

870127  
17  
24

# UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



TESIS CON  
FALLA DE CEN

INCIDENCIA DE STREPTOCOCCUS MUTANS COMO CAUSANTE  
DE CARIES DENTAL EN UNA POBLACION ADULTA.

## TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

Patricia Dolores Maytorena Zamora

Asesor: Q.F.B. María del Socorro Pulido G.

GUADALAJARA, JAL.

1986



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# I N D I C E.

	PAG.
1.- INTRODUCCION	1
II.-GENERALIDADES	3
2.1.- Genero Streptococcus	4
2.1.1. Clasificación	5
2.1.2. Inmunidad	7
2.1.3. Actividad bioquímica	7
2.1.4. Caracteres serológicos	8
2.1.5. Patogenicidad	10
2.1.6. Epidemiología	12
2.2. Estreptococos de la cavidad oral	13
2.2.1. Clasificación	14
2.2.2. Interacciones Huésped-Microorganismo	15
2.3. Streptococcus Mutans	16
2.3.1. Historia	16
2.3.2. Distribución en la cavidad oral	16
2.3.3. Características Bioquímicas	18
2.3.4. Antígenos presentes en la pared celular.	18
2.3.5. Adherencia	19
2.3.6. Clasificación de Subespecies	20
2.3.7. Características Epidemiológicas	21
2.3.8. Características Ecológicas	22
III.-MATERIAL Y METODO.	23
IV.-RESULTADOS	39
V.- CONCLUSIONES	43
VI.- BIBLIOGRAFIA	45

## I N T R O D U C C I O N

Los estreptococos constituyen un grupo relativamente abundante un tanto heterógeno, de formas esféricas caracterizadas por disponerse en cadenas de células. Producen muchas enfermedades en el hombre y animales inferiores en los que pueden estar presentes como comensales, y algunos son saprófitos encontrándose en la leche y sus derivados.

A pesar de los antecedentes de la invasión de microorganismos en muchas enfermedades de animales y humanos no fué sino hasta la década de 1880 cuando W.D. Miller realizó una serie de experimentos simples que colocaron a la caries dental dentro de la categoría de un problema bactericamente dependiente.

En 1960, Keyes realizó una serie de experimentos que establecieron a la caries dental como una enfermedad infecciosa.

Los diversos estreptococos orales pueden constituir de 30 a 60% de las poblaciones bacterianas totales que viven en varios sitios de la cavidad oral humana, considerándose candidatos probables de complicación primaria en formación de caries dental.

Las especies conocidas como productoras de caries en los animales de experimentación son: S. mutans, S. sanguis, S. salivarius.

Es importante enfocar a S. mutans como modelo para estudiar la posibilidad de reducir o eliminar una bacteria específica de la cavidad oral.

Debido a la gran importancia patológica que ocupa la caries dental en nuestro medio, se propone el desarrollo del presente trabajo, para poner de manifiesto la incidencia de S. mutans como causante de caries, para ayudar al control de la misma, ya que ésta es una enfermedad crónica que puede tomar meses para que avance la destrucción a nivel clínicamente detectable. Existe una verdadera necesidad del desarrollo de técnicas de detección de caries más sensible y selectiva.

El presente estudio se realizará en una población de adultos de ambos sexos, que se presenten con un cuadro de caries dental avanzada.

## GENERALIDADES

2.1. El género *Streptococcus* está formado por un gran grupo de microorganismos con características variadas y patógenos por sí mismos; son causa de varias enfermedades específicas y participan en infecciones mixtas con otras bacterias. Son los microorganismos infectantes más comunes de la cavidad bucal.

El género *Streptococcus* tiene características en común como:

- a).- Células esféricas u ovoides.
- b).- Agrupación en forma de cadenas largas, cortas o pares.
- c).- Gram positivos.
- d).- No forman esporas.
- e).- En general son inmóviles exceptuando algunas cepas del grupo D de Lancefield.
- f).- Únicamente los miembros del grupo A y C pueden formar cápsula constituida por ácido hialurónico.
- g).- Catalasa y oxidasa negativos.
- h).- Aerobios y anaerobios facultativos.
- i).- Fermentan carbohidratos sin producción de gas.
- j).- Producen lactato casi exclusivamente a partir de glucosa.

### 2.1.1. Clasificación.

El genero Streptococcus, ha sido difícil de clasificar adecuadamente y ha dado lugar a la proposición de varios esquemas taxonomicos empleando criterios generales; a saber; hemólisis de cultivo en placas de agar sangre, propiedades biológicas y carácter inmunológico, indicado por reacciones de aglutinación y precipitación.

Los relativos a estreptococos patógenos hacen una separación preliminar según la hemólisis, y definen especies y variedades con base inmunológica.

El empleo de la hemólisis en placa de agar sangre fué introducida por Schottmuller en 1903, y resulta especialmente adecuado, pues el agar sangre es el medio de elección para aislamiento inicial. Las reacciones hemolíticas en sangre distinguen tres tipos de estreptococos:

a) Estreptococos  $\beta$ -hemolíticos que producen una zona de hemólisis clara, en el medio rojo opaco, rotando inmediatamente a la colonia.

b) Estreptococos verdes o  $\alpha$ -hemolíticos, que producen una zona de coloración verde alrededor de la colonia, bastante menor que la zona clara de hemólisis-beta.

c) Estreptococos no hemolíticos, indiferentes o hemolíticos que no producen cambios en el medio.

Basándose en sus propiedades biológicas se dividen en cuatro grupos:

- a).- Pyogenes.
- b).- Viridans.
- c).- Enterococo.
- d).- Lactis.

Para la clasificación basada en su caracter inmunológico, utilizando precipitinas, Lancefield encontró que muchos de los estreptococos hemolíticos contienen, en su pared celular, un polisacárido (antígeno C) que permite diferenciarlos en trece grupos serológicos, cada uno designado por una letra de la A a la O con excepción de la I y la J, siendo las cuatro primeras las de mayor importancia.

La clasificación inicial está fuertemente orientada a evaluar el tamaño y aspecto de las colonias individuales en medios de cultivo primario y el tipo de hemólisis producida en agar sangre.

Varios de los estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos del hombre constituyen parte de la flora normal. Los estreptococos se encuentran a menudo en vías intestinales, mientras que S. salivarius y S. mitis están comúnmente en la boca y garganta, ambos pertenecen al llamado grupo viridans. Streptococcus mutans, similar a S. salivarius, puede estar implicado en la aparición de caries dental.

