

Etiología microbiana de la caries

Adriana P. Rodríguez Hernández y Laurie A. Ximénez Fyvie

INTRODUCCIÓN	89
ESPECIES BACTERIANAS RELACIONADAS CON LA CARIES	90
Iniciación de la caries	90
Caries severa de la infancia	96
Progresión de la caries	98
Caries del adulto	99
TERAPIAS PREVENTIVAS CONTRA LA CARIES DENTAL	100
CONCLUSIONES	102
Referencias	102

INTRODUCCIÓN

El microbioma oral humano está constituido por un conjunto de microorganismos que colonizan la cavidad oral en una comunidad ecológica, comensal y simbiótica, de especies potencialmente patógenas que comparten un espacio corporal, sin causarle daño, en la mayoría de los casos, al huésped.

La cantidad y/o proporción de cada especie dentro de un nicho determinado puede variar. Esto puede ser debido a diversos factores como: características propias del huésped, del sitio de colonización, el tipo de ecosistema microbiano o por procesos exógenos, causando patologías. Los cambios en la composición microbiológica de diferentes superficies orales pueden dar origen a la aparición de enfermedades como la periodontitis y la caries.

En la boca, las infecciones de origen exógeno (causadas por microorganismos que no forman parte de la flora comensal), son raras. Cerca del 90% de las infecciones que afectan la cavidad oral son causadas por microorganismos **comensales**. La microbiota propia de un individuo, se adquiere desde su nacimiento por la exposición a distintos microorganismos a través del contacto, en primera instancia, con la madre, y **después** con otros individuos y el medio ambiente en general. La colonización inicial de microorganismos comensales ocurre en etapas y **momentos** específicos de la vida, que están determinados por "ventanas de infectividad" para cada especie en particular.

La etiología microbiana de los procesos cariogénicos **fue conocida** desde finales del siglo XIX. Sin embargo, fue hasta casi un siglo más tarde cuando se demostró por primera vez, que los ácidos producidos por ciertas especies bacterianas de la cavidad oral **son** responsables de causar los defectos en las estructuras del diente **que** dan origen a la caries. Desde la última parte del siglo XX, ya se consideraba **que** *Streptococcus mutans* como el agente etiológico principal de la caries; no obstante, otras especies bacterianas pleomórficas y bacilares como *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii* y *Lactobacillus acidophilus*, también han sido **relacionadas** con la iniciación y progreso de la misma.

La caries presenta una flora específica, conforme se establece y progresa de lesión inicial, a moderada y después a severa. Las evidencias científicas acumuladas sobre la etiología de la caries han demostrado que el proceso cariogénico no es iniciado por un solo microorganismo, sino por un grupo de especies bacterianas específicas **y** que guardan una estrecha relación con la dieta alta en azúcares. Dentro de dichas especies se incluyen *Streptococcus* del grupo *mutans*, **quienes** secretan sustancias ácidas capaces de destruir las estructuras dentales, como el esmalte, la dentina y el cemento radicular.

A pesar de que se conoce la relación que existe entre la presencia de ciertas cepas de *S. mutans* y el desarrollo de la caries, diferentes estudios han demostrado que los procesos cariogénicos pueden iniciarse en ausencia de dicha especie.

Lo anterior indica que, mientras que la detección de *S. mutans* representa un factor de riesgo para presentar la caries, su presencia no es indispensable para que ocurra la enfermedad. **A la fecha** se reconoce que otras especies, principalmente, de los géneros *Lactobacillus*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Veillonella*, *Propionibacterium* y *Atopobium* pueden también jugar un papel importante en los procesos cariogénicos, incluso en ausencia de *S. mutans*.

ESPECIES BACTERIANAS RELACIONADAS CON LA CARIES

El **cuadro 6-1** presenta la diversidad de géneros y especies bacterianas que han sido relacionadas con distintos tipos de caries dental.

Iniciación de la caries

La colonización microbiana en la cavidad oral se ha atribuido a las 'ventanas de infectividad' de cada individuo. Estas ventanas se establecen por la exposición a determinada microbiota desde el nacimiento, **donde van a poder adquirirse** determinados microorganismos **en** ciertas edades de la infancia **y** no así en una edad adulta. Asimismo, **ha quedado esclarecido** que dicha flora se adquiere de la madre o el principal cuidador en edades tempranas.^{1,2,3}

Los primeros estudios que evaluaron niveles bacterianos en infantes recién nacidos, hasta **de** 46 meses de edad, describieron que la adquisición inicial de *Streptococcus mutans* (**figura 6-1**) se da a los 38 meses, comenzando con una ventana de infectividad muy discreta a una edad promedio de 26 meses y estrechamente relacionada con los niveles de *S. mutans* de **las madres**.^{1,2}

Estudios similares que evaluaron la microbiota de recién nacidos y de infantes de hasta 46 meses de edad describieron que la adquisición inicial de *Streptococcus sanguinis* (**figura 6-2**) no prevalece en los infantes **antes de que les erupcionen** los dientes deciduos. Esto **es con** una discreta ventana de colonización de *S. sanguinis*, alrededor de los nueve meses **y** precedida por *S. mutans* a los 26 meses en promedio.^{2,3} **Los** niveles de *S. sanguinis* **disminuyeron** conforme aumentaba la edad y lo contrario **ocurrió** con los niveles de *S. mutans*, lo cual las convierte en especies que compiten por la colonización de la superficie dental.^{2,3,4}

En otro estudio se describió la colonización de especies de *Actinomyces* (**figura 6-3**) en infantes y su relación con la caries en dientes deciduos. La adquisición temprana de *Actinomyces odontolyticus* (**figura 6-4**), en las superficies de la mucosa oral, aumentó de los 2 a los 6 meses de edad. Sin embargo, la colonización de otras especies de *Actinomyces* se volvió más compleja conforme **los infantes iban teniendo erupción dental**. *A. naeslundii* (**figura 6-5**) fue la segunda especie **más** identificada **a** partir del primer año de vida, **la cual también coloniza** junto con *Actinomyces viscosus* (**figura 6-6**) y *Actinomyces gerencseriae* (**figura 6-7**).⁵

Cuadro 6-1. Géneros y especies bacterianas que han sido relacionadas con distintos tipos de caries dental. Los grupos bacterianos se encuentran agrupados de acuerdo a su rama filogenética o Phylum

	Actinobacteria	Bacteroidetes	Firmicutes	Fusobacteria	Proteobacteria	Referencias
Iniciación	Actinomyces sp. Bifidobacterium sp.		Streptococcus sp. Veillonella sp. Lactobacillus sp.			Sarkonen et al., 2000, Becker et al., 2002.
Caries severa	Actinomyces gerencsiae Scardovia wiggsiae		Streptococcus cristatus Granulicatella elegans Veillonella sp.		Neisseria flavescens Campylobacter showae	Kanasi et al., 2010, Tanner et al., 2011, Beighton, 2005, Munson et al., 2004.
Progresión	Propionibacterium sp.	Prevotella histicola Prevotella multisaccharivorax	Lactobacillus gasseri Lactobacillus salivarius Selenomonas clona EY04	Leptotrichia clona GT018	Campylobacter gracilis	Aas et al., 2008, Yang et al., 2012, Shimada et al., 2015.
Caries del adulto	Actinomyces sp. Atopobium sp. Bifidobacterium sp. Propionibacterium sp. Olsenella profusa Rothia dentocariosa	Prevotella sp.	Streptococcus mutans Selenomonas sp. Dialister sp. Eubacterium sp. Pseudoramibacter alactolyticus Lactobacillus sp. Enterococcus faecalis			Chhour et al., 2005, Munson et al., 2004, Preza et al., 2008.

