

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGIA**

**DISEÑO Y VALORACION DE UN MEDIO DE CULTIVO SELECTIVO (SULBAC)
PARA *Streptococcus mutans***

**DIANA MILENA PEDRAZA SANCHEZ
YOHANY ANDRES HERNANDEZ VELANDIA**

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE BACTERIOLOGO(A)

BOGOTA, D.C. COLOMBIA. JUNIO 2006

NOTA DE ADVERTENCIA:
Los conceptos y opiniones emitidos
En este trabajo son responsabilidad
Del autor, no compromete en nada
A la Pontificia Universidad Javeriana
Artículo 23 de la resolución No 13
Julio de 1.996

DEDICATORIA

Dedicamos este trabajo de Grado a
Nuestros Padres quienes finalmente
Nos permitieron llegar a este punto.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Centro de Investigaciones Odontológicas (CIO), quienes permitieron ejecutar y culminar exitosamente

Esta idea.

A la Dra. Margarita Chaves, por su dedicación, apoyo y confianza
En la realización del presente trabajo de Grado.

RESUMEN

Streptococcus mutans es el microorganismo relacionado con el proceso cariogénico, desempeña un papel importante en el inicio de la desmineralización, no siempre se aísla antes del desarrollo de las lesiones, además es posible hacerlo en zonas libres de caries. Sin embargo, estudios epidemiológicos demuestran correlación significativa entre los niveles de estas bacterias en la placa y la saliva con la prevalencia de caries e incidencia de caries.

Teniendo en cuenta que cada vez se hace necesario aumentar la selectividad de los medios de cultivo en el proceso de identificación en los laboratorios de microbiología diagnóstica, este estudio pretende mejorar la calidad de aislamiento que se pueda obtener en el medio de cultivo clásico llamado *Agar Mitis Salivarius* mediante la adición de compuestos químicos como lo son el cloruro férrico y el citrato de sodio y también antibióticos como el sulfisoxazole y la bacitracina, los cuales han arrojado resultados favorables en el aislamiento de *S. mutans*.

Incluye cepas de *S. mutans* previamente aisladas, biotipificadas y congeladas obtenidas en el centro de investigaciones odontológicas, igualmente se utilizaron muestras de saliva de 10 pacientes quienes bajo consentimiento escrito autorizaron el uso de la muestra, la cual se utilizó para la recuperación de otros estreptococos orales, como lo fue *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus rattus*.

El medio de cultivo SULBAC, resultó efectivo en el aislamiento selectivo de *Streptococcus mutans*, observándose un crecimiento del 100% en las diferentes concentraciones a las cuales se ensayó dicho medio, mientras que la inhibición de

crecimiento en los dos medios con concentraciones mas bajas es: *S. sanguis* fue del 70%, *S. sobrinus* fue del 65%, *S. rattus* fue del 100%, observándose que no se presento crecimiento de ninguno de estos estreptococos en las dos concentraciones de medio mas altas, mientras que *S. mutans* presenta un optimo crecimiento en todas las concentraciones, confirmando la selectividad del medio SULBAC para *S. mutans*.

ABSTRACT

Streptococcus mutans is the microorganism related with the cariogenic process, it plays an important role in the beginning of demineralization, not always is isolated before of the tissue injury, also is possible isolate it in tissues without caries. However, epidemiological studies show significant correlation between the levels of this bacterium in the plaque and saliva with the prevalence of caries and incidence of caries.

Each moment is more necessary augment the selectivity of the culture medium in the identification process in the diagnostic microbiology, this study pretends get better, the isolation quality that we can obtain in the classical culture medium named *Mitis Salivarius Agar (MSA)*, by the addition of chemical compounds like ferric chloride and sodium citrate and also, the addition of antibiotics like sulfisoxazole and bacitracin, these antibiotics had give very good results in the isolation of *S. mutans*.

This study includes strains of *S. mutans* previously isolated, chemical identification and freeze, obtained from the Odontological Investigation Centre, also, saliva specimens were obtained from 10 patients, who under permission, authorized specimen analysis, for the recuperation of other streptococcus from the oral cavity like *S. sanguis*, *S. sobrinus*, *S. rattus*.

The culture medium SULBAC shows high effectiveness in the selective isolation of *S. mutans*, showing the grow of the bacterium in 100% at different concentrations of the assay, while the inhibition of the grow in the medium with lower concentration is: *S. sanguis* 37.5%, *S. sobrinus* 50% and *S. rattus* 100%, there is

not grow of any streptococcus in the higher concentrations of the medium, S. mutans shows an optimal grow in all the concentrations, it confirms the selectivity of SULBAC culture medium for S. mutans.

TABLA DE CONTENIDO

PAG

1.	Introducción.....	1
2.	Objetivos.....	3
2.1	Objetivo General.....	3
2.2	Objetivos Específicos.....	3
3.	Antecedentes Bibliográficos.....	4
3.1	Generalidades del Genero Estreptococo.....	4
3.2	Estreptococos Viridans.....	6
3.3.	Grupo <i>Streptococcus Mutans</i>	6
3.3.1	Colonización por Microorganismos del Grupo <i>Mutans</i> y Cariogénesis.....	7
3.3.2.	Mecanismos de Adherencia.....	9
3.4	<i>Streptococcus Mutans</i>	10
4.	Medios de Cultivo.....	12
4.1	Medios de Cultivo Selectivos.....	13
4.2	Preparación.....	13
4.2.1	Disolución del Medio de Cultivo Deshidratado.....	13
4.2.2	Esterilización.....	14
4.2.3	Vertido en Placas.....	15
5.	Agentes Inhibidores del Crecimiento Bacteriano en Medio De Cultivo.....	16
5.1.	Antibióticos.....	16
5.1.1.	Sulfonamidas.....	16
5.1.1.1	Propiedades Químicas.....	17
5.1.1.2.	Efectos en Microorganismos.....	17
5.1.2	Bacitracina.....	18

5.2	Agentes Químicos Actuando Como Bactericidas o Bacteriostáticos.....	19
5.2.1	Cloruro Férrico.....	19
5.2.2	Citrato de Sodio.....	20
6.	Materiales y Métodos.....	21
6.1	Población y Muestra.....	21
6.2	Procesamiento de las Muestras.....	21
6.3.	Siembra de Streptococos orales.....	23
7.	Resultados.....	24
8.	Discusión de Resultados.....	34
9.	Conclusiones.....	36
10.	Recomendaciones.....	37
11.	Bibliografía.....	38
Anexo 1.....		40
Anexo 2.....		43

INDICE DE TABLAS

PAG

Tabla No 1. Identificación bioquímica de Estreptococos orales.....	7
Tabla 2. Componentes y concentraciones del medio SULBAC.....	22
Tabla 3. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 1 (Bajo) Primer ensayo.	24
Tabla 4. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 1 (Bajo) Segundo ensayo.	24
Tabla 5. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 1 (Bajo). Tercer Ensayo.	24
Tabla 6. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 1 (Bajo). Cuarto Ensayo.....	25
Tabla 7. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 1. (Bajo). Quinto ensayo.....	25
Tabla 8. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 2 (Normal). Primer ensayo.	26
Tabla 9. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 2 (Normal). Segundo Ensayo.....	26
Tabla 10. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 2 (Normal). Tercer Ensayo.....	27
Tabla 11. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 2 (Normal). Cuarto Ensayo.....	27
Tabla 12. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 2 (Normal). Quinto Ensayo.	27

Tabla 13.	
Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 3 (ALTO -A). Primer Ensayo.....	28
Tabla 14.	
Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 3 (ALTO-A). Segundo Ensayo.....	29
Tabla 15.	
Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 3 (ALTO -A). Tercer Ensayo.....	29
Tabla 16.	
Comparación de crecimiento de las diferentes cepas.....	29
Utilizadas en el medio 3 (ALTO -A). Tercer Ensayo.	
Tabla 17.	
Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 3 (ALTO – A) Quinto ensayo.....	30
Tabla 18.	
Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 4 (ALTO -B). Primer Ensayo.....	31
Tabla 19.	
Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 4 (ALTO-B). Segundo ensayo.....	31
Tabla 20.	
Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 4 (ALTO –B). Tercer ensayo.....	31
Tabla 21.	
Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 4 (ALTO-B). Cuarto ensayo.....	32
Tabla 22.	
Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 4 (ALTO-B). Quinto ensayo.....	32

INDICE DE FIGURAS

PAG

Figura No. 1 Utilización de la sucrosa por <i>S. mutans</i> y patogénesis de la caries dental.....	9
Figura No. 2 Comparación del crecimiento de las cepas utilizadas en el medio SULBAC 1 con concentración baja.....	25
Figura No. 3 Comparación del crecimiento de las cepas utilizadas en el medio SULBAC 2 con concentración normal.....	28
Figura No. 4 Comparación del crecimiento de las cepas utilizadas en el medio SULBAC 3 con concentración ALTO – A.....	30
Figura No. 5 Comparación del crecimiento de las cepas utilizadas en el medio SULBAC 4 con concentración ALTO – B.....	32

1. INTRODUCCIÓN

La caries dental es desde hace muchos años, la enfermedad bucal de origen infeccioso que se observa con mayor frecuencia en nuestro país. Se caracteriza por la destrucción localizada de los tejidos duros del diente. Los factores principales que influyen en la prevalencia de caries dental son: presencia de microorganismos cariogénicos en saliva y placa dental, dientes susceptibles y sustrato adecuado.

La etiopatogenia se asocia con la presencia de ciertos microorganismos; los que con mayor frecuencia se relacionan con el inicio y desarrollo de la caries son: estreptococos del grupo mutans, *Lactobacillus sp* y *Actinomyces sp*, estos pueden ser aislados a partir de placa dental supra, subgingival y saliva.

La confirmación de crecimiento de estas especies bacterianas se realiza a través de pruebas bioquímicas que incluyen fermentación de carbohidratos y algunas pruebas serológicas de confirmación.

Para el aislamiento de *S. mutans*, la dificultad se presenta debido a la baja selectividad de los medios de cultivo y por la gran cantidad de microbiota acompañante que es inhibida en muy poca proporción. En cuanto a la identificación por perfil bioquímico, la similitud entre especies bacterianas de la cavidad oral incrementa el porcentaje de error en la identificación apropiada de *S. mutans*

En este trabajo, con el fin de disminuir el margen de error, se diseñó un nuevo medio de cultivo selectivo para *S. mutans*. La selectividad se logra adicionándole a

los medios sustancias antibióticas como el Sulfisoxazole y la Bacitracina. Además, el uso de compuestos químicos como el cloruro férrico y el citrato de sodio incrementan las probabilidades de crecimiento selectivo.

Partiendo de los hallazgos encontrados se abre la posibilidad de contar con una herramienta segura para la identificación apropiada de *S. mutans* e inhibir microbiota acompañante, problemática presentada actualmente en los laboratorios de microbiología diagnóstica.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- Modificar el Agar *Mitis Salivarius* (AMS) para aumentar la selectividad en el aislamiento de estreptococos orales, específicamente *Streptococcus mutans*.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Aislar e identificar estreptococos orales de muestras de saliva.
- Realizar la modificación del *Agar Mitis Salivarius* (AMS), con cuatro concentraciones diferentes del antibiótico Sulfisoxazole manteniendo concentraciones constantes de Bacitracina, Citrato de sodio y Cloruro férrico.
- Valorar el crecimiento de *Streptococcus mutans* y otros estreptococos orales en el medio de cultivo SULBAC realizando recuentos manuales en cada una de las cajas sembradas.
- Evaluar la capacidad de inhibición de otros estreptococos orales en el medio de cultivo SULBAC utilizando el modelo estadístico ANOVA empleado por Takada – Hirasawa en el 2005.

3. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

3.1 Generalidades del Genero Estreptococo

En el ámbito biológico, el genero *Streptococcus* se caracteriza por ser microorganismos Gram positivos, catalasa negativa y tienden a agruparse en pares o en cadenas. Son anaerobios facultativos; de hecho, algunas cepas podrían crecer mejor en condiciones anaerobias y otras solamente incrementando las concentraciones de CO₂. (Koneman. 2001).

Presentan un metabolismo fermentativo y producen especialmente ácido láctico (homo fermentativo). Su temperatura optima de crecimiento es de 36°C y en relación con las condiciones de cultivo son muy variables, desde los mas exigentes hasta las que incluso se desarrollan en condiciones hostiles. (Liébana J. 2002)

Con respecto a su clasificación, se han propuesto múltiples criterios, de los cuales se mencionarán algunos:

- Hemólisis: Se debe a la destrucción de la hemoglobina en medios que contienen que contienen sangre y permite distinguir los estreptococos alfa, beta y gamma hemolíticos. La actividad hemolítica puede verse influida por la atmósfera y el tiempo de incubación.
- Estructura antigénica: Existen unos antígenos del grupo que permiten clasificarlos en los que siempre los poseen (serogrupables) y los que habitualmente carecen de ellos (no serogrupables). Este carácter permite

obtener los llamados serogrupos de Lancefield, denominados con letras mayúsculas: A a W, excepto L, J, LL y Ñ; van ligados a un polisacárido parietal denominado C, o a los ácidos teicóicos (grupos D, H y N). Los serogrupos a su vez se dividen en serogrupos en función de polisacáridos parietales (diferentes del C), antígenos capsulares o proteínas de la pared. Por otra parte, los no serogrupables por los grupos de Lancefield, pueden diferenciarse directamente en serotipos en función de elementos estructurales capsulares, proteínas y polisacáridos de la pared celular.

