

TESTS PREDICTIVOS DE CARIES EN BASE AL ESTUDIO DE LACTOBACILOS

Virginia Papone Yorio^(*)

Resumen

Este trabajo se basa en una revisión bibliográfica mediante la cual estudiamos a los lactobacilos, su importancia en el proceso carioso y algunos tests predictivos que nos permiten conocer los distintos grados de actividad acidogénica y el número de colonias de lactobacilos presentes en la saliva de una población determinada.

Palabras claves: Lactobacilos; tests predictivos.

LACTOBACILOS

El género *Lactobacillus* está constituido por bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram positivos, que pertenecen a la familia *Lactobacillaceae*. Sus lados son paralelos, se disponen aislados, en pares o en cadenas, algunas veces filamentosos o pleomórficos. Son no esporulados y usualmente no móviles. Se dividen en un plano sin ramificarse (13, 14). Necesitan para desarrollar medios con requerimientos nutricionales complejos (vitaminas, tiamina, péptidos, aminoácidos, hidratos de carbono, tween 80, etc.). Su morfología colonial es variable según el medio; en el medio de Rogosa (15) desarrollan generalmente colonias de bordes regulares, lisas, brillantes, blanquecinas y transparentes. Algunos autores (7) describen una variedad lisa para *streptobacterium* y una rugosa para *thermobacterium*.

La energía la obtienen de la fermentación anaeróbica de azúcares. Podemos agruparlos en dos tipos: a) homofermentadores, los que dan como producto de la fermentación de la glucosa y otros azúcares un 95% de ácido láctico; b) heterofermentadores, aquellos que producen ácido acético, fórmico, alcohol, CO₂ y otros elementos así como también un 50% de ácido láctico (Tabla 1 y 2).

La mayoría son microaerófilos, otros crecen en condiciones de anaerobiosis, son favorecidos por la

presencia del CO₂. No producen catalasa, oxidasa, ni indol, no reducen nitritos (4).

Son acidófilos, ya que crecen mejor en vecindades de pH 6; su rango es de pH 4 a 6,8, aunque algunos crecen a pH menores. Son rápidamente destruídos por el calor (60 a 65 °C en media hora).

Resisten los ácidos y son capaces de sobrevivir y aún crecer en medio ácido (acidúricos), también son formadores de ácido (acidógenos).

Los lactobacilos los podemos dividir en (4):

- a) *Thermobacterium* - homofermentadores que crecen en un rango de 37°C y 45°C: *L. delbruecki* subespecie *lactis* y *bulgaricus*, *L. helveticum*, *L. acidophilus* y *L. salivarius*.
- b) *Streptobacterium* - crecen en un rango de 30°C a 15°C: *L. casei* y *L. plantarum*.
- c) *Betabacterium* - heterofermentadores que crecen a temperaturas variables: *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. buchneri* y *L. viridescens*.

Con respecto a su habitat podemos citar a la cavidad oral, tracto intestinal del hombre, y en vagina después de la pubertad. Se encuentran también en la leche y sub productos (incluyendo pasteurizada), en levadura, en cerveza, suelo, estiércol, peces y en muchos productos animales y vegetales fermentados. Se han encontrado en una gran variedad de infecciones odontológicas; controles de endodoncia permiten hallarlos en un 5% a 12% de todos los cultivos positivos (12). Se los encontró en bacteriemias (3) y en pulpas infectadas de dientes deciduos. En adultos el número varía de prácticamente 0 hasta aproximadamente 100.000 lactobacilos por ml. de saliva.