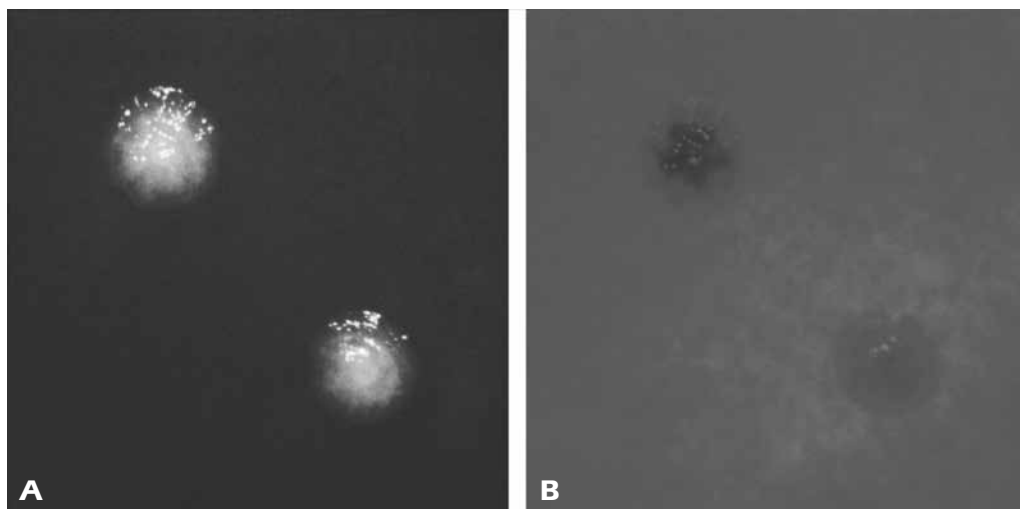


Figura 6-1. *Streptococcus mutans*. **A.** Morfología de colonia con luz incidente (4x). **B.** Morfología de colonia con luz transmitida (4x).



Figura 6-2. *Streptococcus sanguinis*. Microscopía electrónica de barrido (20 000x).

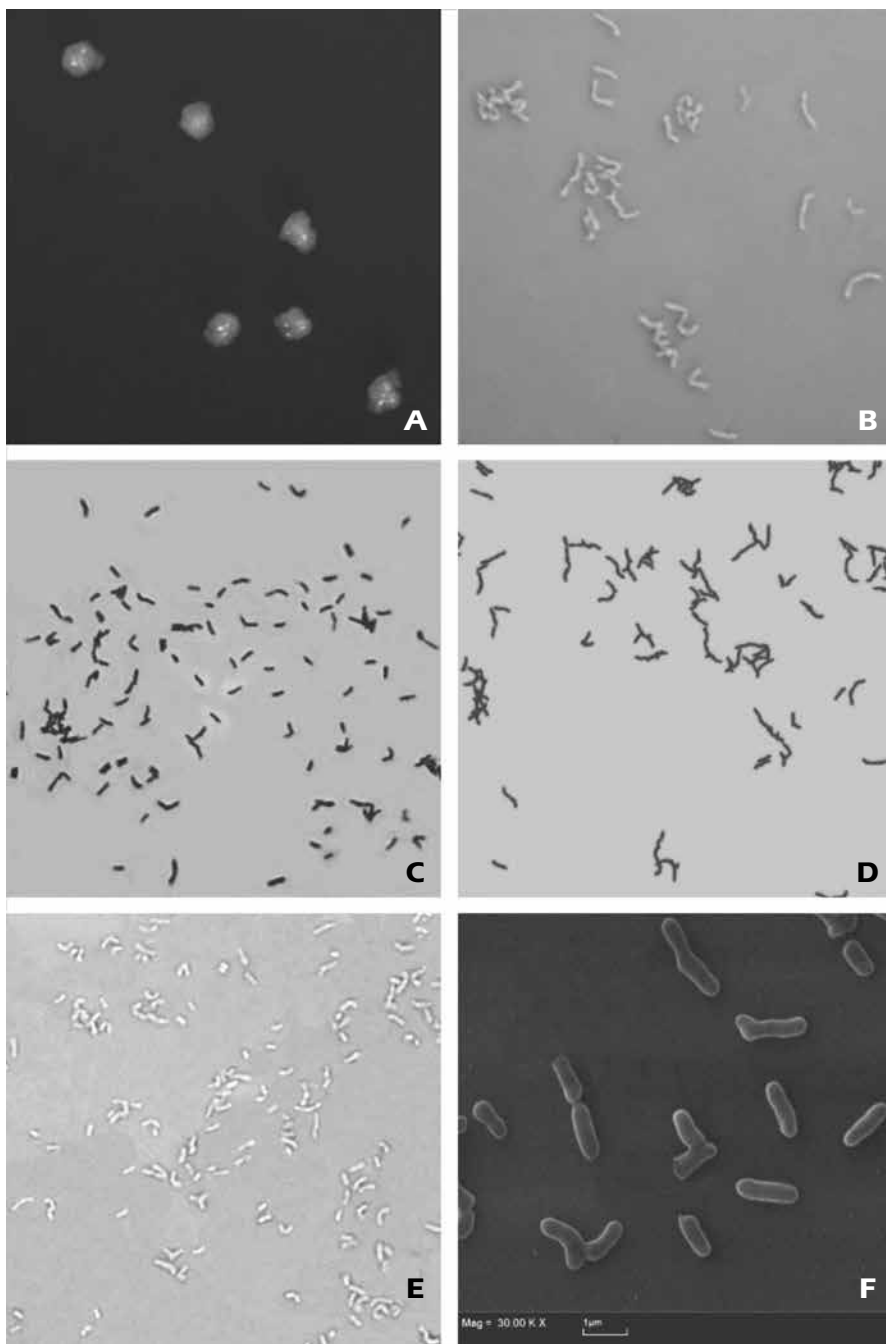


Figura 6-3. Género *Actinomyces*. **A.** *A. israelii*: Morfología de colonia (4x). **B.** *A. gerencseriae*: Interferencia diferencial de Nomarski (100x). **C.** *A. naeslundii*: Campo claro con tinción de Gram (100x). **D.** *A. viscosus*: Campo claro con tinción de Gram (100x). **E.** *A. georgiae*: Interferencia diferencial de Nomarski (100x). **F.** *A. odontolyticus*: Microscopía electrónica de barrido (30,000x).

