. 2006. [acceso 23 de junio de 2016]; 30(3):219-24. Disponible en: <http://jocpd.org/doi/abs/10.17796/jcpd.30.3.q1561155x22u0774?journalCode=jcpd>.
15. Garan A, Akyüz S, Oztürk LK, Yarat A. Salivary parameters and caries indices in children with black tooth stains. *J Clin Pediatr Dent [Internet]*. 2012;36(3):285-8. Disponible en: <http://jocpd.org/doi/abs/10.17796/jcpd.36.3.21466m672t723713?journalCode=jcpd>.
16. Gasparetto A, Conrado CA, Maciel SM, Miyamoto EY, Chicarelli M, Zanata RL. Prevalence of black tooth stains and dental caries in Brazilian school children. *Braz Dent J*. 2003;14(3):157-61.
17. Slots J. The microflora of black stain on human primary teeth. *Scand J Dent Res*. 1974;82(7):484-90.
18. Costa MT, Dorta ML, Ribeiro-Dias F, Pimenta FC. Biofilms of black tooth stains: PCR analysis reveals presence of *Streptococcus mutans*. *Braz Dent J*. 2012;23(5):555-8.

CORRESPONDENCIA

Dr. René Mauricio Barría Pailaquilén
Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile
Av. Carlos Acharán Arce, s/n
Edificio Ciencias del Cuidado en Salud, Piso 3.
Campus Isla Teja
Valdivia. Chile

Correo electrónico: rbarria@uach.cl