(*) Cátedra de Microbiología
Facultad de Odontología

	arabinosa	celobiosa	esculina	fructuosa	galactosa	glucosa	lactosa	maltosa	manitol	manosa	melezitosa	rafinosa	ramnosa	ribosa	salicín	sorbitol	trealosa
<i>L. delbrueckii</i>	-	d	=	+	-	+	-	d	-	+	-	-	-	-	-	-	d
subsp. <i>delbrueckii</i>																	
<i>L. delbrueckii</i>	-	d	+	+	d	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
subsp. <i>lactis</i>																	
<i>L. delbrueckii</i>	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
subsp. <i>bulgaricus</i>																	
<i>L. acidophilus</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	d	-	-	-	-	d
<i>L. salivarius</i>	-	-	d	+	+	+	+	+	+	-	-	+	d	-	-	-	+

d-11 a 89% + (Fuente: 4)

TABLA 1
Fermentación de carbohidratos de algunas especies homofermentadoras del género *Lactobacillus*

En base a su estructura antigénica podemos hacer varios grupos; por reacciones de precipitación entre extractos ácidos y antisuero preparado por inyección de células enteras muertas a conejos. Tenemos entonces:

- A; B-*L. casei* var *casei*;
- C-*L. casei* var. *casei*, var. *alactosus* y var. *rhamnosus*;
- D: E-*L. buchneri* y *brevis*;
- F-*L. fermentum*;
- G-*L. salivarius*.

Grupos antigénicos de *L. acidophilus* no han sido identificados. Los antígenos pueden ser químicamente diversos: polisacáridos de la pared celular (grupos B y C), ácido teicoico ribitol (grupo E) ácido teicoico glicerol de pared (grupo A) y de membrana celular (grupos A y F).

Incidencia de lactobacilos en lesiones cariosas

Condiciones acidúricas asociadas con caries favorecen el crecimiento de lactobacilos (18), éstos son los responsables de la progresión de la lesión en la dentina y contribuyen a mantener el pH ácido en la cavidad oral. Se puede afirmar que aunque no son esenciales en la lesión, el aumento de lactobacilos en saliva nos indica la existencia de lesiones cariosas y condiciones acidogénicas que existen en la boca (22).

En la mayoría de los casos donde se encuentran los lactobacilos, se encuentran estreptococos, ya que la acidez que producen estos últimos favorecen la presencia de los lactobacilos, es decir que al disminuir el pH, disminuye el número de estreptococos y aumentan los lactobacilos.

Los colonizadores primarios son los estreptococos; los ácidos productos finales formados a partir de hidratos de carbono favorecen la aparición en las lesiones cariosas de colonizadores secundarios como los lactobacilos y levaduras. Es decir que los lactobacilos no tienen un papel etiológico primario sino que son patógenos secundarios en la caries (11). Realizando tomas de placa de lesiones cariosas incipientes, se demostró que los lactobacilos no se encontraban en éstas y que su rol en la iniciación de lesiones cariosas sobre la superficie lisa de los dientes era mínima (1).

La flora oral normal tiene gran cantidad de estreptococos. Dietas cariogénicas brinda azúcar en abundancia; esta última, los estreptococos y los productos ácidos finales, favorecen la selectiva proliferación de lactobacilos. Las condiciones ácidas necesarias pueden ser creadas en sitios de la cavidad oral donde los estreptococos están en muy alta concentración y en las regiones retentivas de los dientes en donde la placa dental se acumula (21). La acidez de la misma puede caer a pH 5 en unos minutos, luego que un carbohidrato fermentable es ingerido, lo que favorece la presencia de los lactobacilos.

Aumentan con las lesiones cariosas, con saliva ácida, con la ingesta de azúcares refinados, con disminución del flujo salival y en la diabetes. También aumentan con aparatos de ortodoncia y colocación de prótesis completas. Disminuyen con la higiene y algunos autores indican que a pacientes dentados a los cuales se les realiza la extracción total de sus dientes se lleva a cero el número de lactobacilos.

