

Presencia de *Streptococcus Mutans* Genotipo C en niños y adolescentes peruanos con caries

Presence of *Streptococcus Mutans* Genotype C in Peruvian Children and Adolescents with Caries

Juana R. Delgadillo Avila DDS, MSc, PhD¹; Sofía B. Espinoza Escajadillo Blgo, MSc¹
 Carlos H. Campodónico Reátegui DDS, MSc²; Teresa A. Evaristo Chiyong DDS, MSc²;
 Lita Cáceres de Barces DDS, MSc, PhD²; Dora N. Gómez Meza DDS, MSc³;
 Pamela R. Chacón Uscamaita⁴

1. Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Odontología.
 Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
2. Departamento de Estomatología Preventiva y Social, Facultad de Odontología.
 Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
3. Departamento de Estomatología Rehabilitadora, Facultad de Odontología.
 Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
4. Estudiante de pre-grado, Facultad de Odontología.
 Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Autor para correspondencia: Dra. Juana Delgadillo Avila - jdelgadilloa@unmsm.edu.pe

Recibido: 16-V-2018

Aceptado: 6-VIII-2018

Publicado Online First: 14-VIII-2018

DOI: <https://doi.org/10.15517/ijds.v0i0.34279>

RESUMEN

La caries es una de las enfermedades de naturaleza infecciosa, crónica transmisible muy prevalente en el Perú, relacionada a la presencia del *Streptococcus mutans*, los hábitos de higiene y nutricionales. Objetivo: El propósito de este estudio fue determinar la presencia del genotipo C en el *Streptococcus mutans* en niños y adolescentes peruanos, utilizando la técnica PCR- Multiplex; y su asociación con la prevalencia de caries dental. Material y método: Se trabajó con una muestra de 78 niños y adolescentes de ambos sexos de Lima. El estudio consistió en dos fases, en la primera se obtuvo la saliva estimulada, para el cultivo bacteriano, las mismas que fueron sembradas en agar Mitis Salivarius con bacitracina y sulfisoxasol. En la segunda fase se realizó la genotipificación de acuerdo con su perfil enzimático. Para la extracción de ADN se utilizó el GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit de GeneON GmbH para lo cual se realizó cultivos de las cepas de *Streptococcus sp* en el caldo BHI con sacarosa a 37°C por 24 horas. Resultados: Se evidencia la presencia de *Streptococcus mutans* en 75.6%: 59 de 78 muestras de saliva. Los resultados de la genotipificación por PCR Multiplex demuestran la presencia de 22 muestras de saliva de *Streptococcus mutans* con genotipos C (37,29%) y 37 muestras (62,71%) que no pertenecen a dicho Genotipo. Conclusiones: Los resultados evidenciaron que el *Streptococcus mutans* genotipo C no está relacionado al sexo, grupo etario ni a la presencia de caries dental.

PALABRAS CLAVES

Streptococcus mutans; Genética; Saliva; Caries.

ABSTRACT

Caries is one of the diseases of infectious nature, chronic transmissible very prevalent in Peru, related to the presence of *Streptococcus mutans*, hygienic and nutritional habits. Objective: The purpose of this study was to determine the presence of genotype C in *Streptococcus mutans* in Peruvian children and adolescents, using the PCR-Multiplex technique; and its association with the prevalence of dental caries. Materials and methods: The study was done with a sample of 78 children and adolescents of both sexes from Lima. The study consisted of two phases, on the first one the stimulated saliva was obtained, for the bacterial culture, the same ones that were grown on Mitis Salivarius agar with bacitracin and sulfisoxazol. On the second phase, genotyping was carried out according to its enzymatic profile. For the extraction of DNA, the Gene Extraction Kit GG-1 Bacterial DNA was used, for which cultures of *Streptococcus sp* strains were performed in the BHI broth with sucrose at 37°C for 24 hours. Results: The presence of *Streptococcus mutans* was evidenced in 59 (75.6%) of 78 saliva samples. The results of the genotyping by PCR Multiplex demonstrate the presence of 22 saliva samples of *Streptococcus mutans* with genotypes C (37,297%) and 37 samples 62, 71 % without this Genotype. Conclusions: The results showed that the presence of genotype C is not related to sex, age group or the presence of dental caries.

