



302827  
UNIVERSIDAD MOTOLINIA A. C. N=9  
25j.

ESCUELA DE QUIMICA  
CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

EVALUACION DE TRES MEDIOS DE  
CONSERVACION PARA ESTREPTOCOCCOS  
DEL GRUPO VIRIDANS

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**

P R E S E N T A

**MARTHA ALICIA GARCIA OROZCO**

MEXICO, D. F.

1994

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **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.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL  
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA DEL  
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA  
"IGNACIO CHAVES"

BAJO LA DIRECCIÓN DEL MCM. DR. EDUARDO RIVERA MARTÍNEZ Y LA  
Q.F.B. MA. DEL ROSARIO VÁZQUEZ LARIOS

PORQUE SIN TENER ALAS HEMOS  
VOLADO A LUGARES TAN  
APARTADOS, SERIA REALMENTE  
UNA LASTIMA CONFORMARSE  
CON UN PEDACITO DEL VASTO  
CIELO QUE NOS HA SIDO  
OTORGADO.

A mi esposo, padres, hermanos, familia, amigos  
y maestros, quienes hoy y siempre me han  
enseñado a no tener miedo de volar más alto;  
sino a decidir el momento y el lugar más adecuado  
para hacerlo.

A todos ellos mil gracias por haberme ayudado a  
emprender el vuelo.

## INDICE

### CAPITULO I

#### INTRODUCCION

1.1 Planteamiento del problema.....	1
1.2 Objetivo.....	2
1.3 Hipótesis.....	3

### CAPITULO II

#### ANTECEDENTES

2.1 Conservación de Microorganismos.....	4
2.1.1 Métodos de conservación de microorganismos.....	5
2.2 Características generales de los estreptococos del grupo viridans.....	9
2.2.1 Características macroscópicas y microscópicas.....	9
2.2.2 Fisiología.....	10
2.2.3 Clasificación.....	11
2.2.4 Patogenicidad para el hombre.....	14
2.3 Métodos de conservación de los estreptococos del grupo viridans.....	16

### CAPITULO III

#### PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Diagrama General.....	20
3.1.1 Diagrama 1 para la conservación de las cepas.....	20
3.1.2 Diagrama 2 para comprobar la preservación de las cepas.....	21

3.2	Material, medios de cultivo, reactivos y equipo.....	22
3.2.1	Material biológico.....	22
3.2.2	Material de laboratorio.....	22
3.2.2.1	Preparación de material.....	22
3.2.3	Medios de Cultivo.....	23
3.2.3.1	Preparación de medios de cultivo para las cepas..	23
3.2.4	Reactivos.....	23
3.2.4.1	Preparación de reactivos.....	24
3.2.5	Equipo.....	24
3.3	Metodología.....	25
3.3.1	Preparación de los medios de cultivo.....	25
3.3.2	Comprobación de la conservación de las cepas.....	26

#### **CAPITULO IV**

##### **RESULTADOS**

4.1	Resultados.....	28
4.2	Discusión.....	38

#### **CAPITULO V**

<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>41</b>
--------------------------	-----------

<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>42</b>
--------------------------	-----------

**CAPITULO I**

## INTRODUCCION

### 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El tratamiento de enfermedades infecciosas que afectan al ser humano debe basarse en el estudio del agente causal de las mismas. Al conocer la morfología, fisiología y susceptibilidad de los microorganismos que producen infección se puede llegar a soluciones más certeras en cuanto al diagnóstico, tratamiento y profilaxis. Los microorganismos pertenecientes a un mismo género tienen características en común que los diferencian de otros y a su vez, entre ellos existen diferencias que permiten agruparlos en especies. Sin embargo, son organismos vivos que están sujetos a cambios, por ejemplo mutaciones, que alteran sus características biológicas. Por ello la conservación de microorganismos con todas las características iniciales del primoaislamiento es de suma importancia para estudios posteriores como: susceptibilidad a antibióticos, sinergismos, cambios enzimáticos, estudios epidemiológicos, entre otros.<sup>6,8,10,17</sup>

Las colecciones microbianas son el resultado inmediato de necesidades institucionales individuales.<sup>17</sup> Habitualmente los fines perseguidos son la realización de investigaciones posteriores encaminadas a incrementar el conocimiento sobre los agentes causales para brindar un diagnóstico más eficiente, un tratamiento óptimo y establecer medidas preventivas más exitosas.

Desde 1992 en el Laboratorio de Microbiología del Instituto se creó un cepario con microorganismos obtenidos a partir de hemocultivos, debido a la importancia de la endocarditis bacteriana en pacientes con problemas cardiacos en quienes esta enfermedad puede ser mortal.<sup>14</sup>

En un estudio realizado en el Instituto sobre patrones de susceptibilidad a antimicrobianos se obtuvo que la fuente de bacteremia más frecuente fue endocarditis (28.5%), siendo los estreptococos del grupo viridans los microorganismos aislados con mayor frecuencia, aunque existen otros microorganismos que también la producen, principalmente cocos gram positivos.<sup>21</sup>

Los estreptococos del grupo viridans tienen requerimientos nutricionales estrictos lo cual dificulta su preservación. Por tal motivo, en el presente trabajo se usaron tres medios de cultivo enriquecidos con sustratos tales como el suero y la leche para determinar cual de ellos ofrecía un mayor tiempo de conservación y viabilidad así como menor riesgo de contaminación para preservar los microorganismos en cuestión.

## **1.2 OBJETIVO**

- a) Determinar cual de los tres medios empleados permite a mediano plazo:
  - i) conservar los estreptococos del grupo viridans
  - ii) disminuir el riesgo de contaminación
  - iii) disminuir el costo de almacenamiento
  
- b) Una vez seleccionado el medio que ofrezca mayor viabilidad por más tiempo, almacenar tres alícuotas por cepa para utilizarse en futuros estudios microbiológicos y epidemiológicos.

### **1.3 HIPOTESIS.**

#### **HIPOTESIS ALTERNA.**

Los 3 medios propuestos no son similarmente eficientes en la preservación y viabilidad de estreptococos del grupo viridans.

#### **HIPOTESIS NULA.**

Los 3 medios propuestos son similarmente eficientes en la preservación y viabilidad de estreptococos del grupo viridans.

## CAPITULO II

## ANTECEDENTES.

### 2.1 CONSERVACION DE MICROORGANISMOS.

Los microbiólogos necesitan disponer de cultivos puros y estables así como el químico o bioquímico de sustancias puras para poder trabajar. Sin embargo, a diferencia de las sustancias químicas que pueden almacenarse fácilmente, los cultivos microbianos son extremadamente vulnerables y pueden contaminarse, mutar o bien perderse a no ser que se les dé un manejo adecuado.<sup>8</sup> Como todo ser vivo los microorganismos responden a los estímulos del medio en el que se encuentran; sin embargo, los cambios producidos pueden ser un arma de doble filo, por ejemplo: en la producción de antibióticos, proteínas, enzimas, etc, las cepas mutantes pueden dar un mayor o menor rendimiento; en ensayos de susceptibilidad a antibióticos o de identificación en base a pruebas bioquímicas las mutaciones son contraproducentes ya que los resultados obtenidos no corresponden al microorganismo aislado inicialmente.