S. sanguis se encuentra frecuentemente en placas dentales, pero también es causa común de endocarditis.

bacteriana subaguda.

### 2.1.2. Inmunidad.

Con excepción de la escarlatina, las infecciones estreptocócicas no son seguidas por una resistencia a subsecuentes ataques y la inmunidad en la escarlatina se debe a las antitoxinas presentes en la sangre, y para determinar si ellas son suficientes para crear un estado inmunitario, se utiliza la prueba de Dick. Un ataque es usualmente seguido de inmunidad permanente, pero debemos recordar que una persona es inmune a la acción de la toxina, pero no del estreptococo en sí, el cual puede ocasionar infecciones localizadas como amigdalitis, abscesos, otitis media, etc.

En general podemos decir que la inmunidad es ligera y breve y sólo actúa contra el grupo que la ocasionó

### 2.1.3. Actividad Bioquímica.

La capacidad fermentativa de los azúcares varía de acuerdo a los grupos, pero la no fermentación de la inulina tiene un valor diferencial entre Streptococcus fecalis y el neumococo, el cual es inulina positivo.

No son solubles en bilis, carácter también diferencial con el neumococo.

#### 2.1.4. Caracteres Serológicos.

I.- Composición antigénica.- Como se dijo anteriormente, poseen sustancias carbohidratadas, grupo-específico y antígenos de naturaleza proteica o polisacaridos de tipo específico.

II.- Producción de Toxinas.- Los estreptococos elaboran ciertas toxinas. Algunas parecen ser intracelulares y se encuentran en lisados sónicos de bacterias; otras se difunden de las células encontrándose en filtrados libres de células. En el primer grupo se forma una hemolisina, demostrable en lisados sónicos, diferente de las estreptolisinas extracelulares y mortal para el ratón.

Las toxinas extracelulares incluyen estreptolisinas o hemolisinas, estreptosinasa, hialuronidasa, toxina eritrogénica o escarlatinosa, leucocidina que mata a los heterófilos que ingiere la bacteria y, posiblemente una enterotoxina en algunos estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos que producen intoxicación alimenticia.

a).- Estreptolisinas.- Todd diferenció dos clases de hemolisinas filtrables producidas por estreptococos. Difieren en que una llamada estreptolisina S, es producida sólo en medios que contienen suero y es sensible al calor y al ácido; la otra denominada estreptolisina O, es inactivada por el oxígeno, su actividad puede recuperarse mediante agentes reductores débiles como la cisteína. Ambas hemolisinas son extremadamente lábiles a 37° C.

En las infecciones estreptococicas se forman anticuerpos contra la estreptolisina O y tanto la titulación como su frecuencia en la población aumentan con la edad. La citotoxicidad y la cardiototoxicidad juegan un papel muy importante en la secuela de infecciones agudas.

La estreptolisina S es una hemolisina de bajo peso molecular que se encuentra en los líquidos sobrenadantes de los cultivos bajo la forma de complejo con una molécula portadora no hemolítica, que con frecuencia es albúmina. En contraste con la estreptolisina O, no es lábil al oxígeno y tampoco inmunogénica.

Ambas estreptolisinas S y O son producidas por estreptococos de los grupos A, C y G.

b).- Estreptocinasa.- Los estreptococos hemolíticos de los grupos A, C y G también producen estreptocinasa, activador plasmático que inicia la disolución fibrinolítica de los coágulos de fibrina. La estreptocinasa es antigénica.

Los estreptococos hemolíticos también producen estreptodornasas, una desoxirribonucleasa sin relación aparente con la virulencia.

c).- Hialuronidasa.- La mayor parte de estreptococos hemolíticos producen hialuronidasa cuya acción enzimática despolimeriza la sustancia fundamental de

los tejidos. La substancia capsular de cepas encapsuladas de estreptococos hemolfticos de los grupos A y C- está formada por ácido hialurónico, y tales cepas no- producen hialuronidasa, a pesar de que generalmente - son virulentas.

d).- Toxinas eritrogénicas.- La toxina eritrogénica es responsable del exantema que se observa en la escarlatina, se conoce también como toxina escarlatinosa.

Las toxinas eritrogénicas son antigénicas y estimulan la producción de antitoxinas neutralizantes.

#### 2.1.5. Patogenicidad.

a.- Hombre.- Los estreptococos producen una amplia gama de enfermedades en el hombre, posiblemente- mayor que cualquier otra bacteria; además de ser causa primaria de enfermedades, tiene gran tendencia a - presentarse en infecciones secundarias o mixtas, con- otras bacterias patógenas, a menudo estafilococos. En general, las infecciones estreptocócicas se caracterizan por lesiones supurativas, y muy a menudo manifestaciones de toxemia; éstas últimas adoptan la forma - de las llamadas complicaciones no supurativas de la - infección, incluyendo fiebre, artritis, carditis y nefritis.

Los estreptococos  $\beta$ -hemolfticos son los más virulentos, la mayor parte de los infecciosos para el -

hombre pertenecen al grupo A, S. pyogenes. La infección humana con estreptococo del grupo B, actualmente se encuentra con frecuencia. Las infecciones son menos comunes en adultos que en niños; en los últimos se observa con frecuencia septicemia neonatal y meningitis. Se han encontrado que los estreptococos del grupo G también pueden causar enfermedades en el hombre.

La patogenicidad de éstas bacterias se debe en grado considerable a la producción de sustancias tóxicas solubles.

El antígeno M específico de tipo se relaciona con la virulencia, y su anticuerpo es protector, en tanto que el anticuerpo para el antígeno T, específico de tipo, no lo es. Las cápsulas de ácido hialurónico parecen ser un componente menor en la virulencia del grupo A, pero en el grupo C quizás sean más importantes en este aspecto.

Las formas  $\alpha$ -hemolíticas son parte de la flora bacteriana normal de la boca, vías respiratorias superiores e intestino. Probablemente, rara vez inician la infección de tejidos sanos, pero cuando disminuye la resistencia natural, pueden desencadenar infecciones benignas, principalmente localizadas, como abscesos focales en dientes y encías.

b.- Animales.- Algunos estreptococos producen enfermedades específicas de los animales domésticos;

S. equi.....crup de los caballos

S. agalactiae.....mastitis estreptocócica.

S. pyogenes es patógeno para la mayor parte de - animales de laboratorio.

El estreptococo  $\alpha$ -hemolítico es relativamente-- avirulento para los animales de laboratorio.