- Características Fisiológicas: Mediante algunas pruebas bioquímicas convencionales es posible la identificación de serogrupos. Así, los estreptococos del grupo A son sensibles a un disco de bacitracina con 0.04 unidades; los del grupo B hidrolizan el hipurato o produce CAMP (una proteína que interactúa con la beta hemolisina de *Staphylococcus aureus* incrementando la hemólisis de esta última bacteria); los del grupo D son capaces de desarrollarse en un medio con bilis. Aunque existen excepciones de algunas cepas las citadas pruebas permiten correlacionar la mayoría de ellas con los serogrupos. Sin embargo, para diferenciar los no serogrupables hay que recurrir a otras no convencionales y algo complejas. (Liébana, 2002). Pruebas bioquímicas y de genética molecular son utilizadas para estudiar la interrelación de las especies estreptocócicas entre sí. La combinación de estos métodos permitió una clasificación de los estreptococos con el fin de emplearla en clínica y epidemiología, pero

conforme la clasificación evolucionó se desarrollaron nuevos métodos, y como resultado se describieron varias clasificaciones. En algunos casos se emplean nombres diferentes para especies que describen los mismos organismos; y otras veces, algunos miembros de la misma especie se incluyen en otras especies o se clasifican por separado. Por ejemplo, el género *Enterococcus* incluye ahora algunas especies previamente clasificadas como estreptococos del grupo D. (Adelberg, 2005).

3.2 ESTREPTOCOCOS VIRIDANS

Estas bacterias tienen su hábitat principal en la cavidad oral; colonizan tanto superficies duras como blandas y son los microorganismos más abundantes en todos los ecosistemas primarios. Su significado patógeno más importante va ligado a la formación de placas y a la producción de caries; sin embargo, también se relacionan con otros muchos cuadros patológicos como gingivitis, abscesos peri apicales, pulpitis, celulitis, etc. Fuera del ámbito oral, aunque cada vez con más frecuencia se relacionan con procesos infecciosos; su papel como patógenos no parece tan claro si se exceptúa su importante significación en las endocarditis subagudas; quizás por ello y por que no es “rentable” la completa identificación de todas las especies, muchos laboratorios siguen emitiendo informes bajo la denominación global de estreptococos viridans o estreptococos del grupo viridans. (Liébana, 2002).

Generalmente no son serogrupables ni beta hemolíticos (suelen ser alfa hemolíticos, con un halo verdoso alrededor de las colonias y de hay su nombre) y

difícilmente diferenciables por pruebas fisiológicas convencionales. Ecológicamente y desde el punto de vista de su patogenicidad, los estreptococos viridans son las bacterias más importantes en la cavidad oral. (Adelberg, 2005).

3.3. Grupo *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans fue descrito por Clarke (1924), pero no fue mencionado como una especie independiente si no hasta la 8ª edición del manual de *Bergey*. Los estudios serológicos mostraron que las cepas de *S. mutans* fueron heterogéneas y pudieron ser subdivididas dentro de siete serogrupos distintos. La clasificación de las cepas de *S. mutans* se realizó con base en tests bioquímicos y fisiológicos propuestos por Facklam en 1974. (Schleifer, K.H. 1998).

Este grupo incluye las especies *S. mutans*, *S. sobrinus* y *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. macacae*, *S. downei*, *S. ferus*. (Schleifer, K.H. 1998).

- La diferenciación de los estreptococos del grupo *mutans* se realiza por identificación en la fermentación de carbohidratos, ya que las características macroscópicas en cultivo no permite hacer diferenciación de las especies presentes.

CEPA	Esculina	Inulina	Manitol	Rafinosa	Sorbitol
<i>S. sanguis</i>	-	+	-	-	-
<i>Biotipo 3</i>					
<i>S. mutans</i>	+	+	+	+	+
<i>S. sobrinus</i>	-	+	+	-	-

Tabla No 1. Identificación bioquímica de Estreptococos orales. (Koneman, 2005)

3.3.1 Colonización por Microorganismos del Grupo *Mutans* y Cariogénesis

La colonización de la cavidad oral por microorganismos del grupo mutans tiene gran importancia dentro de la ecología oral, debido a que ellos hacen parte de la flora normal, esto significa que el hecho de estar colonizado no implica necesariamente el desarrollo de caries dental, ya que su presencia debe estar acompañada por los demás factores descritos originalmente por Keyes (dieta cariogénica, huésped susceptible y tiempo). Sin embargo, hay que considerar las diferentes características que pueden presentar estos microorganismos y que pueden hacerlos más patógenos. Por ejemplo, existen diferencias inter-especie como las que presentan *S. mutans* y *S. sobrinus*, estas dos especies bacterianas son muy similares en su comportamiento bioquímico y esto hace que su diferenciación no sea fácil; pero en cuanto a su capacidad patógena, se ha sugerido que *S. sobrinus* puede llegar a ser más agresivo, debido a que es más acidogénico. Por otro lado, algunos estudios han mostrado que la variabilidad genética de *S. mutans* se asocia directamente a la aciduridad, acidogenicidad y síntesis de glucanos, características que están sujetas al biotipo de la cepa que los niños colonizados por ambas especies tienen significativamente más caries que aquellos en los que solo es detectada una de las dos, lo cual puede indicar que la interacción de estas dos especies afecta su capacidad cariogénica. (Khoo, 1998).

El momento en el que se produce la colonización también es relevante en el posterior desarrollo de la enfermedad. Entre más temprano ocurre la colonización por *S. mutans* y *S. sobrinus* más alta es la actividad de caries durante la niñez y precisamente esta es una de las razones por las que es importante evidenciar la

edad, la fuente del contagio y los factores asociados, con el fin de prevenir o disminuir la enfermedad.

En el proceso cariogénico el *Streptococcus mutans* posee características especiales de adherencia; este proceso se lleva a cabo por la unión a la superficie dental y la formación de ácidos, dos características asociadas con la cariogenicidad de este microorganismo. La síntesis de novo de un glucano insoluble por parte de la glucosiltransferasa de la sucrosa es esencial en el proceso de adherencia. Sin embargo, agentes que interfieren con la habilidad de adherencia de *Streptococcus mutans* podrían ser utilizados para controlar la caries dental.

3.3.2. Mecanismos de Adherencia

La adherencia de *Streptococcus mutans* a la superficie dental involucra dos fases: Una interacción inicial reversible entre el organismo y las superficies dentales cubiertas en saliva y una fase irreversible que es principalmente mediada por un glucano insoluble, sintetizado a partir de la sucrosa por la acción enzimática de la glucosiltransferasa. El mecanismo de fijación inicial de la bacteria a la película adquirida sobre la superficie dental ha sido revisado profundamente por *Gibbons* y *Van Houte*. En la figura 1 se puede observar con precisión como se lleva a cabo este mecanismo. En presencia de sucrosa, *Streptococcus mutans* sintetiza el glucano insoluble, el cual es un adherente a la superficie sólida, incluyendo la superficie dental. De esta manera, un mecanismo de prevención de la caries dental podría ser la interrupción del proceso adherente de *Streptococcus mutans* a la superficie dental. (Hamada, S. 1984).

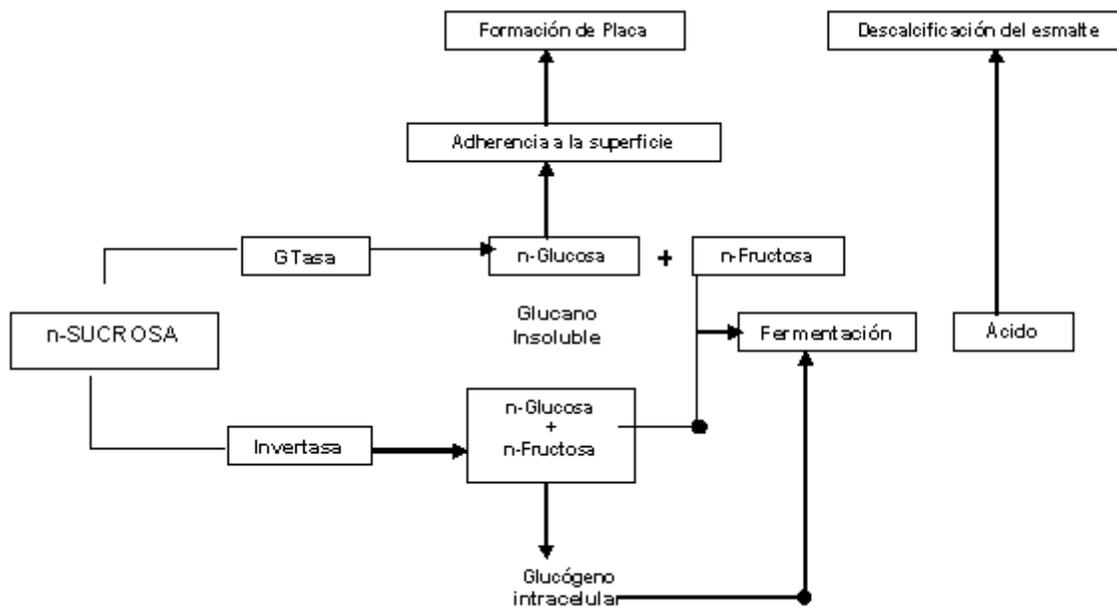


Fig. 1 – Utilización de la sucrosa por *S. mutans* y patogénesis de la caries dental.

3.4 *Streptococcus mutans*

Es la especie más frecuente del grupo. Se aísla en el 70 – 90% de la población no desdentada y resistente a la caries (portadores). En individuos con caries activa o especialmente predispuestos, su cantidad aumenta significativamente. Se considera el microorganismo cariígeno por excelencia. Por su especial capacidad de colonizar superficies duras, se aísla en la cavidad oral, sobretodo a partir de placas supragingivales, radiculares y saliva, en cuyo caso su origen es secundario a la colonización en las placas. Igualmente, su papel es importante en las endocarditis subagudas, representando entre el 7-14% de todas las originadas por los estreptococos.

Sus colonias en agar sangre son alfa y gamma hemolíticas y excepcionalmente beta hemolíticas. En su estructura antigénica hay que destacar que posee los polisacáridos parietales c, e, f, y proteínas asociadas a la mureína conocidas como

antígenos I/II (o también como B, P1 o Pac). Estas proteínas u otras similares participan en procesos adhesivos: a) como adhesinas interactuando con receptores de la película adquirida, tales como proteínas ricas en prolina y b) como glucosiltransferasas y receptoras de glucanos en fenómenos agregativos y coagregativos entre bacterias que colonizan los dientes. Estos antígenos (polisacáridos, proteínas y glucosiltransferasas) se han usado con desiguales resultados para preparar vacunas anticaries.

La relación *S. mutans*-Caries se fundamenta en las siguientes características: Incremento cuantitativo en sujetos predispuestos o con caries activas; capacidad de inducción de la enfermedad en animales de experimentación y protección de los mismos cuando estén inmunizados frente a antígenos del microorganismo y factores de virulencia relacionados con dichos procesos. Entre estos últimos se destacan los factores de cariogenicidad: a) síntesis de polisacáridos intracelulares; b) síntesis de polisacáridos extracelulares de tipo glucanos insolubles y solubles por dextranasas y fructanos (posee GTF-I, GTF-S y FTF); c) el movimiento de polisacáridos intracelulares por glicógeno fosforilasa y extracelulares solubles por dextranasas y fructanasas; d) poder acidógeno, acidófilo y acidúrico, inicio de crecimiento a pH 5.0 y corto efecto post-pH; e) importante capacidad adhesiva por las proteínas parietales que posibilitan su adhesión a superficies duras en ausencia de glucanos, y agregativa y coagregativa a través de mutanos, glucosiltransferasas y proteínas receptoras de glucanos (el papel de los ácidos lipoteicóicos y fimbrias en estos procesos parece ser poco importante) y f) producción de bacteriocinas con actividad sobre estas bacterias gram positivas

que podría tener una significación ecológica, aunque no esta demostrada in vivos su importancia como factor selectivo de la microbiota. (Liébana. 2002)

- Características Bioquímicas

La catalasa es una enzima que protege a las células frente al peróxido de hidrógeno producido en el metabolismo del oxígeno. Cataliza la formación de agua y oxígeno a partir del peróxido de hidrógeno. Es útil para distinguir *Streptococcus* (negativa) de *Staphylococcus* (positiva) y *Clostridium* (negativa) de *Bacillus* (positiva).

La actividad catalasa se detecta añadiendo unas gotas de peróxido de hidrógeno (3%) sobre las colonias (en medio que no sea agar sangre ya que daría lugar a falsos positivos); la producción de burbujas indica la presencia de la enzima.

Las bacterias anaerobias o anaeróbicas facultativas a menudo fermentan carbohidratos a ácidos orgánicos y gas (H_2 o CO_2).

Estos pueden detectarse incluyendo en el medio un indicador de pH y una campana Durham. Se pueden ensayar diferentes azúcares como sustrato para diferenciar especies, sobre todo de bacterias entéricas. Se inocula la bacteria en un medio conteniendo una pequeña cantidad de peptona, un indicador de pH y una fuente de carbono fermentable al 1-2 % y se coloca dentro de los tubos una campana Durham.

Para efectos de identificación de *S. mutans*, es común utilizar la fermentación de azúcares característicos para dicha especie como lo es rafinosa, inulina, sorbitol, manitol para los cuales *S. mutans* es positivo, es decir, los utiliza como fuente

energética, evidenciando esta actividad por la acidez presente en el medio. La esculina contiene un carbohidrato unido a un compuesto aromático. Este test se usa a menudo para distinguir especies de *Streptococcus*. Hay microorganismos que hidrolizan la esculina en esculetina y glucosa, la primera reacciona con sales de hierro originando un compuesto de color negro. Se realiza en tubos inclinados incubados durante 48h. Se crecen las bacterias en un medio complejo que contiene 0,01 % de esculina y un 0,05 de citrato férrico. *S. mutans* característicamente es positivo para esta prueba. (Adelberg, 2005).

4. Medios de Cultivo

Los medios de cultivo son preparados que intentan reproducir artificialmente las condiciones del hábitat natural de los agentes bacterianos. Sus componentes deben cubrir todas las necesidades nutricionales de las bacterias que se van a estudiar y deben incorporarse en una mezcla justa y equilibrada esto permitirá su crecimiento y multiplicación obteniéndose lo que se denomina un cultivo microbiano. La inoculación del microorganismo en un medio de cultivo se denomina siembra. No todas las bacterias tienen las mismas características nutricionales; hay algunas poco exigentes que crecen en la mayoría de los medios, otras que necesitan algunas sustancias en particular, otras que son más difíciles de cultivar e incluso las hay que no crecen en ningún medio conocido hasta la fecha. (Liébana, 2002).