En un trabajo realizado con un grupo de niños (6) se aislaron 500 tipos de lactobacilos, observándose que el *Lactobacillus casei* se encontraba en un 39%, mientras que el *L. acidophilus* en un 11%, los *L. buchneri* en un

	arabinosa	celobiosa	esculina	galactosa	glucosa	lactosa	maltosa	manitol	manosa	melezitosa	rafinosa	ramnosa	ribosa	salicin	sorbitol	trealosa	xilosa
<i>L. casei</i>	-	+	+	+	+	d	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
subsp. <i>casei</i>																	
<i>L. casei</i> subsp. <i>pseudoplantarum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>L. casei</i> subsp. <i>tolerans</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i>	d	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	-	+	+	+	+	d
<i>L. bifermantans</i>	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>L. brevis</i>	+	-	d	d	+	d	+	-	-	-	d	-	+	-	-	-	d
<i>L. buchneri</i>	+	-	d	d	+	d	+	-	-	+	d	-	+	-	-	-	d
<i>L. fermentum</i>	d	d	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	d	d
<i>L. viridescens</i>	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	d	-

d-11 a 89% + w- + a débil reacción (Fuente: 4)

TABLA 2
Fermentación de carbohidratos de algunas especies heterofermentadoras del género *Lactobacillus*

5%, de lo que se comprobó que la especie de lactobacilos dominante aislada era *L. casei*. Tanto el *L. casei* como el *L. acidophilus* son los responsables de la difusión y continuación del proceso carioso y no de la iniciación (11).

TESTS PREDICTIVOS DE CARIES DENTAL EN BASE AL ESTUDIO DE LACTOBACILOS

Mediante los tests predictivos es posible evaluar el riesgo del futuro desarrollo de caries y aumentar la motivación de los pacientes. Nos permiten también valorar la efectividad de programas de educación, de medidas preventivas y terapéuticas aplicadas, e identificar a individuos o grupos con alta actividad cariogénica.

Conjuntamente con los test predictivos es necesario también una buena evaluación clínica de los pacientes. Para obtener mejores resultados es necesario también, el uso combinado de varios test predictivos.

Nos referiremos en especial a tres test predictivos en base al estudio de lactobacilos: test de Snyder, recuento de lactobacilos y Dentocult.

Test de Snyder

La técnica de Snyder (2) no se utiliza en forma individual sino con fines estadísticos en forma colectiva ya sea en escuelas, liceos o cualquier población determinada que se desee evaluar.

Como primera etapa el paciente debe salivar en un frasco estéril hasta obtener un volumen adecuado de saliva (2 ml.). La toma se hace en ayunas, sin higienizarse y estimulando el flujo salival con un trozo de parafina o goma dique estéril.

Luego se procede a la siembra de la misma en el medio de Snyder.

El mismo consta de: triptosa 20 gr., dextrosa 20 gr., agar 20 gr., CINa 5 gr. y 0,02 gr. de verde de bromocresol (indicador de pH). El pH final se ajusta a 4.8 a 25°C. Para su preparación se disuelven 6,5 gr. en 1 litro de agua destilada, se funde, se vierte en tubos de vidrio (10 ml) y se esterilizan. A pH 4,8 el medio es de color verde, cuando está por arriba de 5 es verde azulado y es amarillo cuando el pH está por debajo de 4.

Previo a la siembra debemos poner los tubos con el medio de Snyder en un baño de agua que está a la temperatura de 45°C, sino lo tenemos, simplemente lo ponemos a baño María, lo llevamos a ebullición y una vez fundido dejamos enfriar hasta que llegue a la