#### 2.1.6. Epidemiología;

La fuente principal de estreptococos patógenos - es el hombre que los transporta en las vías respiratorias altas.

Los casos con síntomas manifiestos de enfermedad como amigdalitis, faringitis y escarlatina son fre\_ - cuentes prolíferas de infección.

Los estreptococos pueden encontrarse en la sali\_va y en la faringe, y ser expulsados por el estornudo o la tos contaminando las manos, el portador nasal es más peligroso, ya que aporta cantidades elevadas de - estreptococos al medio ambiente.

## 2.2. Estreptococos de la cavidad oral;

La cavidad bucal presenta una serie de superficies y hendiduras que resultan útiles para la colonización por microorganismos.

En las distintas zonas de la cavidad bucal, la flora puede ser muy variable.

Al parecer, la adhesividad bacteriana resulta importante para la colonización de las superficies duras, epiteliales o mucosas de la cavidad oral por microorganismos patógenos como los estreptococos  $\beta$ -hemolíticos. El antígeno M de superficie facilita la unión de los estreptococos del grupo A.

La relación entre la flora bucal y el huésped es de tipo anfibiótico, es decir, en ciertas circunstancias la relación es prácticamente simbiótica, mientras que en otras éstos microorganismos pueden provocar procesos patológicos.

Los estreptococos comprenden de 30 a 60% de la flora bacteriana oral, las especies encontradas pertenecen al llamado grupo viridans; S. salivarius, S. mitior, S. milleri, S. sanguis y S. mutans en la búsqueda del cual está basado este estudio.

### 2.2.1. Clasificación.

Como los estreptococos facultativos orales son heterógenos e inherentes a la cavidad oral, por mucho tiempo fueron considerados ser de mucha menor importancia que las especies de estreptococos Lancefield - grupos A y B. Por esta razón la mayoría de los laboratorios de bacteriología de hospitales simplemente se referían a ellos como Streptococcus viridans. Esta clasificación supersimplificada de una variedad de cepas con distintas características fisiológicas y serológicas obstaculizaba la verdadera clasificación taxonómica de estos estreptococos.

Es por ésto que actualmente la clasificación se hace en base a análisis morfológicos, bioquímicos y genéticos. Y se sabe que el grupo viridans consta de 5 especies; S. salivarius, S. mitior, S. milleri, S. sanguis y S. mutans.

### 2.2.2. Interacciones Huésped-Microorganismo en la Cavidad Oral.

- A.- Determinantes ecológicos primarios
  - 1.- Adherencia bacteriana
  - 2.- Interrelaciones nutricionales.

- B.- Otros parámetros que influyen

- 1.- Factores del huésped

- a) Mecánico
    - b) Fisiológico
    - c) Enzimático
    - d) Inmunológico

- 2.- Factores Bacterianos

- a) Productos tóxicos
    - b) Ácidos
    - c) Enzimas
    - d) Antígenos

## 2.3. Streptococcus mutans.

### 2.3.1. Historia.

Este organismo fué aislado por primera vez de placa dental por Clarke en 1924, es considerada dis-tinta de los estreptococos orales. Clarke eligió este nombre debido a su tendencia a exhibir tanto una morfología cónica como en forma de bastón.

Después de este reporte inicial fueron pocos los estudios que se realizaron sobre S. mutans, pero cuatro décadas después se iniciaron nuevas investigaciones de este microorganismo, a cargo del Instituto Nacional de Investigación Dental en los años de 1960.

Más recientemente fué demostrada su capacidad cariogénica.

### 2.3.2.- Distribución en la cavidad oral.

Desde un punto de vista ecológico S. mutans ha desarrollado propiedades que le permiten colonizar selectivamente superficies duras, tales como el esmalte de los dientes, también se le localiza en heces tras ser ingerido por los individuos que albergan el microorganismo en la boca.

Estudios preliminares indican que S. mutans se propaga por contacto oral.

Estudios realizados por Gibbons y asociados indi

can que S. mutans es localizado extremadamente en placas ya que ellos encontraron ciertas áreas que contienen altos porcentajes de S. mutans, mientras que los dientes vecinales tenían niveles indetectables de S. mutans.

Algunos investigadores han sugerido que S. mutans puede ser propagado del sitio de un diente a otro bien sea por cepillado de dientes o seda dental incompleta de los dientes.

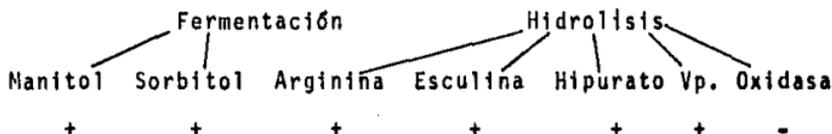
La presencia de bajas cantidades de S. mutans en saliva lo más probable es que se deba a su incapacidad de colonizar superficies mucosas que son bañadas por saliva y su capacidad de adherirse fuertemente al esmalte coronal de modo que cuando son encontrados S. mutans en la saliva, probablemente presentan lavados de placa asociados con lesiones de caries.

### 2.3.3. Características Bioquímicas.

Los aislados de S. mutans son distinguidos de -- otros por su capacidad de fermentar manitol y sorbitol, catalasa negativos, oxidasa negativos, fermentadores de carbohidratos sin producción de gas, producen una glucana llamada también mutana, a partir de la sacarosa.

S. mutans, fermenta también a la lactosa, sacarosa, rafinosa, maltosa, galactosa, melobiosa, trealosa, efructosa e inulina. La mayoría de las cepas no hidrolizan la arnina.

S. mutans produce tanto glucosil transferasa como fructosil transferasa extracelulares y asociadas a células. Estas enzimas son específicamente para el sustrato de sacarosa el cual utilizan para sintetizar fructanos de alto peso molecular, respectivamente.



