



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**CARRERA DE ODONTOLOGÍA**

**TESINA DE GRADO**

**PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
ODONTÓLOGA**

**TEMA**

**ESTUDIO IN VITRO DE LAS BACTERIAS DE LA  
MICROBIÓTICA BUCAL Y SU RELACIÓN CON LAS CARIES  
DENTAL, REALIZADO EN EL LABORATORIO DE  
MICROBIOLOGÍA DE LA UNACH EN EL PERÍODO  
DICIEMBRE 2013 - MAYO 2014**

**AUTORA:**

**BETZY JAQUELINE MAZA MERCHÁN**

**TUTOR:**

**DR. CHRISTIAN NICOLAY CAMACHO GALLEGOS**

**RIOBAMBA - ECUADOR**

**JULIO – 2014**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**CARRERA DE ODONTOLOGÍA**

**CERTIFICADO DE APROBACIÓN**

**ESTUDIO IN VITRO DE LAS BACTERIAS DE LA MICROBIÓTICA BUCAL Y SU RELACIÓN CON LAS CARIES DENTAL, REALIZADO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE LA UNACH EN EL PERÍODO DICIEMBRE 2013 - MAYO 2014**

Tesina de grado para la obtención del título de odontóloga, aprobado en nombre de la universidad nacional de Chimborazo por el siguiente tribunal:

DRA. CECILIA BADILLO

PRESIDENTA DEL TRIBUNAL

DR. CHRISTIAN CAMACHO

TUTOR

ING. PATRICIO TAPIA PAZMIÑO

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

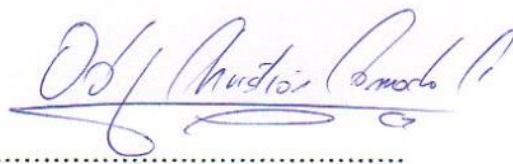
## **DERECHOS DE AUTORÍA**

Yo, Betzy Jaqueline Maza Merchán portadora de la cédula de identidad N° 1717192439-1, declaro ser responsable de las ideas, resultados y propuestas planteadas en este trabajo investigativo y que el patrimonio intelectual del mismo, pertenece a la Universidad Nacional de Chimborazo.

## ACEPTACIÓN DEL TUTOR

Por medio de la presente, hago constar que he leído el protocolo del Proyecto de Tesina de Grado presentado por la señora **BETZY JAQUELINE MAZA MERCHÁN** para optar al título de **ODONTÓLOGA** y que acepto asesorar a la estudiante en calidad de Tutor, durante la etapa del desarrollo del trabajo hasta su presentación y evaluación.

Riobamba, 12 de Mayo de 2014.

A handwritten signature in blue ink, reading "Dr. Christian Nicolay Camacho Gallegos". The signature is written in a cursive style and is positioned above a horizontal dotted line.

*Dr. Christian Nicolay Camacho Gallegos*

## **AGRADECIMIENTO**

El presente trabajo de tesis primeramente agradezco a Dios por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque hiciste realidad este sueño anhelado.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO por darme la oportunidad de estudiar y ser una profesional.

A mi Tutor de tesina, el Dr. Christian Nicolay Camacho Gallegos por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado en mí que pueda terminar mis estudios con éxito.

También me agradezco a mis profesores durante toda mi carrera profesional porque todos han aportado con un granito de arena en mi formación.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida estudiantil a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

## **DEDICATORIA**

A Dios, verdadera fuente de amor y sabiduría.

A mi amado esposo Jhon Celi que ha sido el impulso durante toda mi carrera y el pilar principal para la culminación de la misma, que con su apoyo constante y amor incondicional ha sido amigo y compañero inseparable, fuente de sabiduría, calma y consejo en todo momento, gracias por tu paciencia y comprensión hoy hemos alcanzado un triunfo más porque los dos somos uno y mis logros son tuyos.

A mi hijo Jeanpierre Celi, que es el motivo y la razón que me ha llevado a seguir superándome día a día, para alcanzar mis más apreciados ideales de superación.

A mi madre Alba Merchán, que con su amor y enseñanza han sembrado las virtudes que se necesitan para vivir con anhelo y felicidad.