4.1 Medios de cultivo selectivos

Estos medios permiten el crecimiento de algunas bacterias e inhiben el de otras. Se utilizan en casos que interese recuperar ciertos tipos de microorganismos y se

desea impedir el crecimiento de otros. La selección se puede conseguir a) por inhibición, ya sea añadiendo inhibidores (colorantes, antibióticos o sales biliares), modificando algunas propiedades físicas (concentración de NaCl o pH) o alterando algunas condiciones de cultivo como la temperatura y la atmósfera de incubación (las bacterias anaerobias no crecen en presencia de O₂), b) por enriquecimiento, para lo cual se suelen usar generalmente medios líquidos que, además de impedir total o parcialmente el desarrollo de algunos microorganismos, estimulan el de otros (para enriquecimiento de *Lactobacilos* se usa el caldo Rogosa-Mitchell-Wiseman, que contiene nutrientes esenciales para ellos y un pH de 5.4± 0.2 que impide el crecimiento de muchas especies); un efecto similar se puede conseguir agregando solo aquellos componentes que necesite la bacteria que se intenta seleccionar. (Liébana, 2002).

4.2 Preparación

4.2.1 Disolución del medio de cultivo deshidratado

Para la preparación de medios de cultivo se utiliza agua limpia, recién destilada o recién desmineralizada y cuya reacción sea lo más cercana posible al pH neutro.

Los recipientes destinados a la preparación (por lo general matraces Erlenmeyer) se limpiarán escrupulosamente con el agua que se ha descrito anteriormente, con el fin de eliminar totalmente eventuales residuos de otras sustancias. Los recipientes destinados a la preparación de medios de cultivo deben ser lo suficientemente grandes para que el medio de cultivo que se prepara pueda ser agitado con facilidad y concienzudamente. A ser posible, no se prepararan más de 1 – 2 litros por recipiente. Aproximadamente a la mitad de la cantidad necesaria

de agua se añade el medio de cultivo deshidratado y pesado y se agita suficientemente para conseguir una suspensión homogénea. Después se incorpora la cantidad de agua restante, aprovechando esta adición para desprender e incorporar al conjunto las partículas de medio de cultivo que hubieran quedado adheridas a la pared interna del recipiente.

Todo tipo de medio de cultivo es sensible al calentamiento. Por este motivo, no debe calentarse más de lo estrictamente necesario. (Merck, 2005).

4.2.2 Esterilización

Antes de su esterilización, y dentro de lo posible, es conveniente repartir el medio de cultivo en porciones más pequeñas, por ejemplo, en los recipientes definitivos o en los que ulteriormente se lleve a cabo el trabajo de investigación de que se trate (excepto cajas de Petri)

Si las normas de preparación no indican otra cosa la esterilización se lleva a cabo en autoclave, a 121°C, durante 15 minutos. La esterilidad se consigue con seguridad cuando se ha desalojado correctamente el aire de la cámara de vaporización de la autoclave y de los recipientes en ella contenidos. Con este fin, se deja fluir ampliamente la corriente de vapor manteniendo abierta la válvula de purga durante el comienzo de la fase de calentamiento de la autoclave. Temperaturas más altas y calentamientos mas prolongados de lo previsto, perjudican la calidad del medio de cultivo.

4.2.3 Vertido en placas

Para evitar, considerablemente, la formación de gotitas de condensación de agua en la tapa de las placas de Petri, debe verterse en ellas el medio de cultivo a una

temperatura de 45 – 55 °C. Previamente hay que remover bien el medio de cultivo haciendo oscilar en sentido circular su recipiente, para garantizar el entremezclamiento uniforme de dicho medio de cultivo. Las burbujas de aire en la superficie de la placa se eliminan “abanicando” brevemente la superficie con la no luminosa de un mechero Bunsen. Antes de sembrar las placas puede secarse la superficie húmeda del Agar (que podría favorecer el desplazamiento de microorganismos o el desmembramiento de colonias) en estufa a 30 – 40 °C. Para ello se coloca la parte inferior de la placa de Petri, con su cara interna hacia abajo, algo desplazada sobre la tapa que ahora le sirve de apoyo. Este tiempo de secado alcanza 20 – 30 minutos, como mínimo. En estufas con circulación de aire se precisa menos tiempo. (Merck, 2005).

5. Agentes inhibidores del crecimiento bacteriano en medio de cultivo

5.1. Antibióticos

La acción del agente antibacteriano es lograda mediante los siguientes mecanismos de acción:

- Inhibición de la síntesis de la pared celular
- Inhibición de la síntesis de proteínas
- Inhibición del [metabolismo](#) bacteriano
- Inhibición de la actividad o síntesis del ácido nucleico
- Alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular

Con cualquiera de estas [acciones](#) o con una combinación de ellas, el microorganismo es incapaz de sobrevivir.

5.1.1. Sulfonamidas

Las sulfonamidas fueron los primeros quimoterápicos eficaces que se utilizaron por vía sistémica para evitar y curar infecciones bacterianas en seres humanos. La importancia enorme que tuvo su descubrimiento en la medicina y la salud pública y su empleo amplísimo se reflejaron rápidamente en la disminución neta de las cifras de morbilidad y mortalidad de enfermedades infecciosas tratables. El advenimiento de la penicilina y de los antibióticos disminuyó la utilización de las sulfonamidas y, en la actualidad, su importancia es relativamente pequeña en el armamentario terapéutico del médico. Sin embargo, la introducción de la combinación de trimetoprim y de sulfametoxazole a mediados del decenio de 1970 hizo que se utilizaran más las sulfonamidas en el tratamiento de infecciones microbianas específicas. Para este estudio, se utilizó una sulfonamida, como es el sulfisoxazole, antibiótico utilizado ampliamente para proporcionar selectividad a los medios de cultivo, especialmente para microorganismos de la cavidad oral.

5.1.1.1 Propiedades Químicas

El término *sulfonamida* se utiliza como nombre genérico para derivados de la para-aminobenzenosulfonamida (sulfanilamida); muchos de estos miembros son relativamente insolubles en agua, pero sus sales sódicas son bastante solubles. El grupo $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ no es esencial en sí, pero la característica importante es que el azufre está ligado directamente al anillo benceno. El grupo para NH_2 (cuyo nitrógeno ha sido hoy denominado N^4) es esencial y puede sustituirse solamente por radicales que se transformen in vivo en grupo amino libre. Las sustituciones del grupo amida NH_2 (cuyo N se ha designado como N^1) originan efectos variables

en la actividad antibacteriana de la molécula. No obstante, la sustitución del núcleo aromático heterocíclico en N¹ genera compuestos extraordinariamente potentes. (Goodman, 2006).

5.1.1.2. Efectos en microorganismos

Las sulfonamidas poseen muy diversas actividades antimicrobianas contra bacterias grampositivas y gramnegativas. Sin embargo, en años recientes, han surgido cada vez más cepas resistentes y, por consecuencia, ha disminuido su utilidad. En términos generales, estas ejercen solo un efecto bacteriostático, y los mecanismos de defensa celular y humoral del huésped son esenciales para erradicar finalmente la infección.

- Espectro antibacteriano: Entre los microorganismos que suelen ser sensibles *in Vitro* a las sulfonamidas están *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *H. ducreyi*, *Nocardia*, *Actinomices*, *Calymmatobacterium granulomatis* y *Chlamydia trachomatis*. Las concentraciones inhibitoras mínimas (MIC) varían de 0.1ug/mL, en el caso de *C. trachomatis*, a 4 a 24 64 ug/mL para *Escherichia coli*. Las cifras plasmáticas máximas del fármaco alcanzables in vivo son de 100 a 200 ug/mL.
- Mecanismo de acción: Las sulfonamidas son análogos estructurales y antagonistas competitivos del ácido-para-aminobezoico (PABA) y, por tal razón, impiden que la bacteria utilice de manera normal el PABA en la síntesis de ácido fólico (ácido pteroilglutámico). De modo mas específico, las sulfonamidas son inhibidores competitivos de la dihidropteroato sintetasa, la enzima

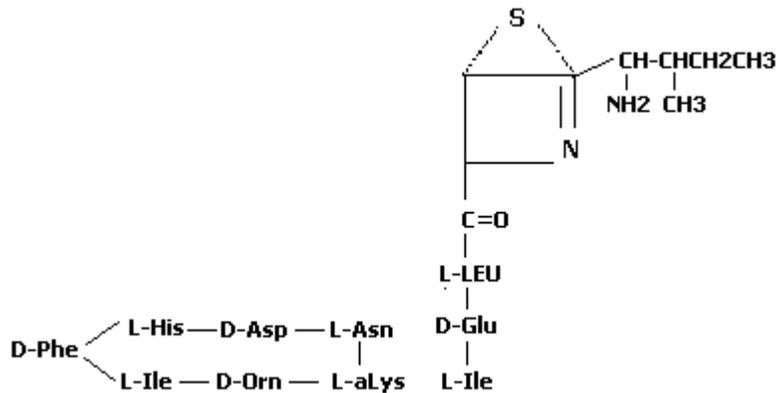
bacteriana que incorpora PABA en el ácido dihidropteroico, precursor inmediato del ácido fólico. Los microorganismos sensibles sintetizan su propio ácido fólico; no son afectadas las bacterias que usan al ácido fólico preformado. La bacteriostasis inducida por las sulfonamidas es antagonizada en forma competitiva por PABA. Ellas no afectan las células de mamífero por este mecanismo porque necesitan ácido fólico preformado y no lo sintetizan; por tal razón son similares a las bacterias no sensibles a sulfonamidas que utilizan ácido fólico preformado. (Goodman. 2006).

5.1.2 Bacitracina

La bacitracina es un antibiótico producido por la cepa Traci-1 de *Bacillus subtilis*, aislada en 1943 del tejido dañado y polvo callejero desbridado de una fractura compuesta en una niña llamada Tracy, de la cual derivó el nombre de bacitracina. *Meleney y Jonson* (1949) han revisado la historia, las propiedades y el uso de este antibiótico.

- Propiedades químicas

Las bacitracinas son un grupo de antibióticos polipéptidos y se han hallado componentes múltiples en más productos comerciales. El componente principal es la bacitracina A y su probable fórmula estructural es la siguiente:



BACITRACINA

Una unidad del antibiótico equivale a 26ug del estándar USP.

- Actividad antibacteriana

Diversos cocos y bacilos grampositivos, *Neisseria*, *H. influenzae* y *Treponema pallidum* son sensibles a 0.1U/ml o menos de bacitracina. *Actinomyces* y *Fusobacterium* son inhibidas por cifras de 0.5 a 5 U/ml. Son resistentes a la bacitracina Enterobacteriaceae, *Pseudomonas*, especies de *Cándida* y *Nocardia*. La bacitracina inhibe la síntesis de la pared bacteriana. (Goodman. 2006).

5.2 Agentes Químicos actuando como Bactericidas o Bacteriostáticos

5.2.1 Cloruro Férrico

El cloruro férrico en solución se obtiene mediante la reacción de mineral de hierro con ácido clorhídrico y cloro.

El cloruro férrico hexahidrato es un producto elaborado a partir de la chatarra de hierro y utilizando también el ácido clorhídrico y el cloro. La solución presenta una gravedad específica de 1.43 g/ml, en tanto que la del sólido es 1.69 g/ml. El cloruro férrico es soluble en etanol, acetona, glicerina y benceno, así como en agua en todas las proporciones.

El producto es altamente oxidante, ataca a los metales incluyendo al cobre. (Chang, 2002).

5.2.2 Citrato de Sodio

El citrato de sodio como una fuente de [carbono](#), esto es, se desarrollará en un medio de cultivo químicamente definido en el cual el citrato de sodio es el único compuesto de [carbono](#). (Chang, 2002).

S. mutans tiene requerimientos nutricionales con ciertos metales incluyendo Magnesio, Manganeso y también Hierro 3+. El *S. mutans* requiere hierro a una concentración de 3.6umol para un crecimiento óptimo. Esta concentración es la más cercana a la concentración en saliva humana. Un transportador en *S. mutans* ABC que codifica para un operón sloABCR, a sido previamente identificado como un transportador de hierro. Algunos ensayos han mostrado que el hierro incrementa el pH en la placa dental *In vivo*, sin embargo el mecanismo aun no es conocido.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Población y Muestra

Se incluyeron 14 cepas de *Streptococcus mutans* previamente aisladas e identificadas en el CIO (Centro de Investigaciones Odontológicas), de pacientes con diagnóstico de caries dental. Adicionalmente se utilizaron 15 muestras de

saliva provenientes de pacientes con caries previo consentimiento informado (Anexo 1). Como cepa control se utilizó la cepa ATCC 31989 de *S. mutans*.

6.2 Procesamiento de las Muestras

Las 14 muestras de saliva y la cepa control se sembraron en el Agar Mitis Salivarius clásico (Difco. Lote 2232423) en condiciones de anaerobiosis (Beckton Dickinson Anaerobic system BBL Lot 4371040) a 37°C durante 48 horas. Algunas de las colonias obtenidas en este medio se identificaron por medio de: Coloración de Gram., obteniendo cocos Gram positivos en cadena; prueba de catalasa, dando como resultado catalasa negativa. A algunas de las colonias se procedió a hacer identificación por medio de panel de baterías bioquímicas (Inulina, Manitol, Sorbitol, Rafinosa y Esculina), y como resultado se obtienen otras especies del género estreptococo de la cavidad oral como lo son *S. sanguis*, *S. sobrinus* y *S. rattus*, los cuales se sembraron en medio de mantenimiento, el Agar Trypticase soya (Difco, Lote 234001) bajo una atmósfera de CO₂ al 5% durante 48 horas. Las 15 cepas de *S. mutans* congeladas se recuperaron en caldo Todd – Hewitt (Difco, Lote 457899) incubándolas bajo condiciones de anaerobiosis durante 48 horas. Tras esta recuperación, se hizo un pase de colonias al Agar Trypticase Soya y se incubó a 37°C con una concentración de CO₂ al 5% durante 48 horas. Una vez recuperadas en este medio sólido de enriquecimiento y mantenimiento, se realizó un pase bacteriano al Agar Mitis Salivarius clásico, se incubó bajo condiciones de anaerobiosis durante 48 horas, se procedió a la identificación bioquímica de las colonias obtenidas cuyas características macroscópicas fueran compatibles con *Streptococcus mutans*: convexas, de borde ondulado, opacas, de

color azul oscuro; las 15 cepas presentaron un crecimiento típico y de estas colonias se procedió a la identificación con la fermentación de azúcares (Inulina, Rafinosa, Manitol, Sorbitol) y Esculina. El 100% de las cepas se identificaron como *Streptococcus mutans*.