### 2.3.4. Antígenos presentes en la pared celular:

La pared celular de estreptococos orales, como la de otros estreptococos, consta de otros componentes antígenicos;

- a.- Peptidoglucanos
- b.- Grupo o polisacarido especifico de serotipo.
- c.- Protefna
- d.- Acido lipoteicoico

Cada una de estas estructuras puede llegar a la superficie de la celula estreptococica y cada una pue de reaccionar con anticuerpos preparados para la célu la bacteriana total. Microfagos electrónicos muestran estructuras filamentosas compuestas de protefna sobre la superficie celular de estos estreptococos. El áci do lipoteococico, que es sintetizado en la membrana - citoplasmica de la bacteria sobresale de la superfi - cie de la célula. Bacteriófagos especificos ha sido - demostrado también que se unen a componentes especificos de la pared celular. Por lo tanto, la pared celu lar debe ser considerada como un mosaico de estas cua tro estructuras importantes, cada una de las cuales - puede involucrarse en la unión (adherencia) de Streptococcus mutans.

### 2.3.5. Adherencia;

Otra propiedad única de S. mutans es que cuando suspensiones de células lavadas de la bacteria son - provistas de sacarosa las células se vuelven adheri - bles a las paredes de receptáculo en el cual están - siendo contenidas. Este fenómeno se ha demostrado que implica conversión de sacarosa a glucano por la enzi - ma glucosiltransferasa (GTF), presente sobre la super ficie de células bacterianas. De este tipo de observa

ciones el término "glucano adherentes" ha evolucionado para describir el modo de adherencia de células. - Muchos productos celulares pudieran estar involucrados en el fenómeno de adherencia.

Una propiedad adicional de S. mutans es que cuando células lavadas son provistas con dextrano sufren una reacción de aglutinación.

Como S. mutans puede crecer bien en una variedad de fuentes de carbohidratos, la habilidad de sacarosa para acrecentar la acumulación de S. mutans sobre los dientes parece deberse al estímulo de interacciones célula a célula. La formación de glucano es necesaria para la adherencia de S. mutans a los dientes.

### 2.3.6. Clasificación de subespecies.

La homogeneidad fenotípica presentada por S. mutans, se pierde cuando se estudian los criterios serológicos, genéticos y bioquímicos del organismo.

Existen hasta 7 tipos serológicos denominados con letras minúsculas de la "a" a la "g", cuya especificidad radica en componentes polisacáridos localizados en la pared celular o sobre la misma.

Desde el punto de vista genético, son 4 los grupos (I-IV) propuestos en base al contenido de G-C que varía del 36-46%. Asimismo, estas genoespecies suelen designarse como las subespecies.

- I.- mutans
- II.- rattus
- III.- cricetus
- IV.- sobrinus

Una clasificación más es la que considera 5 biotipos (I-V) esta tipificación se apoya en la fermentación de manitol, sorbitol, rafinosa y melibiosa, aparte de la hidrólisis de la arginina a su vez estos biotipos se correlacionan con los serotipos a-f.

Serotipo	biotipo	subespecie	contenido G-C (mol %)
c. e. t.	I	mutans	36-38
b	II	rattus	42-44
a, b	III	cricetus	42-44
d, g	IV	sobrinus	44-46
c	V	ferus	42-45

### 2.3.7. Características epidemiológicas.

Después de comprobar la capacidad infecciosa de S mutans se observó que no sólo se encuentra en la cavidad oral sino que también se está presente en las heces tras ser ingerido por los individuos que alberguen el microorganismo en la boca.

La bacteria ha sido aislada prácticamente de todas las áreas geográficas en que se ha muestreado humanos, el estreptococo parece no estar relacionado en su frecuencia de obtención a ningún núcleo económico.

étnico o social, encontrándosele indistintamente en zonas urbanizadas o en áreas remotas y primitivas.

#### 2.3.8. Características Ecológicas.

El ambiente oral prevee condiciones satisfactorias para la vida microbiana que está favorecida por las propiedades de humedad, temperatura, pH, Eh y tensión de oxígeno presentes en la boca; además de factores como flujo de saliva que suministra nutrientes, regula la acidez generada por procesos fermentativos, y remueve los productos de desecho de los microorganismos.

Los efectos más aparentes de su actividad son -- las dos enfermedades de mayor incidencia conocida en el humano: la caries dental y la periodontitis. La primera originada por los ácidos producto de fermentaciones microbianas y la segunda consecuencia de la reacción tisular por parte del huésped contra las masas microbianas y sus productos de desecho depositados en dientes y áreas gingivales.

MATERIAL Y METODO

En la realización del presente trabajo se tomaron - cien muestras de personas que se presentaron con ca\_ - sos de caries avanzada.

La técnica a seguir fué la siguiente:

- Secar la pieza careada con un algodón estéril. Tomar la muestra haciendo un raspado lo más profunda\_ mente posible utilizando una cucharilla para dentina\_ estéril con el fin de obtener la mayor cantidad de - dentina reblandecida posible.

- Colocar la muestra en un isopo estéril, y remi\_ tirla al laboratorio utilizando como transporte al me\_ dio destuart.

- Hacer un frotis y colorear con la técnica de - gram, con el fin de observar la flora microbiana pre\_ sente en la pieza.

- Inocular placas de Agar Sangre, Agar Estrepto\_ cel y Agar Sangre con Estreptocel e incubar a 37° du\_ rante 24 hrs, en un ambiente de CO<sub>2</sub>.

- Al finalizar el perfodo de incubación se obser\_ va el desarrollo de las colonias en la placa de Agar.

- Utilizando las colonias obtenidas en Agar Es\_ treptocel, se hace la prueba de la catalasa para po-- derlas clasificar dentro del género Streptococcus.

- En las placas de Agar Sangre se observa la he\_ molisis producida por los estreptococos que ahf desa\_

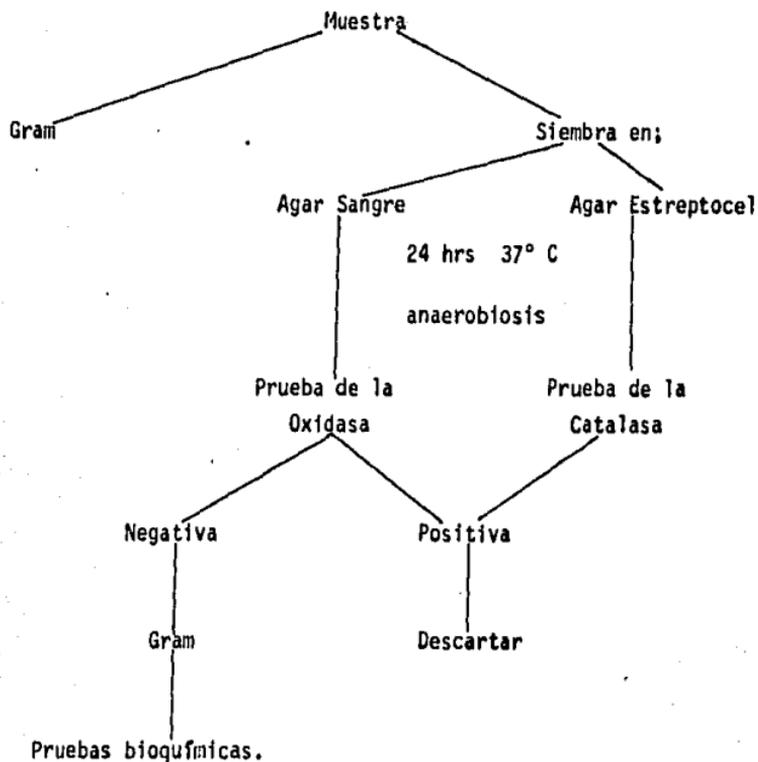
rrollan, clasificándolos como alfa o beta-hemolíticos.