Gran número de laboratorios microbiológicos e instituciones requieren cepas de colección de interés médico-biológico útiles en el diagnóstico, preparación de vacunas, pruebas de desafío, identificación, preparación de antibióticos, producción de proteínas, investigación, enseñanza, etc.<sup>6,10</sup> La conservación de cepas consiste en un método con el que se pretende mantener un cultivo microbiano viable con todas sus características fenotípicas y genotípicas originales. La selección de dicho método depende de la intención en los servicios para los que sea requerida, la inversión, el equipo y las instalaciones existentes.<sup>17</sup>

Es necesario enfatizar que no existe un método universal para preservar exitosamente a los microorganismos. Los grupos taxonómicos de microorganismos y aún cepas dentro de una misma especie pueden cambiar dependiendo del método de preservación usado.<sup>8</sup>

Por lo dicho anteriormente, la formación de un cepario requiere de una gran cantidad de materiales, medios de cultivo y trabajo programado y constante, no es un proceso en el que se obtengan resultados óptimos rápidamente, debe mejorarse año con año. La vigilancia de una colección microbiana debe ser estricta, revisando periódicamente las características de cada microorganismo y las cepas de reciente adquisición deben manipularse inmediatamente para evitar pérdida de viabilidad, selección de mutantes y contaminación.<sup>10</sup>

#### **2.1.1 METODOS DE CONSERVACION DE MICROORGANISMOS.**

Existen métodos de conservación a corto, mediano y largo plazo dependiendo del tiempo que permanezcan viables los microorganismos, aunque la viabilidad es un término relativo ya que el porcentaje de recuperación de un organismo varía en diferentes medios de cultivo y condiciones.<sup>9</sup>

En la conservación a corto plazo la viabilidad es de días a semanas, a mediano plazo es de meses hasta un año y a largo plazo es de más de un año. Entre los métodos de conservación que existen están:

##### **1. Resiembras periódicas o subcultivos.**

El método tradicional es la resiembra periódica pero no es el más satisfactorio. Entre las desventajas que tiene es que fácilmente puede haber un mal etiquetado del cultivo, tiene el inconveniente de seleccionar mutantes y exponer el cultivo a contaminación (especialmente con especies del género *Bacillus*) y puede haber inoculación del microorganismo equivocado. La pérdida de viabilidad es un riesgo constante y los cultivos tienden a perder sus características iniciales por la frecuencia de subcultivo. No es

aplicable a todos los microorganismos puesto que algunos permanecen viables días, otros semanas y en muy pocos casos meses o años.<sup>8,9</sup>

## 2. Reducción del metabolismo y transferencia periódica.

La frecuencia de subcultivos puede reducirse manteniendo al microorganismo en un estado metabólico disminuido. Esto puede lograrse de varias formas, por ejemplo usando medios con escasos nutrientes, medios sellados con aceite mineral o parafina o almacenamiento a bajas temperaturas. Entre las desventajas están la inconveniencia de usar parafina líquida o bien aceite mineral por su difícil manipulación, el riesgo de contaminación si sólo se tiene un tubo por cepa y el espacio de almacenamiento que requieren tubos múltiples de cada cepa.<sup>8,9</sup>

## 3. Deseccación.

Este método consiste en remover el agua presente en el cultivo y evitar la rehidratación. Se ha usado principalmente para la conservación de hongos, quienes parecen ser más resistentes a la desecación que otros grupos de microorganismos, por ejemplo: *Vibrio* y *Pseudomonas* spp.

El método de desecación puede realizarse sobre discos de papel filtro, discos de gelatina o almacenar al microorganismo en tierra estéril. Ninguna de las variaciones del método de desecación tienen una aplicación universal y en la mayoría de los casos han sido empleados para la conservación de cierto grupo de microorganismos o bien para usos más especializados. La estabilidad de las características del cultivo no siempre se ha evaluado y al parecer es cepa-específica.

Los métodos descritos anteriormente podrían considerarse de conservación a corto y mediano plazo, aunque para algunos microorganismos la conservación con alguno de éstos métodos, en

particular el segundo y el tercero, podría dar resultados a largo plazo.<sup>10</sup>

#### 4. Congelación.

La mayoría de las bacterias soportan la congelación y pueden ser preservadas en ese estado. Al congelarlas se disminuye el metabolismo y la energía disponible para las reacciones bioquímicas es mínima. El proceso de lesión celular durante la congelación aún no se conoce bien.<sup>6</sup>

Al parecer el daño se produce por la formación de cristales de hielo y la presencia de electrolitos en concentraciones elevadas al pasar el agua de estado líquido a sólido. Por lo general se adicionan adyuvantes o sustancias protectoras a la suspensión celular como son: glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), suero humano o animal, leche, etc.<sup>9,16</sup>

Las principales técnicas de conservación por exposición a bajas temperaturas son:

a) Almacenamiento a - 20°C.

b) Almacenamiento a - 70°C (se prefiere más que la temperatura de - 20°C aunque puede haber pérdida de viabilidad por formación de cristales que dañen la pared celular bacteriana)

c) Almacenamiento a -196°C en nitrógeno líquido (este proceso resulta más caro en comparación al de una planta de liofilización).<sup>16</sup>

## 5. Liofilización.

Por último el método de liofilización consiste en la deshidratación de un producto previamente congelado cuya agua se elimina por sublimación al vacío. Al estar la suspensión en estado sólido y el agua removida como vapor, la estructura del microorganismo se conserva. Con este método se pueden conservar a temperatura ambiente microorganismos por mayor tiempo. Las colecciones de cultivos y centros de referencia (American Type Culture Collection ATCC, National Collection of Type Culture NCTC, (NRRL) Culture Collection NRRLCC, etc) conservan los cultivos con este método. Sin embargo, no todos los microorganismos pueden preservarse en estado liofilizado como es el caso de los géneros Neisseria, Streptobacillus y Vibrio.<sup>10</sup> En general, las bacterias gram-positivas soportan mejor la liofilización que las gram-negativas. Puede decirse que a mayor número de células en la suspensión inicial mayor será la probabilidad de recuperación de la bacteria.<sup>9</sup>

El método de liofilización es adecuado para instituciones que tengan una colección grande para servicio, ya que se pueden preparar varios lotes que durarán mucho tiempo.<sup>6</sup>

Las desventajas de este método consisten en el elevado costo del equipo y el ser un proceso laborioso.

Los cambios en las características de los cultivos después de varios pases son bien conocidas; sin embargo el grado de alteración de éstas características después de la congelación o la liofilización no se conoce bien. Se han realizado estudios en donde no hay cambios detectables (Hwang, 1970; Mehrotra et al., 1970). Por otra parte puede haber daño enzimático (Macleod Smith and Gelinas, 1966; Moss and Speck, 1966) y del DNA (Webb, 1967, 1969; Servin-Massieu, Sánchez-Torres and Pallares, 1968). Se han observado cambios en la estructura antigénica en algunos géneros, como Shigella, pero no en otras (Jennens, 1954). También la patogenidad puede verse alterada en ciertos casos (Priestley, 1952) mientras que en otros no se afecta (Sorrelss,

Speck and Warren, 1970) Posiblemente el proceso de liofilización seleccione microorganismos resistentes a la congelación o bien aquéllos con propiedades especiales que les permiten sobrevivir.<sup>8,9</sup>