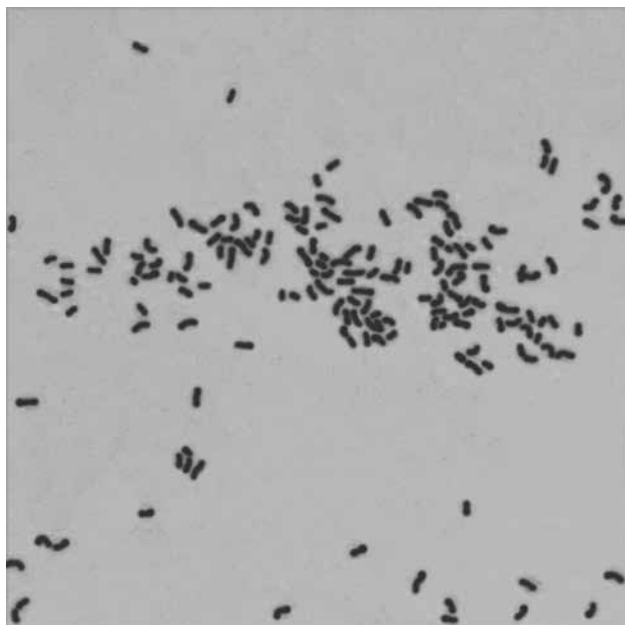


Figura 6-4. *Actinomyces odontolyticus*. Campo claro con tinción de Gram (100x).

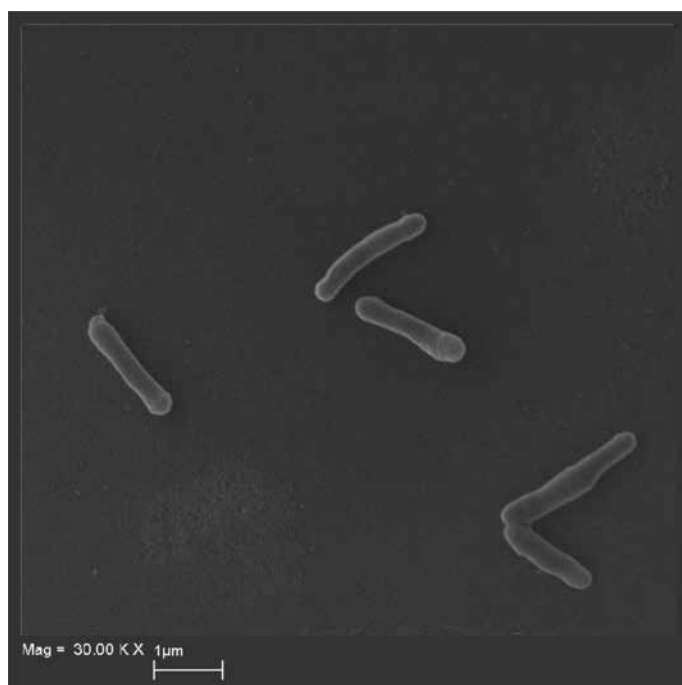


Figura 6-5. *Actinomyces naeslundii*. Microscopía electrónica de barrido (30,000x).

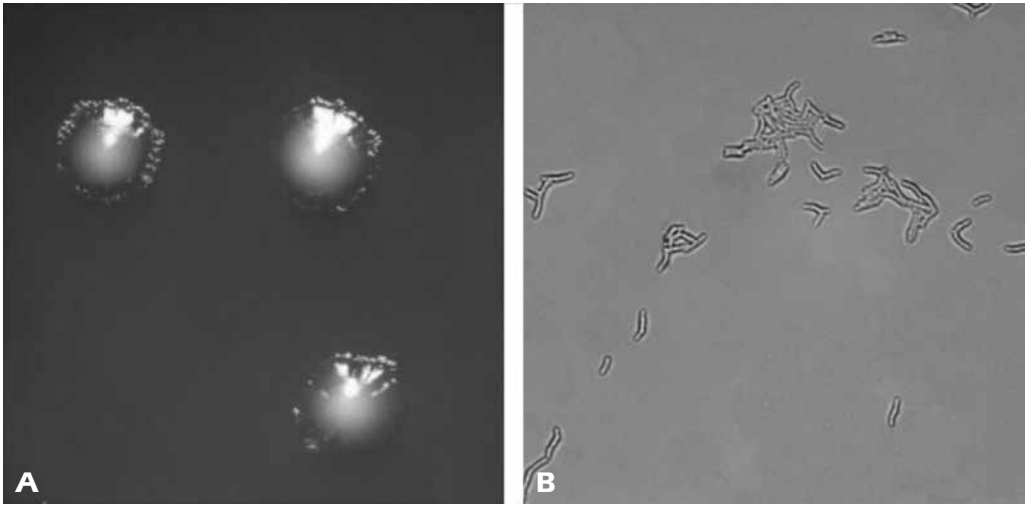


Figura 6-6. *Actinomyces viscosus*. **A.** Morfología de colonia (4x). **B.** Interferencia diferencial de Nomarski (100x).

Mediante técnicas de identificación molecular, se ha podido identificar la microbiota relacionada a caries de la infancia. *S. sanguinis* ha sido asociado con estados de salud oral (no caries/no periodontitis). Mientras que especies como *A. gerencseriae*, *Bifidobacterium* sp. (figura 6-8), *S. mutans*, *Veillonella* sp. (figura 6-9), *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus parasanguinis* y *Lactobacillus fermentum*, han sido asociados con caries de la infancia. Específicamente *A. gerencseriae* es considerada una especie importante en la iniciación de la caries