- De estas colonias se hace un nuevo frotis que se tiñe con la técnica de gram para observar la coloración, morfología y agrupación de los microorganismos.

- De las mismas colonias se hacen las pruebas bioquímicas indispensables para su clasificación, las cuales se mencionan a continuación:

- 1.- Catalasa
- 2.- Oxidasa
- 3.- Veges-Proskauer
- 4.- Hidrolisis de hipurato
- 5.- SIM
- 6.- Camp
- 7.- Fermentación de carbohidratos, Manitol y sorbitol.

## ESQUEMA DEL ESTUDIO REALIZADO.



Como ya se mencionó anteriormente se utilizaron placas de Agar Sangre con estreptocel, para obtener una mayor selectividad en el aislamiento de microorganismos, al mismo tiempo observar las hemólisis características y aunque el aislamiento fue adecuado la hemólisis no se observó con claridad por lo cual este medio de cultivo se dejó de utilizar al poco tiempo de iniciar el -

estudio.

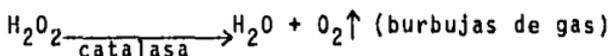
El medio de Estreptocel es selectivo para el crecimiento de estreptococos, además al ponerlo en atmósfera de  $CO_2$  el medio se hace mucho más selectivo para cepas de S. mutans.

Las colonias en Agar Estreptocel son pequeñas, - redondas, como gotas de rocío, transparentes. En tanto que en Agar Sangre son pequeñas, redondas, y se - aprecian mejor ladeando ligeramente la placa de Agar, en este mismo medio se observa la hemólisis que producen las colonias, lo cual nos ayuda a su identificación.

## CATALASA.

- Fundamento; La catalasa es una enzima que se compone de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en oxígeno y agua. Químicamente es una hemoproteína de estructura similar a la de la hemoglobina, excepto que los cuatro átomos de hierro de la molécula están en estado oxidado ( $Fe^{+++}$ ) en lugar de reducidos ( $Fe^{++}$ ).

El peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales del metabolismo oxidativo aeróbico de los hidratos de carbono. La catalasa transforma al peróxido en agua y oxígeno, como lo muestra la siguiente reacción:



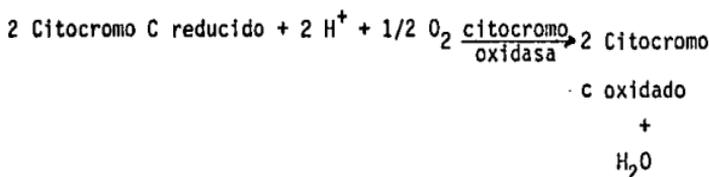
- Técnica: a) Con un palillo aplicador transferir células de una colonia bien aisladas a un portaobjetos.

b) Añadir 1 ó 2 gotas de peróxido de Hidrógeno.

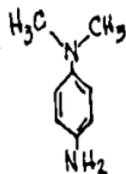
- Interpretación: La aparición de burbujas indica una reacción positiva.

## OXIDASA

- **Fundamento:** Esta prueba está basada en la producción bacteriana de una enzima oxidasa. Esta reacción se debe a la presencia de un sistema citocromoxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como aceptor de  $e^-$  en la etapa terminal del sistema de transferencia de  $e^-$ . La reacción es la siguiente:



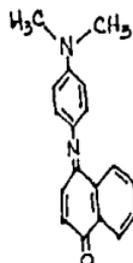
2 Citocromo C oxidado + reactivo  $\xrightarrow{\text{oxidación}}$  Compuesto coloreado



+



$\xrightarrow{\text{oxidación Citocromo c}}$



Dimetil-p-fenilendiamino  $\alpha$ naftol

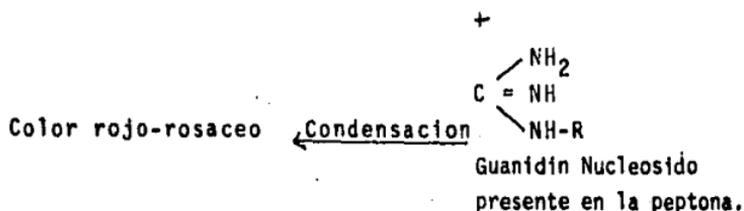
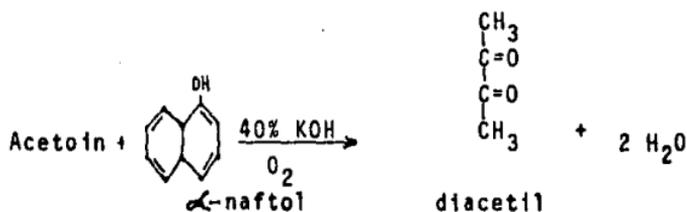
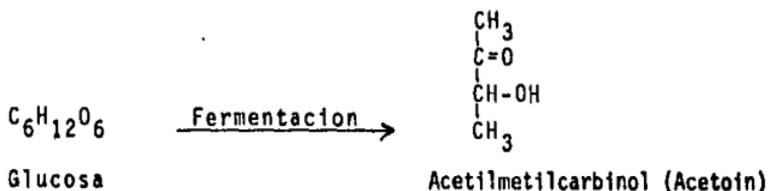
Indofenol Azul

- **Técnica:** En un papel filtro se coloca una colonia X y se le añade 1 gota de cada uno de los reactivos.

- Interpretación: Una coloración azul intenso es positiva.