KEYWORDS

Streptococcus mutans; Genetics; Saliva; Caries.

INTRODUCCIÓN

En el Perú la población infantil y adolescente es afectada por la caries dental en una alta frecuencia, superando el 90% de afectación. La prevalencia en el área urbana es de 90,6% y en la rural 88,7%. El promedio de piezas cariadas, perdidas y obturadas en la dentición temporal y permanente (índice ceo-d/ CPO-D) a nivel nacional es de 5.84 y el promedio de piezas cariadas, perdidas y obturadas en la dentición permanente para la edad de 12 años (CPO-D-12) a nivel nacional es de 3.67 (IC95%: 3,37-3,97) (1).

La caries dental es un proceso patológico infeccioso, multifactorial, localizado y transmisible que destruye los tejidos duros dentales. (2) En términos ecológicos, esta enfermedad es consecuencia de un desequilibrio en el ecosistema oral que lleva al

predominio de una flora antes considerada normal en cavidad oral y ahora convertida en patógena (3).

Los principales microorganismos asociados con la producción de caries son, en orden de frecuencia: 1° *Streptococcus mutans* (principalmente el serotipo C), y en menor proporción *Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus gordonii*; y dos especies de *Lactobacillus* y *Actinomyces* (2).

La presencia de *Streptococcus mutans* en la iniciación de la caries dental se debe a su potencial acidogénico y ácido (4,5). El *Streptococcus mutans* sintetiza un polisacárido de matriz extracelular en biopelículas dentales, por acción de las enzimas extracelulares denominadas glucosiltransferasas, que constituyen un factor de virulencia significativa en el inicio de la caries dental. Estas glucosiltransferasas se clasifican de acuerdo a

su solubilidad en agua del glucano y estas son la gtfB, gtfD y gtfC, esta nomenclatura está basada en el nombre que recibe el gen que lo codifica a cada una de las enzimas. Estos exopolisacáridos proporcionan sitios de unión que promueven el establecimiento de biofilm patógenos (6,7).

Los datos relacionados a la distribución y prevalencia de los serotipos de *Streptococcus mutans* son limitados. En Japón, la prevalencia de los serotipos de *Streptococcus mutans* en muestras orales es principalmente el serotipo c (76%), seguido del serotipo e (26%), el serotipo f (8%) y el serotipo k (2-5%) (8,9).

Pieralisi F. et al. (10) evaluó la diversidad genotípica de *Streptococcus mutans* en niños preescolares libres de caries y caries activas en Brasil. Se encontró una fuerte asociación entre la diversidad genotípica y la experiencia de caries ($r=0,72$; $P<0,001$). Entre los niños con más de un genotipo, 13 tenían caries dental (2 a 5 genotipos) y 4 libres de caries (sólo 2 genotipos). Estos resultados apoyan los hallazgos previos de la diversidad genética de *Streptococcus mutans* en niños preescolares que se asocian con la caries dental.

Cheon K. (11) evaluó la diversidad, comunalidad y estabilidad de los genotipos de *Streptococcus mutans* asociados a caries dental. Se aislaron 18 genotipos, de los cuales 13 genotipos fueron compartidos por al menos dos niños. El número de genotipos por niño estuvo positivamente asociado con la proporción de superficies cariadas. Se presume que la menor cantidad de superficies cariadas están significativamente asociadas con una menor diversidad y mayor estabilidad de genotipos de *Streptococcus mutans*.

Arévalo et al. (12) encontró en niños de 6 y 7 años una prevalencia de *Streptococcus mutans* del 14,9%. De las 47 muestras de saliva, 57,4% (27) correspondieron a niños con caries dental, y de

ellas 8,5% (4), fueron positivas para *Streptococcus mutans* genotipo c, 2,1% (1 cada una) genotipo f, genotipo k, genotipo c y k respectivamente.

Argandoña R. et al. (13) no encontró diferencias en la diversidad genotípica y en la acidogenicidad de los genotipos entre niños sin caries y niños con caries de la primera infancia y niños con una o más cavitaciones. Aunque la diversidad genotípica de *Streptococcus mutans* fue similar entre los grupos de niños, los rasgos fenotípicos de *Streptococcus mutans*, especialmente la respuesta de tolerancia ácida, podría explicar la gravedad de la caries en la primera infancia.