Preparación del medio de cultivo SULBAC

El Agar Mitis Salivarius se preparó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Una vez esterilizado este medio, se preparó a cuatro concentraciones diferentes con el antibiótico sulfisoxazole (MPB Code 102993), manteniendo las concentraciones constantes de bacitracina (Merck. Code 78549), citrato de sodio (Analítica Carlo Erba Lote 3E412093N) y cloruro férrico (Analítica Carlo Erba Lote 45789N78A), las cuales se muestran a continuación.

Componente	Medio 1 (Bajo)	Medio 2 (Normal)	Medio 3 (Alto – A)	Medio 4 (Alto – B)
Bacitracina	300 UI/L	300 UI/L	300 UI/L	300 UI/L
Sulfisoxazole	0.1 g/L	0.2 g/L	0.4 g/L	0.8 g/L
Cloruro Férrico	1.2 mL/L	1.2 mL/L	1.2 mL/L	1.2 mL/L
Citrato de Sodio	2 g/L	2g/L	2g/L	2g/L

Tabla 2. Componentes y concentraciones del medio SULBAC.

6.3 Siembra de Estreptococos orales

Se sembraron las diferentes cepas de estreptococos obtenidos, identificadas y mantenidas en Agar Tripticasa Soya. Este procedimiento se realizó, preparando

una suspensión de bacterias similar al tubo No 5 del Patrón de Mc Farland, sembrando 100 μ L de cada cepa en cinco grupos de medios (un grupo de medios consta de; un medio de concentración bajo, normal, alto –A, alto –B), se incubaron bajo una atmósfera de anaerobiosis durante 48 horas a 37°C. Posterior a este crecimiento, se procedió a hacer identificación bioquímica de los medios en los cuales se obtuvo algún tipo de crecimiento, confirmando que el microorganismo sembrado inicialmente era el mismo que creció en el medio SULBAC.

Este procedimiento se realizó en 5 oportunidades, confirmando inmediatamente los datos del proceso anterior.

7. RESULTADOS

- SULBAC -1 Medio con concentración Baja

CEPA	UFC/mL	%
<i>S. sobrinus</i>	7.8×10^7	93.9%
<i>S. sanguis</i>	6.6×10^7	79.5%
<i>S. rattus</i>	4.1×10^6	4.9%
<i>S. mutans</i>	8.3×10^7	100

Tabla 3. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 1 (Bajo) Primer ensayo.

CEPA	UFC/mL	%
<i>S. sobrinus</i>	7.8×10^7	93.9%
<i>S. sanguis</i>	6.6×10^7	79.5%
<i>S. rattus</i>	8.3×10^6	10%
<i>S. mutans</i>	8.3×10^7	100

Tabla 4. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 1 (Bajo) Segundo ensayo.

CEPA	UFC/mL	%
<i>S. sobrinus</i>	7.4×10^7	89.1%
<i>S. sanguis</i>	7.0×10^7	84.3%
<i>S. rattus</i>	4.1×10^6	4.9%
<i>S. mutans</i>	8.3×10^7	100%

Tabla 5. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 1 (Bajo). Tercer Ensayo.

CEPA	UFC/mL	%
<i>S. sobrinus</i>	7.8×10^7	93.9%
<i>S. sanguis</i>	7.4×10^7	89.1%
<i>S. rattus</i>	4.1×10^6	4.9%
<i>S. mutans</i>	7.8×10^7	93.9%

Tabla 6. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 1 (Bajo). Cuarto Ensayo.

CEPA	UFC/mL	%
<i>S. sobrinus</i>	7.8×10^7	93.9%
<i>S. sanguis</i>	6.6×10^7	79.5%
<i>S. rattus</i>	8.3×10^6	10%
<i>S. mutans</i>	8.3×10^7	100

Tabla 7. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 1. (Bajo). Quinto ensayo.

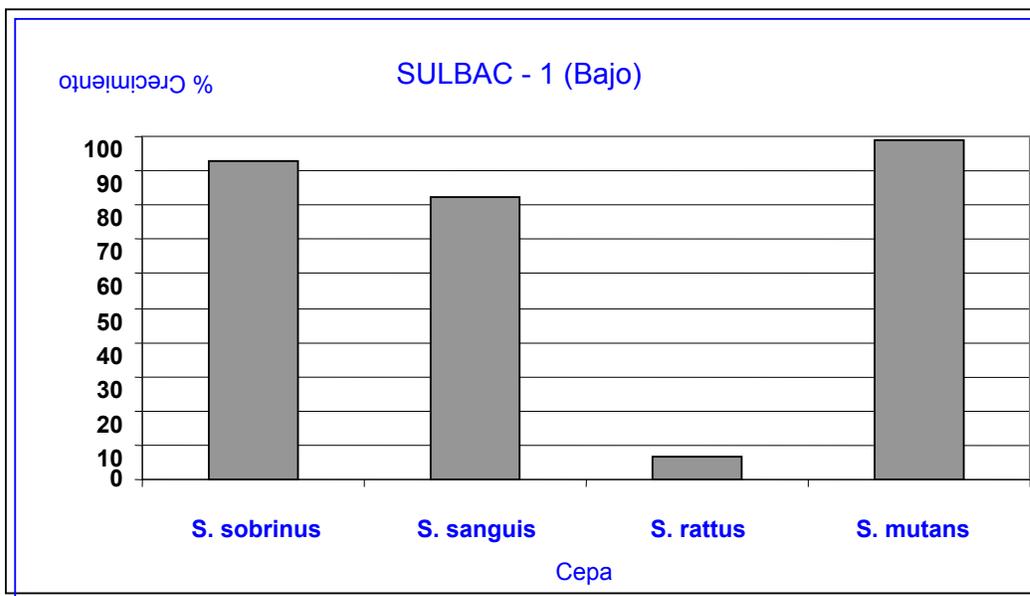


Fig. 2. Comparación del crecimiento de las cepas utilizadas en el medio SULBAC 1 con concentración baja. *S. sobrinus*, *S. sanguis* y *S. mutans* muestran un crecimiento óptimo de 92.9%, 82.3% y 98.7% respectivamente, mientras que *S. rattus* muestra un crecimiento del 6.94%, significativamente menor con respecto a las demás cepas.

- SULBAC – 2 Medio con concentración Normal:

CEPA	UFC/ mL	MEDIO 2 (NORMAL)
<i>S. sobrinus</i>	5.3×10^7	65%
<i>S. sanguis</i>	5.8×10^7	70%
<i>S. rattus</i>	0	0%
<i>S. mutans</i>	8.3×10^7	100%

Tabla 8. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 2 (Normal). Primer ensayo.

CEPA	UFC/mL	MEDIO 2 (NORMAL)
<i>S. sobrinus</i>	6.2×10^7	75%
<i>S. sanguis</i>	4.9×10^7	60%
<i>S. rattus</i>	0	0%
<i>S. mutans</i>	7.4×10^7	90%

Tabla 9. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 2 (Normal). Segundo Ensayo.

CEPA	UFC/mL	MEDIO 2 (NORMAL)
<i>S. sobrinus</i>	5.8×10^7	70%
<i>S. sanguis</i>	4.9×10^7	60%
<i>S. rattus</i>	0	0%
<i>S. mutans</i>	8.3×10^7	100%

Tabla 10. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 2 (Normal). Tercer Ensayo.

CEPA	UFC/mL	MEDIO 2 (NORMAL)
<i>S. sobrinus</i>	6.2×10^7	75%
<i>S. sanguis</i>	4.9×10^7	60%
<i>S. rattus</i>	0	0%
<i>S. mutans</i>	7.4×10^7	90%

Tabla 11. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 2 (Normal). Cuarto Ensayo.

CEPA	UFC/mL	MEDIO 2 (NORMAL)
-------------	---------------	-------------------------

<i>S. sobrinus</i>	5.8×10^7	70%
<i>S. sanguis</i>	4.9×10^7	60%
<i>S. rattus</i>	0	0%
<i>S. mutans</i>	8.3×10^7	100%

Tabla 12. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 2 (Normal). Quinto Ensayo.

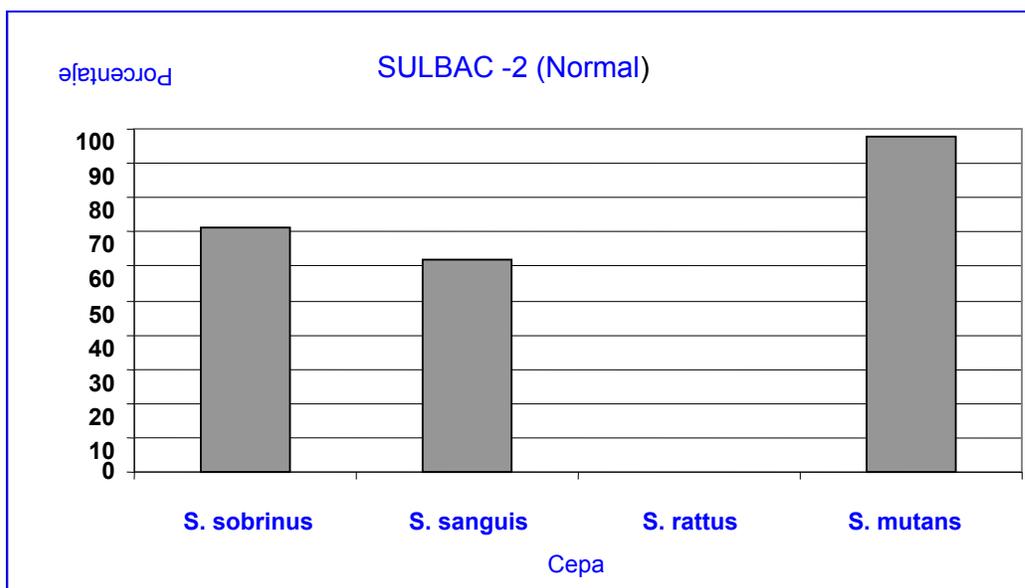


Fig. 3. Comparación del crecimiento de las cepas utilizadas en el medio SULBAC 2 con concentración normal. El aumento en la concentración de sulfisoxazole en el medio comienza a evidenciarse en la disminución del crecimiento de *S. sobrinus* 71%, *S. sanguis* 62% y un crecimiento nulo de *S. rattus*, mientras que *S. mutans* conserva unas características óptimas de crecimiento.

- SULBAC – 3 Medio con concentración ALTO – A

CEPA	UFC/mL	MEDIO 3 (ALTO -A)
<i>S. sobrinus</i>	1.2×10^7	15%
<i>S. sanguis</i>	0	0%
<i>S. rattus</i>	0	0%
<i>S. mutans</i>	7.4×10^7	90%

Tabla 13. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 3 (ALTO -A). Primer Ensayo.

CEPA	UFC/mL	MEDIO 3 (ALTO -A)
<i>S. sobrinus</i>	8.3×10^6	10%
<i>S. sanguis</i>	4.1×10^6	5%
<i>S. rattus</i>	0	0%
<i>S. mutans</i>	7.8×10^7	95%

Tabla 14. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 3 (ALTO-A). Segundo Ensayo.

CEPA	UFC/mL	MEDIO 3 (ALTO -A)
<i>S. sobrinus</i>	8.3×10^6	10%
<i>S. sanguis</i>	0	0%
<i>S. rattus</i>	0	0%
<i>S. mutans</i>	7.4×10^7	90%

Tabla 15. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 3 (ALTO -A). Tercer Ensayo.

CEPA	UFC/mL	MEDIO 3 (ALTO -A)
<i>S. sobrinus</i>	1.2×10^7	15%
<i>S. sanguis</i>	0	0%
<i>S. rattus</i>	0	0%
<i>S. mutans</i>	7.4×10^7	90%

Tabla 16. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 3 (ALTO -A). Tercer Ensayo.

CEPA	UFC/mL	MEDIO 3 (ALTO -A)
<i>S. sobrinus</i>	1.2×10^7	15%
<i>S. sanguis</i>	0	0%
<i>S. rattus</i>	0	0%
<i>S. mutans</i>	7.4×10^7	90%

Tabla 17. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 3 (ALTO – A) Quinto ensayo.

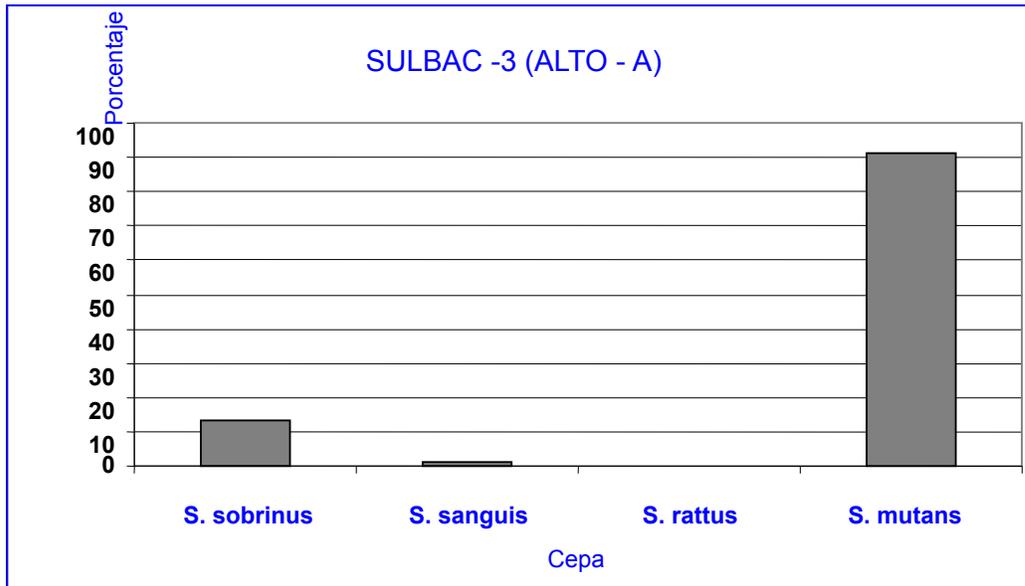


Fig. 4. Comparación del crecimiento de las cepas utilizadas en el medio SULBAC 3 con concentración ALTO – A. El aumento progresivo en la concentración del antibiótico sulfisoxazole aumenta cada vez más la capacidad inhibitoria del medio de cultivo mostrando un crecimiento de 13% para *S. sobrinus*, 1% para *S. sanguis*, 0% para *S. rattus* y poco inhibitorio para *S. mutans* con un crecimiento del 91%.