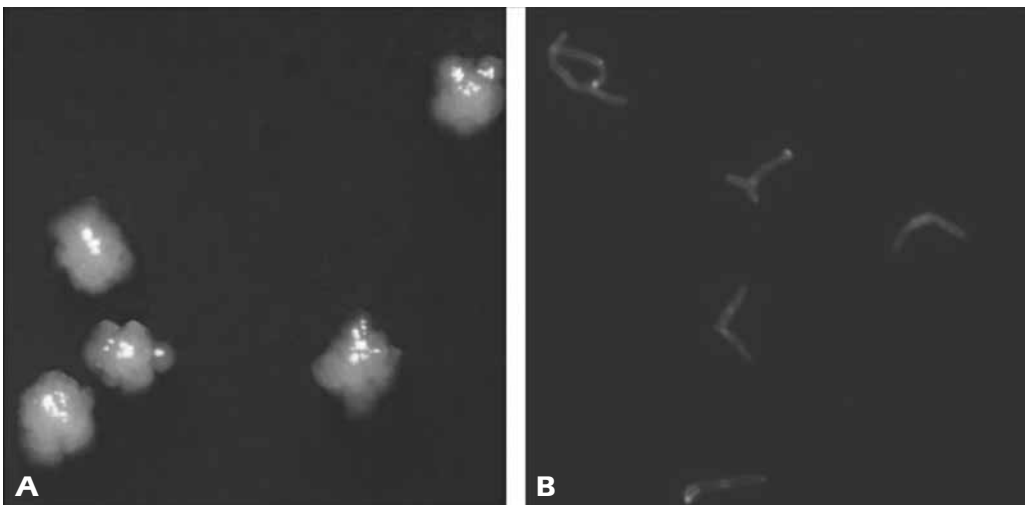


Figura 6-7. *Actinomyces gerencseriae*. **A.** Morfología de colonia (4x). **B.** Campo oscuro (100x).

y mientras que el género *Bifidobacterium* se sospecha que puede estar involucrado en procesos de caries profunda.⁶

Caries severa de la infancia

La caries dental severa de la infancia tiene una implicación clínica de gran importancia, ya que no sólo comprende dentición primaria, sino que es extensiva para dentición permanente.⁷

En los primeros estudios realizados por medio de técnicas moleculares donde se evaluaron muestras de placa dentobacteriana de niños con caries severa, se identificaron alrededor de 139 especies

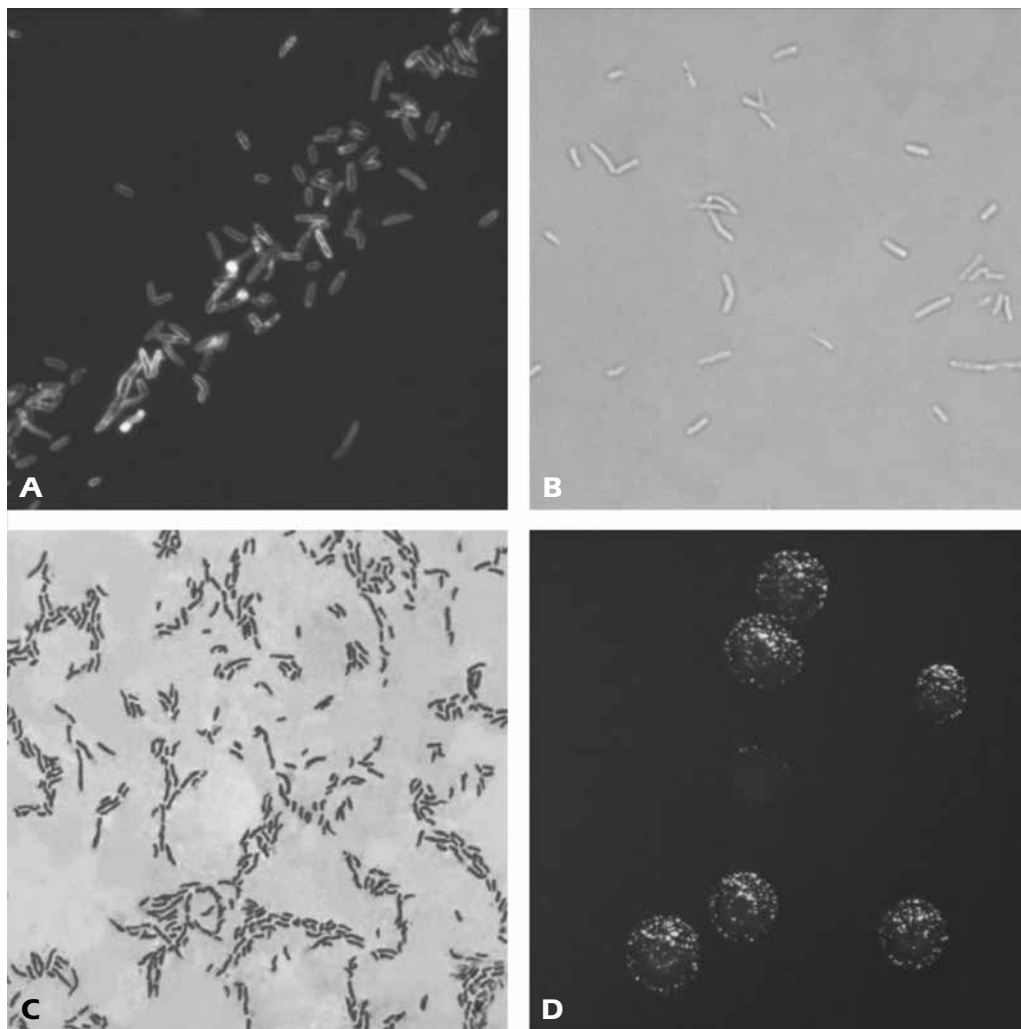


Figura 6-8. Género *Bifidobacterium*. **A.** *B. dentium*: Campo oscuro (100x). **B.** *B. dentium*: Interferencia diferencial de Nomarski (100x). **C.** *Mogibacterium pumilum* (antes *B. adolescentis*): Campo claro con tinción de Gram (100x). **D.** *M. pumilum*: Morfología de colonia (4x).

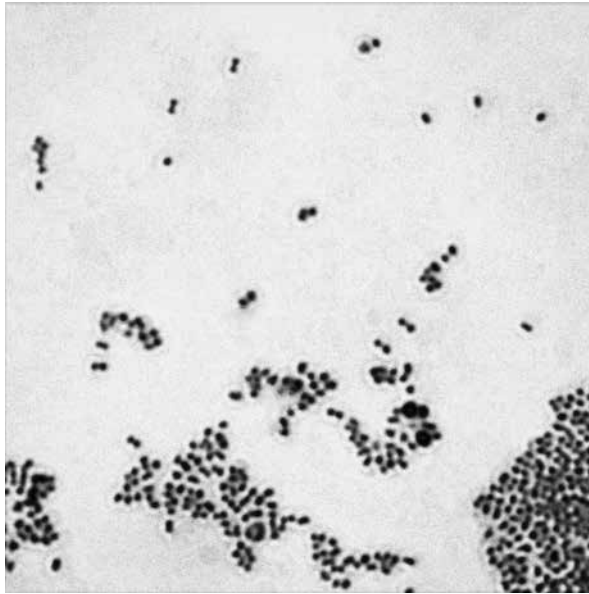


Figura 6-9. *Veillonella parvula*. Campo claro con tinción de Gram (100x).