En la comunidad científica hay consenso en señalar al *Streptococcus mutans* como el microorganismo más importante en caries dental. Por lo tanto, las estrategias de aislamiento, identificación, tipificación, prevención y control se dirigen principalmente hacia él.

La alta incidencia que presenta esta enfermedad bucal, así como la gran necesidad de prevenirla, motivó el desarrollo de esta investigación, cuyo propósito fue determinar la presencia del genotipo C en el *Streptococcus mutans* en niños y adolescentes peruanos, utilizando la técnica PCR-Multiplex; y su asociación con la prevalencia de caries dental. De este modo se podrá enfocar esfuerzos para su prevención y el control de su proliferación, antes que se produzca lesiones de caries.

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO Y POBLACIÓN DEL ESTUDIO

La población estuvo conformada por niños y adolescentes entre 8 y 15 años pertenecientes a tres instituciones educativas de tres distritos de Lima. La muestra se obtuvo con un nivel de confianza de 95%, proporción esperada de 0,94 y precisión de 0,05 dando un total de 78 niños. No fueron considerados para este estudio los

niños que no presenten al menos una lesión de caries dental en boca, que presenten enfermedades sistémicas que alteren las características de la saliva y la flora oral. El presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Código de proyecto No 0422).

EVALUACIÓN DIAGNÓSTICA Y TOMA DE MUESTRA

La identificación de caries se realizó a través de un examen clínico intraoral para examinar el número de piezas cariadas, obturadas o extraídas, basándonos en los criterios de la OMS.

La saliva estimulada fue colectada por espacio de tres minutos, en frascos estériles de boca luego de más de una hora sin haber tomado alimento alguno de haber masticado una cápsula de parafina. La saliva fue almacenada a 4°C y procesada dentro de las siguientes dos horas.

CULTIVO BACTERIANO: DETECCIÓN DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* EN MUESTRAS DE SALIVA HUMANA

Se preparó una batería de diluciones de la muestra de saliva humana en agua peptonada, se consideraron las diluciones 100 (inoculación directa de la muestra), 10⁻² y 10⁻⁴, y se inoculó en medio selectivo Mitis Salivarius con Bacitracina y Sulfisoxazol. En el caso de la inoculación directa de la muestra, ésta se hizo con el aza de cole y en el caso de las demás diluciones se procedió a sembrar en superficie y dispersar con espátula de vidrio estéril 100 µl.

Se procedió a incubar entre 48-72h en condiciones anaeróbicas a 37°C. Las colonias que cumplían los criterios morfológicos fueron aisladas, sometidas a prueba de catalasa y sometidas a observación microscópica con tinción de Gram.

Las colonias fueron colectadas en crioviales con caldo BHI con 10% de glicerol y se almacenaron a -20°C. Aquellas en las que no hubiese suficiente biomasa, se requiriese mayor aislamiento o hubiese dudas en las pruebas de identificación se replicaron en Medio selectivos Mitis Salivarius modificado (14).

ANÁLISIS MOLECULAR

El DNA bacteriano para la amplificación con PCR, fue extraído utilizando el kit DNeasyR Blood y Tissue (Qiagen, Germantown, USA).

La diferenciación entre *Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus mutans*, se realizó utilizando una PCR multiplex (2). Dos pares de cebadores amplificadores gtfI y genes Bft para *S. sobrinus* y *S. mutans*, respectivamente. Cada mezcla de PCR contenía 16 mM (NH₄)₂SO₄, 67mM de tris-HCl (pH8,8), 0.01% de Tween-20, 1, 5mM de MgCl₂, 0, 5 uM de cada oligonucleótido cebador, 0,2mM de cada dNTP (Bioline, Londres, Reino Unido), UK) y 50–100 ng de DNA. Las muestras se amplificaron en un termociclador (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) en las siguientes condiciones de PCR, la desnaturalización inicial se realizó a 96° C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95° C durante 30 segundos, recocido a 59° C durante 30 segundos y extendido a 72°C por 1 minuto.

ELECTROFORESIS

Los productos de la amplificación de los PCR multiplex fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% preparado en el tampón TBE 1X, en una cámara de electroforesis COMPACT XS/S BIOMETRA®. Como marcador de peso molecular se utilizó 1µL de 100 pbLadder DNA marker Geneon para determinar el tamaño de las bandas correspondientes a los genes. Para

la observación de las bandas de ADN se utilizó un Transiluminador de luz ultravioleta UVSTAR 312nm, BIOMETRA.