## RESUMEN

La caries dental es una enfermedad infecciosa (producida por bacterias), que afecta a los tejidos duros del diente (esmalte, dentina, cemento). Es azúcar dependiente y el ácido generado, es un producto del metabolismo de los carbohidratos por la placa bacteriana que produce un descenso del pH en la superficie del diente; es por ello que se efectuó un estudio in vitro de las bacterias de la microbiótica bucal y su relación con las caries dental, realizándolo en el laboratorio de microbiología de la UNACH en el período Diciembre 2013 - Mayo 2014. Fue un estudio prospectivo, porque posee una característica fundamental, que es la de iniciar con la demostración de una supuesta causa o variable independiente (Desarrollo de bacterias patógenas), para luego seguir a través del tiempo determinando o no, la aparición del efecto (caries dental). La investigación planteada, fue realizada sobre 40 placas Petri con diferentes Agar, las cuales se sometieron a cultivo, para determinar bacterias patógenas. Las bacterias identificadas fueron: *C. albicans* (3 UFC), *G. adiacens* (3 UFC), *S. mutans* (10 UFC), *S. mitis* (7 UFC) y, *S. sanguis* (5 UFC). Se concluyó que el *Streptococcus mutans* (25%) y el *Streptococcus mitis* (18%), son las bacterias con mayor actividad en boca, generando la caries dental. La población analizada, presentaba caries dental y demostró que en el 100 % de la misma, existe actividad bacteriana cariogénica. Es importante conocer las diferentes bacterias que habitan dentro de la cavidad bucal, para definir correctamente el tratamiento farmacológico; ya que (p.ej. *Streptococcus mitis*) genera endocarditis en el ser humano. Aplicar antibióticos en el caso de caries profundas, ya que en éstas, existe gran cantidad de *Streptococcus mutans* y el *Streptococcus mitis* y entender científicamente, que la caries es una enfermedad multifactorial que procede de la actividad bacteriana.



# UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CENTRO DE IDIOMAS

## ABSTRACT

Dental decay is an infectious disease (produced by bacteria). It affects hard tooth tissues (enamel, dentin, cementum). Dependent sugar and acid generated are products of the metabolism of carbohydrates by bacterial plaque which produces a pH lowering on the tooth surface; that is why an in vitro study of oral microbiotic bacteria and its relation to dental decay were carried out in the microbiology laboratory UNACH in the period December 2013 - May 2014. It was a prospective study, because it has a key feature that is starting with a demonstration of a possible cause or independent variable (Proceedings of pathogenic bacteria), and then follow through time determining whether or not the occurrence of the effect (dental decay). This research was performed on 40 different agar petri dishes, which were subjected to cultivation in order to determine pathogenic bacteria. The bacteria identified were: *C. albicans* (1 CFU), *G. adiacens* (1 CFU), *S. mutans* (5 CFU), *S. mitis* (2 CFU) and *S. sanguis* (1 CFU). It was concluded that *Streptococcus mutans* and *Streptococcus mitis*, bacteria are most active in the mouth (31.25 % c/u), causing tooth decay. The analyzed population had dental decay and showed that 100 % of this there is cariogenic bacterial activity. It is important to know the different bacteria that live within the oral cavity to define the pharmacological treatment properly because it (eg *Streptococcus mitis*) generates endocarditis in humans. It is recommended to apply antibiotics in the case of deep decay because they have lots of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus mitis*, and understand them scientifically that decay is a multifactorial disease that results from the bacterial activity.

Riobamba, July 15<sup>th</sup> 2014

TRANSLATION REVIEWED BY:

Lic. Dennys Penelanda

ENGLISH TEACHER-UNACH





## ÍNDICE GENERAL

Portada.....	i
Hoja de aprobación.....	ii
Derechos de autoría.....	iii
Aceptación del tutor.....	iv
Agradecimiento.....	v
Dedicatoria.....	vi
Resumen.....	vii
Abstract.....	viii
Índice general.....	ix
Índice de fotografías.....	xiv
Índice de gráficos.....	xv
Índice de tablas.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	
1. PROBLEMATIZACIÓN.....	3
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	4
1.3. OBJETIVOS.....	5