- SULBAC 4. Medio con concentración ALTO – B

CEPA	UFC/mL	MEDIO 4 (ALTO -B)
<i>S. sobrinus</i>	4.1×10^6	5%
<i>S. sanguis</i>	0	0%
<i>S. rattus</i>	0	0%
<i>S. mutans</i>	7.8×10^7	95%

Tabla 18. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 4 (ALTO -B). Primer Ensayo.

CEPA	UFC/mL	MEDIO 4 (ALTO -B)
<i>S. sobrinus</i>	1.6×10^6	2%
<i>S. sanguis</i>	4.1×10^6	5%
<i>S. rattus</i>	0	0%
<i>S. mutans</i>	8.3×10^7	100%

Tabla 19. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 4 (ALTO-B). Segundo ensayo.

CEPA	UFC/mL	MEDIO 4 (ALTO -B)
<i>S. sobrinus</i>	4.1×10^6	5%
<i>S. sanguis</i>	4.1×10^6	5%
<i>S. rattus</i>	0	0%
<i>S. mutans</i>	7.8×10^7	95%

Tabla 20. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 4 (ALTO -B). Tercer ensayo.

CEPA	UFC/mL	MEDIO 4 (ALTO -B)
<i>S. sobrinus</i>	0	0%
<i>S. sanguis</i>	4.1×10^6	5%
<i>S. rattus</i>	0	0%
<i>S. mutans</i>	7.4×10^7	90%

Tabla 21. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 4 (ALTO-B). Cuarto ensayo.

CEPA	UFC/mL	MEDIO 4 (ALTO -B)
<i>S. sobrinus</i>	1.6×10^6	2%
<i>S. sanguis</i>	4.1×10^6	5%
<i>S. rattus</i>	0	0%
<i>S. mutans</i>	8.3×10^7	100%

Tabla 22. Comparación de crecimiento de las diferentes cepas utilizadas en el medio 4 (ALTO-B). Quinto ensayo.

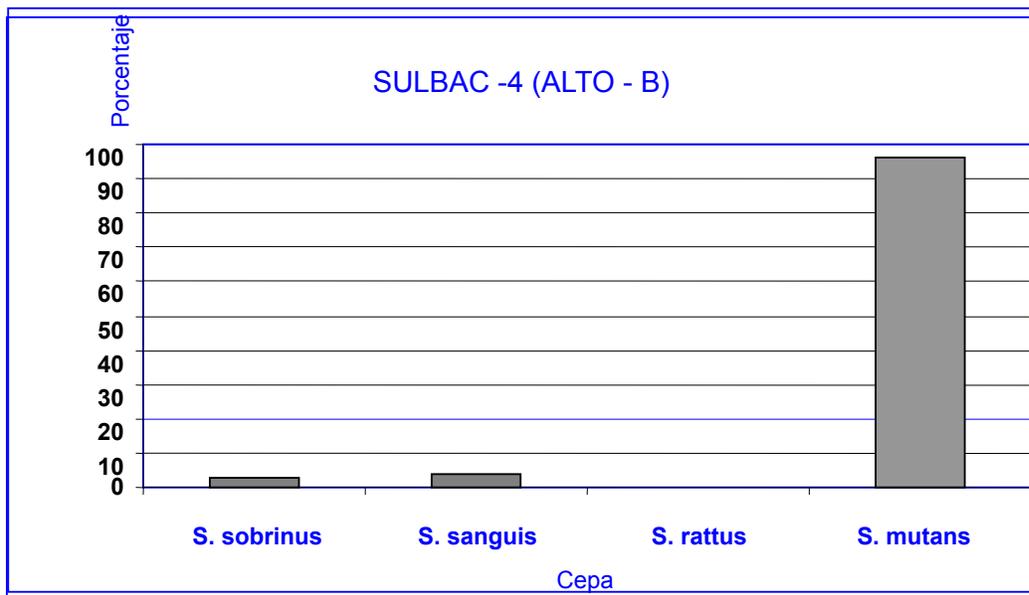


Fig. 5. Comparación del crecimiento de las cepas utilizadas en el medio SULBAC 4 con concentración ALTO – B. La concentración óptima de sulfisoxazole utilizada en este ensayo aumenta las propiedades inhibitorias del medio SULBAC permitiendo un crecimiento apenas de 2.8% para *S. sobrinus*, 4% para *S. sanguis* y 0% para *S. rattus*, mientras que en el crecimiento de *S. mutans* persiste una gran adaptabilidad a las condiciones que el medio le ofrece.

8. DISCUSION DE RESULTADOS

En estudios anteriores se había confirmado la utilidad y selectividad del *Agar Mitis Salivarius* en el aislamiento de estreptococos orales, pero actualmente debido a las dificultades en el proceso de identificación del agente etiológico se hace necesario el diseño de un medio de cultivo con un alto porcentaje de selectividad hacia *S. mutans* y mantener inhibido el crecimiento de estreptococos orales acompañantes, especialmente *Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus sanguis*. (Little, 1977).

Según reportes anteriores, de Takada, Hirasawa en el año 2005, se encontró que se inhibió en el medio MS-MUTV (Mitis-salivarius-Valinomicina) el 72.1% de otros estreptococos orales, y en este estudio el porcentaje de inhibición es del 98% confirmando la gran capacidad inhibitoria que tiene el antibiótico sulfisoxazole, utilizado en ambos estudios y demostrando mayor capacidad inhibitoria en el medio SULBAC 3 y 4 (concentraciones alto A y B), donde la recuperación selectiva de *Streptococcus mutans* y la inhibición de otros estreptococos orales se realizó satisfactoriamente, para el caso exacto de este estudio, la inhibición de *S. sanguis*, *S. sobrinus*, *S. rattus*. (Takada, 2005).

Se utilizó el modelo estadístico ANOVA (Anexo 2), para el análisis de los datos obtenidos; se puede deducir que el crecimiento en el medio de cultivo SULBAC está determinado por dos variables directamente relacionadas y analizadas por el modelo estadístico descrito. Como análisis propio, se puede determinar que el crecimiento obtenido depende de la susceptibilidad bacteriana al antibiótico sulfisoxazole y la concentración del mismo utilizado en los cuatro ensayos. El

análisis de la varianza, muestra que el valor F (3172.02) es mayor a 2.74, siendo este último el valor crítico para F.

El valor para la varianza entre los medios relacionado con el crecimiento bacteriano es de 1071.81, cuyo valor crítico para F es 2.748, como se evidencia entonces es mayor el valor F que el F crítico por lo cual se deduce que el crecimiento bacteriano está determinado por el aumento en la concentración del antibiótico y el tipo de cepa utilizada.

Como análisis de los datos anteriores, se podría concluir que la capacidad de inhibición del medio, estaría dada por las altas concentraciones del sulfisoxazole (el doble de la concentración normal) junto con el cloruro férrico que evita la adhesión al medio de cultivo, hecho que puede ser clave para determinados microorganismos al momento de colonizar y prosperar en el medio de cultivo.

Reportes previos, han demostrado la efectividad que tiene el citrato y el hierro (3+), en el metabolismo del *Streptococcus mutans*, ya que aumenta su crecimiento tanto en un medio de cultivo como en la propia placa dental. Al adicionar al medio SULBAC las concentraciones determinadas de cloruro férrico y citrato de sodio, se permitió que el *S. mutans* creciera bajo una atmósfera de nutrientes suficientes similares a los que obtiene en la cavidad oral humana, requerimiento nutricional esencial para el desarrollo del *S. mutans*. (Khoritoshki, 2005). De igual manera el uso del cloruro férrico y el citrato de sodio como un inhibidor de crecimiento para estreptococos orales diferentes al *S. mutans*, ya que estas bacterias no tienen dentro de su estructura bacteriana genes que codifiquen para enzimas que sean

capaces de degradar el citrato o el hierro lo cual los convierte en agentes tóxicos para la estructura bacteriana.

9. CONCLUSIONES

- Se puede concluir que el sulfisoxazole en compañía del cloruro férrico y el citrato de sodio si actúan de manera inhibitoria en el crecimiento de flora acompañante como lo son los estreptococos orales diferentes a *S. mutans* en una muestra de saliva.
- En las dos concentraciones mas bajas del medio SULBAC preparado, el porcentaje de inhibición es muy bajo y no significativo para el estudio.
- En las dos concentraciones más altas del medio SULBAC preparado, el porcentaje de inhibición es muy alto y significativo para el estudio, confirmando así la utilidad del sulfisoxazole junto con el Cloruro Férrico y el citrato de sodio a dichas concentraciones.
- El medio SULBAC se puede utilizar directamente para la siembra masiva de saliva, recuperando cerca del 98% de los *Streptococcus mutans* e inhibiendo simultáneamente flora acompañante no deseada.
- La selectividad del medio depende directamente de la concentración de antibiótico y la sensibilidad bacteriana, como se evidencia en el análisis estadístico ANOVA.

10. RECOMENDACIONES

Como en el presente estudio las concentraciones de Cloruro Férrico, citrato de sodio y Bacitracina permanecieron estándar a todos los medios ensayados, se recomienda realizar variaciones aleatorias en las concentraciones de los compuestos nombrados anteriormente, ya que en cierto modo se podría aumentar la selectividad del medio.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Adelberg, George F Brooks. Et. Al. Microbiologia Medica de Jawetz. ISBN 9707291862. Mexico; Bogota: Ed. Manual Moderno, 2005.
2. Goodman & Gilman's. the pharmacological basis of therapeutics Goodman, Louis Sanford. ISBN 0071422803. New York ; Chicago, Illinois : McGraw-Hill, c2006.
3. Gold, O. G, et. Al. A selective medium for *Streptococcus mutans*. Arch. Oral. Biol. 18: 1357-1367. 1973.
4. Hamada. S. et. Al. Biology, Immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol. Rev. 44: 331 – 334. 1984.
5. Khoo G, Zhan L., Hoover C. Cariogenic virulence characteristics of mutans streptococci isolated from caries-active and caries-free adults. J. Calif. Dent. Assoc. Dec: 33 (12) 973 – 980. 1998.
6. Khoritoshki, Transport and metabolism of citrate by *Streptococcus mutans*. J.Bacteriol. Jul. 187 (13): 4451-4456. 2005.
7. Koneman, W. Elber. Diagnóstico microbiológico. ISBN 950061250X . 5° Edicion. Buenos Aires ; Bogotá : Médica Panamericana, 2001.
8. Liébana J. Castillo A, Rodríguez Avial C. Genero *Streptococcus*, En: Microbiologia oral. Liébana J. Mc Graw Hill interamericana. Pag. 325 – 335. 2002.
9. Merck Microbiology Manual. 12th Ed. Darmstadt, Germany : Merck KGaA, 2005.

10. Schaecken J. S. Franjen. Comparative recovery of *Streptococcus mutans* on five isolation media including a new simple selective medium. *Journal of Dental Research*. Vol 65, 906-908. 1986.
11. Schleifer, R, Ghering. et. Al. Relatedness and classification of *Streptococcus mutans* and *mutans-like streptococci*. *Journal of Dental Research*. Vol 63: 1047 – 1050. 1998.
12. Takada K. M Hirasawa. A Novel Selective Medium for Isolation of *Streptococcus mutans*. *Journal of Microbiological Methods*. 60: 189 – 193. 2005.

ANEXO 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Según la resolución del Ministerio de Salud de Colombia No. 008430 de 1993 y Pautas Éticas Internacionales para la Investigación y Experimentación Biomédica en Seres Humanos de 2000.

Usted esta siendo invitado a participar en un proyecto de investigación, propuesto por el Centro de Investigaciones Odontológicas. Es muy importante que el investigador le explique claramente en que consiste el estudio y cuales son sus posibles riesgos. Después de leer y entender la información que se presenta a continuación, si usted desea participar en el estudio, por favor firme este documento.

1. La participación en este estudio es totalmente voluntaria.
2. La participación en este estudio puede no beneficiarlo directamente, pero los resultados obtenidos, podrían beneficiar posteriormente a otras personas.
3. Usted tendrá la libertad de retirarse de la investigación en cualquier momento sin sanción alguna.
4. Ninguna persona que acepte a participar en este estudio recibirá beneficios económicos como pago por su participación.
5. Este estudio no tiene ningún interés económico por parte del grupo de investigación, así como tampoco el desarrollo de patentes con base en el material recolectado.

6. Los registros con la información de cada individuo es de carácter absolutamente confidencial, solamente usted y el equipo de investigación tendrán acceso a ella.
7. Cuando los resultados de este estudio se reporten en revistas o congresos científicos, se omitirán los nombres de los participantes.
8. El riesgo existente en la toma de muestra(s) para este estudio es muy bajo y por lo tanto no reviste riesgo de salud para usted.
9. Si usted tiene dudas con respecto al estudio o desea obtener alguna información adicional, no dude en manifestarlo a los investigadores.
10. A usted se le debe entregar una copia de este consentimiento informado.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Según la resolución del Ministerio de Salud de Colombia No. 008430 de 1993 y Pautas Éticas Internacionales para la investigación y Experimentación Biomédica en Seres Humanos de 2000, este estudio se denomina: Diseño y Valoración de un Medio de Cultivo Selectivo para el Aislamiento de *S. mutans*.