### VOGUES-PROSKAUER.

- Fundamento: El ácido pirúvico componente fundamental en la degradación fermentativa de la glucosa, es metabolizado luego a través de varias vías, de acuerdo con los sistemas enzimáticos que poseen las diferentes bacterias. Una de muchas vías lleva a la producción de acetofna que en presencia de oxígeno y de hidróxido de potasio al 40% se convierte en diacetilo, y el alfa-naftol actúa como caralizador para revelar un complejo de color rojo.

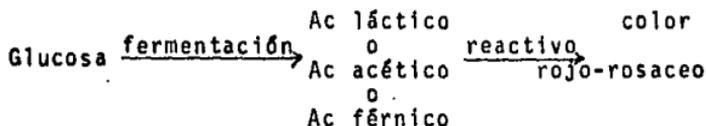


- Técnica: Inocular un tubo de caldo RM/VP con un cultivo puro del organismo en estudio. Incubar durante 24 horas a 35°C. Al finalizar el período, transferir - 1.0 de caldo a un tubo de ensayo limpio. Añadir 0.6 ml de naftol al 5% y 0.2 ml de KOH al 40%. Agitar el tubo cuidadosamente para exponer el medio de oxígeno atmosférico y dejarlo reposar durante 10-15 min.

- Interpretación: Una prueba positiva está indicada por el desarrollo de un color rojo a los 15' de añadir los reactivos, revelando la presencia de diacético, producto de oxidación de la acetofna.

#### ROJO DE METILO.

- Fundamento: La prueba pone de manifiesto la producción de ácido y requiere bacterias que le formen a partir de glucosa, por la vía de fermentación ácida mixta.



- Técnica: Inocular el caldo RM/VP con un cultivo -



- Técnica: a) Inocular un tubo de caldo hipurato con el organismo por investigar. Incubar a 35° C durante 20 hrs. o más.

b) Centrifugar el medio para sedimentar las células y transferir con una pipeta 0,8 ml. - del sobrenadante claro a un tubo limpio.

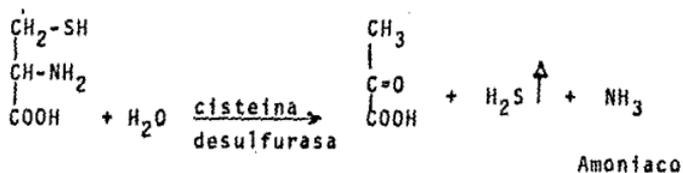
c) Añadir al tubo 0.2 ml del reactivo cloruro férrico y mezclar bien.

- Interpretación: Al añadir el reactivo cloruroférrico se forma un precipitado abundante. Si la solución se aclara dentro de 10 min., la reacción es inespecífica debido a la interacción con el hipurato no hidrolizado o la proteína del medio. Si el precipitado persiste más de 10 min. es que se ha formado benzoato de sodio, indicando hidrólisis y una prueba positiva.

#### SIM.

- Fundamento: Este es un medio combinado en el cual se observa la producción de sulfuro de hidrógeno, indol y motilidad.

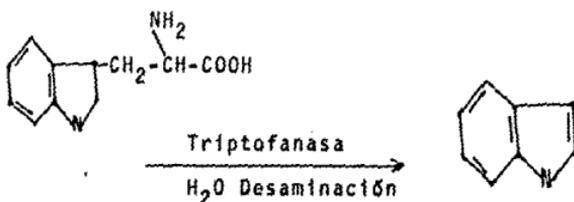
Sulfuro de hidrógeno: Para determinar si el H<sub>2</sub>S puede ser liberado por acción enzimática utilizando aminoácidos con azufre produciendo una reacción visible de color negro.



Cisteina

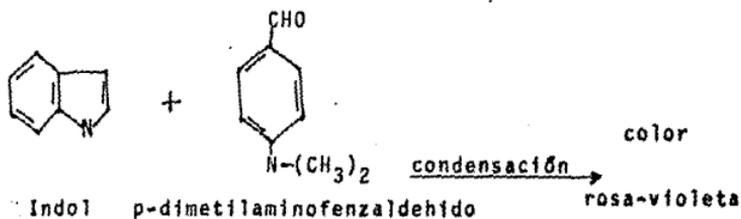
Ac piruvico Sulfuro de  
Hidrogeno

**Indol:** Se determina la habilidad de algunos organismos de separar el indol de la molécula de triptofano.



Triptofano

Indol



**Motilidad:** Para determinar si el organismo es móvil o inmovil.

- Técnica: a) Inocular un tubo con medio de SIM, por picadura. Incubar a 37°C durante 24 hrs.

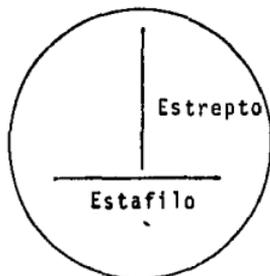
b) Después de observar la motilidad y la producción de H<sub>2</sub>S, se le añaden unas gotas del reactivo de Ehrlich, por la pared interior del tubo.

- Interpretación: La aparición de un precipitado negro en el fondo del tubo indica una prueba positiva para H<sub>2</sub>S.

El desarrollo de un vivo color rosa sobre el medio indica la presencia de Indol. El enturbiamiento - alrededor de la picadura señala que la bacteria es móvil.

#### CAMP

- Fundamento: La actividad hemolítica de la -lisina estafilocócica sobre los eritrocitos se ve intensificada por un factor extracelular producido por estreptococos del grupo B, llamado factor CAMP. Por lo tanto, toda vez que dos reactantes se superponen en una placa de agar sangre ovina se advierte una intensificación de la reacción β-hemolítica.



- Técnica: La prueba se realiza trazando una estría de estreptococos (por identificar) en forma perpendicular a otra estría de una cepa de Staphylococcus aureus conocida como productora de  $\beta$ -lisinas. Ambas líneas no deben tocarse. Las placas inoculadas se deben incubar en atmósfera ambiente. Si bien la incubación en un frasco con vela puede acelerar la reacción se observan más estreptococos grupo A falsos positivos.

- Interpretación: La zona de intensificación de lisis asume la forma de una cabeza de flecha en la intersección de ambas estrías.

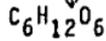


FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS.

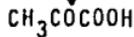
- Fundamento: Para determinar la capacidad de un organismo de fermentar o degradar un carbohidrato específico incorporado al medio produciendo sólo ácido o acompañado de producción de gas.

