



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

**“COMPARACION ENTRE DOS MEDIOS BACTERIOLOGICOS
PARA EL AISLAMIENTO DE: STREPTOCOCCUS MUTANS”**

T E S I S

MARIA FELICITAS ORTEGA SALAZAR

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

1 9 8 3



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

INDICE

	PAGINAS
INTRODUCCION _____	1
GENERALIDADES _____	2
I) Teoría sobre la caries _____	5
II) Curva de Stephan _____	9
III) Vacuna contra la caries dental _____	13
IV) Caracterización de <u>Streptococcus mutans</u> _____	17
V) Evidencias clínicas de <u>Streptococcus mutans</u> como _____ agente etiológico de caries dental _____	22
VI) Microbiología de la caries dental _____	29
MATERIAL Y METODOS _____	38
RESULTADOS _____	51
CONCLUSIONES _____	65
BIBLIOGRAFIA _____	66

INTRODUCCION

Uno de los principales problemas de la población humana, que mayor número de incidencia presenta es la caries dental.

El agente etiológico Streptococcus mutans es capaz de producir lesiones severas sobre las piezas dentarias, ocasionando una destrucción parcial ó total de las mismas, obligando de alguna manera la extracción de la pieza afectada para evitar infecciones que puedan alterar el estado de salud del individuo. En la actualidad se ha visto que la prevención radica en la limpieza dental y debido a esto los investigadores sugieren una protección inmune contra el fenómeno cariogénico mediante la elaboración de una vacuna, seleccionando dentro de los distintos antígenos bacterianos propuestos como inmunógenos aquellos que faciliten su producción. Es por ello que cobra importancia el aislamiento de diferentes variedades de Streptococcus mutans.

De los medios de cultivo más usados para el aislamiento de colonias de Streptococcus mutans se tiene al MS (mitis-salivarius-agar), y actualmente se ha propuesto un nuevo medio selectivo que se le conoce como MSFA (manitol-sorbitol-fucsina-azida), que permite un mayor porcentaje de aislamiento y recuperación de colonias, principalmente aquellas que se encuentran clasificadas dentro del grupo Viridans alfa.

Streptococcus mutans es poseedor de mecanismos patógenos específicos, los cuales se manifiestan bajo un carácter que bien podríamos calificar de oportunista. En última instancia la caries resulta de la acción fermentativa polimicrobiana ligada a la placa dental.

El objetivo de este trabajo, es el de llevar a cabo la comparación en cuanto a porcentaje de aislamiento y recuperación de Streptococcus mutans en los medios MS y MSFA, en muestras de placa dental y lesiones cariosas en niños de la escuela primaria Ejercito Nacional Cipilco.

GENERALIDADES

La caries dental es un problema de salud, que afecta a casi toda la humanidad. Se considera una enfermedad infecciosa y multifactorial que afecta a los tejidos calcificados del diente y que se caracteriza por la destrucción de ellos, comenzando en su superficie y progresando hacia el interior u órgano nucle llamado pulpa dentaria. La destrucción implica la descalcificación de la porción inorgánica o calcificada de estos tejidos duros en primera instancia y la posterior desintegración de la sustancia orgánica que los forma. (32)

Se han llevado a cabo varios estudios sobre caries dental con el fin de demostrar que el principal agente causal es Streptococcus mutans; microorganismo cariogénico que ha sido aislado de las lesiones cariosas utilizando medios selectivos especiales tal como el MS (mitis-Salivarius agar) muchos estudios mas han corroborado su patología y virulencia que le caracteriza.

Actualmente se considera al Streptococcus mutans como el grupo de estreptococos que tienen mayor relación con la caries dentaria sobre todo en las superficies lisas.

Streptococcus mutans pertenece a la familia Streptococcaceae representada por estreptococos anaerobios facultativos gram positivos no esporulados. Se encuentra dentro del grupo viridans alfa junto con otros estreptococos como son:

Streptococcus faecalis, Streptococcus salivarius, Streptococcus anginosus, Streptococcus sanguis y Streptococcus mitis. Los estreptococos se encuentran relacionados con una gran variedad de enfermedades entre las que se encuentran la erisipela, las infecciones focales, la endocarditis bacteriana, la faringitis, etc. El sólo enunciado de estas enfermedades basta para comprender la importancia que los estreptococos tienen en la patología humana, recordando que el hombre es el huesped más susceptible para uno de los grupos

mas importantes de estreptococos. (31)

Así pues la caries dental es una enfermedad de origen bacteriano en -- los tejidos duros del diente y ocurre específicamente en sitios localizados de la dentición. Estos sitios son en orden de importancia las fosetas y fisuras de la superficie oclusal del diente, las superficies proximales que -- ponen en contacto a uno y a otro diente y finalmente las caras bucal y pala-- tina de los dientes. Mientras el área localizada sea un área retentiva tan-- to de alimentos como de placa dentobacteriana y esté a salvo de la acción -- limpiadora de la saliva, de la lengua y de la musculatura oral así como mu-- chas veces de la propia higiene y cepillado bucales cuanto más va a repre-- sentar un área susceptible para el desarrollo propicio de las condiciones -- conducentes a una caries dental. Las fisuras y fosetas de los dientes son sitios anatómicos que retendrán alimentos de la dieta principalmente aque-- llos que contengan sacarosa u otro tipo de azúcares ya sea monosacáridos o disacáridos con propiedades cariogénicas. A su vez estas retenciones favo-- recen y protegen el desarrollo bacteriano y concentran la producción de -- ácido de la placa dentobacteriana iniciándose así la disolución del diente.

(61)

TEORIAS SOBRE LA CARIES

ASPECTOS GENERALES

AGENTE ETIOLOGICO DE LA CARIES
DENTAL.

ESTUDIOS EN ANIMALES PARA DE--
TERMINAR LA INVOLUCRACION DE
BACTERIAS CARIOGENICAS.

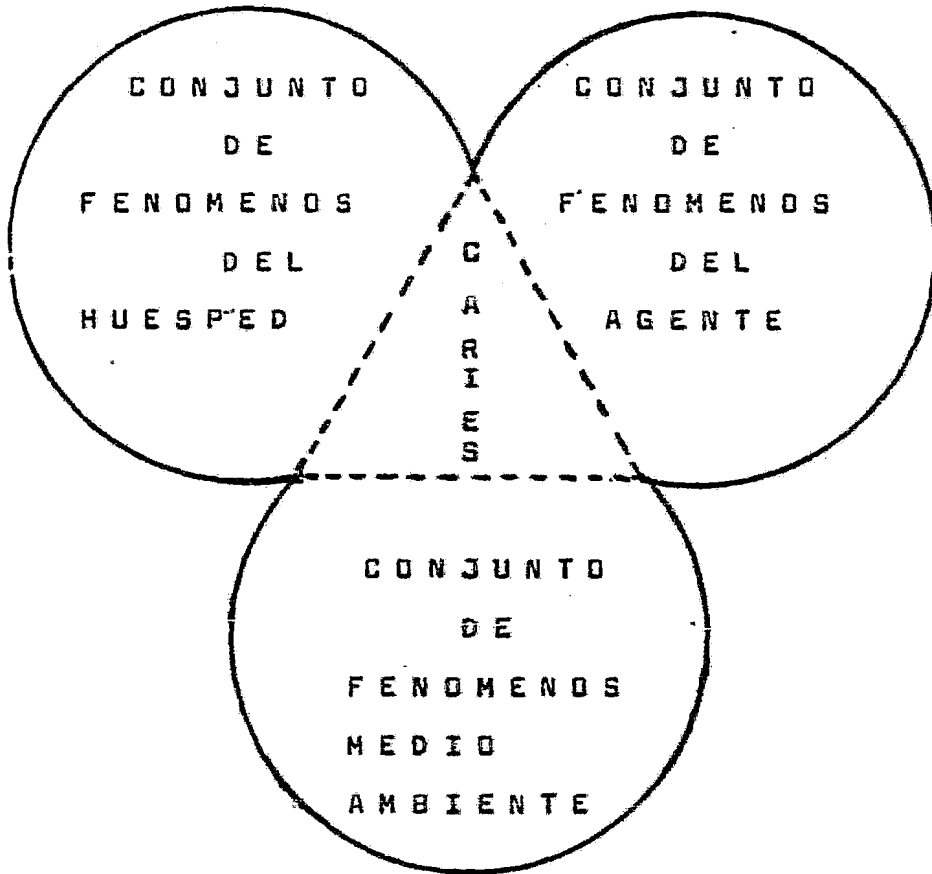
TEORÍAS SOBRE LA CARIES

Sin entrar en un mayor detalle, sobre la historia de las teorías de la iniciación y progresión de la caries mencionaremos simplemente que desde -- 1890 el doctor Miller propuso la teoría acidogénica. (61)

Esta teoría, que es la que actualmente prevalece explica que la iniciación de la caries, sobre todo en los sitios de mayor frecuencia se debe a la transformación de los carbohidratos principalmente la sacarosa y otros retenidos en las fisuras y fosetas de los dientes los cuales son transformados principalmente a ácido láctico. Esta producción de ácido descalcifica el esmalte. Existen otras teorías acerca de la iniciación de la caries como son la teoría proteolítica y la teoría proteolítica quelatoria, ambas se refieren en cierta manera, a que antes de la disolución del mineral del esmalte, es necesario que exista una degradación de las proteínas interprismáticas que en pocas cantidades posee el esmalte. Estas teorías no fueron avaladas por evidencia ni del laboratorio ni de la clínica, por lo que continúa prevaleciendo la teoría acidogénica.

La unión de tres grandes conjuntos de factores son necesarios para poder producir caries dental y a estos tres grupos de factores los representamos como:

(TEORIA SOBRE LA CARIES)



AGENTE CAUSAL DE LA CARIES DENTAL

En 1930 el agente causal ^é el microorganismo al cual se le atribuía el inicio de la caries dental era el Lactobacillus acidophilus, sin embargo actualmente se sabe que Lactobacillus acidophilus desempeña un papel importante, no en la iniciación de la lesión cariosa sino que es el responsable de la producción de ácido ya que se encuentra en un alto porcentaje en las lesiones de caries dental ya constituidas. El Lactobacillus acidophilus es una bacteria tanto acidúrica como acidogénica y es capaz de sobrevivir en un medio con pH= 5. Se ha visto que para la iniciación de caries es necesaria la formación de un conglomerado de bacterias denominada placa dentobacteriana.

El proceso de formación de la placa, ocurre de la siguiente manera: En ocasiones se han observado a las bacterias adhiriéndose directamente al esmalte, sin embargo por lo general, un esmalte limpio es cubierto casi inmediatamente por una proteína salival denominada película adquirida y junto con esta se adhieren ciertos microorganismos de la saliva (42). Después de que estos microorganismos invaden esta película adquirida otros microorganismos se depositan y se adhieren a los organismos que colonizaron primero la película y, de esta forma con un depósito abundante de bacterias y proteínas de la saliva se forma una masa y un conglomerado de bacterias denominado placa dentobacteriana.

La placa dentobacteriana consiste principalmente en su etapa inicial, de cocos gram positivos, y más tarde en su fase de maduración a los 7 días, se incluyen elementos gram negativos. Un análisis bacteriológico de la placa dentobacteriana nos lleva a la recuperación de 27 variedades de microorganismos que han sido aislados de la placa, que también contiene células epiteliales y algunos leucocitos. La cuenta microscópica de bacterias es de -

2.5×10^{11} bacteria/ gramo sin embargo la cuenta total cultivable de estas bacterias es de solamente de 7.1×10^{10} microorganismos por gramo. - Esta observación nos sugiere que al menos una porción importante de las bacterias en la placa están muertas ó si estan viables no han podido ser recuperadas en los medios de cultivo usados. La distribución por porcentajes de los organismos cultivados de la placa permanecen más o menos constantes y es la siguiente:

Nos. presentes en placa dentobacteriana / de microorganismos	
Estreptococos facultativos	27
Dipteroides facultativos	23
Dipteroides anaeróbicos	18
Peptoestreptococos	13
Veillonella	6
Bacteroides	4
Fusobacteria	4
Neisseria	3
Vibrio	2

Sin embargo los lactobacillus en la placa constituyen menos del 0.01 % y es evidente que desempeñan un papel mínimo en la caries dental. (23).

La gran mayoría de estreptococos de la cavidad oral pertenece al tipo de los viridans (17). Todos estos estreptococos han sido probados en estudios relacionados con caries dental con excepción de Streptococcus pneumoniae. El mejor correlacionado de todos es Streptococcus mutans que manifiesta un comportamiento similar al Lactobacillus acidophilus en cuanto a su capacidad tanto acidúrica como acidogénica, aunque en menor grado que el lactobacilo (12). Los restantes estreptococos orales, no crecen

a un pH tan bajo como lo hace Streptococcus mutans.