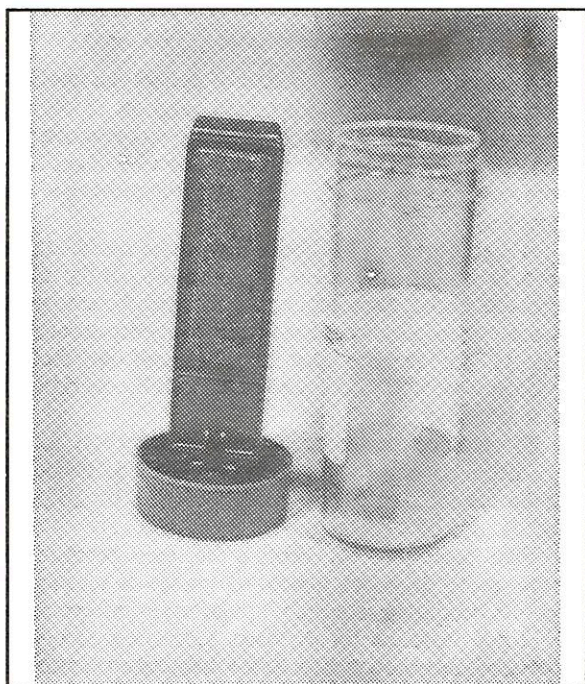


FIGURA 1

Dispositivo rectangular con su recipiente de rosca correspondiente utilizado para el Dentocult

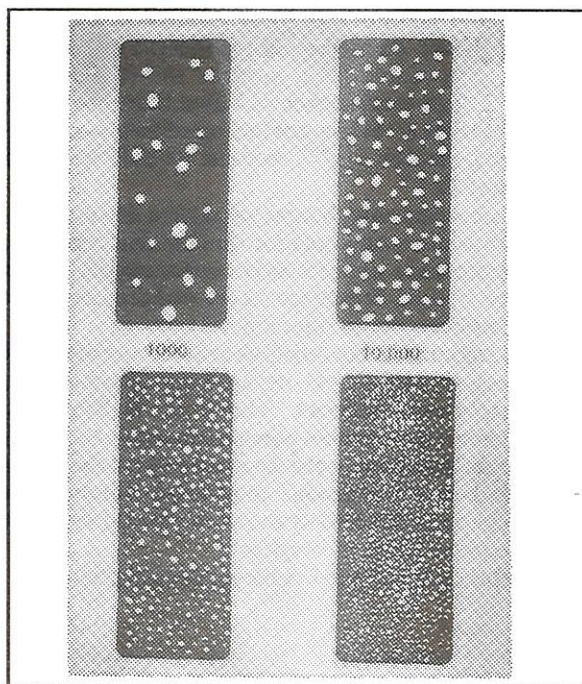


FIGURA 2

Modelos standar que nos permiten comparar la densidad con el número de colonias de lactobacilos que desarrollan en el Dentocult.

temperatura deseada (40 a 45°C), la cual controlamos con la palma de la mano. El medio no puede estar muy caliente porque corremos el riesgo de destruir a los microorganismos presentes en la saliva, ni muy frío ya que no nos permitiría su correcta homogeneización.

Para sembrar usamos pipetas de vidrio estériles o micropipetas. Homogeneizamos la saliva con el mixer y tomamos con la pipeta 0,2 ml de saliva la cual vertemos en el tubo con el medio de Snyder con técnica aséptica, es decir flameamos la boca del tubo, vertemos la saliva, flameamos nuevamente y tapamos el mismo. Homogeneizamos con el mixer o con las manos haciendo rotar el tubo entre ambas. Una vez homogeneizado se identifica el material y se lleva a estufa a incubar a 37°C. Se hace la lectura durante tres días.

La cantidad de ácido producida por la flora acidogénica es detectada por cambios del pH indicador y comparado con un control durante las 24, 48 y 72 horas.

Tiempo	24 horas	48 horas	72 horas	72 horas
	+	-	-	-
		+	-	-
			+	-
Actividad acidogénica	alta o marcada	moderada o mediana	baja o ligera	inactiva o nula
	+ amarillo			
	- verde			

Puede aparecer el agar amarillo (+) y roto lo que nos indica que hubo actividad acidogénica con desprendimiento de gases que da lugar a ruptura del agar y lo desplaza. Generalmente un resultado positivo a las 24 horas nos sugiere que los factores desencadenantes potenciales de la caries están presentes.