## **2.2 CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS ESTREPTOCOCOS DEL GRUPO VIRIDANS.**

Los estreptococos del grupo viridans constituyen un grupo relativamente abundante un tanto heterogéneo pertenecientes al género Streptococcus que causan infecciones importantes en el hombre y que se encuentran formando parte de la flora bacteriana de la orofaringe. Se les identifica en base a sus características fisiológicas, bioquímicas y serológicas.<sup>13</sup>

### **2.2.1 CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS Y MICROSCOPICAS.**

Los estreptococos del grupo viridans poseen características comunes al resto de los estreptococos. Son células de forma esférica a ovoide de menos de 2 micras de diámetro que en caldos de cultivo forman cadenas o pares, debido a que la división celular ocurre en un plano. No son móviles, no forman esporas y son gram positivos.<sup>7,13,20</sup>

Algunas especies requieren para su crecimiento de medios suplementados con compuestos con el grupo tiol como la cisteína, o bien de las formas activas de la vitamina B6 (piridoxal fosfato o piridoxamina) por lo que se les ha denominado estreptococos variante nutricionales. Antes se pensaba que eran mutantes nutricionales de especies de estreptococos del grupo viridans; sin embargo actualmente se piensa que pertenecen a una especie distinta dentro del género Streptococcus.<sup>1,13,14,15,19</sup>

Las colonias miden de 0.1 a 0.5 mm, pueden tener un aspecto mucoso y translúcido o bien liso y no translúcido. El tamaño y aspecto de la colonia se ven afectados por el medio de cultivo y la atmósfera de incubación. La temperatura de incubación es de 35 a 37°C y requieren de una atmósfera de CO<sub>2</sub> para poder crecer.<sup>1,13</sup>

Uno de los esquemas más útiles para la clasificación inicial de los estreptococos se basa en su acción en agar-sangre. Los estreptococos grupo viridans forman colonias rodeadas de una zona de alfa-hemólisis que muestra la característica decoloración verde o bien son no hemolíticos. Bajo condiciones de anaerobiosis los estreptococos del grupo viridans son generalmente no hemolíticos.<sup>1,20</sup>

### 2.2.2 FISILOGIA.

Los estreptococos del grupo viridans son bacterias que requieren de medios enriquecidos. Se identifican por exclusión, ya que dan reacciones negativas con la mayoría de las pruebas diseñadas para identificar a especies del género.<sup>1</sup> Son microorganismos anaerobios facultativos. Su metabolismo es fermentativo y el principal producto de éste es ácido láctico.

La mayoría de las especies no crecen en agar bilis 40% y son bilis esculina negativas; algunas pueden crecer en agar bilis 10% (<sup>7,20</sup>). Sin embargo, en un estudio realizado por Facklam con 112 cepas de estreptococo del grupo viridans, 20 fueron erróneamente identificadas como no enterococos grupo D por dar reacción positiva de bilis esculina. Streptococcus intermedius fue la especie que presentó este comportamiento.<sup>5</sup>

Entre las características fisiológicas más importantes de los estreptococos del grupo viridans están: formación de ácido en caldos de manitol, sorbitol, lactosa, inulina y rafinosa, hidrólisis de esculina, arginina e hipurato, formación de glucanos

en agar sacarosa al 5%, tolerancia a medios con diferentes concentraciones de bilis y cloruro de sodio, etc (Cuadro I).<sup>4</sup>

### 2.2.3 CLASIFICACION.

Los estreptococos del grupo viridans son quizás el grupo de cocos gram positivos más difíciles de identificar a nivel de especie. Estudios genéticos aún no han aportado soluciones e incluso han hecho más confusa la clasificación de este grupo de microorganismos.<sup>1</sup>

Los intentos de clasificación y nomenclatura de los estreptococos se basan en:

#### 1. Cambios producidos en la sangre (actividad hemolítica)

Los estreptococos del grupo viridans son alfa o gamma hemolíticos. En la hemólisis alfa la sangre es hemolizada parcialmente por lo que alrededor de la colonia se observa una coloración verdosa, mientras que en la hemólisis gamma no se afectan los glóbulos rojos por lo que no hay hemólisis. En general las especies hemolíticas son las más patógenas.<sup>20</sup>

#### 2. Agrupamiento serológico (análisis de antígenos)

En los estreptococos grupo viridans la mayoría de las cepas no tienen antígenos de grupo por lo que no se pueden usar estudios serológicos para esquemas de identificación. Lancefield trató de usar antígenos de carbohidratos y nucleoproteína pero halló reacción cruzada de aglutinación y precipitación entre los antígenos de carbohidrato y los antígenos de nucleoproteína resultaron aparentemente homólogos en las cuatro cepas que empleó.

### 3. Características fisiológicas.

Las pruebas fisiológicas se basan en el contenido enzimático que le permite a las especies de estreptococo grupo viridans metabolizar ciertos azúcares (Cuadro II).

Hasta el momento no se ha logrado relacionar la serología con las características fisiológicas de los estreptococos del grupo viridans.<sup>4</sup>

Habitualmente los estreptococos del grupo viridans se clasifican por patrones de fermentación, composición de azúcares de la pared celular y producción de dextranos y levanos partiendo de sacarosa. Los criterios estrictos para la especificación todavía están en etapa evolutiva.<sup>7</sup> A pesar de que la presencia de este tipo de microorganismos es común en infecciones sistémicas, aún no existen esquemas de diferenciación satisfactorios. No hay todavía un texto taxonómico en el que se reconozca a todas las especies de estreptococos del grupo viridans, y los esquemas propuestos para su diferenciación en especies no son prácticos.<sup>4</sup>

Todos los intentos para usar sistemas serológicos para la diferenciación de estreptococos del grupo viridans han fallado al no mostrar correlación entre la serología y las características fisiológicas de las cepas. Uno de los problemas consiste en que aún no se han investigado suficientemente sus propiedades fisiológicas para lograr diferenciarlos. Carlsson, Colman y Williams, así como Hardie y Bowden han investigado extensamente las características fisiológicas de este grupo de microorganismos.<sup>4</sup>

La precisa identificación de especies de estreptococo del grupo viridans responsables de causar endocarditis bacteriana es de suma importancia para elegir la terapia. Los estreptococos del grupo viridans son susceptibles a penicilina no así los enterococos.

Para la diferenciación de estreptococos del grupo viridans y estreptococos del grupo D enterococos y no enterococos se emplean pruebas tales como crecimiento en agar eosina azul de metileno, hidrólisis de esculina en presencia de bilis y crecimiento en cloruro de sodio al 6.5% (Cuadro I).<sup>11</sup>

En S. mitis y S. sanguis II se han detectado antígenos de carbohidrato F, G, H, K, M y O en la pared celular, pero la mayoría de las cepas aisladas no pueden agruparse. Producen peróxido de hidrógeno y aproximadamente un tercio produce dextrano a partir de glucosa.<sup>13</sup>

S. sanguis I produce peróxido de hidrógeno y dos tercios de las cepas producen dextrano insoluble. También esta especie produce enzimas proteolíticas como neuraminidasa, aldolasa de ácido neuramínico e IgA proteasa.<sup>13</sup>

S. MG-intermedius y S. anginosus-constellatus no producen polisacáridos (dextranos o levanos) a partir de la sacarosa ni tampoco peróxido de hidrógeno.<sup>13</sup>

En S. salivarius se han detectado antígenos F, H y K pero por lo general tampoco puede agruparse. No produce peróxido de hidrógeno y produce levanos en vez de dextranos a partir de sacarosa.