## CARBOHIDRATO

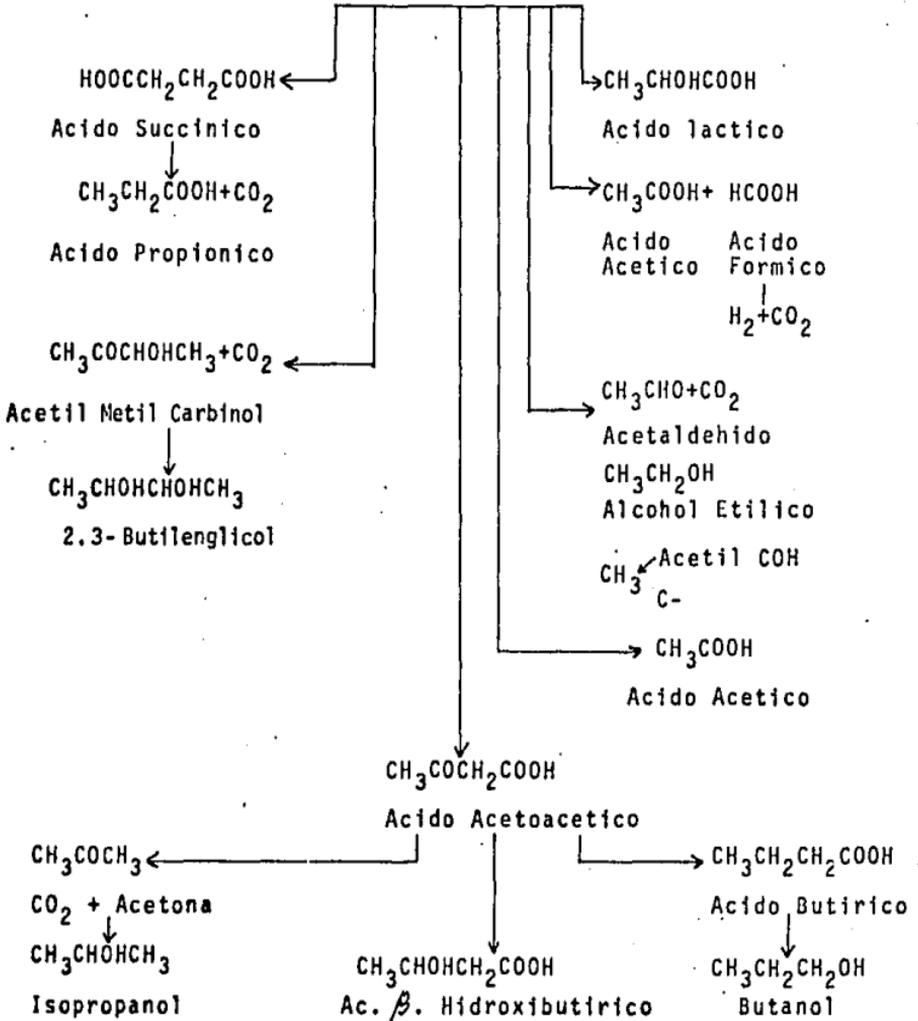
DISACARIDO, TRISACARIDO, POLISACARIDO



Glucosa



Acido Piruvico



- Técnica: Los caldos se inoculan por ag  
tación, tomando una muestra de la cepa problema. Inme  
diatamente incubar a 37° C por 24 hrs.

- Interpretación: La prueba es positiva -  
cuando hay un viraje del indicador hacia el amarillo-  
debido a la acidez producida cuando la bacteria utili  
za el Carbohidrato, y es negativa al virar a rosa a -  
causa de la alcalinidad del medio.

ESTR  
SUN  
OF  
LA  
BIBLIOTEC  
ESTR  
TESIS  
NO  
BIBLIOTEC  
ESTR

RESULTADOS

El presente estudio se realizó en cien muestras obtenidas de pacientes que se presentaron con cuadro avanzado de caries dental, los pacientes fueron en su totalidad adultos de ambos sexos, los cuales en su mayoría requirieron que su pieza fuera extirpada.

Del total de siembras realizadas se observó que 12 cepas presentaban morfología bacilar.

En el resto de la población se logró aislar cepas con agrupación típica de estreptococo, las cuales presentaron -hemólisis en agar sangre. A estas cepas se les hicieron las pruebas bioquímicas para su clasificación, de donde se obtuvieron 30 cepas pertenecientes a Streptococcus mutans, 23 de S. sanguis, 5 de S. milleri, 18 de S. salivarius, 12 de S. mitior. Lo anterior se ejemplifica en la fig. 1.

En base al total de Estreptococos corresponden los siguientes porcentajes, ver fig. 2.

Las siembras que se realizaron en la composición del medio propuesto no fueron aisladas de la manera esperada, ya que la hemólisis no era del todo clara, aunque el aislamiento sí fue adecuado.

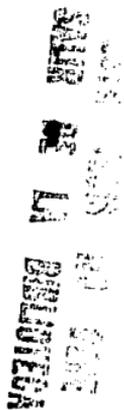
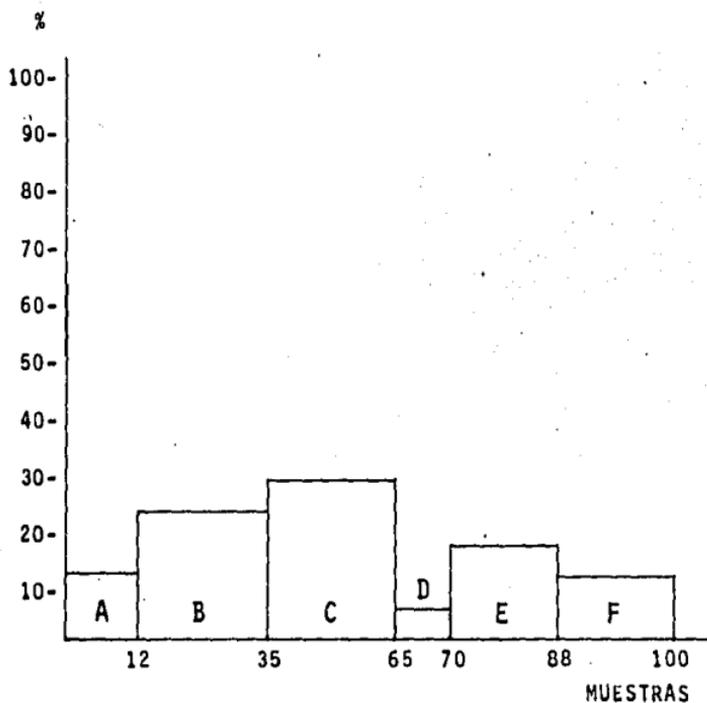