GENOTIPIFICACIÓN DE *STREPTOCOCCUS MUTANS*

EXTRACCIÓN DEL ADN CROMOSÓMICO

Para la extracción de ADN se utilizó el GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit de GeneON GmbH para lo cual se realizó cultivos de las cepas de *Streptococcus sp* en el caldo BHI con sacarosa a 37°C por 24 horas. Se obtuvieron 727 pares de bases con la secuencia que se observa en la tabla 1.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron procesados en el programa SPSS versión 25. Se utilizó la prueba U de Mann Whitney para comparar la experiencia de caries según sexo, presencia de *Streptococcus mutans* y presencia de genotipo C. El nivel de significancia considerado fue 5%.

RESULTADOS

La muestra estuvo conformada por 78 niños y adolescentes, distribuidos equitativamente

según sexo. La edad en el sexo masculino fue en promedio $12,41 \pm 3,41$, y en el sexo femenino $12,49 \pm 3,07$.

La prevalencia de caries dental en la muestra fue de 82,1% (64 de 78 sujetos). La experiencia de caries de la muestra fue $3,47 \pm 3,19$, siendo en el sexo femenino mayor en comparación al sexo masculino.

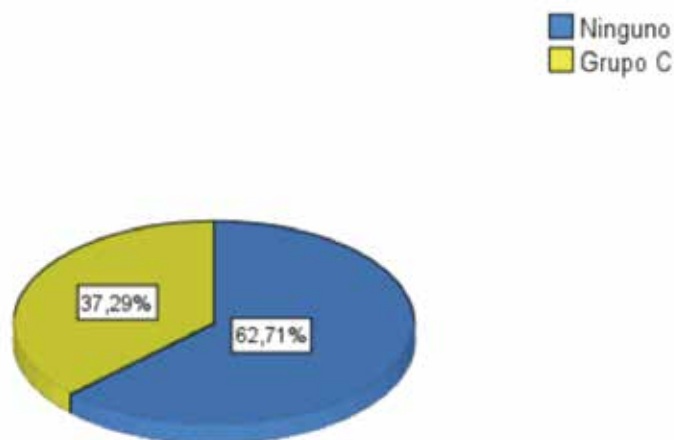
Se encontró presencia de *Streptococcus mutans* en el 75,6% de la muestra (59 de 78 sujetos), no encontrándose diferencias estadísticamente significativas en el CPOD-ceod entre los que presentaron y no presentaron *Streptococcus mutans*.

En los 59 niños y adolescentes que presentaron *Streptococcus mutans* se identificaron 22 pertenecientes al genotipo C (figura 1). No encontrándose diferencias estadísticamente significativas en cuanto su distribución según el sexo $X^2 = 0,192$ $p = 0,789$.

La experiencia de caries dental no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los sujetos que presentaron y no presentaron el genotipo C (Tabla 2).

Tabla 1. Análisis de Genotipificación.

Sistemas	Genes	Iniciadores	Secuencia (5'→3')	Producto de PCR	Referencia
PCR	<i>rgpH</i>	SC-F SC-R	CGGAGTGCTTTTACAAGTGCTGG AACCACGGCCAGCAAACCCTTTAT	727bp	Arévalo <i>et al</i> 2014

**Figura 1.** Presencia de Genotipo C en la muestra.**Tabla 2.** Experiencia de caries total según sexo, presencia de *Streptococcus mutans* y genotipo C presente en la muestra.

Experiencia de caries total (CPOD-ceod)				
	N°	Media	DS	p
Sexo				
Masculino	39	2,92	3,3	U= 0,545
Femenino	39	4,03	3,01	0,03
<i>Streptococcus mutans</i>				
Ausente	19	3	2,21	U= 548,5
Presente	59	3,63	3,44	0,888
Genotipo C				
Presente	22	3,36	3	U= 389,5
Ausente	37	3,86	3,75	0,782

DISCUSIÓN

La caries es una de las enfermedades de naturaleza infecciosa crónica transmisible, muy prevalente en el Perú y el mundo, relacionada a la presencia del *S. mutans* (1).