Los cultivos de S. mutans deben ser incubados en CO<sub>2</sub> para lograr un crecimiento óptimo. Siempre produce peróxido de hidrógeno, dextranos insolubles y dextranasas. Algunas especies dan bilis esculina positiva por lo que pueden confundirse con S. bovis.<sup>13</sup>

S. morbillorum a diferencia de otras especies fermenta la sacarosa débilmente. Se diferencia de S. uberis y S. acidominimus por no hidrolizar hipurato de sodio. Este microorganismo es

microaerofílico y requiere de una atmósfera de CO<sub>2</sub> para poder crecer.<sup>13</sup>

#### 2.2.4 PATOGENICIDAD PARA EL HOMBRE.

Se considera que los estreptococos del grupo viridans tienen un potencial bajo de infectividad y que las infecciones clínicas ocurren después de una lesión en las áreas donde habitualmente se localizan. Sin embargo, la asociación de estos microorganismos con la producción de caries dental y endocarditis está bien establecida. Los estreptococos son el grupo de microorganismos más importante que habitan la cavidad bucal. Algunas especies colonizan de forma selectiva ciertas superficies, por ejemplo, S. salivarius se encuentra en gran cantidad en la superficie dorsal de la lengua, S. mutans, considerado como el principal agente de la caries dental, se encuentra en gran cantidad formando parte de la placa dental que reviste las lesiones por caries. S. mitis, S. sanguis I y S. sanguis II se localizan en la superficie del diente y en la faringe. El hábitat de S. morbillorum aun no está bien definido.<sup>3, 13</sup> La caries es un ataque microbiano directo sobre el diente en donde se afectan los tejidos más duros del cuerpo, el esmalte y la dentina. Se caracteriza por desmineralización inicial de la materia inorgánica de dichas estructuras seguida por la destrucción de los componentes orgánicos.<sup>3</sup>

La placa dental es una acumulación de bacterias, los productos bacterianos extracelulares y los constituyentes salivales que se adhieren firmemente a la superficie dental. La formación de placa permite un contacto ininterrumpido entre los microorganismos acidógenos y la superficie del esmalte. La matriz de la placa está compuesta de material intercelular de origen bacteriano o salival. Aproximadamente la mitad de esta matriz está integrada por polisacáridos, como glucanos y levanos, productos del metabolismo de la sacarosa. Dichos polisacáridos, en especial los glucanos

menos solubles, son necesarios para la adhesión de las bacterias entre sí y a la superficie dental. Los glucanos pueden ser solubles o insolubles en agua. Ambos tipos contienen cadenas ramificadas de unidades de glucosa unidas mediante enlaces alfa 1,6 y alfa 1,3, aunque estos últimos predominan en los glucanos insolubles. Se supone que la adherencia de S. mutans a las superficies dentales depende principalmente de los glucanos insolubles.<sup>3</sup>

Los procedimientos dentales, en especial las extracciones y manipulación de tejidos periodontales ocasionan bacteremia transitoria, en muchos casos, por estreptococos del grupo viridans y otros microorganismos. Incluso algunas técnicas menos traumáticas como la profilaxia dental, el cepillado o la masticación de alimentos duros y dulces pueden provocar, según se supone, algunos casos de bacteremia. En la mayoría de las personas, las bacterias son eliminadas rápida y totalmente de la sangre sin ninguna consecuencia. No obstante, para aquéllos individuos con afecciones cardíacas reumáticas o defectos congénitos del corazón, o quienes tienen prótesis valvulares cardíacas, la bacteremia transitoria llega a tener consecuencias mortales.<sup>3</sup> Estos microorganismos se fijan y colonizan válvulas cardíacas dañadas u otras partes del endocardio, dando principio a un episodio de endocarditis bacteriana subaguda. Es frecuente que los pacientes con endocarditis tengan antecedentes de atención dental reciente.<sup>3</sup>

En pacientes con problemas cardíacos es de suma importancia el diagnóstico de endocarditis bacteriana, ya que esta enfermedad cuando no se trata con antibióticos es mortal. No existe ninguna otra enfermedad infecciosa en la que la capacidad del antibiótico para eliminar a las bacterias sea tan fundamental.

La endocarditis bacteriana se define como una enfermedad aguda o crónica, debida a la invasión de un área localizada del endotelio de un reborde de las válvulas con desprendimiento continuo de bacterias en el torrente sanguíneo.<sup>12</sup>

Los microorganismos que comúnmente causan endocarditis son cocos gram-positivos como: estreptococos del grupo viridans, estafilococos y enterococos.<sup>18</sup> Los estreptococos del grupo viridans son responsables de un gran porcentaje de todos los casos de endocarditis bacteriana, mencionándose en algunas publicaciones frecuencias que fluctúan entre 54 y 80%.<sup>4,16</sup>

La endocarditis se clasifica en aguda y subaguda según se presente por menos o más de 6 semanas respectivamente. Los estreptococos del grupo viridans están asociados más comúnmente a la endocarditis bacteriana subaguda (EBS). Los estreptococos variante nutricionales son responsables de un 5% de las endocarditis estreptocócicas del grupo viridans, pudiendo infectar tanto válvulas nativas como prostéticas.<sup>1,12,14,15</sup>

### **2.3 METODOS DE CONSERVACION DE LOS ESTREPTOCOCOS DEL GRUPO VIRIDANS.**

Los estreptococos del grupo viridans tienen requerimientos nutricionales exigentes; deben emplearse medios enriquecidos como: soya tripticaseína, infusión de cerebro y corazón, Todd-Hewitt o caldo peptonado. Estos medios están libres de azúcares reductores los cuales podrían influir en la expresión de beta hemólisis de los estreptococos. El pH del medio debe ser de 7-7.4.<sup>1</sup>

Los requerimientos nutricionales de los estreptococos son complejos debido a la incapacidad del microorganismo para sintetizar muchos de sus aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas. En muchos casos, el suero sanguíneo permite el desarrollo de estas bacterias.<sup>7,19</sup>

En algunas publicaciones se menciona el uso de caldo de soya tripticaseína con 20% de glicerol para la conservación de estreptococos del grupo viridans a -70°C,<sup>2</sup> así como también de caldo Todd-Hewitt.<sup>4,14</sup>

A esta temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  es necesario añadir un crioprotector para evitar pérdida de viabilidad por formación de cristales durante la congelación que dañen la pared celular microbiana. Entre los crioprotectores más comúnmente empleados están el glicerol, el dimetilsulfóxido, suero humano o animal y leche descremada.<sup>16</sup>

CUADRO I. Diferenciación de Estreptococos del grupo Viridans,  
no Enterococos grupo D y Enterococos.