dónde los **Taxa** más frecuentes fueron: *Granulicatella elegans*, *Veillonella* sp. HOT-780, *Veillonella atypica*, *Neisseria flavescens* y *Campylobacter showae* (figura 6-10).⁸ En otro estudio realizado con cultivos bacterianos y secuenciación por clonación, las especies **mayormente** relacionadas con caries

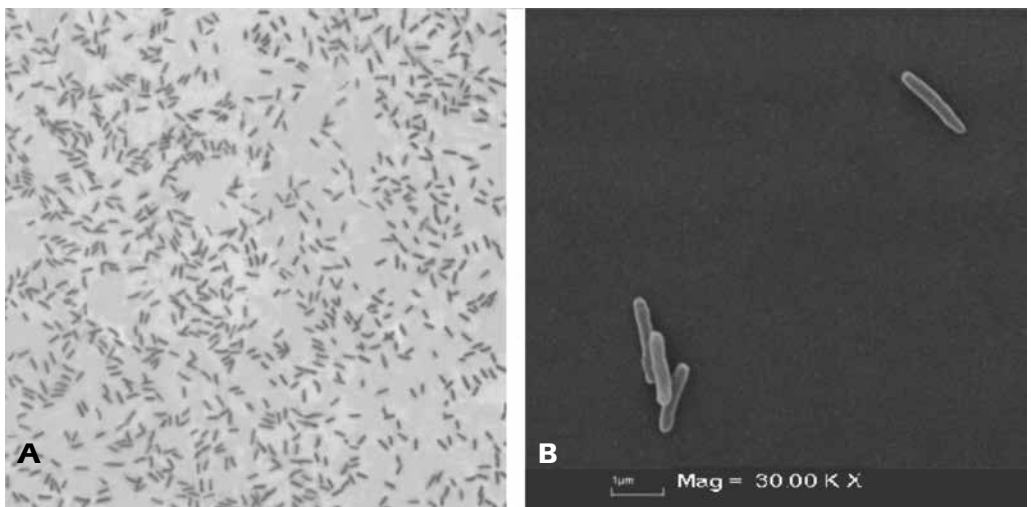


Figura 6-10. *Campylobacter showae*. **A.** Campo claro con tinción de Gram (100x). **B.** Microscopía electrónica de barrido (30,000x).

severa de infantes fueron: *S. mutans*, *Scardovia wiggsiae*, *Veillonella parvula*, *Streptococcus cristatus* y *A. Gerencseriae*.⁹

Fisiológicamente, las especies de *Veillonella* utilizan lactato como fuente de carbono, su asociación con la caries dental, sugiere una relación simbiótica con *S. mutans*, debido al ambiente rico en ácido láctico, derivado del metabolismo de esta especie.⁸ Por otro lado, la especie *S. wiggsiae*, ha sido relacionada con la caries severa de la infancia junto con *S. mutans* y en caries profundas de adultos.^{10,11}

Progresión de la caries

Los perfiles microbiológicos de la caries se pueden diferenciar tanto en dentición primaria como en secundaria, e inclusive en lesiones activas o también llamadas profundas, que **involucren** dentina.

La hipótesis de la carie **dependiente** de la ecología de la placa dentobacteriana, sugiere que la caries es el resultado del desbalance entre la microflora residente derivada de los cambios locales y factores de predisposición que varían de individuo a individuo. Diversas especies bacterianas pueden participar en el proceso carioso; no obstante, es difícil determinar los microorganismos involucrados en la progresión de la caries si no son consideradas otras variables de predisposición como la dieta u otros factores.^{12,13}

Especies de los géneros *Veillonella*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Actinomyces*, *Atopobium* y *Prevotella* (figura 6-11), parecen jugar **una función** importante en la progresión de la caries **y caries activa**.^{14,15} **En específico**, especies como *Prevotella histicola* y *Prevotella multisaccharivorax* se han identificado en lesiones cariosas en dentina de sujetos con pH salival ácido.¹⁶ Ciertas especies de *Lactobacillus* parecen tener una influencia sobre lesiones cariosas con extensión a dentina, como *Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus salivarius*, que se han encontrado estrechamente relacionadas con la progresión de la caries.¹³

También se ha descrito la presencia de *S. mutans* en altos niveles en lesiones cariosas de dientes primarios, junto con especies de *Corynebacterium* clona AK153 y *A. gerencseriae*. Mientras que

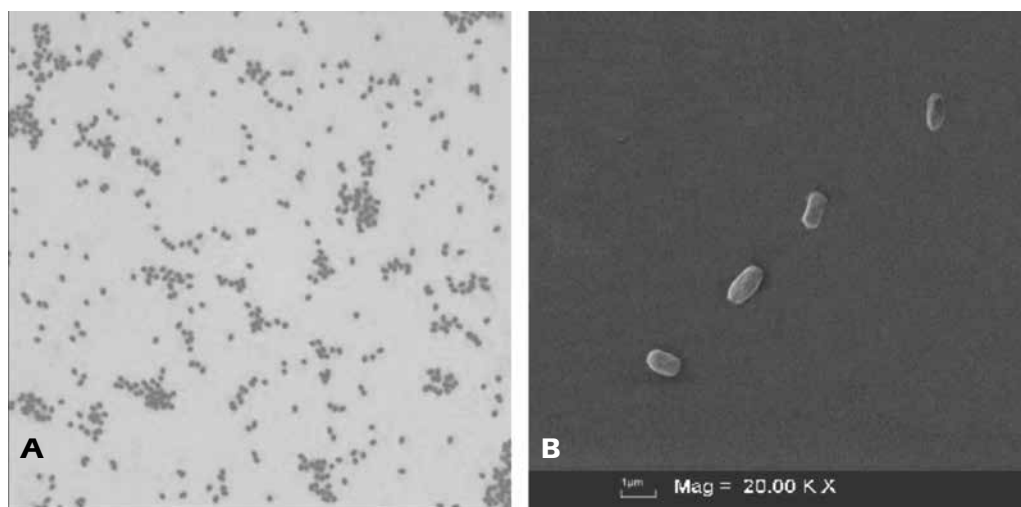


Figura 6-11. *Prevotella intermedia*. **A.** Campo claro con tinción de Gram (100x). **B.** Microscopía electrónica de barrido (20,000x).

en dientes permanentes de sujetos jóvenes con caries, la flora predominante han sido de especies del género *Propionibacterium*, *Leptotrichia* clona GT018, *Campylobacter gracilis* (figura 6-12) y *Selenomonas* clona EY04.¹⁴