Además de la propiedad de producir ácido el Streptococcus mutans sintetiza grandes cantidades de polisacáridos intracelulares y extracelulares; los intracelulares le sirven de nutrientes, cuando estos se encuentran en baja concentración y los extracelulares como un medio de adherencia a diversas superficies como por ejemplo la de los dientes, las superficies del tubo de ensayo ó alambres de níquel ó de cromo. Éstos polisacáridos extracelulares están constituidos por dextranas ó por levanas. El Streptococcus mutans obtiene estos polímeros metabolizando los azúcares (sacarosa, fructosa y glucosa), los cuales atraviezan la membrana mediante una fosfotransferasa asociada a membrana dependiente de fosfoenolpirúvico como donador de fósforo, y la síntesis ulterior de los polisacáridos glucanas y fructanas (se puede llamar levanas) se verifican por la acción enzimática en placa por glucosiltransferasa o fructosiltransferasa respectivamente, las glucanas son de importancia crítica en la formación de la placa dental y en la patogénesis de la caries dental (por ser insoluble en agua), la fracción glucosa alfa (1-3) y se adhieren a la superficie sólida cuando son sintetizadas de novo. (11).

ESTUDIOS EN ANIMALES PARA DETERMINAR LA INVOLUCRACION DE BACTERIAS CARIOGENICAS.

Una serie de experimentos importantes han proporcionado conclusiones valiosas como por ejemplo, se determinó que para la iniciación y progreso de caries es necesario la participación de un agente causal esto fue comprobado en una serie de estudios con ratas gnotobióticas alimentadas con una dieta cariogénica rica en azúcares. Las ratas no desarrollaron caries dental ni siquiera a nivel microscópico, sin embargo los testigos -- que fueron no gnotobióticas, desarrollaron extensas cavitaciones en sus dientes, lo que nos comprueba que para que se produzca caries necesitamos la intervención de microorganismos cariogénicos.

Aunque el Lactobacillus acidophilus fue capaz de producir caries dental, en animales gnotobióticos es de señalarse que la virulencia del organismo cariogénico estaba relacionada, no solo con la producción de ácido, sino también que existió una correlación muy importante entre la cantidad de formación de placa "in vitro" y la capacidad del organismo de producir extensas caries en los animales gnotobióticos. Entonces mientras más placa producía el organismo "in vitro", más virulento era en animales gnotobióticos, tal fue el caso de Streptococcus mutans.

CURVA DE STEPHAN

El pH en la placa puede ser medido con relativa facilidad, por medio de microelectrodos de antimonio (38, 50, 51), ó de vidrio (9).

Cuando la boca se enjuaga con una solución de glucosa al 10%, y se mide el pH por aproximadamente una hora, después de haberse enjuagado, la curva de pH presenta las características que se muestran en la figura 1. Esta curva es conocida como curva de Stephan.

De la glucosa empleada en la solución al 10%, parte de esta se diluye en saliva y parte penetra a la placa bacteriana, la fracción que penetra a la placa es rápidamente metabolizada a ácido difundiendo muy lentamente

a través de la matriz de la placa, hacia la saliva por lo tanto se concentra ácido en la placa y el pH empieza a descender (38).

Si la placa es expuesta, a una concentración mayor de carbohidratos entonces el pH disminuirá aún más, manteniéndose así por un tiempo mayor (figura 2). Se ha visto que el pH de la placa bacteriana está condicionado a la cantidad de carbohidratos disponibles por unidad de tiempo y viene siendo, numéricamente el producto de la concentración del carbohidrato, por la duración de la exposición de la placa a ese carbohidrato (37) Otro factor muy importante es la solubilidad del carbohidrato en cuestión. La glucosa, es muy soluble y penetrará a la placa fácilmente, en cambio el almidón que es mucho menos soluble tendrá una menor influencia en el pH de la placa. Sin embargo, en algunas personas esto puede resultar nocivo, ya que para descalcificar la raíz del diente, no se necesita tanta acidez como para descalcificar el esmalte, entonces aunque el carbohidrato sea poco soluble y el pH baje relativamente, también puede llegar a producir caries del cuello de los dientes en su porción radicular.

Una vez que todo el carbohidrato que ha penetrado a la placa, ha sido metabolizado el pH vuelve a subir. La saliva juega un papel muy importante en mantener el pH, a niveles menos dañinos como se muestra en la figura 3. (15, 36). La forma en la que va a actuar el ácido, sobre las estructuras del diente, depende de la solubilidad de estas, de si se ha ingerido -- fluor durante su desarrollo, ó ha tenido aplicaciones tópicas de fluoruro entonces, se formará primero fluoruro de calcio y después fluorapatita la cual es menos soluble que la hidroxiapatita, estructura inorgánica natural del diente humano; la solubilidad de la hidroxiapatita aumenta notablemente a un pH de 5, denominado también pH crítico (36). Sin embargo una vez que el esmalte ha sido destruido por el ácido, se pueden encontrar a más profundidad en el diente, relaciones de Ca/ P mas bajas que de 10/6 y estas naturalmente son más solubles.

FIG. 1 CURVA DE STEPHAN

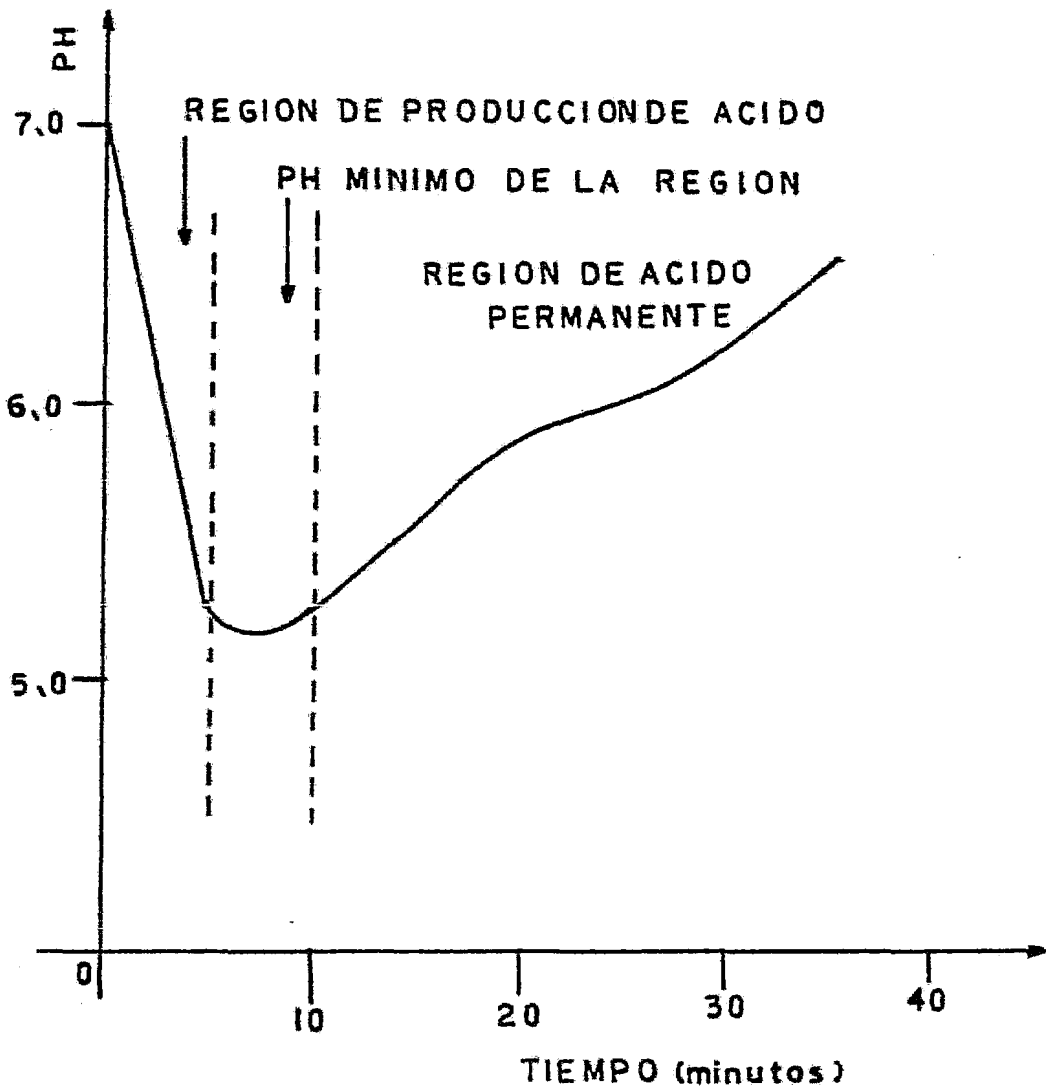


FIG.2 LAS CURVAS 1,2,3Y4 MUESTRAN LOS EFECTOS EN EL PH CUANDO LA DISPONIBILIDAD DE LA GLUCOSA AUMENTA CON EL TIEMPO

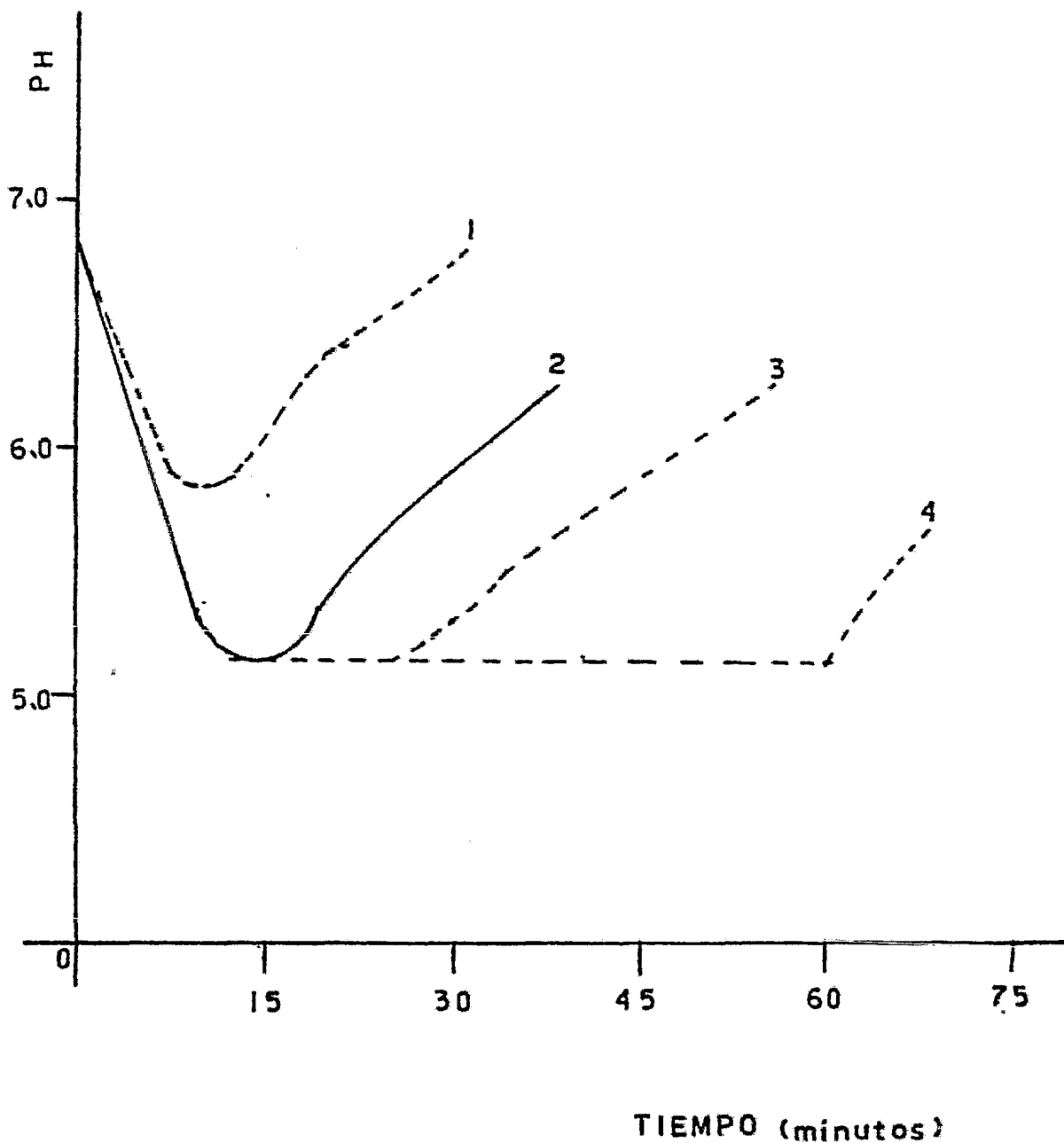
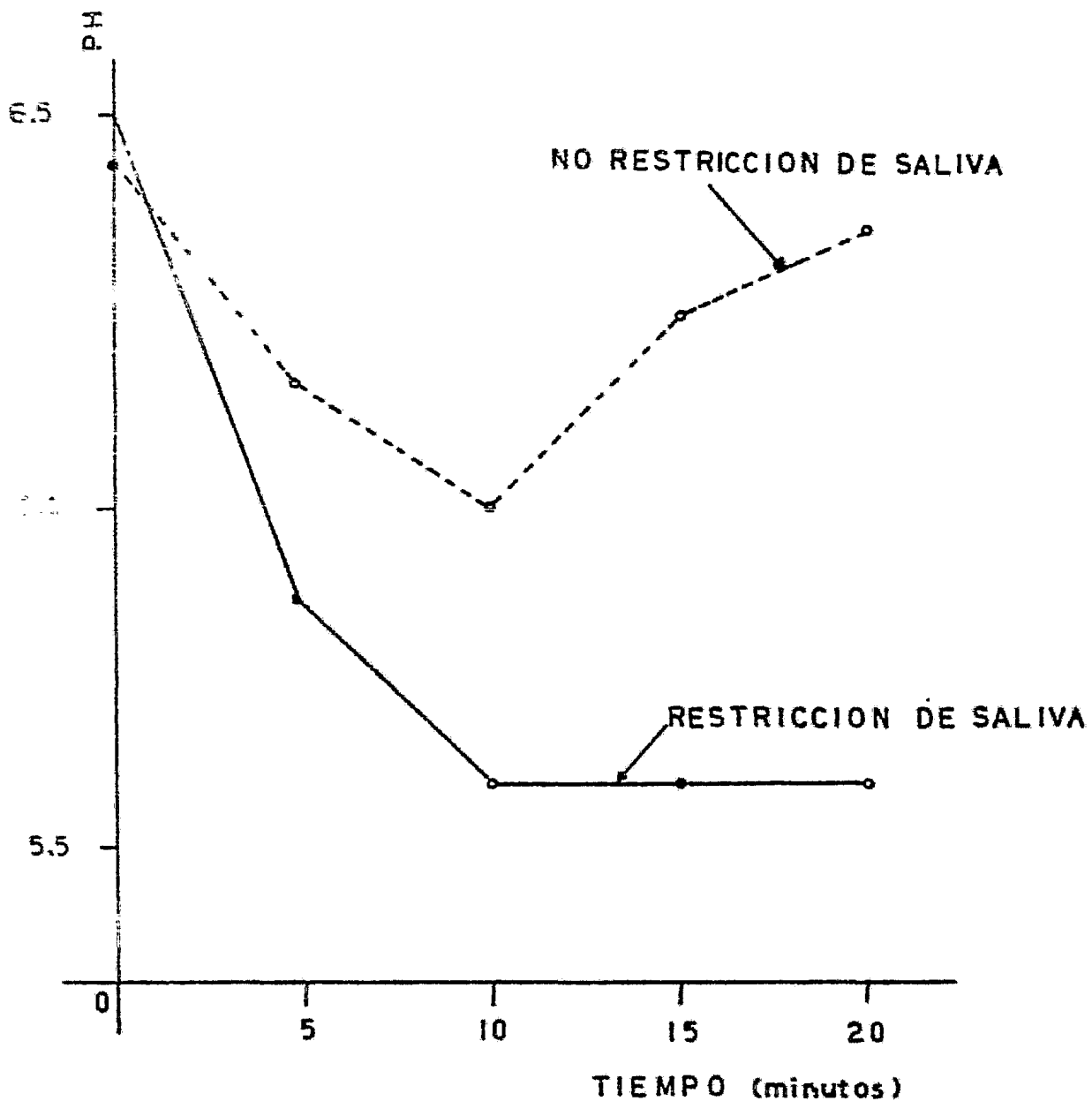