El objetivo del estudio es: Modificar el *Agar Mitis Slivarius (AMS)* para aumentar la Selectividad en el aislamiento de estreptococos orales, específicamente *Streptococcus mutans*.

La muestra necesaria para este estudio es saliva.

La(s) muestra(s) será(n) conservadas adecuadamente en el Centro de Investigaciones Odontológicas de la Pontificia Universidad Javeriana y será(n) utilizada(s) únicamente en esta investigación.

Las dudas pueden ser resueltas por comunicación con: Margarita Chaves Clavijo (margarita.chaves@javeriana.edu.co), ó al teléfono 3208320 extensión 2899.

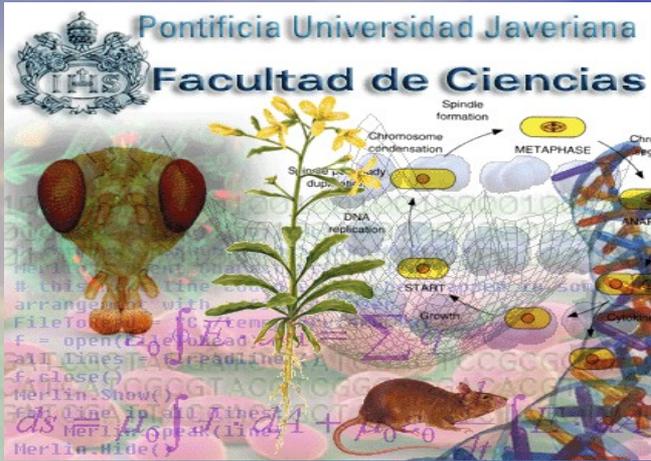
CERTIFICO QUE ESTOY DE ACUERDO EN PARTICIPAR EN EL ESTUDIO Y QUE RECIBÍ COPIA DE ESTE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Fecha: _____

Nombre del Paciente: _____

Firma del paciente: _____

No. De Cédula: _____



Diseño y valoración de un medio d

DISEÑO Y VALORACION
DE UN MEDIO DE CULTIVO
PARA
Streptococcus mutans

Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias
Facultad de Odontología - CIO
Carrera de Bacteriología

- Dra. Margarita Chaves Clavijo, MSc
Directora
- Dra. Lorenza Jaramillo, MSc
Co-Directora

AUTORES

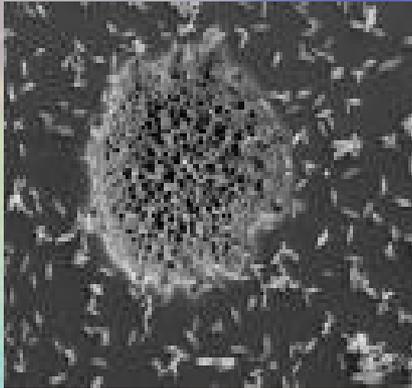
- **DIANA MILENA PEDRAZA SANCHEZ**
Bacteriologia 10º Semestre

- **YOHANY ANDRES HERNANDEZ V**
Bacteriologia 10º Semestre

GENERALIDADES *Streptococcus*

- Constituido por especies que difieren en algunas características metabólicas, fisiológicas y serológicas

GENERALIDADES *Streptococcus*

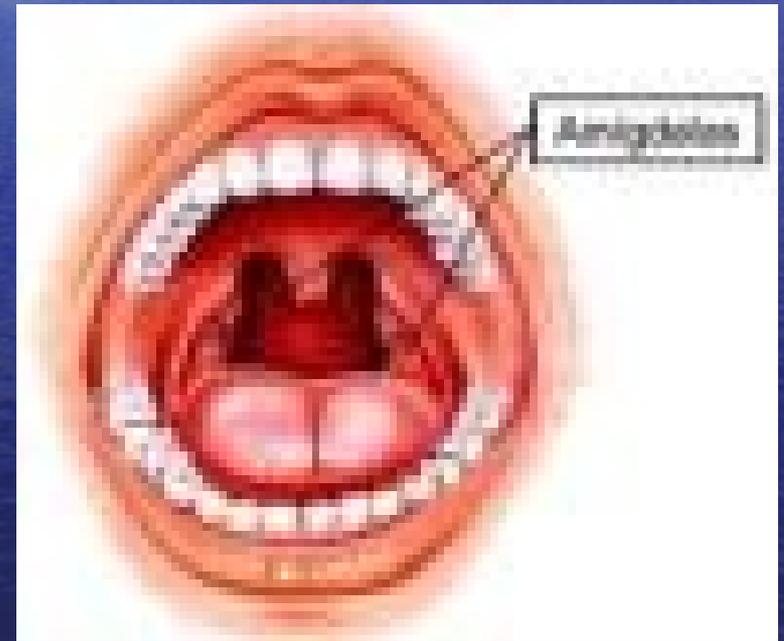
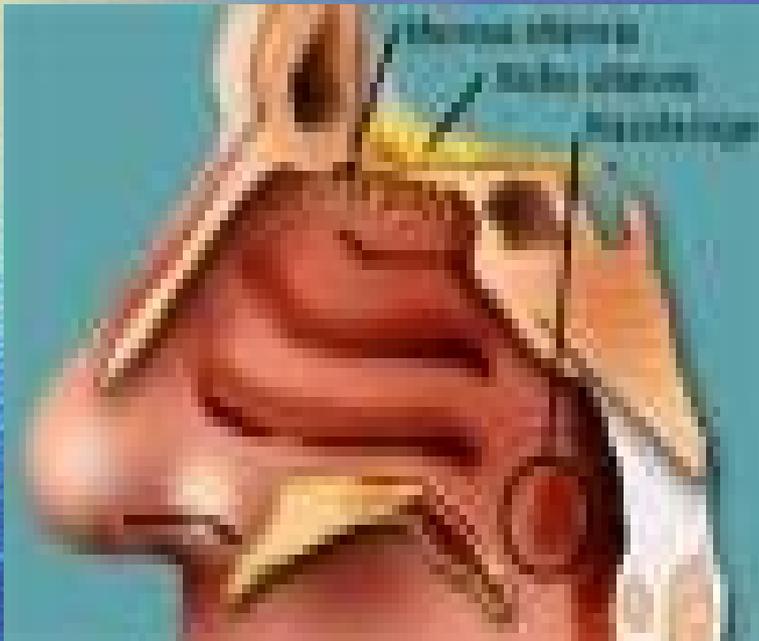


- Gram Positivos
- Catalasa Negativa
- Agrupacion en pares o cadenas
 - Anaerobios Facultativos

GENERALIDADES GRUPO *Streptococcus*

- Homo fermentativos.
- Temperatura optima de crecimiento :
36°C

GENERALIDADES GRUPO *Streptococcus*





Grupo Mutans

- *S. sobrinus*
- *S. mutans*
- *S. cricettus*
- *S. rattus*
- *S. macacae*
- *S. downei*
- *S. ferus*



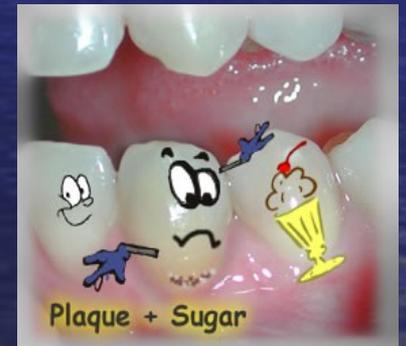
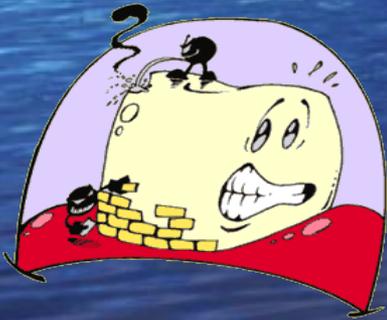
FISIOPATOGENIA DE LA CARIES DENTAL



Cariogenesis

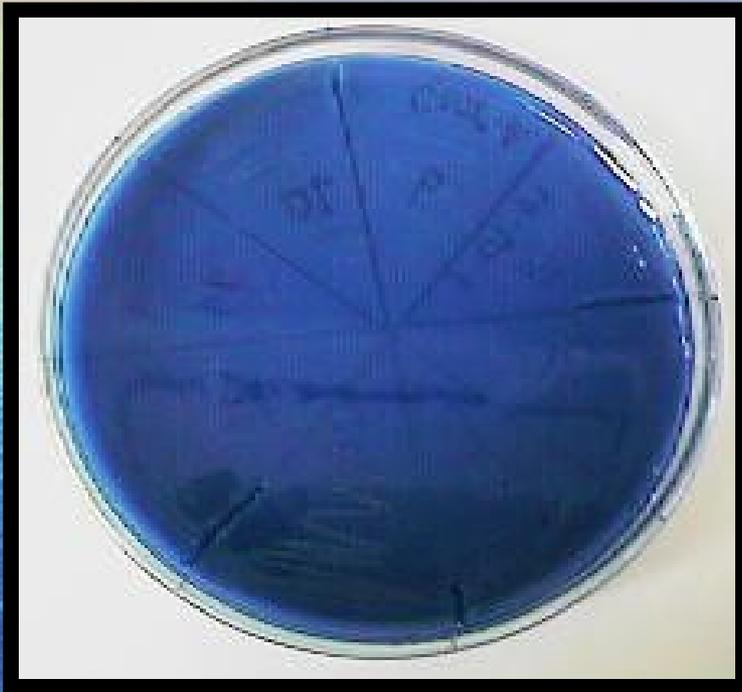


- Variedad de Microorganismos.
- Similitud en identificación.



Cepa	Inulina	Manitol	Rafinosa	Sorbitol	Esculina
<i>S. mutans</i>	+	+	+	+	+
<i>S. sobrinus</i>	+/-	+	+/-	+/-	-
<i>S. rattus</i>	+	+	-	+	+/-
<i>S. sanguis</i>	+/-	-	-	-	+/-

Medios de Cultivo



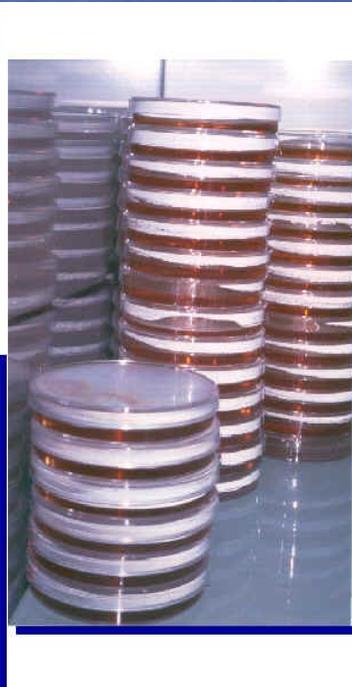
- Intentan reproducir artificialmente las condiciones del hábitat natural de los agentes bacterianos.
- Sus componentes deben cubrir todas las necesidades nutricionales de las bacterias.

CONDICIONES GENERALES DE UN MEDIO DE CULTIVO



- Temperatura
- Grado de humedad
- Presión de oxígeno adecuada
- Grado correcto de acidez o alcalinidad

Medios de Cultivo



- x DIFERENCIALES
- x ENRIQUECIMIENTO
- x MANTENIMIENTO
- x SELECTIVOS

Medios de Cultivo



Agar Mitis salivarius

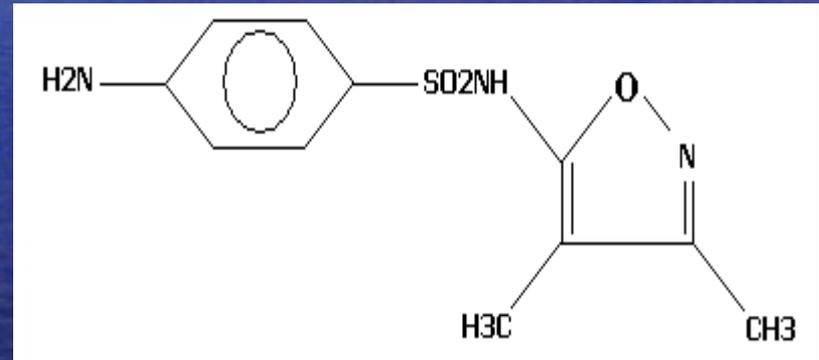
- Selectivo para estreptococos orales.



- Composicion:
- Peptona
- Sacarosa
- Telurito de K+
- Bacitracina
- Cristal Violeta
- Azul Tripan

SULFISOXAZOLE

- Sulfonamida
- Gram positivos y Gram negativos
- Efecto Bacteriostático



Mecanismo de Acción

- Análogos estructurales y antagonistas del PABA
- Impiden la utilización normal del PABA en síntesis de Ácido Fólico

Justificación

- De acuerdo a la similitud entre especies, se hizo necesario plantear nuevas y efectivas herramientas para poder obtener un crecimiento selectivo de *S. mutans* y mantener inhibido el crecimiento de estreptococos orales acompañantes, especialmente *Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus sanguis*

OBJETIVO GENERAL

- Modificar el Agar *Mitis Salivarius* (AMS) para aumentar la selectividad en el aislamiento de estreptococos orales, específicamente *Streptococcus mutans*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Aislar e identificar *Streptococcus mutans* de muestras de saliva.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Realizar la modificación del Agar Mitis Salivarius (AMS) a cuatro concentraciones diferentes del antibiótico sulfisoxazole manteniendo concentraciones constantes de citrato de sodio y cloruro ferrico, además de las establecidas en la preparación del Agar Mitis Salivarius (AMS).

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Valorar el crecimiento de *Streptococcus mutans* en el medio de cultivo SULBAC.
- Evaluar la capacidad de inhibición de otros estreptococos orales en el medio de cultivo SULBAC.