Caries del adulto

La población adulta es un foco importante de caries radiculares debido a las zonas de dentina expuesta y la acumulación de placa dentobacteriana. La diversidad de microbiota en caries radiculares y caries del adulto ha sido ampliamente estudiada. Alrededor de 245 especies han sido identificadas en caries de adultos, de las cuales especies de los géneros *Atopobium*, *Actinomyces*, *Prevotella*, *Selenomonas*, *Dialister*, *Fusobacterium* (figura 6-13), *Eubacterium* (figura 6-14), *Olsenella*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, y *Pseudoramibacter* han sido encontradas como predominantes en este tipo de lesiones. Es importante mencionar que alrededor del 50% de las especies detectadas en las lesiones con caries en adultos, permanecen como especies no-cultivables hasta el momento.^{17,18}

En otro estudio se analizaron muestras de caries con dentina involucrada provenientes de individuos entre 24 y 79 años de edad. Los resultados mostraron que los Taxa predominantes por cultivo anaerobio fueron *Propionibacterium* (18%), *Olsenella profusa* (14%), y *Lactobacillus rhamnosus* (8%). Mientras que los Taxa predominantes por identificación molecular fueron *S. mutans* (16%), *Lactobacillus gasseri/johnsonii* (13%) y *L. rhamnosus* (8%).¹¹

Por medio de secuenciación de la fracción 16S rRNA se analizaron muestras de placa supragingival de raíces con y sin caries en adultos. Los géneros y especies más identificados en las muestras de caries radiculares fueron *Actinomyces* sp., *Lactobacillus* sp., *S. mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Selenomonas* sp. clona CS002, *Atopobium* sp. y *Olsenella* sp., *Pseudoramibacter alactolyticus* y *Propionibacterium* sp. FMA5. Por el contrario, especies de los géneros *Selenomonas*, *Veillonella*, *Leptotrichia* sp., así como especies como *Fusobacterium nucleatum* (figura 6-15), *Selenomonas noxia*, *S. cristatus* y *Kingella oralis*, fueron características colonizadoras de las superficies radiculares sin caries.¹⁸

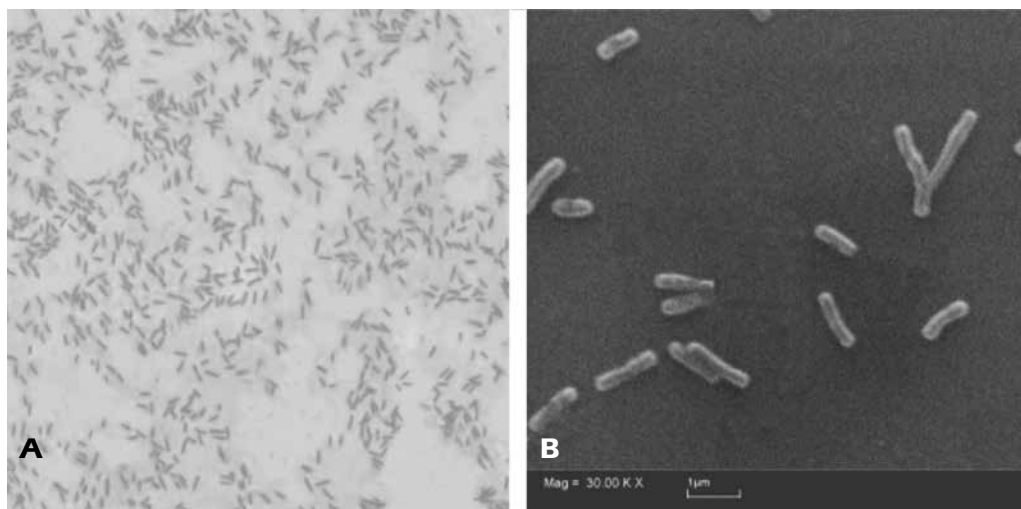


Figura 6-12. *Campylobacter gracilis*. **A.** Campo claro con tinción de Gram (100x). **B.** Microscopía electrónica de barrido (30,000x).

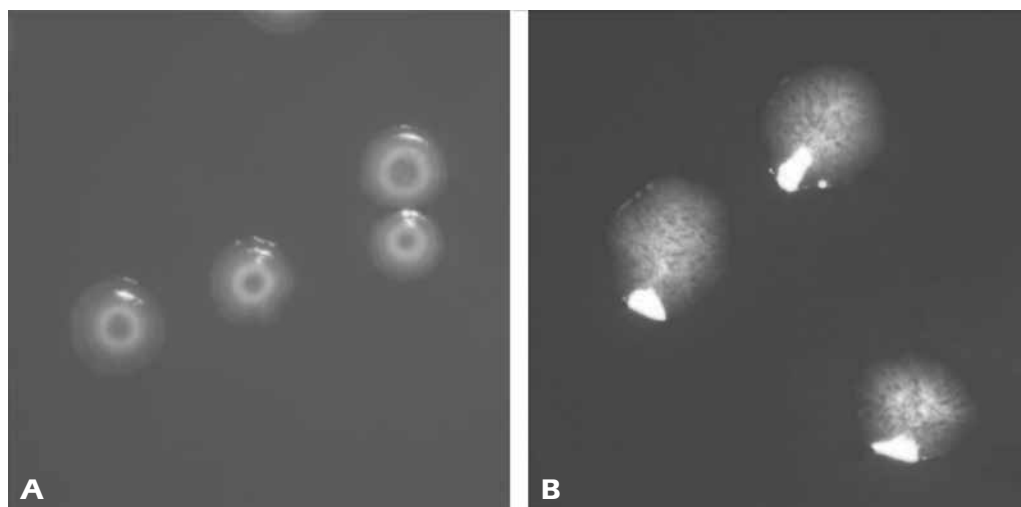


Figura 6-13. Género *Fusobacterium*. **A.** *F. nucleatum*: Morfología de colonia (4x). **B.** *F. periodonticum*: Morfología de colonia (4x).