1.3.1.	Objetivo general.....	5
1.3.2.	Objetivos específicos.....	5
1.4.	JUSTIFICACIÓN.....	5

## CAPÍTULO II

2.	MARCO TEÓRICO.....	7
2.1.	POSICIONAMIENTO PERSONAL.....	7
2.1.1.	Marco institucional.....	7
2.2.	FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	6
2.2.1.	Estructura dentaria.....	6
2.2.1.1.	Tejidos dentales.....	6
2.2.2.	Saliva como medio coadyuvante para la producción de caries y habidad de bacterias.....	11
2.2.2.1.	Producción.....	11
2.2.2.2.	Características y composición de la saliva.....	12
2.2.2.3.	Funciones.....	13
2.2.3.	Bacterias.....	14
2.2.3.1.	Estructura de la célula bacteriana.....	16
2.2.4.	Bacterias Gram positivas.....	17
2.2.5.	Bacterias Gram negativas.....	18
2.2.6.	Clasificación de las principales bacterias de la cavidad bucal...	20
2.2.7.	Candida albicans.....	21
2.2.8.	Streptococcus mitis.....	21
2.2.9.	Streptococcus mutans.....	22
2.2.10.	Granulicatella adiacens.....	22
2.2.11.	Bacteria Haemophilus.....	23
2.2.12.	La caries.....	24
2.2.12.1.	Etiología.....	25
2.2.12.2.	Anatomía dental.....	25
2.2.12.3.	Tiempo.....	26
2.2.12.4.	Dieta.....	26

2.2.13.	Tipos de caries.....	27
2.2.13.1.	Caries coronal.....	27
2.2.13.2.	Caries radicular.....	27
2.2.14.	Pulpitis.....	28
2.2.14.1.	Causas.....	28
2.2.15.	Periodontitis.....	29
2.2.15.1.	Los síntomas de periodontitis.....	30
2.2.16.	La endocarditis.....	30
2.2.16.1.	Causas de la endocarditis bacteriana.....	30
2.2.16.2.	Cómo se diagnostica la endocarditis bacteriana.....	31
2.2.16.3.	Cómo se previene la endocarditis bacteriana.....	32
2.2.16.4.	Concepto y expresión matemática del crecimiento bacteriano..	32
2.2.16.5.	Concepto de muerte de un microorganismo.....	36
2.2.16.6.	Qué necesita un microorganismo para crecer.....	37
2.2.16.7.	Detección y medida del crecimiento.....	39
2.2.16.8.	Recuento directo.....	39
2.2.16.9.	Medida de la masa de células.....	39
2.2.16.10.	Recuento de viables.....	40
2.2.16.11.	Ciclo de crecimiento de poblaciones.....	40
2.2.16.12.	Factores físicos y químicos que influyen en el crecimiento.....	42
2.2.17.	Medios de cultivos bacterianos.....	47
2.2.17.1.	Placas de agar.....	47
2.2.17.2.	Tipos.....	48
2.2.17.3.	Agar sangre.....	49
2.2.17.4.	Agar chocolate.....	49
2.2.17.5.	Agar Thayer-Martin.....	49
2.2.17.6.	Agar TCBS.....	50
2.2.18.	Medios bacteriológicos de uso general.....	50
2.2.18.1.	Agar bilis esculina con azida.....	50
2.2.18.2.	Agar CLED (Agar cistina-lactosa deficiente en electrolitos)...	50
2.2.18.3.	Agar entérico de Hektoen.....	50

2.2.18.4.	Agar McConkey.....	50
2.2.18.5.	Agar Manitol salado.....	51
2.2.18.6.	Agar Mueller-Hinton.....	51
2.2.18.7.	Agar nutritivo.....	51
2.2.18.8.	Agar Önöz.....	52
2.2.18.9.	Agar Feniletil alcohol.....	52
2.2.18.10.	Agar Tripticasa soya (TSA).....	52
2.2.18.11.	Agar Xilosa, Lisina, Desoxicolato.....	52
2.2.18.12.	Agar cetrimida.....	52
2.2.18.13.	Agar glucosado de Sabouraud.....	53
2.2.18.14.	Agar Infusión cerebro corazón.....	53
2.2.18.15.	Agar papa dextrosa.....	53
2.2.18.16.	Tioglicolato.....	53
2.3.	DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS.....	54
2.4.	HIPÓTESIS Y VARIABLES.....	55
2.4.1.	Hipótesis.....	55
2.4.2.	Variables.....	55
2.4.2.1.	Variable dependiente.....	55
2.4.2.2.	Variables independientes.....	55
2.5.	OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES.....	56