• PROCESO EXPERIMENTAL



Diseño y valoración de un medio d

**14 Cepas *S. mutans*.
(CIO)**



15 Muestras Pacientes



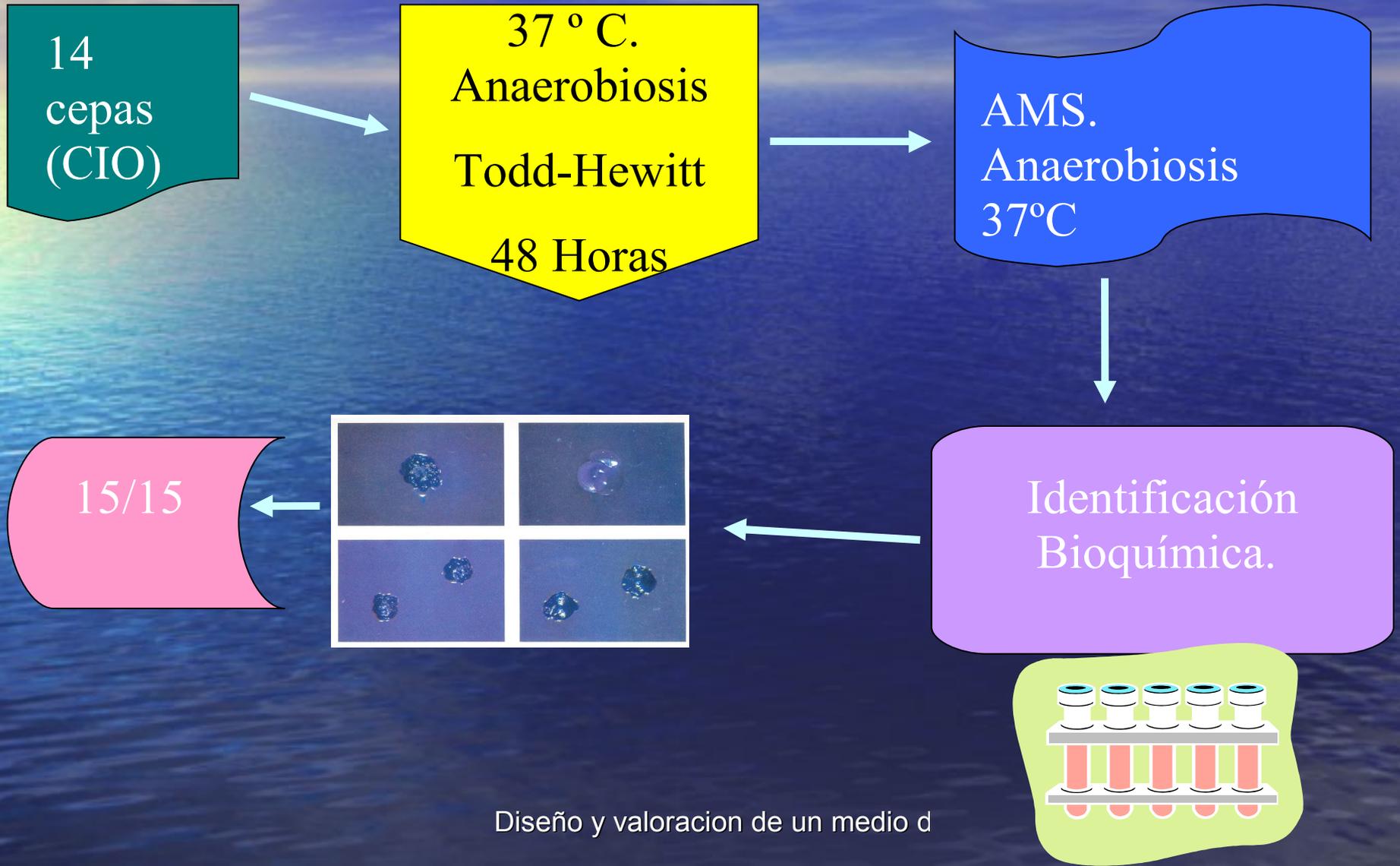
**Otros
estreptococos
orales.**



CEPA

**ATCC 31989 de *S.*
*mutans***

RECUPERACION DE CEPAS



15 muestras
de saliva



Siembra
directa en
AMS

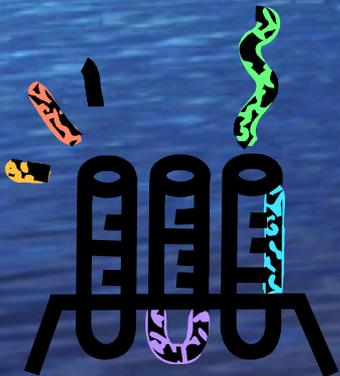
Incubación 37°C.
Anaerobiosis.

48 Horas

Identificación
Bioquímica

IDENTIFICACION BIOQUIMICA

- *Streptococcus rattus*
- *Streptococcus sobrinus*
- *Streptococcus sanguis B3*



PREPARACION MEDIO DE CULTIVO SULBAC



- Base de preparación AMS.
- Adición de compuestos químicos.



Componente	Medio 1 (Bajo)	Medio 2 (Normal)	Medio 3 (Alto – A)	Medio 4 (Alto – B)
Bacitracina	300 UI/L	300 UI/L	300 UI/L	300 UI/L
Sulfisox.	0.1 g/L	0.2 g/L	0.4 g/L	0.8 g/L
Cloruro Ferrico	1.2 mL/L	1.2 mL/L	1.2 mL/L	1.2 mL/L
Citrato de Sodio	2 g/L	2g/L	2g/L	2g/L

PREPARACION MEDIO SULBAC



- Esterilizacion a 121°C a 15 libras de presión durante 15 Minutos.
- Adición de compuestos labiles.





Control de Esterilidad

- 3 medios de cada concentración
- Incubacion: Atmósfera de anaerobiosis durante 48 horas.
- No se observo crecimiento



GRUPO DE MEDIOS

- BAJO
- NORMAL (Takada, Hirasawa. 2005)
 - ALTO-A
 - ALTO-B

SIEMBRA MEDIO SULBAC

- Incubadas bajo anaerobiosis durante 48 horas a 37°C.



- Morfología de colonias
- identificación bioquímica

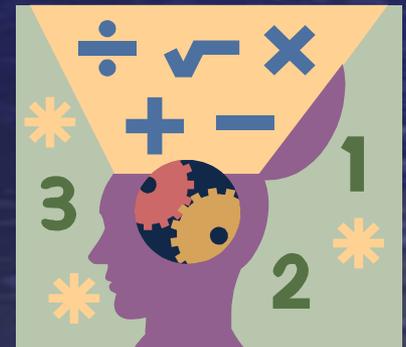


RESULTADOS

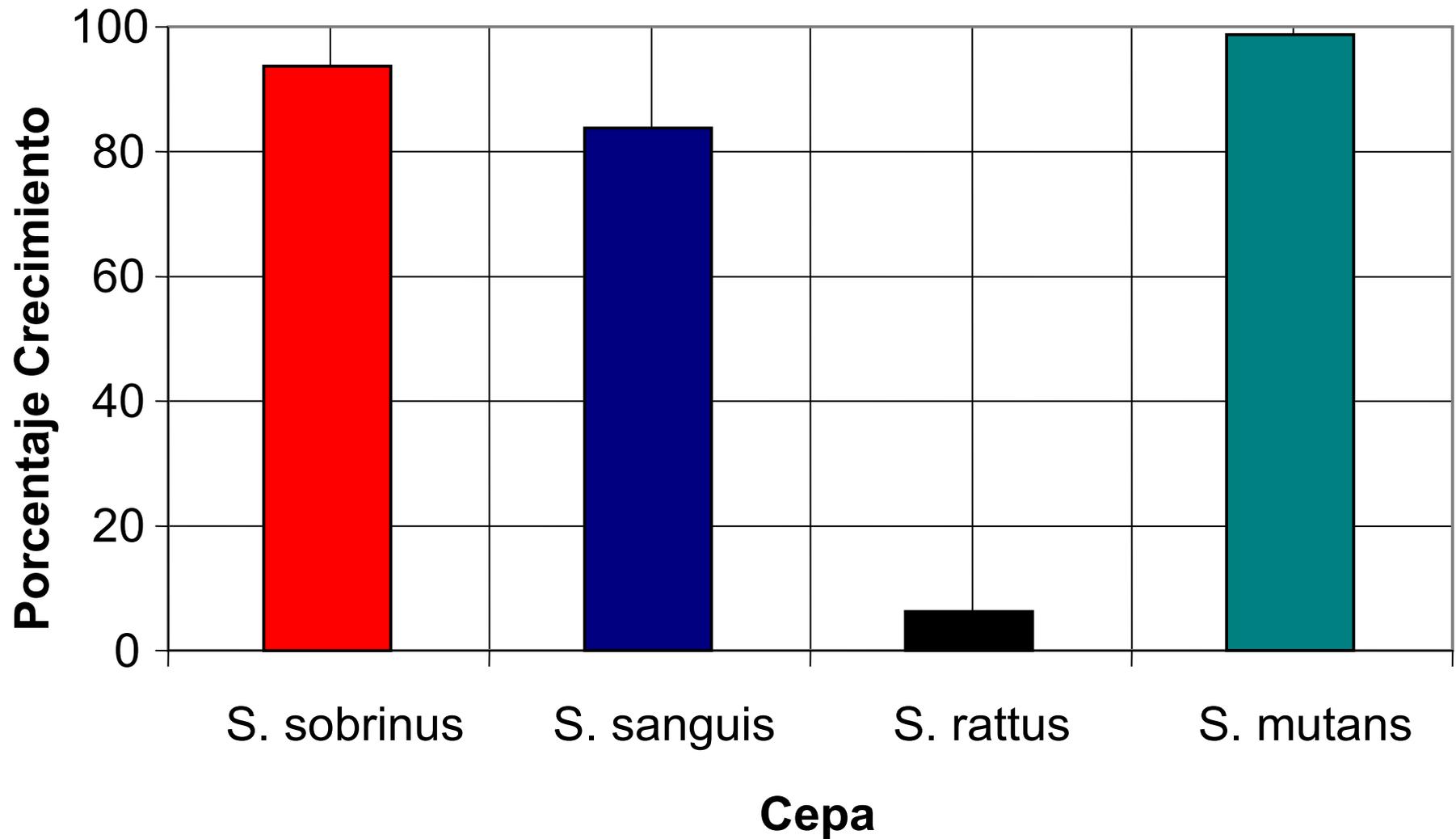


RESULTADOS

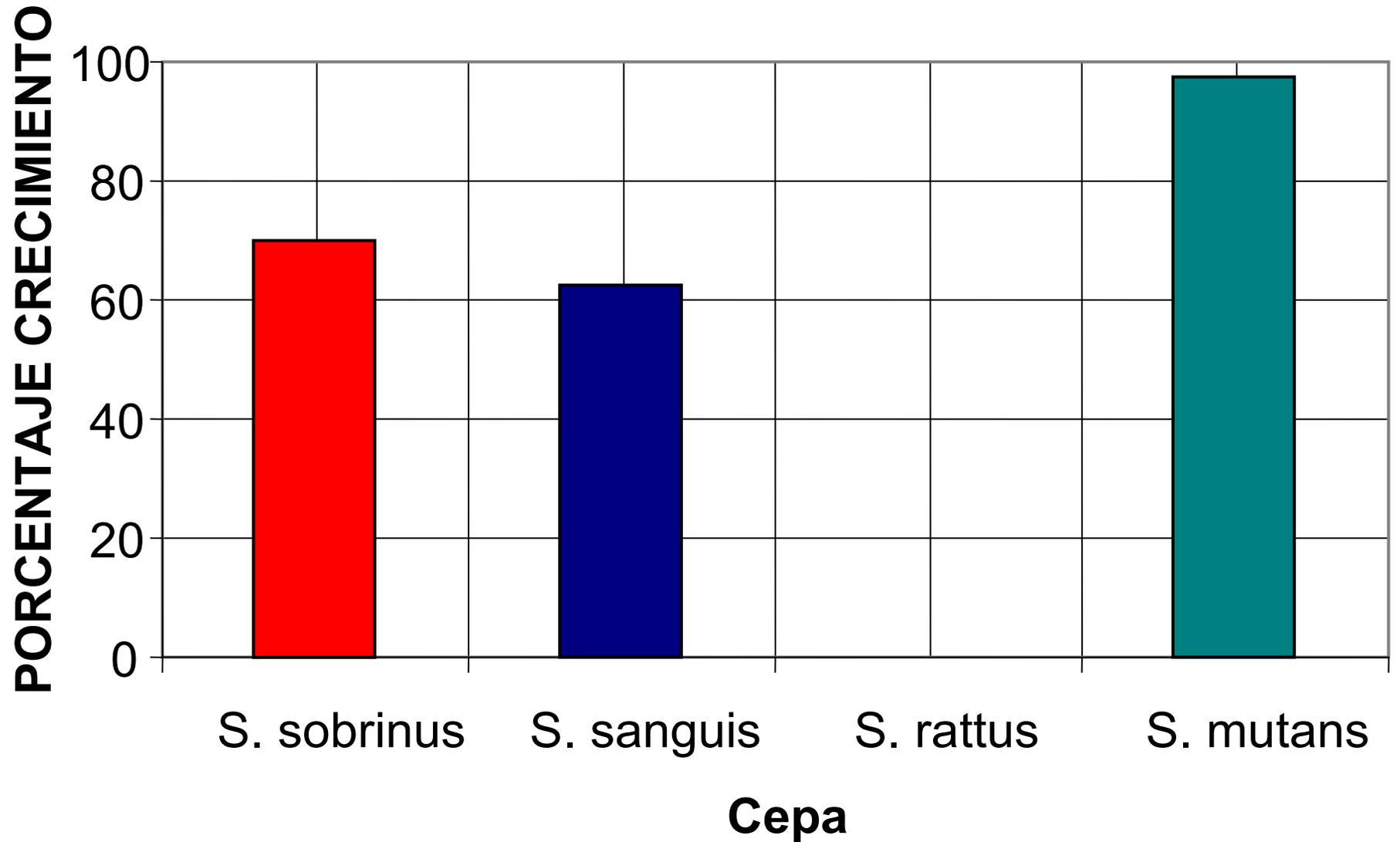
- Recuento de Colonias.
 - *S. mutans*
 - 8.4×10^7 UFC/mL.
 - 100%