	S. mutans	S. viridans	S. bovis no enterococo	S. faecalis enterococo
caldo enterococoso con 10% de bilis	V	- (*)	+	+
caldo S. faecalis	-(*)	-(*)	V	+
NaCl 0.5%	-	-	-	+
Agar eosina azul metileno	-	-	V	+
Sorbitol	+	-	-	+
Manitol	+	-	V	+
Hemólisis	alfa/gamma	alfa/gamma	alfa/gamma	alfa/beta/ gamma
Antígeno grupo D	-	-	+	+
Sensibilidad a lancomicina	S	S	S	R

V= variable, S= sensible, R= resistente, -(\*)= generalmente negativo

(Neefe Lynne, Chretien Jane, Delaha Edward, Garagusi Vincent. Streptococcus mutans Endocarditis. Confusion with enterococcal endocarditis by routine laboratory testing. JAMA. Vol. 230, No. 9 December p. 1298-1299. 1974)

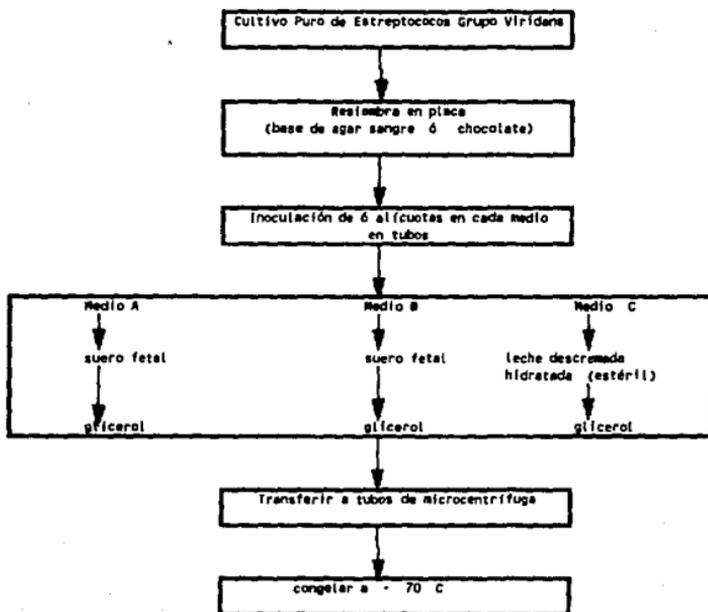


**CAPITULO III**

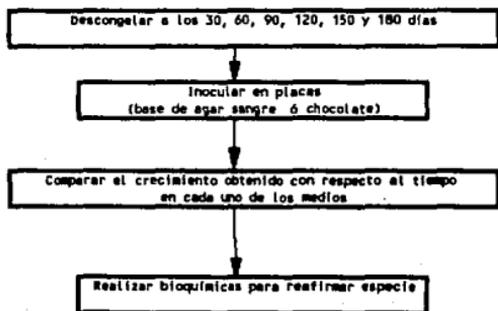
PARTE EXPERIMENTAL

3.1 DIAGRAMA GENERAL.

3.1.1 DIAGRAMA 1. PARA LA CONSERVACION DE LAS CEPAS.



3.1.2 DIAGRAMA 2. PARA COMPROBAR LA PRESERVACION DE LAS CEPAS.



### **3.2 MATERIAL, MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y EQUIPO.**

#### **3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO.**

Cepas de estreptococos del grupo viridans aisladas de hemocultivos de pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" en el periodo comprendido de enero de 1992 a agosto de 1993.

#### **3.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO**

pipetas Pasteur de vidrio

placas de petri

viales de microcentrifuga 1.5ml (Robbins Scientific No. 1012-00-00)

puntas para micropipeta (Rainin No. RT 200)

tubos de 5 x 75 mm con tapón de rosca

matraces Erlen-Meyer de 250 ml

matraces Erlen-Meyer de 125 ml con tapón de rosca

asa de nicromel

##### **3.2.2.1 PREPARACION DE MATERIAL.**

Esterilizar el material de vidrio como pipetas Pasteur y cajas petri en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Esterilizar el material de plástico como viales de microcentrifuga y puntas para micropipeta en gas.

#### **3.2.3 MEDIOS DE CULTIVO**

-Caldo de Todd-Hewitt (Difco)

- Caldo de Soya Trypticaseína (Bioxon)
- Infusión de cerebro y corazón (Bioxon)
- Base de agar sangre (Bioxon)
- Base de agar chocolate (Bioxon)
- Agar de eosina azul de metileno (Bioxon)
- Agar Bilis Esculina (Bioxon)
- Hemina (Bioxon)

### 3.2.3.1 PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LAS CEPAS.

Medio A:           caldo Todd-Hewitt  
                   suero bovino fetal al 10%  
                   glicerol al 50%

Medio B:           caldo soya tripticasa  
                   suero bovino fetal al 10%  
                   glicerol al 50%

Medio C:           caldo BHI  
                   leche descremada al 20%  
                   glicerol al 20%

### 3.2.4 REACTIVOS

- NaCl
- Dextrosa
- Indicador (1.6g de púrpura de bromocresol en 100ml de etanol)
- Agua destilada
- Leche descremada (Svelty Nestlé)
- Glicerol (Merck)
- Suero bovino fetal (Erikar)

### 3.2.4.1 PREPARACION DE REACTIVOS.

i) Prueba de tolerancia de sal (prueba de NaCl 6.5%)

Caldo infusión corazón	25 g
NaCl	60 g
Dextrosa	1 g
Indicador (1.6 g de púrpura de bromocresol en 100 ml de etanol)	1 ml
Agua destilada	1000 ml

Mezclar los reactivos, disolver, dispensar en tubos apropiados y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

ii) Preparación de leche descremada.

Leche descremada Svelty	14 g
Agua destilada	70 ml

En un matraz Erlenmeyer de 125 ml con tapón de rosca esterilizar 70ml de agua destilada a 121°C durante 15 minutos. En condiciones de esterilidad añadir 14 g de leche en polvo y disolver.

### 3.2.5 EQUIPO

agitador vortex (Clay Adams Mixer No. 2651)  
autoclave (Médica instrumental MORS 870780501)  
incubadora con atmósfera de CO (HERAEUS)  
ultracongelador (REVCO 675B-6)  
pipeta digital electrónica (Edp plus No. EP-1000)

### 3.3 METODOLOGIA.

#### 3.3.1 PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

MEDIO A. (Todd-Hewitt) Preparar el caldo según instrucciones del fabricante dispensar alícuotas de 0.45 ml en tubos de 5 x 75 mm con tapón de rosca. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Inocular los tubos hasta observar una consistencia lechosa del medio y agregar con micropipeta 50 microlitros de suero bovino fetal y 500 microlitros de glicerol estéril. Homogeneizar la suspensión en el vortex y con pipeta Pasteur estéril pasar el contenido de los tubos a viales de microcentrifuga previamente rotulados con el número de la cepa, el número del hemocultivo de origen, el medio y la fecha. Finalmente almacenar los viales inoculados a -70°C.

MEDIO B. (Soya Trypticaseína) Preparar el caldo según instrucciones del fabricante dispensar alícuotas de 0.45 ml en tubos de 5 x 75 mm con tapón de rosca. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Inocular los tubos hasta observar una consistencia lechosa del medio y agregar con micropipeta 50 microlitros de suero bovino fetal y 500 microlitros de glicerol estéril. Homogeneizar la suspensión en el vortex y con pipeta Pasteur estéril pasar el contenido de los tubos a viales de microcentrifuga previamente rotulados con el número de la cepa, el número del hemocultivo de origen, el medio y la fecha. Finalmente almacenar los viales inoculados a -70°C.

MEDIO C. (BHI) Preparar el caldo según instrucciones del fabricante y colocar alícuotas de 0.49 ml en tubos de 5 x 75 mm con tapón de

rosca. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Inocular los tubos hasta observar una consistencia lechosa del medio y agregar con micropipeta 100 microlitros de glicerol estéril y 500 microlitros de leche Sveltes hidratada al 20%. Homogeneizar la suspensión en el vortex y con pipeta Pasteur estéril pasar el contenido de los tubos a viales de microcentrifuga previamente rotulados con el número de la cepa, el número del hemocultivo de origen, el medio y la fecha. Finalmente almacenar los viales inoculados a -70°C.