FIG. 3 INFLUENCIA DE LOS AMORTIGUADORES SALIVALES SOBRE EL PH DE LA PLACA



TRANSFORMACION Y DISOLUCION DE COMPUESTOS

La placa posee dos propiedades con respecto al ácido que produce:

- 1) Lo contiene en alta concentración, y permite su producción en grandes cantidades, en un período relativamente corto (39,50).
- 2) La difusión de estas sustancias a través de la matriz de la placa es relativamente lenta, de tal manera que el ácido formado necesita un período relativamente largo para difundirse a la saliva, donde existen ciertos amortiguadores que controlan su pH, y con lo cual el ácido se acumula en la placa y baja su pH.

VACUNA CONTRA LA CARIES DENTAL

INMUNIZACION EFECTIVA CON ANTIGLUCOSIL
TRANSFERASA EN *Macacus irus*.

ENSAYO DE GLUCOSILTRANSFERASA EN SERES
HUMANOS.

PREPARACION DE UNA VACUNA CONTRA CARIES
DENTAL EN MEXICO.

INMUNIDAD EFECTIVA CONTRA CARIES EN RA
TAS GESTANTES.

VACUNA CONTRA LA CARIES DENTAL

Se han efectuado gran número de experimentos con el objetivo de encontrar una vacuna contra la caries dental, y en ocasiones se han obtenido resultados alentadores por un lado y dudosos por otra parte en animales de experimentación.

Se han identificado cuatro tipos antigénicos (I, II, III, IV) --- además del serotipo C para el Streptococcus mutans. Los microorganismos muertos, destruidos o bien sus productos metabólicos se han usado como vacunas. Miranda (32) cita que Wagner en Estados Unidos de Norteamérica ha encontrado que las ratas inunizadas con Streptococcus faecalis desarrollan mucho menos caries que los animales no inunizados utilizados como control; Cohen en Inglaterra al trabajar con 4 monos (Macacus irus) desarrolló una vacuna contra el Streptococcus mutans, habiendo obtenido resultados sumamente alentadores en cuanto a una drástica reducción en el número de caries dentaria comparadas con un grupo control y los trabajos --- efectuados por Hayashi, Challacombe y Lehner, reportan que al vacunar a individuos (con caries activa) con una preparación de glucosiltransferasa de Streptococcus mutans presentaron altos niveles de anticuerpos - - - - anti-glucosiltransferasa en el suero y niveles medios en saliva, mostrando se una disminución del número de caries dentales.

Existen 2 glucosiltransferasas en Streptococcus mutans:

GLUCOSILTRASFERASA A: enzima encargada de la síntesis de los glucanos solubles (Dextrán).

GLUCOSILTRASFERASA B: enzima encargada de la síntesis de los glucanos solubles (Leván).

Los anticuerpos antiglucosiltransferasa inhiben la capacidad de adherencia de Streptococcus mutans.

Lehner y colaboradores han observado que la presencia de caries determina un aumento de la proporción de Iga, IgG, y IgM en la saliva (31).

Sin embargo ha sido especificado por algunos investigadores que la uti

lización de vacunas contra el estreptococo no es muy aceptable ya que éste tiene antígenos comunes con algunos tejidos del organismo como son: corazón, riñón, pudiendo con esto acarrear problemas de hipersensibilidad con alteración y destrucción de estos tejidos.

PREPARACION DE UNA VACUNA CONTRA CARIES DENTAL EN MEXICO

Por otra parte Bayona en México (3), realizó un estudio para la preparación de una vacuna contra la caries, utilizando Lactobacillus acidophilus aislados de humanos, se seleccionaron un total de 7 cepas (de niños y adultos) haciendo la consideración de que los lactobacilos en contacto con la mucosa digestiva no son capaces de causar trastornos (posiblemente con excepción de la caries y eso solo cuando se encuentran vivos en la boca), el estudio pretendió plantear un procedimiento para tratar de inu-
nizar al hombre contra la caries dental (2).

Michalek y Jerry (53), citan que la administración por vía intravenosa de Streptococcus mutans inactivado en ratas gestantes 6715 mutante--C211, permite detectar una actividad de aglutininas para homólogos de ---
Streptococcus mutans en el calostro, leche y suero.

Esta actividad de anticuerpos fue asociada con la IgG ya que se presentaron títulos elevados, anti-Streptococcus mutans tanto en el suero como en la saliva de crías amamantadas por las ratas gestantes.

Otros estudios han indicado que los anticuerpos específicos de la clase IgA pueden ser inducidos por la administración oral de Streptococcus mutans además se han demostrado también en ratas lactantes niveles altos de IgG circulante. La elevación de los anticuerpos obtenidos pasivamente se correlacionó directamente con el aumento de la Ig G. Estos hallazgos apoyan las observaciones de Lehner (32) que en primates inmunizados por Streptococcus mutans aparecen anticuerpos IgG en el suero lo cual les confiere protección contra la caries. Algunos estudios indicaron que la inducción de IgA proporciona una --

respuesta inmune contra Streptococcus mutans. La inmunización de ratas gestantes en tejido mamario con Streptococcus mutans indujo una respuesta inmune secretora, que se detectó por la presencia de anticuerpos -- específicos en el calostro y leche, pudiendo estar asociada con la protección que presentan los ratones lactantes de madres con títulos elevados anti-Streptococcus mutans en suero (53).

El aspecto de la protección inmune contra el fenómeno cariogénico - requiere, desde un punto de vista ideal que dentro de los distintos - antígenos bacterianos propuestos como inmunógenos para el desarrollo de una vacuna, se cumpla con las condiciones siguientes:

- a) Inmunógeno no tóxico, ni inductor de reacciones cruzadas contra el huésped, produciendo en todo caso respuesta inflamatoria limitada y transitoria.
- b) Persistencia para inducir anticuerpos protectores eficientes.
- c) Especificidad para eliminar únicamente a los agentes responsables de la enfermedad.
- d) Habilidad para inducir básicamente anticuerpos salivales.
- e) Impedimento de bloquear el mecanismo secretor de las inmunoglobulinas o la actividad de las mismas.
- f) Capacidad para inhibir la colonización, ya sea reduciendo la adherencia y/o multiplicación microbiana. (11)

CARACTERIZACION DE STREPTOCOCCUS MUTANS

GENERALIDADES

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS

SINTESIS DE POLISACARIDOS EXTRACELULARES

RESISTENCIA A CONCENTRACIONES ELEVADAS
DE SACAROSA.

RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS

FERMENTACION DE MANITOL

ESPECIFICIDAD ANTIGENICA.

GENERALIDADES

SARRO

La formación de placas de sarro sobre los dientes parece ser un requisito para la producción de caries (31). El sarro se forma -- mediante una impregnación de la placa dental con cristales de fosfato de calcio los cuales provienen de los minerales precipitados que se encuentran en solución en la saliva (21).

El sarro está compuesto de una matriz proteica a la cual se -- incorporan partículas de alimento, residuos de mucina y células epiteliales descamadas así como también varios microorganismos y sus metabolitos, éste es permeable tanto a glucosa como a la sacarosa, y relativamente impermeable al almidón (20). Posee también sistemas enzimáticos necesarios para la conversión de carbohidratos fermentables en productos finales ácidos.

CARACTERISTICAS MORFOLÓGICAS

Streptococcus mutans es un microorganismo gram positivo, no esporulado. En MS (mitis salivarius agar) produce colonias elevadas, convexas de color azul claro de 0.5 a 1 mm de diámetro con márgenes ondulados y una estructura interna característica finamente granular, también se han identificado las variantes lisas (59).

Streptococcus mutans normalmente presenta una hemólisis tipo alfa ó gamma en gelosa sangre, sin embargo en un trabajo realizado por -- Larry W. y colaboradores se demostró la presencia de beta hemólisis , en tres cepas de Streptococcus mutans (41).

Estos estreptococos crecen en un medio que contiene NaCl al 4% no hay producción de amoniaco a partir de arginina, no llevan a cabo la hidrólisis del almidón; fermentan la inulina, la rafinosa y el sorbitol.

En caldo sacarosa se produce una dextrana precipitable con etanol ó butanol. T. Ikeda y H.J. Sandham (59), proponen un medio selectivo con grandes concentraciones de sacarosa, para la identificación de Streptococcus mutans y explican que el agar MS (mitis salivarius) con altas concentraciones de sacarosa hasta en un 40 % (p/v), es útil para el aislamiento e identificación de Streptococcus mutans en placa dental humana, este medio permite el desarrollo de pocas bacterias por lo que las cepas de Streptococcus mutans son fácilmente reconocibles.

Como prueba de su capacidad de adhesión a superficies lisas -- Streptococcus mutans tuvo un crecimiento muy adhesivo en un caldo con 5 % de sacarosa.

Streptococcus mutans posee ciertas características cariogénicas , como son por ejemplo, el de colonizar las superficies lisas de los -- dientes; siendo considerado como un microorganismo con alta capacidad acidogénica.

Las colonias de Streptococcus mutans pueden crecer en los medios de cultivo que contengan uno o varios carbohidratos, se le considera como el microorganismo más acidogénico de todos los estreptococos -- presentes en la placa dental.

Además de estas características Streptococcus mutans puede ser -- diferenciado de otras bacterias presentes en placa dental de la siguiente forma:

1) SÍNTESIS DE POLISACÁRIDOS EXTRACELULARES A PARTIR DE SACAROSA

Ciertas especies de estreptococos de la cavidad oral producen diferentes tipos de polisacáridos extracelulares a partir de la sacarosa.

En el caso de Streptococcus mutans, las glucanas producidas aumentan la capacidad de los microorganismos para colonizar al diente.

La incorporación de grandes cantidades de sacarosa en medios selectivos para estreptococos MS (mitis-salivarius) por ejemplo ó medios no selectivos MM108 (medio 10), permiten llevar a cabo la diferenciación de Streptococcus mutans en el medio, por la morfología de sus colonias (14).

2) RESISTENCIA A ALTAS CONCENTRACIONES DE SACAROSA

La elaboración de medio selectivo con 40% (p/v) de sacarosa permite detectar fácilmente las colonias de Streptococcus mutans.