El ministerio de salud (MINSA) (1) realizó un estudio en el año 2005, en 24 departamentos, la prevalencia en el área urbana fue 90,6% con un promedio (índice ceo-d/ CPO-D) a nivel nacional fue de 5.84, valores mayores a los encontrados en el presente estudio.

En relación al sexo esta investigación encontró mayor prevalencia en el sexo femenino, coincidiendo con autores como Oho T., (15). Sin embargo en otras investigaciones predominan el sexo masculino (16,17) e incluso otros autores no encontraron ninguna asociación entre el sexo y la severidad de la caries dental (18,19).

Sobre la presencia de *Streptococcus mutans*, empleando el PCR Multiplex, los resultados evidenciaron prevalencias mayores de *Streptococcus mutans* a la encontrada por Sánchez & Acosta (20) en niños de 8 a 10 años de edad: 32%, y a las de Arévalo *et al.* (12) que encontraron una prevalencia de 14,9%. Salazar *et al.* (19) encontraron prevalencias mayores (88,2%) en escolares de 5 a 17 años.

Se encontró una relación positiva entre caries dental y *Streptococcus mutans* en 12 estudios realizados por Graciano (21), la presencia de *Streptococcus mutans* parece estar relacionada con la producción de caries y con factores socioculturales. Gispert (22) plantea que existe correspondencia entre el grado de infección y la actividad de caries, por lo que un estudio de este tipo se considera de estimable valor en el pronóstico de riesgo a caries. Sánchez & Acosta (20) encontraron que el 80% de los *Estreptococos*

correspondieron al grupo mutans, no se demostró asociación entre bacteria predominante e incidencia de caries.

En este estudio de genotipificación por PCR-Multiplex se identificó 22 muestras de saliva con genotipo C, que de acuerdo a la solubilidad de la glucosiltransferasa es mixta y que está en relación con la virulencia del *Streptococcus mutans* (23), nuestro resultado no guarda relación directa con la incidencia de caries en la población de estudio.

La presencia de *Streptococcus mutans* de genotipo C en el presente estudio fue de 37,29%. Gamboa (2) manifiesta que el principal microorganismo asociado con la producción de caries es *Streptococcus mutans* principalmente del serotipo C. Arévalo *et al* (12) encontraron que la prevalencia de *S. mutans* tipo C fue de 8,5 %, frecuencia mucho menor a la encontrada en el presente estudio.

CONCLUSIONES

Los resultados evidencian que el *S. mutans* genotipo C se presentó sólo en un 37% de la población, lo cual permite asumir la presencia de otro genotipo presente en la población de niños y adolescentes peruanos.

REFERENCIAS

1. Ministerio de Salud del Perú. Oficina General de Epidemiología y Dirección General de Salud de las Personas. Prevalencia Nacional de Caries dental, fluorosis del esmalte y urgencia de tratamiento en escolares de 6 a 8, 10, 12 y 15 años. Perú, (2005), [citado abril 8,2017] .Disponible en: https://www.minsa.gob.pe/portalweb/06prevencion/prevencion_2.asp?sub5=13
2. Gamboa F. Identificación y caracterización microbiológica, fenotípica y genotípica