Almacenar las alícuotas de los 3 medios en tubo, la leche disuelta y el glicerol estéril a 4°C para ser usados posteriormente.

### **3.3.2 COMPROBACION DE LA CONSERVACION DE LAS CEPAS**

1.- Una vez preparadas y almacenadas las alícuotas del cultivo puro de estreptococo en cada uno de los tres medios, proceder a descongelarlas a intervalos de 30,60,90,120,150 y 180 días. En condiciones de esterilidad homogeneizar el contenido de cada vial con pipeta Pasteur estéril y depositar 4 gotas de la suspensión en placas de base de agar sangre o chocolate. Incubar a 37°C en atmósfera parcial de CO<sub>2</sub> durante 24 hrs (efectuar esta operación por duplicado para cada vial). Transcurrido el tiempo de incubación comparar el crecimiento obtenido en cada uno de los medios con respecto al tiempo, indicando el crecimiento con cruces:

- a) +++ recuperación excelente
- b) ++ recuperación buena
- c) + recuperación pobre

2.- A partir del crecimiento obtenido realizar pruebas bioquímicas para identificación de estreptococos:

- 1) bilis-esculina
- 2) crecimiento en agar eosina azul de metileno
- 3) NaCl 6.5%

Incubar a 37°C en atmósfera parcial de CO<sub>2</sub> durante 24 hrs.

**CAPITULO IV**

## RESULTADOS Y DISCUSION.

### 4.1 RESULTADOS.

Durante el periodo de estudio se utilizaron quince cepas de estreptococo del grupo viridans, las cuales fueron: Streptococcus sanguis I (8 cepas), Streptococcus sanguis II (1 cepa), Streptococcus mitis (3 cepas), Streptococcus mutans (1 cepa), Streptococcus morbillorum (1 cepa) y Streptococcus acidominimus (1 cepa) (Ver cuadros 1 y 2).

Todas las cepas, a excepción de la 32 y 39, tuvieron una recuperación excelente en los tres medios de conservación empleados durante todo el periodo de estudio. La cepa 32 (S. mutans) obtuvo una recuperación buena a partir de los 120 días, disminuyendo todavía más su recuperación a los 180 días en el medio A; en tanto que la 39 (S. morbillorum) tuvo una recuperación pobre después de 120 días en los tres medios (Cuadro 3 y 4).

En general las especies que mejor recuperación tuvieron después de 180 días fueron S. sanguis I, S. sanguis II, S. mitis y S. acidominimus (Figura 1). En el medio A, las cepas 32 (S. mutans) y 39 (S. morbillorum) tuvieron una recuperación pobre a los 180 días (Figura 2). En los medios B y C a los 180 días la cepa 32 (S. mutans) tuvo una recuperación buena, en tanto que la 39 (S. morbillorum) tuvo una recuperación pobre (Figuras 3 y 4 respectivamente).

Las pruebas de bilis esculina, crecimiento en NaCl al 6.5% y en agar eosina azul de metileno se mantuvieron constantes en la mayoría de las cepas, únicamente la cepa 43 (S. sanguis I) mostró variaciones en la reacción de bilis esculina, siendo en ocasiones positiva y en otras negativa. La misma prueba en la cepa 33 (S. sanguis I) dió positiva durante todo el periodo de estudio (Cuadro 5).

CUADRO 1. RELACION DE ESTREPTOCOCOS DEL GRUPO VIRIDANS

\*\*\*\*\*

No. de cepa                      ESTREPTOCOCO

\*\*\*\*\*

1	<u>Streptococcus sanguis I</u>
23	<u>Streptococcus mitis</u>
31	<u>Streptococcus sanguis II</u>
32	<u>Streptococcus mutans</u>
33	<u>Streptococcus sanguis I</u>
37	<u>Streptococcus sanguis I</u>
39	<u>Streptococcus morbillorum</u>
43	<u>Streptococcus sanguis I</u>
44	<u>Streptococcus sanguis I</u>
47	<u>Streptococcus sanguis I</u>
48	<u>Streptococcus sanguis I</u>
51	<u>Streptococcus acidominimus</u>
52	<u>Streptococcus mitis</u>
53	<u>Streptococcus sanguis I</u>
55	<u>Streptococcus mitis</u>

\*\*\*\*\*

**CUADRO 2. CEPAS UTILIZADAS**

<b>CEPA</b>	<b>FRECUENCIA</b>
<u>S. sanguis I</u>	8
<u>S. mitis</u>	3
<u>S. sanguis II</u>	1
<u>S. mutans</u>	1
<u>S. morbillorum</u>	1
<u>S. acidominimus</u>	1
<b>TOTAL</b>	<b>15</b>

CUADRO 3. Recuperación en los medios A, B y C a los 90, 120, 150 y 180 días

No. de copa MEDIO	1			23			31			32			33		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Tiempo (días)															
90	+++	/	+++	+++	/	+++	+++	/	+++	+++	/	+++	+++	/	+++
120	+++	/	+++	+++	/	+++	+++	/	+++	++	/	++	+++	/	+++
150	+++	/	+++	+++	/	+++	+++	/	+++	+	/	+	+++	/	+++
180	+++	/	+++	+++	/	+++	+++	/	+++	+	/	++	+++	/	+++
No. de copa MEDIO	37			39			43			44			47		
A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
Tiempo (días)															
90	+++	/	+++	+++	/	+++	+++	/	+++	+++	/	+++	+++	/	+++
120	+++	/	+++	++	/	++	+++	/	+++	+++	/	+++	+++	/	+++
150	+++	/	+++	+	/	+	+++	/	+++	+++	/	+++	+++	/	+++
180	+++	/	+++	+	/	+	+++	/	+++	+++	/	+++	+++	/	+++
No. de copa MEDIO	48			51			52			53			55		
A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
Tiempo (días)															
90	+++	/	+++	+++	/	+++	+++	/	+++	+++	/	+++	+++	/	+++
120	+++	/	+++	+++	/	+++	+++	/	+++	+++	/	+++	+++	/	+++
150	+++	/	+++	+++	/	+++	+++	/	+++	+++	/	+++	+++	/	+++
180	+++	/	+++	+++	/	+++	+++	/	+++	+++	/	+++	+++	/	+++

+++ recuperación excelente

+++ recuperación buena

++ recuperación pobre

A= Medio A

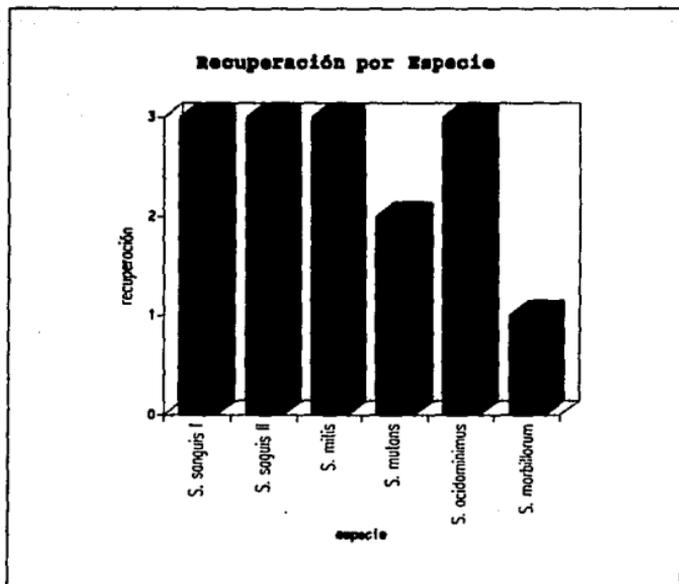
B= Medio B

C= Medio C

Cuadro No. 4 RECUPERACION A LOS 180 DIAS.