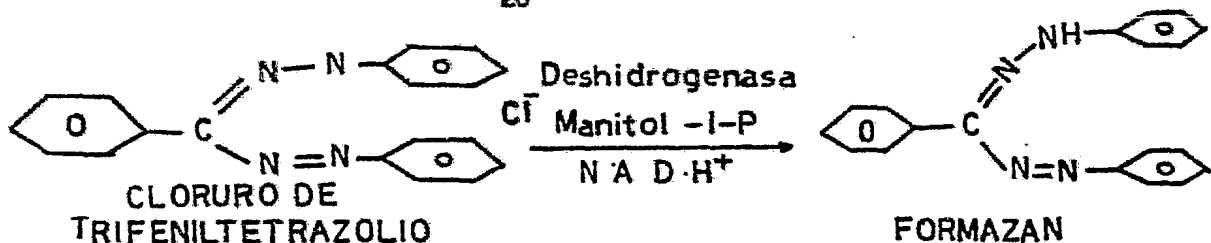
3) RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Hasta la fecha se ha aprovechado la resistencia de Streptococcus mutans a ciertos antibióticos como son: la sulfedimetina y la bacitracina los cuales adicionados al medio y en presencia de un 20 % permiten el desarrollo de estos microorganismos (59).

4) FERMENTACION DE MANITOL

A diferencia de otros estreptococos presentes en la cavidad oral Streptococcus mutans lleva a cabo la producción de ácido a partir de manitol, las colonias en el medio MS (mitis-salivarius) son rociadas con una solución de manitol y después de incubadas a 37°C durante 3hrs, son nuevamente rociadas con una solución de cloruro de trifeniltetrazolium e incubadas de nuevo, dando como resultado la aparición de un color rojo formazán. La reducción del tetrazolio se realiza por medio de la deshidrogenasa- manitol 1- fosfato que es la mediadora del catabolismo del manitol, lo cual permite la observación de colonias rosa-oscuro.

La reducción del cloruro de 2,3,5- trifeniltetrazolio se observa en la siguiente reacción:



Las muestras de placa dental pueden sembrarse también en caldos de cultivo selectivos conteniendo manitol y púrpura de bromocresol, el ácido producido por la fermentación de un hidrato de carbono da lugar a un cambio en el pH. El cambio de color debido a la acidez estará influido por el indicador de pH utilizado y las propiedades amortiguadoras del medio, esto en un término de 48 hrs, es considerado como positivo.

5) ESPECIFICIDAD ANTIGENICA

Streptococcus mutans también puede ser identificado por inmunofluorescencia, con base a la especificidad de los diferentes serotipos de Streptococcus mutans. Estos métodos no han tenido aplicación, en la investigación clínica, a pesar de facilitar la enumeración simultánea y clasificación de los serotipos de Streptococcus mutans en muestras de placa ya formadas. Otro beneficio sería, para determinar la historia de la infección clínica con Streptococcus mutans involucrando la cuantificación de anticuerpos de los pacientes con antecedente antigénico de este microorganismo.

Streptococcus mutans se distingue de otras bacterias primordialmente por su capacidad de enlazarse a la glucosiltransferasa por intermedio de glucana integrada a proteínas superficiales de su pared celular. Aunado a esto, cepas de Streptococcus mutans son aglutinadas ante la adición de dextranas con alto peso molecular; sin embargo no hay relación con la adherencia inducida por glucosiltransferasa y sacarosa, después de observarse que mutantes no adherentes se aglutinan con las dextranas sin producir caries y que también hay cepas sin la capacidad de aglutinación pero con propiedades adherente y cariogénica intactas. (11)

EVIDENCIAS CLINICAS DE S. MUTANS EN
CARIES DENTAL.

ENSAYOS

PORTADORES SANOS DE S. MUTANS (Gran
des Lagos ILLINOIS).

ASOCIACION DE S. MUTANS A LESIONES -
CARIOSAS EN DIENTES HUMANOS.

ESTUDIO "IN VITRO" ADHERENCIA DE --
S. MUTANS EN SALIVA.

AISLAMIENTO Y TIPIFICACION DE S. MUTANS
EN LESIONES ACTIVAS.

AZUCAR DE ACOPLAMIENTO EFECTO EN ACTI
VIDAD METABOLICA Y CARIOGENICIDAD.

VIRULENCIA (L. casei y S. mutans) -
EN RATAS GNOTOBIOTICAS.

ENSAYO CON PORTADORES SANOS (GRANDES LAGOS ILLINOIS)

Diversas investigaciones han correlacionado al Streptococcus mutans con la caries dental, (30). Harris J. Keene e Irving L. Shklair en un año de estudio en jóvenes reclutas de la escuela naval de (Grandes Lagos, Illinois), confirmaron el estado de portador de Streptococcus mutans en caries dental mediante evidencia clínica y radiográfica, a partir de muestras tomadas de la placa dental en tres sitios diferentes, considerados -- clínicamente sanos: oclusal, proximal y bucolingual en los 4 cuadrantes molares derechos e izquierdos, de maxilar y mandíbula.

Encontrándose Streptococcus mutans en las muestras de placa de 17 individuos durante el examen inicial (Portadores). Los 4 jóvenes restantes fueron considerados como (no portadores).

El estudio se continuó practicando con exámenes periódicos a los 17 portadores, en los cuales se obtuvieron siempre resultados positivos.

Tipo de caries en un año	No. de portadores de <u>Streptococcus mutans</u> .	No. de no portadores de <u>Streptococcus mutans</u> .	Total
Presencia de caries	10	0	10
Ausencia de caries	7	4	7
Total	17	4	21

Además fué reportado que 10 de los 17 portadores de Streptococcus mutans desarrollaron más de una lesión cariosa. No se observó ninguna lesión en los individuos considerados como (no portadores).

De esta manera se proporciona evidencia de una asociación entre Streptococcus mutans y la iniciación de caries dental en humanos.

ASOCIACION DE STREPTOCOCCUS MUTANS A LESIONES CARIOSAS EN DIENTES HUMANOS

Kirek C. Hoerman y colaboradores estudiando muestras de placa obtenidas de superficies interproximales y de escoraciones en 164 jóvenes, encontraron en un 72% de la población colonias de Streptococcus mutans. La presencia de caries interproximales no fueron clínicamente evidentes en el primer molar. Las muestras de placa fueron sembradas en MS (mitis-salivarius agar) incubadas a 37 C por 24 hrs con una atmósfera de 95% de N₂ y 5% de CO₂. (35). La asociación con lesiones cariosas en superficies interproximales se presenta en un bajo porcentaje.

ESTUDIO "IN VITRO" SOBRE ADHERENCIA DE STREPTOCOCCUS MUTANS EN SALIVA.

Birgitta Köhler, Krasse y Carlen realizaron un estudio "in vitro" para observar la transmisión de Streptococcus mutans a los niños por medio de sus madres, detectándose por inmunofluorescencia el serotipo C en muestras de saliva. (5). Se observó baja adherencia en algunas de las pruebas con niños altamente infectados por sus madres.

Streptococcus mutans es adquirido tempranamente después del nacimiento del primer diente, siendo la madre una de las principales fuentes de infección para los niños. Köhler, B., y D. Bratthall citan en su trabajo que el hijo no siempre es infectado, pero generalmente la madre es la portadora de Streptococcus mutans encontrándose presente un gran número de estos microorganismos en la saliva.

AISLAMIENTO Y TIPIFICACION DE STREPTOCOCCUS MUTANS EN LESIONES ACTIVAS

Shigeyuki H. Masuda y Kotani llevaron a cabo el aislamiento y la clasificación serológica de Streptococcus mutans aislado a partir de muestras dentales y de heces de niños de 4 a 9 años que presentaban caries activa. (55). El porcentaje de recuperación de Streptococcus mutans varió de 0 a 72.5%.

Streptococcus mutans fué aislado de placa dental, caries de dentina y en 10 sujetos considerados portadores se aisló a partir de las muestras de

cales. De 1047 cepas aisladas de las cuales 290 eran de origen fecal, 289 de placa dental, y 468 de caries dentina, se detectó en un 66,6 el serotipo C de Streptococcus mutans (55). Los serotipos d, e, f, y g se encontraron con menor frecuencia. Keyes trabajando con roedores demostró que la aparente resistencia a caries variaba después de ser inoculados los animales con Streptococcus mutans muerto (aislado de heces de ratas con caries activa) ya que estas desarrollaban caries activa con presencia de Streptococcus mutans cariogénico.

Sin embargo se ha demostrado en ratas gnotobióticas que la ingestión de Streptococcus mutans muerto induce la producción de anticuerpos - - - anti-Streptococcus mutans del tipo Iga, presente en saliva, leche y calostro lo cual confiere protección para la caries dental.

Las siguientes tablas nos muestran los porcentajes y los serotipos de Streptococcus mutans aislados en niños a partir de muestras de placa dental y material fecal, de una población japonesa.

Prueba	edad	a sexo	b tipo de caries	DE STREPTOCOCCUS MUTANS		
				placa dental	caries dentina	heces
A	7	m	3/5	94,6	83,8	16,8
B	9	f	2/24	22,1	30,6	14,7
C	4	m	14/20	5,9	76,3	1,7
D	5	m	13/20	10,9	98,2	72,5
E	8	f	12/24	14,4	57,6	8,7
F	7	f	11/24	0	89,8	3,7
G	4	m	9/20	0	92,3	1,1
H	5	f	10/20	6,0	96,7	12,0
I	4	f	13/20	0	94,4	37,7
J	4	f	19/20	31,2	96,0	13,4
Media				18,4	81,5	18,2

Referencia de la tabla anterior:

a m (masculino); f (femenino)

b numero de caries / No. de dientes presentes

DISTRIBUCION DE SEROTIPOS DE STREPTOCOCCUS MUTANS AISLADOS:

Origen	<u>No. de aislamientos y serotipos</u>					total
	C	d	e	f	g	
Placa dental	199(6)	1(1)	21(2)	42(1)	26(1)	289
Caries de dentina	279(7)	12(3)	85(3)	92(1)	1(1)	468
Heces	209(7)	8(2)	27(3)	44(1)	2(1)	290
Total	687(7)	21(4)	133(4)	177(1)	29(1)	1,047

Los estudios serológicos efectuados presentan una mayor proporción del serotipo C de Streptococcus mutans y ausencia de los serotipos a y b.

AZÚCAR DE ACOPLAMIENTO EFECTO EN LA ACTIVIDAD METABOLICA Y
CARIOGENICIDAD.

T. Ikeda, T. Shiota y colaboradores probaron un azúcar de acoplamiento CSSF (coupling-sugar-sucrose-free), que contiene una mezcla de azúcares, oligosacárido utilizado como sustrato para el crecimiento y la producción de ácido de Streptococcus mutans 6715 donde CSSF resultó ser un sustrato pobre para la agregación celular y para la actividad de la glucosiltransferasa, formación de placa y para la adherencia de los microorganismos a las superficies del tubo.

En presencia de sacarosa, su CSSF inhibió la actividad de la glucosiltransferasa y la capacidad de adherencia de los microorganismos (60).

Las ratas alimentadas con sacarosa y CSSF tuvieron pocas lesiones cariosas en comparación con aquellas ratas alimentadas solamente con sacarosa.

VIRULENCIA (LACTOBACILLUS CASEI Y STREPTOCOCCUS MUTANS) EN RATAS
GNETABIOTICAS.

Michalek y colaboradores comentan que los Lactobacillus comprenden un pequeño porcentaje dentro de la microflora oral de los humanos y son aislados comúnmente de saliva y más frecuentemente de lesiones con caries activa, - compararon la patogenicidad y colonización en ratas gnetabióticas con una mezcla de Lactobacillus casei y Streptococcus mutans 6715 (54). Detectándose un alto porcentaje de Lactobacillus casei en comparación con Streptococcus mutans ambos fueron encontrados en lengua y saliva; Streptococcus mutans predominó en placa. La diferencia en los niveles de colonización y actividad de caries — entre estos dos microorganismos en ratas, fue más evidente cuando los experimentos se prolongaron hasta por 45 días.

De acuerdo a estudios previos con Lactobacillus casei, Lactobacillus acidophilus y otras especies de Lactobacillus, se demostró que estos inducen caries dental.

Streptococcus mutans, coloniza exclusivamente en forma selectiva la superficie de los dientes y restos significativos de placa iniciando la producción de caries.

Lactobacillus casei, es mucho menos cariogénico que Streptococcus mutans.

Las glucanas insolubles facilitan la acumulación de Streptococcus mutans en la superficie de los dientes, con el consiguiente aumento en la producción de ácido láctico dando como resultado final la disolución del esmalte y la aparición de caries dental (54).

Se ha demostrado que los estreptococos de la cavidad oral difieren marcadamente en sus requerimientos de aminoácidos frente a otros estreptococos (56). Streptococcus faecalis, no tiene en su pared aminoácidos como leucina, y cuando está privado de un aminoácido que se encuentra en la pared del péptido-glicano como es lisina ó alanina, le provoca autólisis en el medio de crecimiento.

La ausencia de lisina ó de glutamato/glutamina para Streptococcus mutans FA-1 no causó autólisis celular. La síntesis de peptidoglicano vista bajo mecanismos reguladores más precisos termina cuando un aminoácido esencial de la pared está ausente. La aparición de Streptococcus mutans en la cavidad oral dependerá indudablemente de que encuentre los nutrientes esenciales.

Fapanoyotou et al, en un estudio cualitativo de saliva humana encontraron 20 aminoácidos libres dentro de los cuales la alanina, glicina y el ácido glutámico están presentes en grandes cantidades. Detectándose en baja concentración ácido aspártico, valina, leucina, lisina, ornitina, prolina, serina, y aminoácidos aromáticos.