Recuento de colonias de lactobacilos en el medio de Rogosa

Este test nos permite contar las colonias de lactobacilos presentes en saliva que desarrollan posteriormente a su siembra en el medio de Rogosa. Este medio (15) está formado por tripticase 10 gr., extracto de levadura 5 gr., KH_2PO_4 6 gr., citrato de amonio 2 gr., solución salina 5 ml., glucosa 20 gr., acetato de sodio 25 gr., ácido acético (99,5%) 1,32 ml., Tween 80 1 gr., agar 15 gr., agua 1 litro. Se disuelven los ingredientes en un litro de agua (no se esteriliza) y se reparte en placas de Petri. El pH se ajusta a 5,4.

Para la técnica se debe coleccionar saliva previamente estimulada (con parafina o goma dique estéril) en un frasco estéril. Se homogeneiza la muestra ya sea en forma manual o con un mixer y se diluye la misma en thiol. En la Cátedra de Microbiología, después de probar varias diluciones optamos por utilizar aquella

con la cual obtuvimos mejores resultados: 1 ml. de saliva en 10 ml. de medio. Se pipetea 0,1 ml. de esta dilución y se vuelca sobre la placa con el medio de Rogosa. Luego extendemos la saliva uniformemente con una varilla de vidrio doblada mediante el calor y llevamos a incubar a 37°C durante 24 a 48 horas en campana (CO₂).

Transcurrido ese tiempo se realiza el recuento. Para ello usamos un contador de colonias con lupa. Este aparato tiene un dispositivo cuadrulado donde colocamos la placa. Se cuentan las colonias por cuadrado y se multiplican por la dilución del inóculo.

Las colonias de lactobacilos aparecen en el medio de Rogosa, en su mayoría, de 2 a 4 mm. de diámetro, redondas, lisas, blancas, convexas brillantes y transparentes. En el medio pueden desarrollar también colonias de levaduras, pero éstas en general tienen un diámetro mayor y diferente morfología colonial; en caso de dudas se debe realizar una coloración de Gram para que no se falsee el resultado.

La interpretación del recuento es la siguiente:

* 0 a 5.000 ufc/ml	nula o ligera actividad acidogénica
* 5.000 a 50.000 ufc/ml	moderada actividad acidogénica
* más de 50.000 ufc/ml	alta actividad acidogénica

Un bajo recuento de colonias está asociado generalmente a una baja actividad cariogénica, un recuento alto en cambio, a una acentuada actividad cariogénica. En general niños con bajo recuento de lactobacilos tienen bajo consumo de azúcar y tienen bajo nivel de actividad cariosa. (22, 23).

El recuento de lactobacilos en predicción de caries debe ser usado en salud y en pacientes tratados, tratando de que no halla áreas de retención sobre los dientes como cavidades abiertas, malas restauraciones, dentaduras o bandas ortodóncicas. En estas situaciones el recuento parece reflejar la frecuencia de ingesta de carbohidratos fermentables e indirectamente el riesgo de iniciación de lesiones cariosas (8).

Dentocult

Mediante este método podemos determinar también microorganismos acidúricos presentes en la saliva, pero la diferencia con los test predictivos previamente descritos es que puede ser usado en el consultorio odontológico y puede ser fácilmente entendido por los pacientes.

Al igual que en los anteriores debe recolectarse saliva, la cual es volcada sobre un medio similar al de Rogosa, el cual se encuentra en un dispositivo rectangular que a su vez se coloca dentro de un frasco enroscándolo. (Fig. 1). La ventaja que tiene es que se incuba aeróbicamente a 37°C o a temperatura ambiente durante dos o más días.

El número de colonias que desarrollan en el dispositivo se compara con la densidad de modelos standar. Se utilizan cuatro modelos: 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ (Fig. 2).

Este test tiene la ventaja de que permite la comparación de varias tomas realizadas de un mismo paciente, ya que los Dentocult pueden ser refrigerados por largos períodos sin alterarse. Esto trae aparejado, en general, una motivación de los mismos en el control de su higiene y en la dieta.

Pueden aparecer errores en los resultados, ya sea por una mala homogeneización de la saliva, o por el desarrollo en el dispositivo de colonias grandes de hongos que crecen mejor que los lactobacilos a la temperatura de la habitación.