No. de cepa	1	23	31	32	33	37	39	43	44	47	48	51	52	53	55
	RECUPERACION														
A	+++	+++	+++	+	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
B	+++	+++	+++	++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
C	+++	+++	+++	++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+++recuperación excelente, ++ = recuperación buena, += recuperación pobre  
 Recuperación de las cepas de estreptococo grupo viridans almacenadas en los  
 Medios A, B y C a -70 C a los 180 días.



**Fig. 1** Recuperación por especie de los estreptococos del grupo viridans a los 180 días en lo A, B y C. Las especies con menor recuperación son *S. mutans* y *S. morbillorum*.

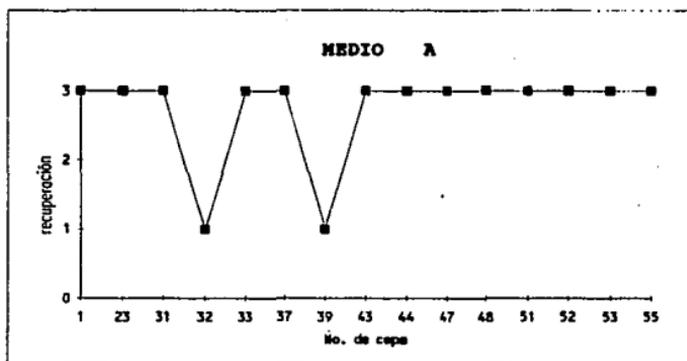


Fig. 2 Recuperación de cepas de estreptococo grupo viridans después de estar almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 180 días en el medio A. En la escala del eje Y una recuperación excelente es de tres unidades, una recuperación buena de dos unidades y una recuperación pobre de una unidad.

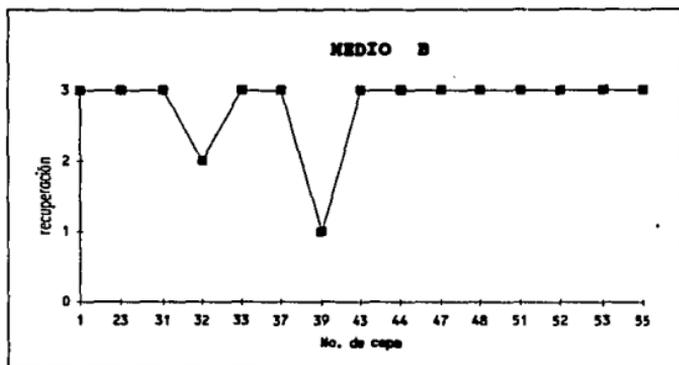


Fig. 3 Recuperación de capas de estreptococo grupo viridans después de estar almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 180 días en el medio B. En la escala del eje Y una recuperación excelente es de tres unidades, una recuperación buena de dos unidades y una recuperación pobre de una unidad.

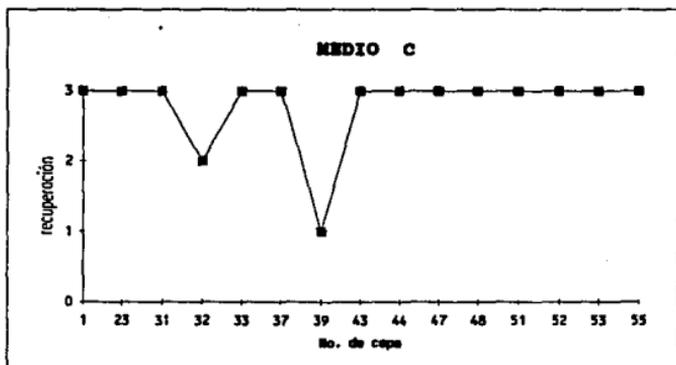


Fig. 4 Recuperación de cepas de estreptococo grupo viridans después de estar almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 180 días en el medio C. En la escala del eje Y una recuperación excelente es de tres unidades, una recuperación buena de dos unidades y una recuperación pobre de una unidad.

**Cuadro 5. RESULTADO DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS EFECTUADAS  
A LOS 90, 120, 150 y 180 DIAS.**

CEPA DIAS	EMB				BE				Na Cl 6.5%			
	90	120	150	180	90	120	150	180	90	120	150	180
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

EMB=crecimiento en agar eosine azul de metileno  
NaCl 6.5%= crecimiento en cloruro de sodio al 6.5%  
BE= hidrólisis de bítila esculina

## 4.2 DISCUSION

Para efectuar estudios posteriores de los agentes causales de enfermedades infecciosas, como es el caso de la endocarditis bacteriana, es necesario conservar el microorganismo en cuestión en condiciones tales que se alteren lo menos posible sus propiedades y características iniciales (morfológicas, fisiológicas, genéticas).<sup>7</sup>

Los estreptococos del grupo viridans son responsables de más de la mitad de los casos de endocarditis bacteriana.<sup>4,13,16</sup> Debido a que tienen requerimientos nutricionales fastidiosos, su crecimiento y conservación se vuelven tareas difíciles.<sup>14,15,19</sup> Para la conservación de este grupo de microorganismos se recomienda el uso de medios enriquecidos tales como soya tripticaseína, Todd-Hewitt e infusión de cerebro y corazón entre otros.<sup>1</sup> En el presente trabajo los medios antes mencionados fueron además adicionados con suero o leche descremada y glicerol como crioprotector. Los medios adicionados con suero fueron: Todd-Hewitt (medio A) y soya tripticaseína (medio B), la leche se adicionó al medio de infusión de cerebro y corazón (medio C).

Todas las cepas probadas mostraron excelente recuperación en los tres medios a los 90 días.

De las quince cepas empleadas, trece (87%) tuvieron una recuperación excelente en los tres medios de conservación después de 180 días. La recuperación de la cepa 32 (*S. mutans*) a los 180 días en el medio A fue pobre, mejorando en los medios B y C; en tanto que la cepa 39 (*S. morbillorum*) en este mismo periodo tuvo una recuperación pobre. Tanto la cepa 32 como 39 corresponden a especies diferentes de estreptococos del grupo viridans. Podría suponerse que estas especies en particular requieren de otro tipo de nutrientes para mejorar su conservación; sin embargo, sería necesario contar con un mayor número de cepas de estas especies.

para comprobar que su mala recuperación posterior al almacenamiento es especie-específico y no medio-específico.

En general los tres medios empleados cumplirán con la función de conservar las cepas de estreptococos del grupo viridans a mediano plazo. Sin embargo cabe mencionar que el medio B (Soya Trypticaseína) fue más eficiente en la conservación de cepas, ya que presentó una recuperación adecuada incluso en la especie S. mutans. La metodología empleada permite ahorrar espacio de almacenamiento y disminuir riesgos de contaminación. Cabe mencionar que durante el periodo de estudio se observó contaminación en algunas de las cepas, sin embargo esta era debida al agua de condensación de las placas después de incubar o bien por manipulación errónea inicial al momento de guardar la cepa, ya que por ejemplo, se observaba contaminación a los 90 días pero no a los 150.