Fig. 1

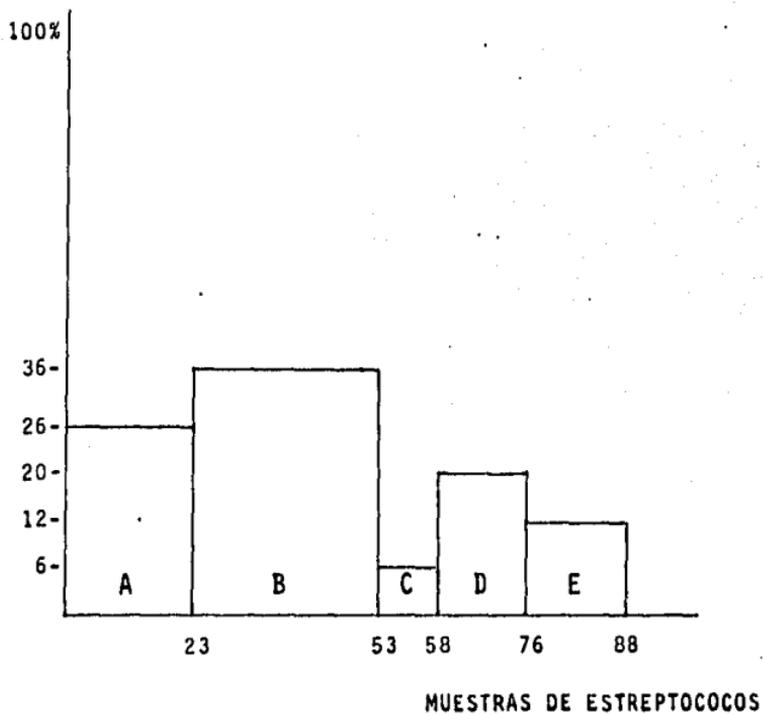
GRAFICA DE RESULTADOS GLOBALES  
ENCONTRADOS COMO FLORA  
CAUSANTE DE CARIES  
DENTAL.



- A Bacilos sin identificar  
 B *S. sanguis*  
 C *S. mutans*  
 D *S. milleri*  
 E *S. salivarius*  
 F *S. mitior*

Fig. 2

PORCENTAJES CORRESPONDIENTES AL TOTAL DE ESTREPTOCOCOS CAUSANTES DE CARIES DENTAL.



- A *S. sanguis*
- B *S. mutans*
- C *S. milleri*
- D *S. salivarius*
- E *S. mitior*

## CONCLUSIONES

Haciendo una comparación entre los resultados de este estudio con los obtenidos en otras investigaciones, en donde se observa que los Estreptococos están presentes en un numeroso grupo de personas con caries dental, y que el de mayor porcentaje encontrado es S. mutans, vemos que ambos son semejantes en sus resultados, ya que el obtenido en éste fué de un 88% para Estreptococos de los cuales un 36% corresponde a S. mutans, siendo el mayor dentro del grupo.

Por lo general la caries en la microbiología pasa a segundo término restándosele la importancia que debiera tener, después de lo experimentado observamos que ocupa un lugar muy importante dentro de las infecciones estreptococicas.

Con respecto a que la combinación de Estreptocel Agar con sangre de carnero desfibrinada, no nos dió un buen resultado, para obtener al mismo tiempo un mejor aislamiento y observación de hemólisis, seguramente fué porque la Azida de Sodio que contiene el Agar-Estreptocel interfiere en la lisis de los eritrocitos, por lo tanto creemos que este medio no es adecuado para el fin que se propuso.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Seltzer Samuel. Endodoncia. Argentina. Edit. Mundi S.A.I.C. y F. 1979.
- 2.- A. Nolte W. Microbiología Odontológica. 3a. Edición. México, D.F., Edit. Interamericana-1982.
- 3.- W. Burnett George, S. Schuster George. Microbiología Oral y enfermedad infecciosa. Buenos Aires, Argentina, Ed. Médica Panamericana 1982.
- 4.- M. Silverstone L., W. Johnsen N., M. Hardie J., D. Williams R.A. Caries Dental etiología, patología y prevención. México, D.F. Edit.-Manuel Moderno, 1985.
- 5.- W. Koneman Elmer, D.Allen Stephen., Dowell V.R., M. Sommers Herbert., Diagnóstico Microbiológico. Buenos Aires, Ed. Médica Panamericana, 1983.
- 6.- W. Ross P., P. Holbrook W., Microbiología Bucal y Clínica. México, D.F. Ed. Científica PLM.-1985.
- 7.- Takada Kasuko, Ikeda Tadashi, Mitsui Isamu, Shio-ta Tetsu. Mode of Inhibitory Action of a Bactericin Produced by Streptococcus mutans. C3603. Tokyo Japón. Infection and-Immunity, 1984.
- 8.- Huerta Miranda Jorge Dr., Microbiología de la ca\_

ries dental. Viña del Mar, Chile. Departamento de Odontología Experimental. 1981.

- 9.- Palestein Helder W.H., El papel de la flora microbiana en la enfermedad parodontal. - Holanda, 1981.
- 10.-Conde González Carlos Q.B.P. Streptococcus mutans como un modelo de relación huésped-parásito. Boston, 1982.
- 11.-Schuster George S., Oral Microbiology and Infectious Disease. D.D.S., Ph. D. Second Student Edition. Baltimore. 1983.
- 12.-A. Freeman Bob Dr., Tratado de Microbiología de Burrows. México, D.F. Ed. Interamericana, 21a. Ed. 1983.
- 13.-Davis, Dulbecco. Eisen, Wood. Tratado de Microbiología. 2a. Ed. México, D.F. Salvat Editores, S.A., 1980.
- 14.-Mazur Abraham Dr., Harrow Benjamin Dr., Bioquímica Básica. 10a. Edición. México, D.F. Ed. Interamericana, 1975.
- 15.-R. Mc Ghee Jerry., Michalek Suzanne., H.C. assell Gail., Philadelphia., Ed. Harper & Row, Publishers, 1982.