### CAPÍTULO III

3.	MARCO METODOLÓGICO.....	57
3.1.	MÉTODO.....	57
3.1.1.	Tipo de investigación.....	57
3.1.2.	Diseño de la investigación.....	58
3.1.3.	Tipo de estudio.....	58
3.2.	POBLACIÓN Y MUESTRA.....	58
3.2.1.	Población.....	58
3.2.2.	Muestra.....	59

3.3.	TÉCNICAS E INSTRUMENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS.....	59
3.4.	TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	60
CAPÍTULO IV		
4.	ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.	61
CAPÍTULO V		
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	66
5.1.	CONCLUSIONES.....	66
5.2.	RECOMENDACIONES.....	66
BIBLIOGRAFÍA.....		67
ANEXOS.....		69
FOTOGRAFÍAS DE LA INVESTIGACIÓN.....		69
CERTIFICADO DEL LABORATORIO.....		73

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía N° 1:	Proteus vulgaris en agar sangre.....	18
Fotografía N° 2:	Gram Negativa Escherichia coli.....	19
Fotografía N° 3:	Materiales de la investigación.....	69
Fotografía N° 4:	Hisopado del paciente.....	69
Fotografía N° 5:	Cultivo en estufa.....	70
Fotografía N° 6:	Agares con Unidad de Formación de Colonias.....	70
Fotografía N° 7:	Agares con Unidad de Formación de Colonias.....	71
Fotografía N° 8:	Agares con Unidad de Formación de Colonias.....	71
Fotografía N° 9:	Análisis de Unidad de Formación de Colonias bajo el microscopio.....	72

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N° 1: Cultivos realizados en el laboratorio de la UNACH.....	61
Gráfico N° 2: Cantidad de cultivos realizados en el laboratorio externo.....	62
Gráfico N° 3: Bacterias encontradas según cultivos UNACH.....	63
Gráfico N° 4: Bacterias encontradas según cultivos laboratorio externo.....	65

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1: Cultivos realizados en el laboratorio de la UNACH.....	61
Tabla N° 2: Cantidad de cultivos realizados en el laboratorio externo.....	63
Tabla N° 3: Bacterias encontradas según cultivos UNACH.....	64



## INTRODUCCIÓN

Los odontólogos afirman que actualmente tenemos dientes más sanos que en otros tiempos. Algunos jóvenes de países industrializados alcanzan la madurez sin tener amalgamas. Esto se atribuye a la higiene, la fluoración del agua y la adición de flúor a los dentífricos.

La placa, mezcla pegajosa de comida, saliva y bacterias que se reproducen en los dientes, es la causa principal de caries. Las bacterias, de un tipo único que se encuentra en la boca, se alimentan de azúcares y almidones y destilan un ácido que ataca el esmalte. Cuando se forma un pequeño orificio, el deterioro continúa en la siguiente capa, la dentina y, por último, se introduce en la pulpa del diente.

El ataque inicial suele pasar inadvertido; el dolor se sentirá hasta que una cavidad deje expuesto el nervio. El dulce y los alimentos demasiado fríos o calientes suelen provocar dolor, primer síntoma del problema. Para curarlo, el dentista retira la parte afectada del diente y rellena el hueco. La higiene bucal escrupulosa y las revisiones frecuentes del dentista son las mejores medidas preventivas, y han de iniciarse a temprana edad.

La caries dental es una enfermedad infecciosa (producida por bacterias) y afecta a los tejidos duros del diente (esmalte, dentina, cemento) Es azúcar dependiente y el ácido generado, es un producto del metabolismo de los carbohidratos por las bacterias; Produciendo un descenso del pH en la cavidad bucal y afectando las superficies de los dientes.

El resultado es la disolución del componente orgánico y la desmineralización del componente inorgánico de los tejidos duros del diente. De los diversos procesos infecciosos que se suscitan en la cavidad bucal humana, las enfermedades periodontales tienen especial importancia ya que cada día que pasa son más las personas que se ven afectadas por estas patologías.