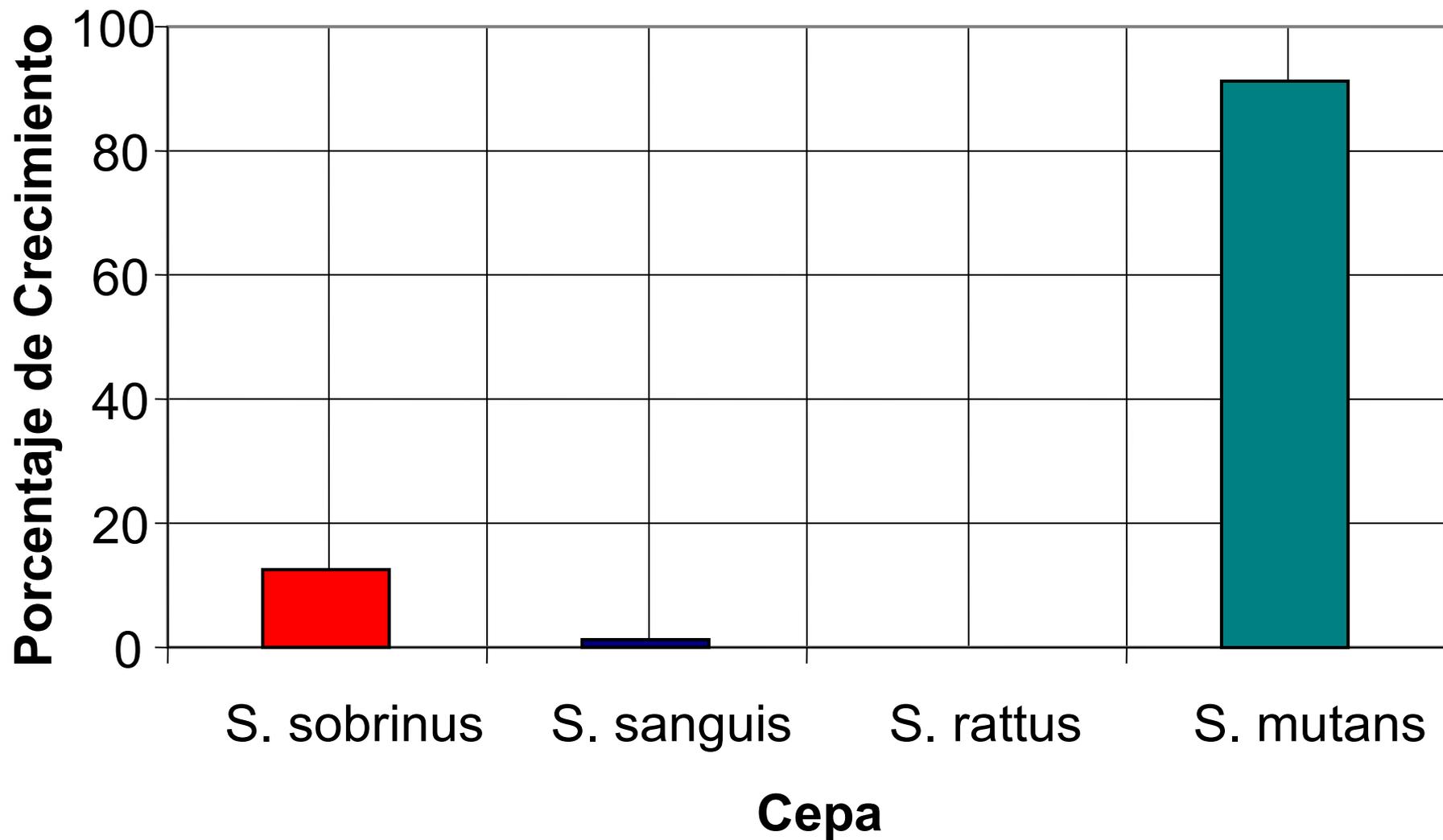
SULBAC 1 (BAJO)



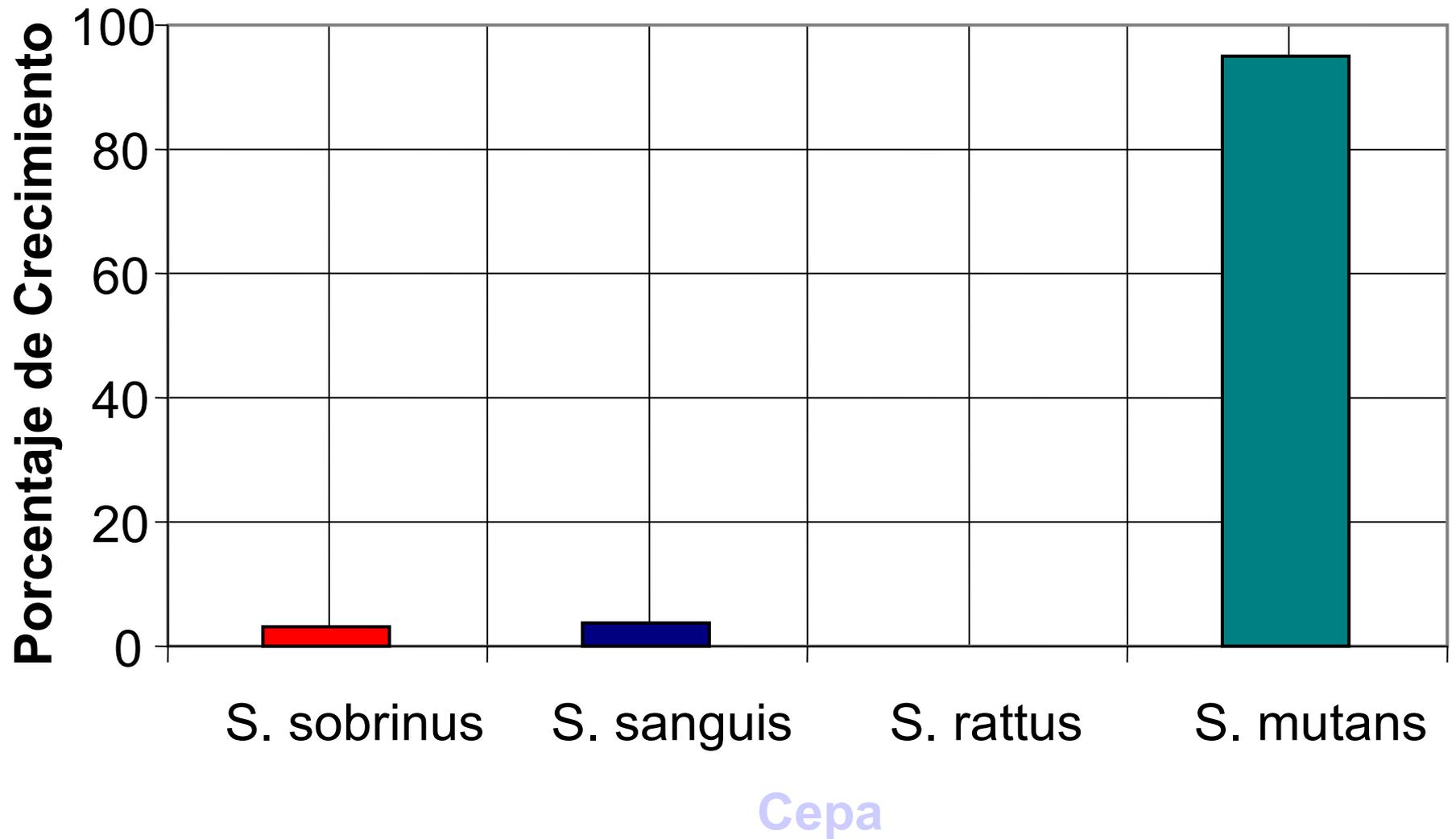
MEDIO SULBAC (NORMAL)



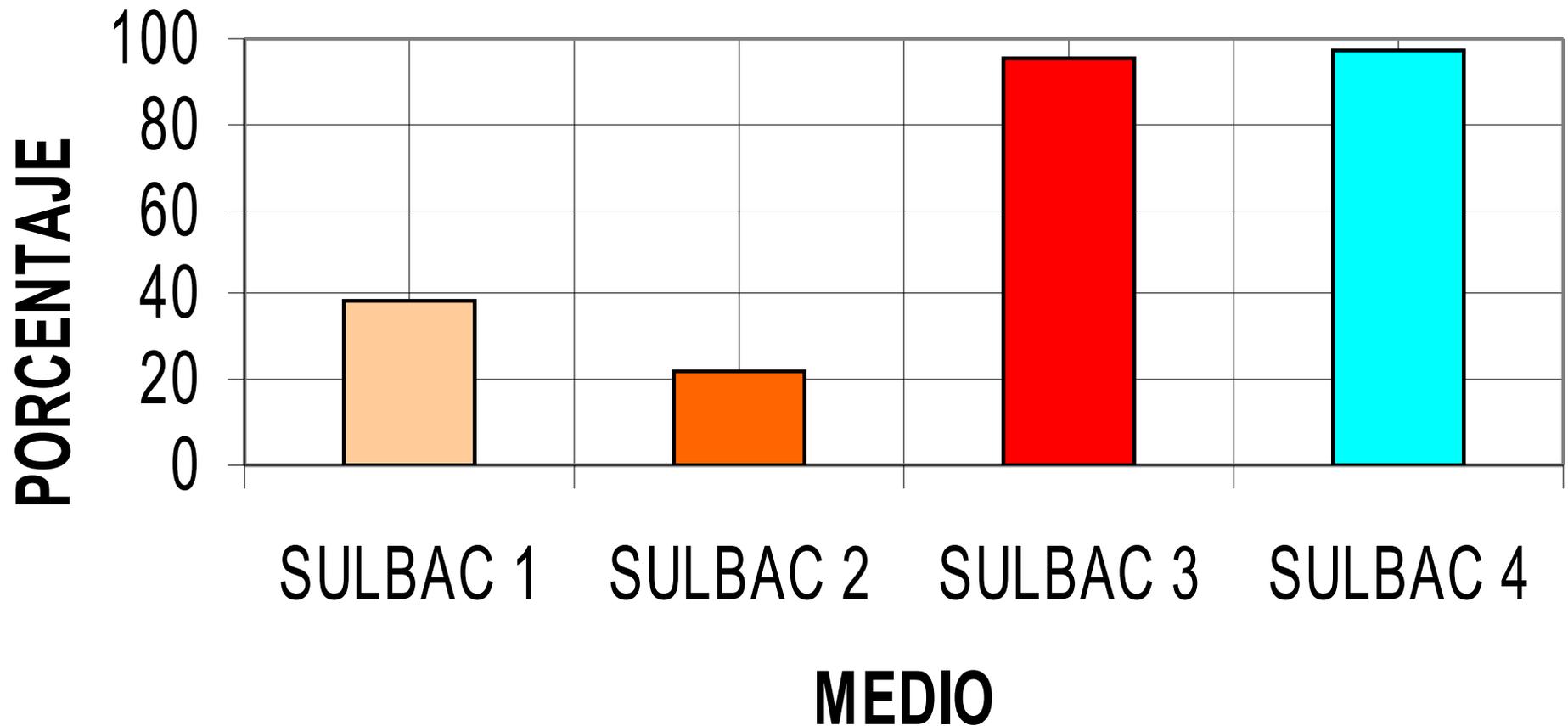
SULBAC 3 (ALTO -A)



SULBAC 4 (ALTO -B)



INHIBICION DE OTROS ESTREPTOCOCOS ORALES



DISCUSSION



DISCUSION

- Resultados obtenidos por Takada, Hirasawa en el año 2005, evidencian un porcentaje de inhibición de otros estreptococos orales del 72.1% en su medio MS-MUTV.

DISCUSSION

- MS-MUTV; Inhibe al 72.1%. (Otros Estreptococos orales)
- SULBAC; Inhibe al 98% (Otros Estreptococos orales)

DISCUSION

- Reportes previos, han demostrado la efectividad que tiene el citrato y el hierro (3+), en el metabolismo del *Streptococcus mutans*, ya que aumenta su crecimiento tanto en un medio de cultivo como en la propia placa dental. (Korithoski, 2005)

Análisis Estadístico

- Se utilizo el modelo estadístico ANOVA (Análisis de Varianza).
 - **Valor F crítico: 2.748**
 - **Valor F para el estudio: 3172.02**

Ho: Concentracion Sulfisoxazole no afecta crecimiento Bacteriano.

Ha: Concentracion Sulfisoxazole afecta el crecimiento Bacteriano.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

- El medio SULBAC 3 y 4, demuestra una recuperación selectiva de *Streptococcus mutans* y la inhibición de otros estreptococos orales, para el caso exacto de este estudio, *S. sanguis*, *S. sobrinus*, *S. rattus*.

CONCLUSIONES

- El sulfisoxazole junto con el cloruro ferrico y el citrato de sodio actúan de manera inhibitoria en el crecimiento de flora acompañante.

CONCLUSIONES

- En las dos concentraciones más altas del medio SULBAC preparado, el porcentaje de inhibición es muy alto y significativo para el estudio, confirmando así la utilidad del sulfisoxazole junto con el cloruro ferrico y el citrato de sodio a dichas concentraciones.

CONCLUSIONES

- El medio SULBAC se puede utilizar directamente para la siembra masiva de saliva, recuperando cerca del 98% de los *Streptococcus mutans* e inhibiendo simultáneamente flora acompañante no deseada.

CONCLUSIONES

- Según el modelo estadístico, se concluye de forma general que la selectividad del medio SULBAC, esta dada por la susceptibilidad de la bacteria al antibiótico y las concentraciones de sulfisoxazole.

RECOMENDACIONES

- **Modificación de las concentraciones de:**
 - **CLORURO FERRICO**
 - **CITRATO DE SODIO**
 - **BACITRACINA**

AGRADECIMIENTOS

- Dra. Margarita Chaves.
- Centro de Investigaciones Odontologicas

GRACIAS