En cuanto a las pruebas bioquímicas, la cepa 43 (S. sanguis I) mostró resultados variables en la prueba de bilis esculina siendo en ocasiones el resultado positivo y en otras negativo. En la cepa 33 (S. sanguis I) se obtuvo un resultado positivo para esta misma prueba durante todo el periodo de estudio, sin embargo se ha reportado que pueden ocurrir excepciones ocasionales con esta especie en particular.<sup>1</sup> En el caso de la cepa 43 sería conveniente continuar efectuando dicha prueba para evaluar el comportamiento de esta cepa en particular, ya que de las ocho cepas de S. sanguis I que se utilizaron la 43 es la única que muestra este comportamiento tan indefinido.

Puesto que con los tres medios de conservación se obtienen resultados similares, la elección de uno de ellos como medio definitivo para la conservación de los estreptococos del grupo viridans podría basarse en las dificultades de su elaboración.

El medio que presenta más riesgo de contaminación es el medio C, debido a que uno de los sustratos adicionados a este medio fue la leche, la cual se preparó esterilizando el agua destilada y

añadiendo en condiciones de esterilidad la cantidad necesaria de leche en polvo(periódicamente se realizaron controles microbiológicos de la misma para evitar contaminaciones ). Posteriormente se obtuvo la referencia de que esterilizándola a 120°C durante 15 minutos no hay desnaturalización de proteínas y carbohidratos por lo que conserva sus propiedades nutricionales y se corren menos riesgos de contaminación. A diferencia del suero bovino fetal empleado en los medios A y B, la leche se almacenó en refrigeración y no en congelación, por lo que la vida media de la misma es menor y es necesario prepararla antes de guardar una determinada cepa si es que ya lleva mucho tiempo almacenada.

En cuanto a modificaciones a la técnica de guardado recomendaría que los medios A y B se prepararan con el glicerol incluido y de esta forma se esterilizaran en alícuotas, para que sólo se añada un reactivo al final (suero) y no dos (suero y glicerol); lo anterior implica menos riesgo de contaminación porque el vial se abre menos veces.

Los proyectos que pueden derivarse del presente trabajo podrían consistir en determinar si las propiedades fisiológicas de los estreptococos del grupo viridans se modifican con el tiempo y de ser así como podrían minimizarse dichos cambios.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

**CAPITULO V**

## CONCLUSIONES.

1.- Los tres medios empleados ofrecieron resultados similares en la conservación de estreptococos del grupo viridans a mediano plazo.

2.- La metodología empleada presentó la ventaja de ahorrar espacio de almacenamiento y disminuir riesgos de contaminación de las cepas por las condiciones en que son almacenadas.

3.- El medio que proporciona mayor eficiencia para el almacenamiento de estreptococos del grupo viridans fue el constituido por Soya Trypticaseína, suero bovino fetal al 10% y glicerol al 50%, ya que permitió mejor recuperación aún en cepas con tendencia a menor resistencia de almacenamiento.

## BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Balows Albert, Hausler William, Herrmann Kenneth. **MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY.** 5th. American Society for Microbiology. Washington. 1991
- 2.- Dall Lawrence, Herdon Betty. Association of cell-adherent glycocalyx and endocarditis production by viridans group streptococci. Journal of Clinical Microbiology. 28(8):1698-1700. 1990
- 3.- Duncan James. Infecciones de la Cavidad Bucal. En Youmans G.P. **MANUAL DE INFECTOLOGIA.** 2ª Edición Tomo 1. Editorial Interamericana McGrawHill. México. 1982
- 4.- Facklam R. R. Physiological differentiation of viridans streptococci. Journal of Clinical Microbiology. 5(2):184-201. 1977
- 5.- Facklam R. R., Thacker L.G., Fox B., Eriquez L. Presumptive Identification of Streptococci with a New Test System. Journal of Clinical Microbiology. 15(6):987-990. 1982
- 6.- Fajardo Ambriz, Escarraman Mata. Compilación de datos sobre colecciones de cepas de microorganismos a nivel nacional. Tesis Profesional. Facultad de Química. UNAM. 1978
- 7.- Joklik W.K., Willet H.P., Amos B.D. **ZINSER MICROBIOLOGIA.** Editorial Médica Panamericana. 18ª Edición. Buenos Aires. 1970
- 8.- Kirsop B.E., Snell J.J. **MAINTENANCE OF MICROORGANISMS. A MANUAL OF LABORATORY METHODS.** Academic Press Inc. London. 1984

9.- Lapage S.P., Redway K.F. PRESERVATION OF BACTERIA WITH NOTES ON OTHER MICROORGANISMS. MONOGRAP SERIES No. 7 Public Health Laboratory Service. London. 1974

10.- Munguía Pérez J.L. Sugerencias en la organización y manejo de un cepario microbiano. Tesis Profesional. ENCB-IPN. 1968

11.- Neefe Lynne, Chretien Jane, Delaha Edward, Garagusi Vincent. Streptococcus mutans Endocarditis. Confusion with Enterococcal Endocarditis by Routine Laboratory Testing. JAMA. 230(9):1298-1299. 1974

12.- Paterson Philip. Endocarditis Bacteriana. En Youmans G.P. MANUAL DE INFECTOLOGIA. 2ª Edición Tomo 2. Editorial Interamericana McGrawhill. México. 1982.

13.- Roberts Richard. Viridans and beta hemolytic (nongroup A, B and D Streptococci) In Infectious Diseases and Their Etiologic Agents. Part III. Academic Press Inc. London. 1989

14.- Roberts Richard, Krieger Arlene. Viridans streptococcal endocarditis. The role of various species, including pyridoxal-dependant streptococci. Reviews of Infectious Diseases. 1(6):955-966. 1979

15.- Ruoff, K.L. Nutritionally variant streptococci. Clinical Microbiology Rev. 4(2):184-190. 1991

16.- Sánchez Peón Ignacio, Felemovicus Dolengevich Ramón. Creación y funcionamiento de una colección de capas microbianas en la Facultad de Química UNAM. Tesis Profesional. Facultad de Química. UNAM. 1974

17.- III Seminario sobre conservación de cepas y colecciones de microorganismos. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE), Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN, Asociación Mexicana de Microbiología A. C., Centro Nacional de Cultivos Microbianos (CENACIUM). Distrito Federal. México. 1993

18.- Schlant Robert. Antimicrobial treatment of infective endocarditis due to viridans streptococci, enterococci and staphylococci. JAMA. 261(10): 1471-1477. 1989

19.- Slade D. Hutton. Estreptococos del Grupo A y Otros Estreptococos. En Manual de Infectología. 2a. Capítulo 17. Tomo 1. Editorial Interamericana McGrawHill. México. 1992

20.- Sonnenwirth A., Jarett L. METODOS Y DIAGNOSTICOS DE LABORATORIO CLINICO. Editoril Médica Panamericana. 8ª Edición. Tomo 2. Buenos Aires. 1986

21.- Villegas Olga, Rivera Martínez Eduardo, López Vidal Yolanda, Vázquez Larios Rosario. Patrones de Susceptibilidad a Antimicrobianos de Microorganismos Aislados en Hemocultivos de Pacientes del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". México. 1993