- del *Streptococcus mutans*: experiencias de investigación. *Uni Odontol.* 2014 Jul-Dic; 33 (71): 65-73. <http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana>
3. Ojeda G. J. C., Oviedo G. E., Salas L. A. *Streptococcus mutans* and dental caries. *Revista CES Odontología* ISSN 0120-971X Volumen 26 No. 1 Primer Semestre de 2013.
 4. Ikeda T., Ochiai K., Shiota T. Taxonomy of the oral *Streptococcus mutans* based on colonial characteristics and serological, biochemical and genetic features. *Arch Oral Biol.* 1979; 24 (10,11): 863-867.
 5. Burne R. Oral streptococci Products of their environment. *J Dent Res.* 1998; 77 (3): 445-452.
 6. Koo H., Xiao J., Klein M., Jeon J. Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. *J Bacteriol.* 2010; 192 (12): 3024-3032.
 7. Busuioc M., Mackiewicz K., Buttaró B., Piggot P. Role of intracellular polysaccharide in persistence of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 2009; 191 (23): 7315-7322.
 8. Nakano K., Nomura R., Nakagawa I., Hamada S., Ooshima T. Demonstration of *Streptococcus mutans* with a cell wall polysaccharide specific to a new serotype k, in the human oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2004 Jan; 42 (1): 198-202.
 9. Nakano K., Nomura R., Shimizu N., Nakagawa I., Hamada S., Ooshima T. Development of a PCR method for rapid identification of new *Streptococcus mutans* serotype k strains. *J Clin Microbiol.* 2004; 42 (11): 4925-4930.
 10. Pieralisi F. J., Rodrigues M. R., Segura V. G., Maciel, S., Ferreira, F. B., Garcia, J., & Poli-Frederico, R. Genotypic Diversity of *Streptococcus mutans* in Caries-Free and Caries-Active Preschool Children. *International Journal of Dentistry*, 2010, 824976.
 11. Cheon K., Moser S., Wiener H., Whiddon J., Momeni S., Childers N, et al. Characteristics of *Streptococcus mutans* genotypes and dental caries in children. *European Journal of Oral Sciences* [serial on the Internet]. (2013, May), [citado Abril10, 2017]; 121 (3pt1): 148-155.
 12. Arévalo M., Canacuan F., Echeverry J., Salazar C., Martínez C., Martínez M. & Correa M. Identificación molecular y genotipificación de *Streptococcus mutans* de muestras de saliva de niños de Medellín, Colombia. *CES odontol.* [Internet]. 2014 Dec [cited 2018 July 06]; 27(2): 47-60. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-971X2014000200005&lng=en
 13. Argandoña R., Duque C., Sampaio K., Rodrigues V., de Aguilar M. L., Colombo N., Arthur R., de Cassia T., Gomez F., Botazzo A. Genotypic diversity and phenotypic traits of *Streptococcus mutans* isolates and their relation to severity of early childhood caries. *BMC Oral Health* (2017) 17:115.
 14. Pedraza Sánchez D. M., Hernández Velandia Y. A. Diseño y valoración de un medio de cultivo selectivo (SULBAC) para *Streptococcus mutans* [Trabajo para obtener el título de Bacteriologo]. [Bogota (Colombia)]: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Carrera de Bacteriología; 2006.
 15. 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. 2000; 15: 258-262.
16. Padilla B. M. Streptococcus mutans en saliva y su relación con caries dental. Unidad Académica de Odontología. México. UAZ, 2009; 55 (6) 48-5.
 17. Hoshino T., Kawaguchi M., Shimizu N., Hoshino N., Ooshima T., Fujiwara T. PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using gtf genes. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004 Mar; 48 (3): 195-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15023429>
 18. Liébana J. Genotipos de Streptococcus mutans de saliva y placa en escolares usando la técnica AP-PCR y el cebador OPA-2. Tesis doctoral. Universidad de Granada 2007. Editorial de la Universidad de Granada. ISBN: 978-84-338-4285-5.
 19. Salazar L. A., Vásquez C., Almuna A., Oporto G., Santana R., Herrera C. L., Sanhueza A. Detección molecular de estreptococos cariogénicos en saliva. Molecular detection of cariogenic streptococcus in saliva. Int. J. Morphol. [internet] dic. 2008 [citado 2017 octubre 22] 26 (4): 951.
 20. Sánchez-Pérez L., Acosta G. E. Estreptococos cariogénicos predominantes, niveles de infección e incidencia de caries en escolares. Revista ADM 2007; 54 (2): 45-51.
 21. Graciano M., Correa Y., Martínez C., Burgos A., Ceballos J., Sánchez L. Streptococcus mutans y caries dental en América Latina. Revisión sistemática de la literatura. Revista Nacional de Odontología. Rev. Cubana Estomatol v.37 n.3 Ciudad de La Habana sep.-dic. 2000.
 22. Gispert E., Rivero A. y Cantillo E. Relación entre el grado de infección por Streptococcus mutans y la posterior actividad cariogénica. Centro Provincial de Investigaciones Estomatológicas. Ciudad de La Habana. vol 8 n° 14 2012.
 23. Welsh J., McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research. 1990; 18 (24): 7213-7218.



Attribution (BY-NC) - (BY) You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggest the licensor endorses you or your use. (NC) You may not use the material for commercial purposes.