El Dentocult es un test práctico, pero sumamente costoso para su empleo en nuestro medio.

Conclusiones

Los lactobacilos son colonizadores secundarios de las lesiones cariosas, por lo que están relacionados íntimamente con la actividad cariogénica y también con la dieta.

También coincidimos con los disintintos autores que afirman que los tests predictivos son de gran ayuda para la educación del paciente, ya sea en la ingesta, control de placa y control de odontología restauradora.

Bibliografía

1. Abramovich, A. Estados iniciales de las caries adamantinas provocadas por *L. salivarius*. *Rev. Asoc. Odont. Argentina*, 1974, Vol. 62:5-6.
2. Alban, A. An improbed Snyder test. *J. Dent. Res.* 1970, 49:641.
3. Bender and Pressman Conditions affecting sensitivity

of techniques for detection of bacteriemia. *J. Dent. Res.* 1961, 40:951.

4. Berguey's Manual of sistematic bacteriology. 1986, Vol. 2, 9ª ed., London: William Wilkins.

5. Birkhed; Edwardsson and Andersson Comparision among a dip-slide test (Dentocult) plate count and Snyder test for estimating number of lactobacilli in human saliva. *J. Dent. Res.* 1981, 60(11): 1832-1841.

6. Bowen, W. Interpretation and use of microbiological

- findings in dental caries. *Oral Microbiol. Immunology*, 1986, 1:82-84.
7. Burnett, G.; Schuster, G. Microbiología oral y enfermedad infecciosa. 1982, México: Panamericana.
 8. Crossner, C. Salivary lactobacillus counts in the prediction of caries activity. *Conn. Dent. Oral Epid.*, 1981, 9: 182-190.
 9. Hammond, B. Studies of encapsulated lactobacilli III human oral strains. *J. Dent. Res.* 1967, 46: 340.
 10. Larmas, M. Simple test for caries susceptibility. *International Dent. J.* 1985, 35: 109-117.
 11. Loesche, W. Dental caries: a treatable infection. 1982, USA: Charles C. Thomas.
 12. Matte, M. Selection of a micromethod and its use in the estimation of salivary *St. mutans* and *Lactobacillus* counts in relation to dental caries in Zanzanian children. *Caries Res.* 1985, 19: 497-506.
 13. Mc. Ghee, J. Dental Microbiology, 1982, USA: Harper and Ron.
 14. Nolte, W. Microbiología Odontológica, 1982, 3er. ed., México: Interamericana.
 15. Rogosa, M.; Mitchel; Wiseman. A selective medium for the isolation and enumeration of oral lactobacilli. *J. Dent. Res.* 1951, 30: 682.
 16. Rosan, B adn Hammond, Toxicity of *L. casei*. *J. Dent. Res.* 1965, 44: 783.
 17. Rosen, S.; Lenny and O'Malley. Lactobacilli in the oral cavity. *J. Dent. Res.* 1968, 47: 358.
 18. Sims, W. The interpretation and use of Snyder test and *Lactobacillus* count. *American Dent. Assoc.* 1970, 80: 1315.
 19. Snyder, ML and others, Evaluation of laboratory test for the estimation of caries activity. *JADA.* 1962, 65: 30.
 20. Snyder, M. and Clarke, Evaluation of colorimetric (Snyder) test. *J. Dent. Res.* 1950, 29: 298-303.
 21. Staat, R. and others. Levels on the quantity and microbial composition of human dental plaque. *J. Dent. Res.* 1975, 54: 872.
 22. Steinle; Madonia; Bahn. Relationship of lactobacillus to the carious lesion. *J. Dent. Res.* 1967, 46: 191.
 23. Vanderas, A. Bacteriologic and nonbacteriologic criteria for indentifying individuals of high risk of developing dental caries. *J. Public Health Dent.* 1986, Vol. 46 (2).
 24. Westergren and Krasse. Evaluation of a micromethod for determination of *St. mutans* and *Lactobacillus* infection. *J. Clinical Microbiol.* 1978 jan: 82-83.
-