Su etiología y desarrollo se ha relacionado desde muchos años con la presencia de microorganismos periodontopatógenos, destacándose entre estos los pertenecientes a la Familia Bacteroidaceae, representados por los Géneros Porphyromonas y Prevotella.

Constantemente surgen nuevas especies del Género Prevotella, las cuales están implicadas en mayor o menor grado en causar daño al periodonto y es por ello que resulta de vital importancia para el Odontólogo el hecho de conocer las especies de este Género que han sido reclasificadas, así como la detección e identificación de nuevas especies a los fines de aplicar el tratamiento antimicrobiano más adecuado y garantizar resultados exitosos luego de la implementación del mismo.

La presente investigación está estructurada, en cinco capítulos; en el Primer Capítulo se describe aspectos eminentemente referentes al problema que se ha investigado; en el Segundo Capítulo, se desarrolla la fundamentación teórica, que es el sustento científico, teórico, conceptual, legal, y doctrinario del problema investigado; en el Tercer Capítulo, se da a conocer el proceso metodológico que se aplicó en la ejecución de la investigación, es decir se explica cómo se realizó la obtención de y el tratamiento de la información recabada en la investigación de campo, actividad que permitió construir un nuevo conocimiento sobre el problema de investigación; en el Capítulo Cuatro contiene los datos obtenidos en la investigación tabulados y graficados con su respectivo análisis e interpretación; en el Capítulo Cinco, contiene las conclusiones y recomendaciones de esta investigación.

# CAPÍTULO I

## 1. PROBLEMATIZACIÓN

### 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tener mal aliento, o los dientes amarillentos son sólo algunos problemas que la salud bucodental busca eliminar. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), entre 60 y 90 % de las personas en edad escolar de todo el mundo tiene caries.

Entre el 5 y 20 % de los adultos en edad madura pierdan piezas dentales, lo que (además de dar muy mal aspecto) origina otros problemas de salud, entre ellos los digestivos. La caries genera infecciones que contaminan el tejido nervioso y afectan las encías, lo que genera que la masticación no sea muy efectiva y provoque mayor trabajo al sistema digestivo.

El tema es de tal importancia, que en los países desarrollados se destina entre 5 y 10% del gasto público sanitario a programas y temas relacionados con la salud bucodental, de acuerdo con el organismo internacional.

En Ecuador y específicamente la provincia de Chimborazo, no se han encontrado trabajos de investigación relacionados con microorganismos y menos aún, investigaciones in vitro que demuestren qué tipo de microorganismo habitan en la boca.

La cavidad bucal alberga una gran variedad de microorganismos que en condiciones normales no causan daño. No obstante, cuando se rompe el equilibrio se desarrollan diversas afecciones, la enfermedad periodontal es una de ellas, en las diferentes etapas y tipos de manifestaciones en el periodonto se reconoce un origen polimicrobiano.

Durante mucho tiempo se ha podido establecer cuales microorganismos son los implicados en el desarrollo de procesos como gingivitis y periodontitis, sin embargo, a través de técnicas moleculares aplicadas a la taxonomía de microorganismos se han podido reclasificar especies e identificar otras, entre estas las del Género *Prevotella*, microorganismos implicados y de gran importancia en el desarrollo de las enfermedades periodontales.

En los Estados Unidos de Norteamérica, más del 50 % de los niños, 96 % de los adultos jóvenes y el 99.5 % de los adultos mayores de 64 años han padecido de caries dental. Estudios recientes en países industrializados han demostrado un incremento de aproximadamente nuevas superficies dentarias afectadas por persona cada 10 años, desde la edad de 20 años a los 65. Los índices CPO (dientes Cariados, Perdidos, Obturados) son de aproximadamente 81.4 en edades entre 55 y 65 años, y de 101.3 en edades arriba de 75 años.

Actualmente, las inferencias acerca de la caries dental y sobre todo los resultados en adultos mayores de los índices CPO, deben ser revisados y evaluados mucho más cuidadosamente, porque normalmente los índices incluyen las superficies de cualquier diente perdido, ya sea que su pérdida haya sido debida a caries dental o por alguna otra razón, como podría ser por problemas periodontales o traumatismos.

Estudios más recientes efectuados en la población de los Estados Unidos han demostrado, que solo 33 % de los adolescentes entre las edades de 12 a 17 años se encuentran libres de caries y que el 75 % de la caries dental en niños está concentrada en solo el 25 % de esta población.