En todas las muestras de Streptococcus mutans FA-1 obtenidas de fluidos de placa y saliva se encuentran presentes en concentraciones elevadas aminoácidos como el glutamato, aspartato y glicina.

MICROMIOLOGIA DE LA CARIES DENTAL
MICROORGANISMOS INVOLUCRADOS EN LA
CARIES DENTAL.

CARIES DE PUNTOS Y FISURAS

CARIES DE SUPERFICIES LISAS

CARIES DE LA RAIZ Y SUPERFICIES
CERVICALES.

CLASE DE BACTERIAS EN LOS TRES TIPOS
DE CARIES.

FORMAS ACTINOMYCETALES

LACTOBACILOS

FORMAS ESTREPTOCOCCICAS

MEDIOS DE CULTIVO PARA AISLAR S. MUTANS

MS (mitis-salivarius)

MSFA (manitol- sorbitol- fucsina- azida)

CARACTERIZACION DE OTROS ESTREPTOCOCOS

VIRIDANS EN LA CAVIDAD ORAL.

CARIES DE PUNTOS Y FISURAS

El principal agente etiológico es el lactobacilo acidófilo gran productor de ácido láctico.

CARIES DE SUPERFICIES LISAS

El agente causal sería el estreptococo cariogénico que prolifera en la placa bacteriana, formando verdaderas macrocolonias que se adhieren firmemente al diente, por la dextrana que produce la colonia a partir de la sacarosa ó azúcar común. Son también grandes productores de ácidos.

CARIES DE LA RAIZ Y SUPERFICIES CERVICALES

Aunque no han sido bien estudiadas, se ha encontrado una relación más que causal entre este tipo de caries y el Odontomyces viscosus; un tipo de actinomicete que produce levanas, compuesto parecido al dextrán siendo además productor de ácido en su metabolismo.

FORMAS ACTINOMICETALES

En lesiones cariosas de la raíz dentaria, se han logrado aislar e identificar varias especies de actinomyces tales como Actinomyces viscosus, --- Actinomyces naeslundii, y Actinomyces eriksonni.

En el hamster sirio se ha logrado producir una lesión cariosa radicular que reproduce la lesión del diente humano, alimentando al animal con una dieta cariogénica y se observa la aparición de una placa dentaria densa que cubre y se adhiere a la raíz y parte de la corona de sus molares, bajo esta placa, se produce la lesión cavitaria del tejido cementario y no así del esmalte coronario.

LACTOBACILOS

Probablemente son las cepas homofermentativas las que producen ácido láctico, el principal representante es el lactobacilo acidófilo y el segundo en importancia al Lactobacillus casei.

Las cepas heterofermentativas producen ácidos débiles como el propiónico, fórmico, acético, además de etanol y CO_2 . El representante principal es el Lactobacillus fermenti. La capacidad para producir descalcificación del esmalte de este microorganismo ha sido probada in vitro sobre dientes extraídos, comprobándose que es capaz de producir una caries inicial del esmalte en forma experimental.

FORMAS ESTREPTOCOCCICAS

Numerosos grupos de estreptococos que son capaces de producir caries dentales con mayor rapidez o lentitud son llamados estreptococos cariogénicos. La mayor dificultad para su clasificación es la falta de uniformidad en sus características bioquímicas, de cultivo ó en su estructura antigénica.

Se han tratado de agrupar a los estreptococos cariogénicos según sus semejanzas morfológicas y fisiológicas en Streptococcus mutans, - - - - Streptococcus mitis, Streptococcus salivarius y Streptococcus sanguis.

Actualmente se considera al Streptococcus mutans como el grupo de estreptococos que tiene mayor relación con la caries dental (4,32).

MEDIOS DE CULTIVO PARA AISLAR A STREPTOCOCCUS MUTANS

Streptococcus mutans puede aislarse junto con otros estreptococos orales en agar MS (mitis - salivarius). Streptococcus mutans es diferenciado de otros estreptococos por la fermentación de manitol y sorbitol principalmente, y por la propiedad de adherencia a las superficies lisas en presencia de sacarosa (47,52).

La recuperación en el medio MS (mitis-salivarius) nunca es cuantitativa ('4), y depende de los tipos de medio de cultivo empleados para aislamiento (40,48).

Mitis salivarius fue modificado para hacer más selectivo, el aislamiento de Streptococcus mutans mediante la adición de sulfonamida (7), polimixina (16) ó bacitracina (24).

Streptococcus mutans se estudió por primera vez en 1924 (10,29). A partir de esta fecha algunos investigadores aislaron de dientes con caries, numerosas colonias de Streptococcus mutans mediante el uso de varios medios para su desarrollo (15,25,63) incluyendo el medio MS (mitis-salivarius) (33).

Harald A. B. Linke propone un nuevo medio para el aislamiento de - - - Streptococcus mutans (29), este medio no solo recupera un gran número de cadenas de Streptococcus mutans por su contenido de manitol y sorbitol sino que facilita la diferenciación de otros estreptococos como:

Streptococcus salivarius, Streptococcus mitis, Streptococcus sanguis ya que estos no crecen ó bien se desarrollan muy escasamente después de 10 días de incubación, el medio se caracteriza por la presencia de un indicador ácido, pudiendo ser usado tanto en condiciones aerobias como anaerobias, - - - - Streptococcus faecalis y Staphylococcus aureus pueden ser diferenciados de Streptococcus mutans por su morfología y pruebas bioquímicas, lo cual al mismo tiempo permite caracterizarlos.

En los estudios de inhibición de crecimiento se encontró que muchas especies de estreptococos son relativamente resistentes al tratamiento con --

ácida de sodio, algunas cadenas son capaces de resistir hasta 1,000 microgramos / ml, concentraciones de 200 microgramos / ml permitieron inhibir el crecimiento en un 50%, encontrándose también inhibición en el crecimiento de Streptococcus mutans pero no así en el Streptococcus faecalis.

TABLA PARA LA CARACTERIZACION MORFOLOGICA DE S. MUTANS Y OTRAS ESPECIES.

CEPAS	CRECIMIENTO EN MSFA AGAR.	CARACTERISTICAS DE LA COLONIA.	CREC. SOBRE AGAR MS.
S. mutans	++	De rosas a rojas como copitas de nieve.	+
ONZ - 175	++	Rosas	++
ONZ - 176	++	Rosas frambuesa	+
ONZ - 65	++	Rosas frambuesa	+
SL - 1	+++	Rosas, lisas	+
BS - 6	++	De rosas a rojas	+
B - 13	++	Rosas, sedosas	(+)
B - 14	+++	Rosas, sedosas	+
BHT	++	Rosas, aplastadas	++
AHT	+++	Rosas a rojas	++
NCTC 10449	+++	Azul-púrpuras sedosas.	++
P - 4	++	Rojas, sedosas	+
FA - 1	++	Rosas, sedosas	+
B - 2	++	Rojas, sedosas	+
S. mitis ATCC 15009.	(+)	Rosa-rojas, afelpadas	+
S. mitis ATCC 15910.	(+)	Rosa-rojas, sedosas	+++
S. mitis	+	Rosa-rojas, afelpadas	++
S. salivarius	-		++++
S. salivarius ATCC 13419.	(+)	Rosas-azuladas	+++++
S. salivarius	+	Rosas-azuladas lisas.	++

Continuación de la tabla:

<u>CEPAS</u>	<u>CREC. EN MSEA</u>	<u>CARACT. DE LA COLONIA</u>	<u>CREC. EN EGAR MS</u>
<i>S. sanguis</i> 10556	-	Rosas-azuladas	++
<i>S. sanguis</i> ATCC 10557 (+)		Rosas- azuladas afelpadas.	+
<i>S. faecalis</i> ATCC	+++	Rosas-azuladas dentadas.	++
<i>S. faecalis</i>	++	Rosas, brillosas	++
<i>S. faecalis liquefaciens</i>	+++	Rosas mate	+++
<i>S. pyogenes</i> (+)		Rosas, brillosas	-
<i>S. durans</i>	+	Rosas- mate	++
<i>S. agalactiae</i>	+	Rosas- rojas. mate.	+
<i>S. lactis</i>	+++	Rosas azuladas afelpadas.	+++

Características presentadas de la colonia en ambos medios de 10 días de incubación aeróbica a 36⁰ C.

NOTA TIPO DE CRECIMIENTO DE LAS COLONIAS

NULO (-)

ESC. SE (+)

BUENO (+, ++)

MUY BUENO (++, +++)

EXCELENTE (+++, +++)

CARACTERIZACION DE OTROS ESTREPTOCOCCOS VIRIDANS

ESPECIES DE ESTREPTOCOCCOS

<u>PRUEBA</u>	<u>S.SALIVARIUS</u>	<u>S. SANGUIS</u>	<u>S. M ITIS</u>
<u>Tamaño (micras)</u>	<u>0.8 a 1.0</u>	<u>0.8 a 1.2</u>	<u>0.6 a 0.8</u>
	<u>diámetro</u>	<u>diámetro</u>	<u>diámetro</u>
<u>Gram positivos</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>
<u>Hemólisis alfa</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>
<u>Beta</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>
<u>Tolerancia a:</u>			
<u>•</u> <u>10 C</u>	<u>-</u>	<u>-</u>	<u>-</u>
<u>◦</u> <u>45 C</u>	<u>+</u>	<u>d</u>	<u>d</u>
<u>Azul de metileno</u>			
<u>en leche.</u>	<u>-</u>	<u>-</u>	<u>-</u>
<u>6.5% NaCL</u>	<u>-</u>	<u>-</u>	<u>-</u>
<u>Bilis (40 %)</u>	<u>-</u>	<u>+</u>	<u>-</u>
<u>Crecimiento a</u>			
<u>pH= 9.6</u>	<u>-</u>	<u>ND</u>	<u>-</u>
<u>Tolerancia a</u>			
<u>◦</u> <u>60 C/ 30 min.</u>	<u>-</u>	<u>d</u>	<u>-</u>
<u>Solubles a hemolisina</u>			
<u>•</u>	<u>-</u>	<u>ND</u>	<u>-</u>
<u>S</u>	<u>-</u>	<u>ND</u>	<u>-</u>
<u>Otros</u>	<u>-</u>	<u>-</u>	<u>ND</u>
<u>Fibrinolíticas</u>	<u>-</u>	<u>-</u>	<u>-</u>
<u>Hidrolisis de:</u>			
<u>Gelatina</u>	<u>-</u>	<u>-</u>	<u>-</u>
<u>Almidón</u>	<u>-</u>	<u>-</u>	<u>-</u>
<u>Hipurato</u>	<u>-</u>	<u>-</u>	<u>-</u>
<u>Esculina</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>-</u>

CONTINUACION DE LA TABLA:

PRUEBA	<u>ESPECIES DE ESTREPTOCOCOS</u>		
	<u>S. SALIVARIUS</u>	<u>S. SANGUIS</u>	<u>S. M ITIS</u>
Arginina	-	+	d
Reducción de			
la tacha tornazol	+	+	+
Formación de ácidos			
Glucosa	+	+	+
Maltosa	+	+	+
Lactosa	+	+	+
Sacarosa	+	+	+
Trealosa	+	+	+
Salicina	+	+	+
Inulina	+	+	-
Rafinosa	+	-	+
Arabinosa	-	-	-
Xilosa	-	-	-
Glicerol	-	-	-
Manitol	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Rx en caldo con			
5% de sacarosa,	-	+	+

S. salivarius puede ser aislado fácilmente a partir de saliva, esputo y tracto intestinal humano, se considera no patógeno, tiene como habitat boca, garganta y nasofaringe.

S. sanguis puede ser aislado de garganta de humanos, tiene como habitat probablemente el hombre.

S. mitis puede obtenerse a partir de saliva, esputo y tracto intestinal humano, tiene como habitat boca, garganta y nasofaringe.

ND= datos insuficientes d= respuesta variable.

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y LOCALIZACIÓN CELULAR DE ANTÍGENOS

ANTÍGENOS DE GRUPO (HAPTENO)			
DESIGNACIÓN	NATURALEZA QUÍMICA	LOC. CELULAR	ESPECIES
D	Glicerol, ácido telceico, D-alanina y glucosa.	"intracelular entre la membrana y pared.	S. faecalis
F	Ramnosa y glucopiranosil-N-acetil-galactosamina tetrasacárido.	pared	S. anginosus
H	Polisacárido de ramnosa	pared	S. sanguis
	Ne tiene antígeno específico de grupo		S. salivarius
TIPO DE ANTÍGENO (HAPTENO)			
(11 tipos)	polisacárido de ramnosa-glucosamina-glucosa.	pared celular	S. faecalis
(de 1 a 5)	Carbohidratos algunos tipos poseen glucosa, galactosa y ramnosa.		S. anginosus
(5 tipos)			S. sanguis
Se han podido demostrar 2 tipos serológicos:			
(1, 11 y 1-11)	galactosa, glucosa ramnosa.		
	Tipo 1-0-Beta-D galactopiranosil-	pared celular	S. salivarius
	(1-6)- D-galactosa.		

Bergey's Manual (of determinative bacteriology) 1957.