TERAPIAS PREVENTIVAS CONTRA LA CARIES DENTAL

En la actualidad existen diversas terapias preventivas para contrarrestar la caries, tales como: técnicas de higiene oral, aplicación de fluoruro en diversas presentaciones, e inclusive índices microbiológicos de predisposición para dicha infección; sin embargo, la caries sigue prevaleciendo altamente a nivel mundial. En México, el "Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales (SIVEPAB)",

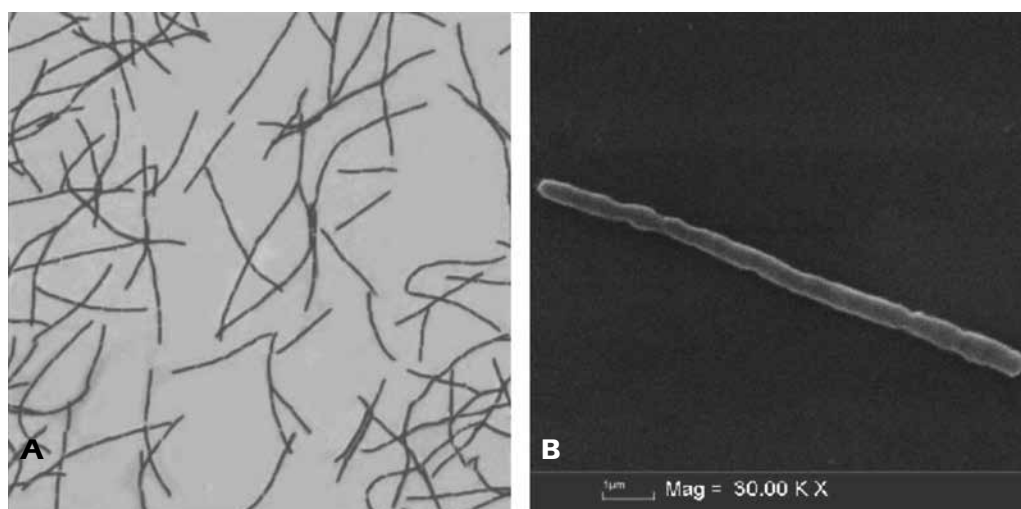


Figura 6-14. *Eubacterium saburreum*. **A.** Campo claro con tinción de Gram (100x). **B.** Microscopía electrónica de barrido (30,000x).

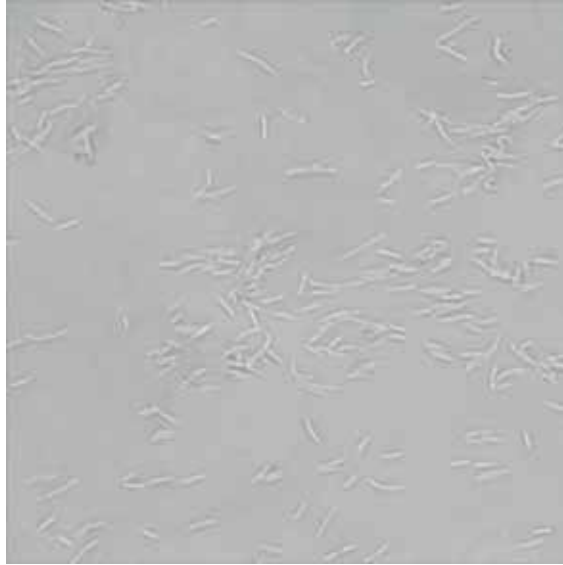


Figura 6-15. *Fusobacterium nucleatum*. Interferencia diferencial de Nomarski (100x).

reportó en el año 2013, una prevalencia de caries dental del 94.9% en sector salud de la población mexicana, encontrándose que en todos los grupos de edad ésta fue superior al 87%, pero en la población de mayor a 40 años se presentó una prevalencia superior al 97%.¹⁹

Las enfermedades infecciosas han sido por mucho tiempo interceptadas por medio de los mecanismos de defensa del huésped a través de inmunizaciones. Se han desarrollado vacunas tanto activas como pasivas contra *S. mutans*, ya que sigue siendo el microorganismo blanco de elección.

Las primeras terapias de inmunización contra la caries, demostraron que a través de la administración intravenosa de *S. mutans* en chimpancés, se desarrollaba en ellos una disminución de la infección. A pesar de no tener bases inmunológicas, comprendían los investigadores que los niveles bacterianos podían ser controlados de ese modo.²⁰

Entre las terapias de inmunización diseñadas actualmente, existen diversos componentes de *S. mutans* que participan en su adhesión y en la formación y unión a glucanos, que solos o en combinación se ha mostrado que causan efectos inhibitorios de caries en animales de experimentación.²¹ Por ejemplo, la inactivación por inserción de glucosiltransferasas que codifican enzimas que sintetizan glucanos insolubles (*gtfB* y *gtfC*) y solubles (*gtfD*).²²

Asimismo, se han encontrado efectos preventivos de la caries dental, con la aplicación de proteínas intactas derivadas de la síntesis de péptidos recombinantes y de vacunas de DNA que codifican fragmentos antigénicos de *S. mutans*.²¹ Las proteínas de adhesión de antígeno I/II de *S. mutans* son un ejemplo de inmunización por medio de antígenos recombinantes de la porción central de adhesión de dichas proteínas.²²

Por otro lado, terapias pasivas inmunológicas también han sido diseñadas como suplementos en la dieta con anticuerpos policlonales IgG o IgY contra la glucosiltransferasa, glucanos de unión a proteínas y agentes transgénicos monoclonales específicos para antígenos de superficie de *S. mutans*, las cuales han reducido de manera considerable caries en animales de experimentación.²¹

El incremento en anticuerpos IgA salivales en infantes, también ha sido aceptado como terapia coadyuvante, ya que evita la colonización de *S. mutans*. Los infantes entre el primer y tercer año de edad, son competentes inmunológicamente a nivel de mucosa oral. Con frecuencia, antes de los 18 meses no han sido infectados con *Streptococcus* del grupo *mutans*, ya que la ventana de colonización de dichos microorganismos es entre los 18 y 36 meses de edad. Por lo tanto, no han creado anticuerpos para antígenos de glucosiltransferasa, lo cual hace factible poder inmunizar a los infantes de esa edad, **esto como** un efecto preventivo **de** colonización de dichas especies.²³

En general, los individuos con bajos o nulos niveles de *Streptococcus* del grupo *mutans* en una edad temprana, cursan **por** mejor salud dental en **una** edad madura.²¹

Desde el siglo pasado se han desarrollado terapias de remplazo bacteriano, las cuales consisten en la inoculación de especies microbianas inocuas para evitar la colonización de especies relacionadas con la caries dental. El objetivo de **estas** terapias es favorecer la colonización con microorganismos que no **influyan** en la severidad de la caries, pero que sean colonizadores persistentes en el tejido del huésped susceptible a una infección específica. En el caso de la caries dental **han** encontrado que diversos tipos de *S. mutans* que producen bajas cantidades de ácidos y variantes naturales de *S. salivarius*, no son cariogénicos. **Estudios** han demostrado que estas especies pueden estar presentes en ratones de laboratorio sin causar caries. Una vez infectados con este tipo de *S. mutans*, los animales de experimentación comienzan a ser más resistentes a la **infección, por lo tanto, la** terapia de remplazo promueve una gran resistencia **con** cepas inocuas **para** el huésped **inoculado, desplazando la colonización de la bacterias residentes que podrían ser más patógenas.**²⁴

Otra alternativa **de este tipo de terapias**, se ha enfocado en la generación de *S. mutans* con constructos carentes de lactato deshidrogenasa. Con esta terapia se espera que se produzca **menos** cantidad de ácido láctico que las células nativas de dicha especie, **ya que el ácido láctico promueve** el desarrollo de la caries dental.²⁵

Las terapias de reemplazo más recientes se han enfocado **a realizar** especies de *S. mutans* con modificaciones genéticas (A2JM), que reducen de manera significativa la caries en animales de experimentación. Las modificaciones de A2JM consisten en mutaciones en la biosíntesis del gen d-alanina (péptido indispensable del peptidoglicano), **que permite su colonización en bajas cantidades y que a la vez ocasiona que dicha especie colonice y altere a otras especies bacterianas, con el fin de obtener D-alanina para su crecimiento.**²⁶

No obstante, tomando en consideración que *S. mutans* no es el único agente causal de la caries, **ya que hay** otros microorganismos acidogénicos involucrados en la progresión del proceso carioso,²¹ queda la incertidumbre de la efectividad de los tratamientos enfocados **para** dicha especie.