MATERIAL Y METODOS

EQUIPO

Autoclave (Presto S.A.)
 Balanza analítica (E. Mettler Zurich)
 Balanza gravimétrica (E.Mettler Zurich)
 Equipo millipere
 Incubadora 37 C
 Liofilizadora (The Welch Scientific Company)
 Microscopio óptico (Spencer)

MATERIAL

Asa de platino para siembra
 Cubrebocas
 Gradillas
 Guantes de hule
 Hilo dental (Oral B)
 Jeringas hipodérmicas desechables 5ml
 Jeringas de Insulina
 Mechero de Bunsen
 Papel aluminio
 Pinzas de moho
 Pinzas de tres dedos
 Seporte Universal
 Sobres generadores de anaerobiosis Gas-Pack (EBL)
 Tela de asbesto
 Tripie

MATERIAL DE VIDRIO

Cajas de petri desechables y de vidrio
 Embudo cola corta
 Frasco para anaerobiosis
 Matraces Erlenmeyer de 100ml, 250ml, 500ml

Pipetas Pasteur estériles

Palillos estériles

Pipetas serológicas de 1ml, 5ml, 10ml

Portaobjetos

Probetas graduadas 100ml, 500ml.

REACTIVOS

41

Aceite de inmersión (Sigma)
Acetona (Drogas tacuba)
Alcohol etílico 96° (LISA Lab. Asteca)
Antibiótico bacitracina (Lab. Dr. Zapata)
Sulfato de kanamicina (Bristol)
Azida de sodio (Sigma)
Acido clorhídrico 1N (Baker)
2,3,5 cloruro de trifenil- tetrazolium 1% (Merck)
Carbonato de calcio precipitado (Merck)
Cloruro férrico (Baker)
Cloruro de manganeso (Carlo Erba)
Solución 1 N de Cloruro de sodio
Equipo para tinción de Gram
Fosfato dipotásico (Merck)
Fosfato monosódico (Merck)
Fosfato disódico (Merck)
Sulfato de magnesio heptahidratado (Baker)
Solución salina isotónica estéril
Telurito de potasio 1% (Merck)

CARBOHIDRATOS

Dextrosa (Baker)
Fructosa (Merck)
Inulina (Merck)
Lactosa (Merck)
Manitol (Merck)
Maltosa (Merck)
Sacarosa (Merck)
Sorbitol (Calbiochem)

MEDIOS DE CULTIVO

Agar bacteriológico (Bioxón)

Almidón soluble (Merck)

Base de caldo rojo de fenol (Bioxón)

Bacto peptona (Difco)

Bacto agar (Difco)

Caldo Jordans (Tripticasa soya-Extracto de levadura- K_2HPO_4 - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, $MnCl_2$, sacarina)

Caldo tieglicolate (Difco)

Extracto de levadura (Bioxón)

Extracto de carne (Bioxón)

Gelatina Difco)

Mitis salivarius agar (Difco)

MSFA (maritol- sorbitol-fucsina-azida)

MEDIOS DE CULTIVO

AGAR MITIS SALIVARIUS

Deshidratado

Bacto triptosa.....	10g
Difco-peptona proteasa# 3...	5g
Peptona-proteasa Difco.....	5g
Dextrosa.....	1g
Sacarosa Difco.....	30%
Fosfato dipotásico.....	4g
Azúl de tripano.....	0.075g
Cristal violeta.....	0.008g
Agar.....	15g
Bacitracina	0.2U/100ml
Sulfato de kanamicina.....	300 μ g /ml
Agua destilada.....	1000 ml

NOTA: Cada uno de los antibióticos fueron usados individualmente.

Para rehidratar el medio, se suspenden 90g de mitis salivarius en 1000ml de agua destilada, se calienta hasta disolver completamente el medio esterilizar en autoclave a 121⁰C durante 15 mín. y una vez enfriado a 50-55⁰C adicionar 1 ml, de solución de telurito de potasio y bacitracina. Pasar a cajas pstri 25 ml del medio ajustar pH=7. (Nota) no calentar el medio despues de haber adicionado la solución de telurito.)

ANTIBIOTICOS EN MS (MITIS SALIVARIUS)

La bacitracina fué preparada a una concentración de 200U/ ml, se liofilizó y repartió en frascos pequeños, manteniéndola en refrigeración hasta su uso. (Nota se resuspende con 1 ml de agua estéril).

Sulfato de kanamicina fué preparada una solución conteniendo 300 μ g /ml y de esta se probaron 300 μ g, 200 μ g y 180 μ g respectivamente.

La solución de telurito de potasio al 1% antes de su uso se filtró por Millipore.

MEDIO MSFA

D-sorbitol10g
D- manitol..... 10g
Extracto de levadura.... 20g
Azida de sodio..... 100mg
Fucsina básica..... 5mg
CaCO₃..... 10g
Agar..... 15g
Agua destilada.....1000ml
PH = 7

Esterilizar el medio a 121⁰C durante 15 mñ. una vez enfriado verter aproximadamente 15 ml del medio a las cajas de petri estériles.

MEDIO DE CULTIVO CALDO JORDAN'S

Parte I del medio basal

1.- Pesar los ingredientes para proporciones de 1000 ml.

Tripticasa.....	5g
Extracto de lev.	5g
K ₂ HPO ₄	5g

2.- Disolver los ingredientes en 500 ml. de agua destilada completamente; sin calentar el medio.

3.- Adicionar 0.5 ml. de solución de sales pH=7 ajustado con HCL 0.1N después de enfriado.

4.- La composición de la solución de sales: pH=7

MgSO ₄ .7H ₂ O	0.8g
FeCl ₃ .6H ₂ O	0.04g
MnCl ₂	0.012g
Agua destilada	100ml

Parte II sustrato

Sacarosa al 5%, como sustrato.

a). Tomar 500ml. de agua destilada en un matríz de 600 ml.

b). Disolver 50g. de sacarosa con agitación rigurosa.

c). Adicionar 500 ml de medio basal.

d). Colocar 10 ml dentro del tubo de ensayo.

e). Mezclar part. I y II del medio y esterilizar en autoclave a 115 C  durante 30 minutos

CALDO DE TIUGLICLLATG

Deshidratado

Peptona de Caseína.....	15g
Extracto de Levadura.....	5g
Dextrosa.....	5g
Cloruro de sodio.....	2.5g
Tioglicolato de sodio.....	0.5g
L. Cistina.....	0.5g
pH final 7.1 ± 0.2	

Esterilizar a 121 C⁰ durante 15 minutos.

En caso de utilizar el medio un día después de esterilizado se someten los tubos a baño maría durante 10 mín. aproximadamente.

METODOAislamiento de las cepas de Streptococcus mutans

Las pruebas realizadas en ambos medios selectivos para microorganismos anaerobios facultativos como es el caso de Streptococcus mutans agente de mayor importancia en nuestro estudio de placa dentobacteriana se llevaron a cabo en grupos de niños de edad escolar primaria de la Escuela Ejército Nacional Cópico.

Colección de PDB (placa dentobacteriana)

- 1.-El operador mediante una técnica aséptica selecciona el diente problema y le aísla por medio de rollos de algodón estériles.
- 2.-El diente es secado con un chorro de aire
- 3.- Se clasifica la lesión en caries:
 - a) Esmalte superficial
 - b) Esmalte profundo
 - c) Cavitación profunda con caries masiva de dentina
- 4.- La PDB es colectada raspando suavemente la lesión con palillos estériles con punta depositando éstas inmediatamente en tubos con solución salina-estéril para diluciones 1:10 y 1: 100 para obtener colonias más aisladas en los medios.
- 5.- Las muestras tomadas con hilo dental entre los espacios interproximales de los dientes son sembradas directamente en las cajas de MS agar y MSFA.
- 6.- Una vez sembradas todas las cajas son incubadas a 37 C durante 24 hrs. en anaerobiosis en un ambiente producido por la extinción de la llama de una vela teniendo aproximadamente una atmósfera 95% de N₂ y 5% de CO₂; se dejan toda la noche en aerobiosis a la misma temperatura de incubación.
- 7) Al término de este tiempo en las cajas de MS (mitis salivarius) en las que se observe crecimiento se rocía una solución al 10% de manitol y se incuban a 37 C durante 3 hrs. después son rociadas nuevamente con una solución al 4% de cloruro de trifoniltetrasolius incubándose a 37 C durante 1 hr.

Las soluciones de manitol y cloruro de trifeniltetrazolium se prepararon con una solución amortiguadora de fosfato 0.067 M a pH=7.2 para asegurar desarrollo de color, las colonias de Streptococcus mutans toman un color rosa, -- elevadas ásperas, otros estreptococos permanecen de color azul y las colonias de enterococos si es que son aisladas, aparecen planas, lisas y rojo brillante.

8.- En las cajas de MSFA (manitol-sorbitol-fucsina-azida) y MS (mitis-salivarius) se analizan las colonias que crecieron morfológicamente y mediante tinción de Gram; aquellas que demostraron ser estreptococos se pasaron a un caldo nutritivo Jordan's con 5% de sacarosa incubándose por 48 hrs - tiempo en el que debe observarse:

a) Colonias adheridas a la pared del tubo

b) pH ácido de aproximadamente 4.3 si las colonias desarrolladas pertenecen a Streptococcus mutans.

En los tubos que se encontraron estas características se les agregó una pequeña cantidad de carbonato de calcio estéril.

9.- Los tubos se sellan con parafilm para evitar en lo posible la contaminación y son guardados en refrigerador hasta completar el lote total del estudio.

10.- Una vez completado el lote; se toma de cada tubo un inóculo y se siembra en caldo Jordan's recién preparado; el cual se incuba por 24 hrs a 37 C y de esta manera se procede a hacer la caracterización bioquímica de las cepas puras de estreptococos obtenidas.

11.- Prueba de fermentación de azúcares:

a) Dextrosa

b) Fructosa

c) Inulina

d) Lactosa

e) Maltosa

f) Manitol

g) Sorbitel

Prueba de licuefacción de gelatina

Prueba de hidrólisis del almidón

Para la preparación de los carbohidratos: se utilizó caldo base rojo de fenol pH= 7.2; al 0.5% como concentración final, esterilizados a 110 C^o durante 10 mín. e incubados a 37 C^o durante 24 hrs como prueba de esterilidad.

12.- Las cepas de Streptococcus mutans recuperadas se pasaron a caldo de tioglicolato en tubos con tapón de rosca; incubadas a 37 C^o durante 24 hrs; se cubren con papel aluminio para protegerlos de la luz manteniéndolos a temperatura ambiente.

RESULTADOS

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

RESULTADOS

Todas las pruebas fueron observadas hasta una semana de incubación.

Las pruebas de licuefacción de gelatina e hidrólisis del almidón fueron negativas para todas las cepas probadas.

El total de cepas aisladas de Streptococcus mutans en nuestro estudio fueron 19 de 90 niños muestreados; es de considerarse la dificultad que representa este tipo de aislamiento, puesto que este microorganismo es extremadamente sensible ante cualquier variación y difícil de preservarlo durante mucho tiempo ya que muere con mucha facilidad, además de que los cultivos puros pueden ser fácilmente contaminados ante cualquier descuido por parte del operador.

A continuación se dan los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas y morfológicas de las cepas aisladas en el orden que sigue:

Pruebas control en los medios MS (mitis salivarius) y MSFA

Tabla de referencia

Muestreo en MS conteniendo 300 μ /ml de una solución de 300 μ /ml de sulfato de kanamicina.

Muestreo en MS con sulfato de kanamicina 200 μ /, 180 μ / y 100 μ /.

(Tablas de resultados)

Muestreo con Macitracina en MS agar (200 U/ml) y MSFA (manitol-sorbitol-fucsina- azida).

Reporte de cepas en caldo Jordan's

Reporte de cepas en caldo de tioglicolate

Reporte de pruebas bioquímicas realizadas a las 24, 48 y 72 hrs. de incubación.

PRUEBAS CONTROL EN LOS MEDIOS DE CULTIVO MS Y MSFA

Las pruebas de control realizadas en ambos medios selectivos, para microorganismos anaerobios facultativos como es el caso de Streptococcus mutans -- agente de mayor importancia en nuestro estudio de placa dentobacteriana, fueron llevadas a cabo en un grupo de niños de ambos sexos de 11 y 12 años de edad de sexto grado de primaria.

El grado de la lesión fué clasificado de la siguiente manera:

- A) Muestra testigo libre de caries
- B) Muestra con pedazo de caries
- C) Muestra de caries incipiente
- D) Muestra de caries incipiente con amigdalitis
- E) Muestra lesión con caries moderada
- F) Muestra caries severa

Aspecto de las colonias aisladas en el medio MS (mitis-salivarius) y medio MSFA de la prueba piloto:

<u>Muestra</u>	<u>Cultivo puro</u>	<u>Medio Mitis salivarius</u>	<u>MSFA</u>	<u>Especie de Mo.</u>
<u>B-2</u>	<u>+</u>	<u>Forma circular, colonias</u>	<u>-</u>	<u>S. salivarius</u>
<u>B-2'</u>	<u>+</u>	<u>pequeños, azúles transpa</u>	<u>-</u>	<u>S. salivarius</u>
<u>C-3</u>	<u>+</u>	<u>rentes, borde liso, con-</u>	<u>-</u>	<u>S. salivarius</u>
<u>C-3</u>	<u>+</u>	<u>vexas consistencia cremo</u>	<u>-</u>	<u>S. salivarius</u>
<u>E-5</u>	<u>+</u>	<u>mosa fáciles de tomar --</u>	<u>-</u>	<u>S. salivarius</u>
<u>E-5'</u>	<u>+</u>	<u>del medio.</u>	<u>-</u>	<u>S. salivarius</u>
<u>F-10</u>	<u>+</u>	<u>" " "</u>	<u>-</u>	<u>S. salivarius</u>
<u>F-6</u>	<u>+</u>	<u>Colonias azúles más oscu</u>	<u>-</u>	<u>S. sanguis</u>
<u>F-8</u>	<u>+</u>	<u>ras, sup. elevada, consis</u>	<u>-</u>	<u>S. sanguis</u>
<u>F-9</u>	<u>+</u>	<u>tencia suave, convexas pe</u>	<u>-</u>	<u>S. sanguis</u>
<u>F-10</u>	<u>+</u>	<u>co fáciles de tomar del medie.</u>	<u>-</u>	<u>S. sanguis</u>
<u>F-6'</u>	<u>+</u>	<u>Colonias azúles opacas, de</u>	<u>-</u>	<u>S. mitis</u>
<u>F-8'</u>	<u>+</u>	<u>consistencia más o menos</u>	<u>-</u>	<u>S. mitis</u>
<u>F-9'</u>	<u>+</u>	<u>blandas, pequeñas.</u>	<u>-</u>	<u>S. mitis</u>

Véase clasificación en la tabla No. 1 siguiente.

DIFERENCIACION DEL GRUPO ALFA VIRIDANS Y OTRAS ESPECIES DE ESTREPTOCOCCOS

ESPECIES DE ESTREPTOCOCCOS	INULINA	MANITOL	SORBITOL	LACTOSA	MALTOSA	FRUCTOSA	SACAROSA	DEXTROSA	LICUEF. GELATINA	HIDROLISIS ALMIDON
STREPTOCOCCUS MUTANS	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
STREPTOCOCCUS MITIS	-	-	-	+	+	(-)	+	+	-	-
STREPTOCOCCUS SANGUIS	A +	-	-	+	+	(-)	+	+	-	-
STREPTOCOCCUS SALIVARIUS	A +	-	-	+	+	(-)	+	+	-	-
STREPTOCOCCUS FACCALIS	-	A	+	+	+	+	+	+	-	-
STREPTOCOCCUS ANGINUS	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
STREPTOCOCCUS CREMORIS	-	rara mente fermenta	-	+	+		rara/e		-	-
STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
STREPTOCOCCUS LACTIS	-	+	-	+	+		+	+	-	-
STREPTOCOCCUS EPIDERMICUS	-	-	+	+	+		+	+	-	+
STREPTOCOCCUS EQUISIMILIS	-	-	-	+	+			+	-	D
STREPTOCOCCUS PYOGENES	-			+	+		-	+	+	D

D = reacción retardada

MUESTREO REALIZADO EN MS (MITIS SALIVARIUS) CONTENIENDO 300% / ml DE UNA SOLU
CION DE 300% / ml DE SULFATO DE KANAMICINA.

Resultado: Hubo completa inhibición de crecimiento en todas las cajas sembradas aún después de la primera semana de incubación.

MUESTREO REALIZADO CON EL ANTIBIOTICO SULFATO DE KANAMICINA EN EL MEDIO MS ---
(MITIS SALIVARIUS) CON 200%, 180% y 100% RESPECTIVAMENTE.

Los niños seleccionados pertenecían al quinto año de primaria (10 y 11 años), las muestras fueron tomadas directamente de la lesión con el uso de pañillo e hilo dental en forma aséptica:

- A) a nivel de esmalte profundo
- B) en cavitación profunda con caries masiva

Todas las cajas fueron sometidas a las condiciones anteriormente mencionadas, de las colonias desarrolladas en MS (mitis salivarius) y MSFA (manitol sorbitol-fucsina-azida) las más pequeñas fueron seleccionadas para observar su característica morfológica mediante tinción de Gram. Una característica muy especial fue observada en el medio MSFA en el cual se observó un cambio de coloración en el medio de rosa a amarillo claro y las colonias eran bastante pequeñas y del mismo color del medio, su morfología correspondía a estreptococos gram positivos. En cambio las colonias más grandes y que permanecían de color rosa después de la incubación no mostraban las características adecuadas y por lo general era difícil obtener un cultivo puro, esto fue tomado en forma particular como medio de selección de colonias para el aislamiento de Streptococcus mutans.

Comprobando el pH ácido del caldo Jordan's y observando el crecimiento que en algunos casos era puntiforme o bien en forma de roseta, se procedió a realizar las pruebas bioquímicas correspondientes.

FROTIS DE LAS CEPAS PROBADAS EN CALDO JORDAN'S

MUESTRA	CULTIVO		CADENAS		DIRECCION		CELULAS	
	puro	contaminado	cortas	largas	rectas	largas	grandes	pequeñas
MSFA 1 con CaCO ₃	+		+		+			+
MSFA 1 sin CaCO ₃	+		+		+			+
MSFA 2 con CaCO ₃	+			+	+			+
MSFA 2 sin CaCO ₃	+		+		+			+
MSFA 3 con CaCO ₃	+			+	+	+		+
MSFA 3 sin CaCO ₃	+		+			+		+
MSFA 4 con CaCO ₃		+						
MSFA 4 sin CaCO ₃		+						
MSFA 5 con CaCO ₃	+			+	+			+
MSFA 5 sin CaCO ₃	+		+		+			+
MS 100 <i>1</i> CaCO ₃	+		+		+			+
MS 100 <i>1</i> sin CaCO ₃	+		+		+			+

CONTINUACION DE LA TABLA

MUESTRA	CULTIVO		CADENAS		DIRECCION		CELULAS	
	puro	contaminado	cortas	largas	rectas	largas	grandes	pequeñas
MS 200 μ /con CaCO ₃	+		+		+			+
MS 200 μ /sin CaCO ₃	+			+		+	+	
MS 100 μ /sin CaCO ₃	+		+		+			+

RÉSULTADOS DE LAS PRUEBAS BIQUÍMICAS A LAS
24, 48 y 72 HRS. DE INCUBACIÓN.

CEPA	MALTOSA	GLUCITOL	DETRUSA	LACTOSA	MELITIL	FRUCTOSA	SUCROSA	INULINA
MSFA I con CaCO_3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MSFA 2 con CaCO_3	+++	- ++	+ ++	+++	+ ++	+ ++	+++	+ ++
MSFA 3 con CaCO_3	- ++	- ++	+++	+ ++	- ++	+ ++	- ++	+++
MSFA 3 sin CaCO_3	± ± ±	- - -	± ± ±	± ± ±	- - -	± ± ±	- - -	- - -
MSFA 5 con CaCO_3	± ± ±	+ ++	+++	+++	+++	+ ++	- ++	+++
MS 100 I con CaCO_3	- - -	- - -	- ++	- - -	- - -	- ++	- ++	- - -
MS 200 2 con CaCO_3	- - -	- - -	- ++	- - -	- - -	- ++	- ++	- - -
MS 100 3 con CaCO_3	+ ++	+ ++	+ ++	+++	+++	+ ++	+++	+++

De los resultados obtenidos en este muestreo, podemos decir que fueron recuperadas 5 cepas de Streptococcus mutans además de otras especies de -- estreptococos como son Streptococcus thermophilus, Streptococcus cremoris.

El aspecto final de las colonias es bastante diferente en caldo Jordan's algunas cadenas suelen estar finamente enrolladas y dispersas y otras prácticamente compactas, en el medio sólido las cadenas eran sumamente cortas.

Para mantener las cepas por más tiempo y hacer resiembras menos frecuentes se utilizó el caldo de tioglicolato.

MUESTRO REALIZADO CON SACITRACINA EN MS AGAR (200 U/ml) COMO

CONCENTRACION FINAL Y MSFA.

Los niños seleccionados en este caso fueron de cuarto año de primaria de (9 y 10 años), en este muestreo se colectaron 32 muestras. Las colonias fueron pasadas al caldo Jordan's y posteriormente se realizaron todas las pruebas bioquímicas, de este muestreo fueron recuperadas 14 cepas puras de Streptococcus mutans, a continuación se muestran las características obtenidas en ambos caldos utilizados y el resultado final de las pruebas bioquímicas realizadas.

REPORTE DE LAS CEPAS RESEBRADAS DE CALDO JORDANS

A LAS 48 HRS. DE INOCUACION.

MUESTRA	CULTIVO		CADENAS		DIRECCION		CELULAS	
	puro	contaminado	cortas	largas	rectas	curvas	grandes	pequeñas
MS 1	+		+	+	+			+
MS 2	+			+		+		+ pequeños + grumos.
MS 3	+		+		+			+ pequeños
MS 4	+		+			+		+ grumos
MS 5	+		+		+			+ grumos
MS 6	+		+		+			+
MS 7		+						
MS 8	+		+			+		+ grumos
MS 9	+			+	+			+
MS 10	+		+		+			+ pequeños
MS 11	+		+		+	+		+ grumos
MS 12	+			+	+		+	
MS 13	+		+		+			+
MS 14	+		+	+		+		+
MS 15	+			+	+			+ grumos

CONTINUACION DE LA TABLA

MUESTRA	CULTIVO		CADENAS		DIRECCION		CELULAS	
	puro	contaminado	cortas	largas	rectas	curvas	grandes	chicas
MS 16	+		+		+	+		+
MS 17	+		+		+			+
MSFA 1	+		+		+			+ grupos
MSFA 2	+		+		+	+		+
MSFA 3	+		+		+			+
MSFA 4	+		+		+			+
MSFA 5	+			+		+	+	
MSFA 6	+		+		+			+
MSFA 7	+		+		+			+
MSFA 8	+		+		+			+
MSFA 9	+			+		+		+
MSFA 10	+		+			+		+
MSFA 11	+		+			+		+
MSFA 12	+		+			+		+
MSFA 13	+		+		+			+
MSFA 14	+		+		+			+
MSFA 15	+		+		+			+

REPORTE DE LAS CEPAS RESEBRADAS DE CALDO JORDAN S A CALDOTIOGLICOLATO DE 24 HRS. DE INCUBACION.

MUESTRA	CULTIVO		CADENAS		DIRECCION		CELULAS	
	puro	contaminado	cortas	largas	rectas	curvas	grandes	chicas
MS I	+		+		+			+ grumos
MS-2	+		+			+		+
MS 3		+						
MS 4	+		+		+			+ grumos
MS 5	+		+		+			+ grumos
MS 6	+		+		+			+
MS 7	+		+		+			+
MS 8	+		+		+			+
MS 10	+		+		+			+
MS 11	+		+		+			+
MS 12	+		+		+			+
MS 13	+		+		+			+
MS 14	+		+		+			+
MS 15	+			+		+		+
MS 16	+		+		+			+
MS 17	+				+			+

CONTINUACION DE LA TABLA

MUESTRA	CULTIVO		CADENAS		DIRECCION		CELULAS	
	puro	contaminado	cortas	largas	rectas	curvas	grandes	chicas
MSFA 1	+			+		+		+ grupos
MSFA 2	+			+		+		+
MSFA 3	+		+			+		+ grupos
MSFA 4	+			+	+			+
MSFA 5	+		+			+		+
MSFA 6	+			+		+		+
MSFA 7	+			+		+		+
MSFA 8	+		+		+		+	
MSFA 9	+			+		+		+
MSFA 10	+		+			+		+
MSFA 11	+		+		+		+	
MSFA 12	+			+		+		+
MSFA 13	+		+			+		+
MSFA 14	+			+		+		+
MSFA 15	+			+		+		+

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS A LAS 24, 48 y 72 hrs.

DE INCUBACION.

CEPA	MALTOSA	SORBITOL	DEXTOSA	LACTOSA	MANITOL	FRUCTOSA	SACAROSA	INULINA
MS 4	-	-	+	+	-	+	+	-
MS 6	-	-	+	-	-	+	-	-
MS 7	-	-	+	-	-	+	-	-
MS 10	-	-	+	-	-	+	-	-
MS 11	-	-	-	+	-	+	-	-
MS 12	+	+	+	+	+	+	+	+
MS 13	-	-	+	+	-	+	-	-
MS 15	+	-	+	+	+	+	-	+
MS 16	+	-	-	+	-	+	+	-
MS 17	+	-	-	+	+	+	+	+
MSFA I	+	-	+	+	-	+	+	-
MSFA 2	+	-	+	+	+	+	+	+
MSFA 3	+	-	+	+	-	+	+	+
MSFA 4	+	+	+	+	+	+	-	+
MSFA 5	-	-	-	+	-	+	-	-
MSFA 6	+	-	-	+	+	+	+	+
MSFA 7	+	+	+	+	-	+	+	+
MSFA 8	+	-	+	+	-	+	+	+

CONTINUACION DE LA TABLA

<u>CEPA</u>	<u>MALTOSA</u>	<u>SORBITOL</u>	<u>DEXTRUSA</u>	<u>LACTOSA</u>	<u>MANITOL</u>	<u>FRUCTOSA</u>	<u>SACAROSA</u>	<u>INULINA</u>
MSFA 9	+	+	+	+	+	+	+	+
MSFA 10	+	-	+	+	-	+	-	-
MSFA 11	+	+	+	+	+	+	+	+
MSFA 12	+	+	+	+	+	+	+	+
MSFA 13	-	-	+	+	-	+	-	-
MSFA 14	+	+	+	+	+	+	+	+
MSFA 15	+	+	+	+	+	+	+	+

NOTA:

Las cepas que no aparecen en la lista, se perdieron al no crecer en el caldo de tioglicolato.