De ahí la inquietud de **la necesidad** de terapias de remplazo y tratamientos para evitar **colonización de posibles** especies relacionadas con **patogenicidad** a una edad temprana en los infantes, **e inclusive** previo a su dentición.²⁷

CONCLUSIONES

La microbiota relacionada con caries se encuentra determinada por las “ventanas de infectividad” de cada individuo, establecidas por la exposición a distintos microorganismos, desde el nacimiento y hasta ciertas edades, como es la ventana de infectividad de *S. mutans* que se establece entre los 26 y 38 meses de edad.

Gracias a técnicas de identificación molecular se han encontrado asociaciones de especies bacterianas y distintos tipos de caries como *A. gerencseriae*, considerada como una especie que participa en la iniciación de la caries y *Bifidobacterium* involucrada en caries profunda. La relación entre especies involucradas en caries dental severa, refleja **el** ambiente rico en productos bacteria-

nos como es el ácido láctico derivado del metabolismo de especies como *S. mutans*, lo cual sugiere una relación simbiótica con especies como *Veillonella* sp.

Debido a que la ventana de colonización de los microorganismos cariogénicos se encuentra entre los 18 y 36 meses de edad, los infantes no han creado anticuerpos para antígenos de glucosiltransferasa, lo cual hace factible poder inmunizarlos o aplicar terapias de remplazo, esto como un efecto preventivo de colonización para *S. mutans* y otras especies potencialmente cariogénicas.

Referencias

1. **Caufield PW, Cutter GR, Dasanayake AP:** Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res* 1993;72:37-45.
2. **Caufield PW, Dasanayake AP, Li Y, Pan Y, Hsu J, Hardin JM:** Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. *Infect Immun* 2000;68:4018-4023.
3. **Milgrom P, Riedy CA, Weinstein P, Tanner AC, Manibusan L, Bruss J:** Dental caries and its relationship to bacterial infection, hypoplasia, diet, and oral hygiene in 6- to 36-month-old children. *Community Dent Oral Epidemiol* 2000;28:295-306.
4. **Carlsson J, Grahnen H, Jonsson G, Wikner S:** Establishment of *Streptococcus sanguis* in the mouths of infants. *Arch Oral Biol* 1970;15:1143-1148.
5. **Sarkonen N, Kononen E, Summanen P, Kanervo A, Takala A, Jousimies-Somer H:** Oral colonization with Actinomyces species in infants by two years of age. *J Dent Res* 2000;79, 864-867.
6. **Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML et al.:** Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol* 2002;40:1001-1009.
7. **Li Y, Wang W:** Predicting caries in permanent teeth from caries in primary teeth: an eight-year cohort study. *J Dent Res* 2002;81:561-566.
8. **Kanasi E, Dewhirst FE, Chalmers NI, Kent R et al.:** Clonal analysis of the microbiota of severe early childhood caries. *Caries Res* 2010;44:485-497.
9. **Tanner AC, Mathney JM, Kent RL, Chalmers NI et al.:** Cultivable anaerobic microbiota of severe early childhood caries. *J Clin Microbiol* 2011;49:1464-1474.
10. **Beighton D:** The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dent Oral Epidemiol* 2005;33:248-255.
11. **Munson MA, Banerjee A, Watson TF, Wade WG:** Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. *J Clin Microbiol* 2004;42:3023-3029.
12. **Marsh PD:** (1994) Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 1994;8:263-271.
13. **Shimada A, Noda M, Matoba Y, Kumagai T, Kozai K, Sugiyama M:** Oral lactic acid bacteria related to the occurrence and/or progression of dental caries in Japanese preschool children. *Biosci Microbiota Food Health* 2015;34:29-36.
14. **Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM et al.:** Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol* 2008;46: 1407-1417.
15. **Yang F, Zeng X, Ning K, Liu K et al.:** Saliva microbiomes distinguish caries-active from healthy human populations. *ISME J* 2012;6:1-10.
16. **Kianoush N, Adler CJ, Nguyen KA, Browne GV et al.:** Bacterial profile of dentine caries and the impact of pH on bacterial population diversity. *PLoS One* 2014;9:e92940.
17. **Chhour KL, Nadkarni MA, Byun R, Martin FE, Jacques NA, Hunter N:** Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries. *J Clin Microbiol* 2005;43: 843-849.
18. **Preza D, Olsen I, Aas JA, Willumsen T, Grinde B, Paster BJ:** Bacterial profiles of root caries in elderly patients. *J Clin Microbiol* 2008;46:2015-2021.
19. **SIVEPAB:** Resultados del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales. México, 2013.
20. **Bowen WH:** A vaccine against dental caries. A pilot experiment in monkeys (*Macaca irus*). *Br Dent J* 1969;126:159-160.
21. **Smith DJ:** Dental caries vaccines: prospects and concerns. *Expert Rev Vaccines* 2010;9:1-3.
22. **Yamashita Y, Bowen WH, Burne RA, Kuramitsu HK:** Role of the *Streptococcus mutans* gtf genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. *Infect Immun* 1993;61:3811-3817.
23. **Taubman MA, Nash DA:** The scientific and public-health imperative for a vaccine against dental caries. *Nat Rev Immunol* 2006;6:555-563.
24. **Hillman JD, Socransky SS:** Replacement therapy of the prevention of dental disease. *Adv Dent Res* 1987;1:119-125.
25. **Russell RR:** The application of molecular genetics to the microbiology of dental caries. *Caries Res* 1994;28: 69-82.
26. **Hillman JD, Mo J, McDonnell E, Cvitkovitch D, Hillman CH:** Modification of an effector strain for replacement therapy of dental caries to enable clinical safety trials. *J Appl Microbiol* 2007;102:1209-1219.
27. **Beighton D:** Can the ecology of the dental biofilm be beneficially altered? *Adv Dent Res* 2009;21:69-73.