CONCLUSIONES

El empleo de ambos medios de cultivo MS (mitis salivarius) y MSFA (manitol-serbitol-fucsina-azida) para el aislamiento de Streptococcus mutans ha llevado a seleccionar aquel medio que sea más útil, y representativo en porcentaje de recuperación.

Nosotros hemos considerado al medio MSFA como el de mayor capacidad de aislamiento de colonias de este microorganismo. Tanto la preparación y manejo del medio es fácil, y los reactivos se encuentran al alcance de cualquier laboratorio de Microbiología, y no requiere ser de coste elevado.

El tipo de crecimiento de Streptococcus mutans es muy característico. Colonias pequeñas, amarillas cremosas fáciles de tomar del medio lo que nos permite seleccionar rápidamente las colonias y diferenciarlas de otros microorganismos.

MS (mitis-salivarius) es un medio que ha sido utilizado con anterioridad y es considerado como selectivo, sin embargo nuestra experiencia en este ensayo nos dice que puede ser utilizado en la recuperación de colonias de Streptococcus mutans pero es difícil obtener un buen porcentaje de crecimiento y recuperación. Su preparación en el laboratorio suele ser muy laboriosa por lo cual requiere su importación.

Una de las cepas aisladas fué proporcionada al Dr. Armando Bayona-- (Presidente de la Asociación Dental Mexicana) para ensayos inmunológicos que serán realizados en el departamento de Investigación Microbiológica de la ENEP Zaragoza.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Aceves Medina Ma. del Carmen: Los aspectos microbiológicos de la caries dental. (tesis) Facultad de Química UNAM 19 78.
- 2) Acosta H. Bayona, y Gomez Castellanos: Aglutininas en la saliva de individuos inmunizados con 7 cepas de Lactobacilos en preparacion. Trabajo presentado en el VII Congreso Nac. de ADM 17 a 21 de noviembre pp. 79-88, 1963.
- 3) Bayona Gonzalez: Seroaglutininas para L. acidophilus en habitantes de la ciudad de México. Sal. Pub. Mex. VII 2 pp.345-349, 19 60.
- 4) Bergey's Manual: Of determinative Bacteriology 7a edition the Williams & Wilkins Company, pp.508-520, 1957.
- 5) Birgitta Kehler, B.G. Krasse: Adherence and Streptococcus mutans infection in vitro study with saliva from noninfected and infected preschool children. Infection and Immunity Vol. 34 No.2 pp.633-636, Nov. 1981.
- 6) Bratthall, D: Demonstration of five serological groups of Streptococcal strains resembling S. mutans. Odontol.Revy 21: pp.143-152, 1970.
- 7) Carlsson, J: A medium from isolation of Streptococcus mutans Arch. Oral Biol. 12pp. 1657-1658, 1967.
- 8) Calmes Robert: Involvement of phosphoenolpyruvate in the catabolism of caries conducive disaccharides by S. mutans. Lactose transport Infection and Immunity, Vol. 19, No. 3pp. 934-942, March, 1978.
- 9) Clarke, J. K: On the bacterial factor in the aetiology of dental caries Br.J: Exp. Pathol. 5: pp.141-147, 1924.
- 10) Charlton, G.A: A microglass electrode for hydrogen ion determinations Br.J: Exp. Pathol. 1: pp.174, 1956.

- 11) Conde Gonzalez Carlos: *Streptococcus mutans* como un modelo de relacion huésped- parasito; *Revista de Infectologia* Vol. 11 Num. 3 marzo 1982 Mexico D.F.
- 12) Drucker, D.B.: Optimum pH values for growth of various plaque streptococci in vitro.
In Mc. Hugh, W.D.: *Dental plaque* Edimburg and London, E & S.- Living stone, pp. 241, 1970.
- 13) Deutsh and I. Gedalia: Chemically distinct stages in developing human fetal enamel. *Archs Oral Biol* Vol. 25, pp 635-637, Pergamon press Ltd. 1980.
- 14) Emilson, C.G. and D. Bratthall: Growth of *Streptococcus mutans* on various selective media. *J. Clinical Microbiol* 4: 95-98, 1976.
- 15) Englander, H.R.: The effects of saliva on the pH and lactate - concentration in dental plaques. I caries rampant individual, - *J. Dent Res.* 38: 848. 1959.
- 16) Fitzgerald, R. J. and B.O. Adams: Increased selectivity of mitis salivarius agar containing polymyxin. *J. Clin. Microbiol.* - - - I: 239-240. 1975.
- 17) Fitzgerald D.R.J: Streptococci of the oral cavity other than --- *S. mutans*: an evaluation of some present knowledge. *Dent. Res.* 55: 177, 1976.
- 18) Fitzgerald, R.J. H.V. Jordan: Experimental caries and gingival - pathologic changes in the gnotobiotic rat. *J. Dent Res.* 39: 923-935, 1960.
- 19) Fosdick L. S. and Starke: Solubility of the tooth enamel in saliva at various pH levels. *J. Dent. Res* 18: 417, 1939.
- 20) Franco Martinez F. Javier: *El streptococcus mutans y la caries dental* (tesis) Facultad de Química UNAM, 1978.

- 21) Farias Elinas Martha: Influencia de ciertos iones sobre el desarrollo de un agente cariogénico *S. mutans* (tesis) Facultad de Química UNAM, 1978.
- 22) Gary Fitts and Bernard Bikale Jr.: Bacterial degradation of dental research and department of microbiology of Alabama in Birmingham. - Alabama 35294, US: pp 1303-1309, 1972.
- 23) Gibbons, R.J Soeransky : Studies of the predominant cultivable - - microbiota of dental plaque. Arch Oral Biol. 9: 365, 1964.
- 24) Gold O.G., H.V. Jordan: A selective medium for *Streptococcus mutans* Arch Oral Biol. 18: 1357-1364, 1973.
- 25) Guggenheim, B.K.G. König: Modifications of the oral bacterial flora and their influence on dental caries in the rat. I: The effects of inoculating 4 labelled strains of Streptococci. delv. Odontol. - - Acta 9: 121-129, 1965.
- 26) H.V. Jordan, R.J. Fitzgerald: Inhibition of experimental caries by sodium metabisulfite and its effect on the growth and metabolism of selected bacteria. Arch. Oral Biol. 12: 1653-1658, 1968.
- 27) Harald A.B. Linker: Growth inhibition of glucose- grown cariogenic - and other Streptococci by saccharin in vitro. Department of microbiology, N.U. Dental Center N.Y. (Z. Naturforsch Ch. 32c, 839-843, 1977).
- 28) H.V. Jordan and P.H. Keyes: In vitro methods for the study of plaque formation and carious lesions. Arch.Oral Biol. 11: 799-801,1966.
- 29) Harald A.B. Linker: New medium for the isolation of *S. mutans* and - its differentiation from other oral streptococci. Journal of - - clinical microbiology, pp 604-609, June, 1977.
- 30) Harris J.Keene : Relationship of *Streptococcus mutans* carrier status to the development of carious lesions in initially caries free ---- recruits. Research Progress report NDRI/FR7408
work unit M.F. 12.524.012 0006 A. G 31 Bureau of medicine and surgery

navy department Washington, D.C. 20390.

- 31) H. Hugh Fudenberg. Manual de Inmunología clínica, Editorial Manual Moderno pp 197-'98, 573-574, 1978.
- 32) Huerta Miranda Jorge: Microbiología de la caries dental, Revista ADM, mayo-junio, Vol. XXXIII No. 3, 1981.
- 33) Jordans, H.V.B. Krasse: A method of sampling human dental plaque for certain "caries-inducing" Streptococci. Arch Oral Biol. 13: 919-927, 1968.
- 34) Jordan, H.V. Fitzgerald : Inhibition of experimental caries by - sodium metabisulfite and its effect on the growth of selected bacteria. Journal Dent. Res 39: 116-123, 1960.
- 35) Kirck C. Hoerman: Great lakes, 111 the association of *S. mutans* - with early carious lesions in human teeth. Jada, Vol. 85, -- -- -- decemcer, pp 1349-1352, 1972.
- 36) Kleinberg. L. Craw, D. and Komiyaama: Effect of salivary supernant on the glycolytic activity of the bacteria in salivary sediments. Arch. Oral Biol 18: 787, '973.
- 37) Kleinberg L. Studies on dental plaque the effect of different --- concentration of glucose on the pH of dental plaque in vivo, J. - Dent Res. 40: 1087, 1961.
- 38) Kleinberg L. the construction and evaluation of modified types of antimony microelectrodes for intra oral use. Br. Dent J. 104: 196, '958.
- 39) Komiyaama, K., and Kleinberg: Comparison of glucose utilization and acid formation by *S. mutans* and *S. sanguis* at different pH. J. -- Dent Res 53: 241, 1974. (abstract)
- 40) Liljenmark, W.F.D.H. Okrent: Differentiation recovery of *Streptococcus mutans* from various mitis salivarius agar preparations. J. Clin. Microbiol. 4: 108-109, 1970

- 41) Larry Wolff and William F: Observation of beta hemolysis among - three strains of *S. mutans*. Infection and Immunity, pp.745-748, feb. 1978.
- 42) Mc. Dougall, W.A. Studies on the dental plaque. III the effect of saliva on salivary mucids and its relationship to the regrowth - of plaques. Aust. Dent. J. 8: 463, 1963.
- 43) Perch, B.E. Kjeus: Biochemical and serological properties of *S. mutans* from various human and animal sources. Acta Pathol. Microbiol.Scand. B.82: 357-370,1974.
- 44) Robert M. Stephens: Changes in hydrogen- ion concentration on tooth surfaces and in carious lesions J. A.D.A Vol.27pp.718-723, 1940.
- 45) R.M.Mc Cabe, P.H.Keyes: An in vitro for assessing the plaque forming ability of oral bacteria. Arch Oral Biol.Vol. 12,pp.1653, 1967.
- 46) R.M.Green and R.L. Hartles: The effect of diets containing different mono and disaccharides on the incidence of dental caries in the albino rat. Arch oral biol. Vol.14 pp. 235-241,1969.
- 47) Shklair,I.L.H.J.Keene: The distribution of *Streptococcus mutans* on the teeth groups of naval recruits. Arch Oral Biol.19: 199-203, 1974.
- 48) Staat,R.H.Inhibition of *S. mutans* strains by different mitis-salivarius agar preparations. J. Clin. Microbiol.3:378-380,1976.
- 49) Stephan,R.M.: Studies of changes in the pH produced by pure cultures of oral microorganism, J.Dent Res 26: 15,1947.
- 50) Stephan, R.M.: Changes in hydrogen ion concentration on tooth surfaces and in carious lesions, J.Am.Dent Assoc.27:718,1940.
- 51) Stralfors,A.: Investigations into the bacterial chemistry of dental plaques, Odontol.T.58:153,1950.

- 52) Syed S.A and W.J. Leesche: Efficiency of various growth media in recovering oral bacterial flora from dental plaque, Appl. Microbiol. 26: 459-465, 1973.
- 53) Suzanne M. Michalek and Jerry Mc. Ghee: Effective immunity to dental caries passive transfer to rats of antibodies to *S. mutans* elicits protection. Infection and Immunity. pp. 644-650, Sep. 1977.
- 54) Suzanne M. Michalek: Oral ecology and virulence of *Lactobacillus casei* and *S. mutans* in gnotobiotic rats. Infection and Immunity pp. 690-696, Sep. 1981.
- 55) Shigeyuki Hamada Norio: Isolation and serotyping of *S. mutans* from teeth and feces of children. J. Clin. Microbiology pp. 314-318, April, 1980.
- 56) S.J. Mattingly: Recovery of *S. mutans* after amino acid deprivation Infection and Immunity pp. 585-590. Sep. 1977.
- 57) Shigeyuki Hamada, Torii: Adherence of *S. sanguis* clinical isolates to smooth surfaces and interaction of the isolation with *S. mutans* glucosyltransferase. Infection and Immunity, pp. 363-372, Apr. 1981.
- 58) Susan K. Harlander: *Streptococcus mutans* dextranase; stimulation of glucan formation by phosphoglycerides infection and Immunity, pp. 450-456, Feb. 1978.
- 59) T. Ikeda and H.J. Sandham: A high-sucrose medium for the identification of *S. mutans*. Arch. Oral Biol. Vol. 17 pp. 781-783, 1972.
- 60) T. Ikeda: Virulence of *S. mutans* comparison of the effect of a coupling sugar and sucrose on certain metabolic activities and cariogenicity. Infection and Immunity, Vol. 19 pp. 477-480, 1978.

- 61) William A. Nolte: Oral microbiology with basic microbiology and Immunity. Third edition. The C.V. Mosby Company, pp. 515-534, 1977.
- 62) J.J. Peres: Influence of growth medium on adsorption of *S. mutans*, *Actinomyces viscosus*, and *Actinomyces naeslundii* to saliva treated hydroxyapatite surfaces. *Infection and Immunity*, pp. 111-117, April, 1981.
- 63) Zimmer, D.D., J.M. Jablon: Experimental caries induced in animals by streptococci of human origin. *Proc. Soc. Biol. Med.* 118:766-770, 1965.