## **1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

¿Cuáles son las principales bacterias que encontramos en la microbiota bucal relacionadas con la caries dental?

### 1.3. OBJETIVOS

#### 1.3.1. Objetivo general

Demostrar mediante un estudio in vitro, cuáles son las principales bacterias que encontramos en la microbiota bucal, que producen la caries dental.

#### 1.3.2. Objetivos específicos

- Analizar las muestras de microbiótica bucal relacionada con la caries dental, mediante la revisión bibliográfica.
- Realizar un estudio in vitro de las 10 muestras seleccionadas, con los 4 Agares determinados.
- Establecer la relación que existe entre la caries dental y la microbiótica bucal.

### 1.4. JUSTIFICACIÓN

Se ha considerado de importancia demostrar que en el caso de que la caries ataque la dentina, el diagnóstico variará entre una caries media o una caries profunda en base a la profundidad de la caries de la dentina.

Con la presente investigación, se demostrará que las bacterias que provocan la caries, pueden desmineralizar partes más profundas de las sustancias duras del diente. De este modo la caries penetra desde el esmalte dental hasta la dentina. En dicho caso, en presencia de una caries profunda de la dentina, los ácidos y las toxinas de las bacterias pueden provocar una inflamación de la pulpa (pulpitis). Ésta a su vez, puede producir periodontitis en el momento en que dicha bacteria invade el periodonto bucal. A su vez a través del torrente circulatorio, dichas bacterias pueden invadir el endocardio y producir endocarditis bacteriana con sus consecuencias.

Podremos identificar también qué tipo de microbiótica existe en la boca y poder así, realizar el tratamiento farmacológico correcto, ya que existen microorganismos muy complejos y patológicos. Por todo lo expuesto, este estudio in vitro, podrá demostrar la relación que existe entre las bacterias encontradas en la microbiota bucal y la carie dental.

En este trabajo de investigación se pretende concienciar al profesional y al estudiante la importancia sobre las bacterias de microbiótica bucal y su relación con la caries dental, porque con este avance nos permite tener mayor conocimiento, de las afecciones que pueden producir las bacterias que se encuentran en la cavidad oral.

El desconocimiento que tiene la población de las normas de higiene oral, es frecuente; las consecuencias son el desarrollo de las bacterias de diverso tipo, pues la boca constituye la entrada de diferentes enfermedades para nuestro organismo

Porque los lineamientos que se establecerán en el trabajo de investigación, serán aplicados con el fin de poner en práctica los conocimientos adquiridos en la Universidad Nacional de Chimborazo, lo que nos permitirá establecer mecanismos de prevención y difusión de esta propuesta.

## **CAPÍTULO II**

### **2. MARCO TEÓRICO.**

#### **2.1. POSICIONAMIENTO PERSONAL.**

Aunque mucha gente no la considere una enfermedad, la caries es la patología infecciosa más extendida en el mundo y afecta al 80-90% de la población.

La caries es una enfermedad multifactorial que se caracteriza por la destrucción de los tejidos del diente como consecuencia de la desmineralización provocada por los ácidos que genera la placa bacteriana. Las bacterias fabrican ese ácido a partir de los restos de alimentos de la dieta que se les quedan expuestos. La destrucción química dental se asocia a la ingesta de azúcares y ácidos contenidos en bebidas y alimentos.

Más allá de la pérdida de los dientes, este problema bucal se relaciona con úlceras de estómago, infartos o incluso ciertos tumores. La prevención de la caries dental es el mejor tratamiento del que disponemos con el fin de lograr un mejor cuidado de la cavidad bucal en la población. De aquí la importancia de nuestra investigación en los momentos actuales, para evitar posibles consecuencias como la endocarditis bacteriana.

##### **2.1.1. Marco institucional.**

La Universidad Nacional de Chimborazo es una entidad jurídica sin fines de lucro, autónoma, de derecho público, cuya sede principal se encuentra en la ciudad de Riobamba, creada mediante Ley N° 98, publicada en el Suplemento del Registro Oficial N° 771 del 31 de Agosto de 1995; sus siglas son UNACH.

Se rige por la Constitución de la República del Ecuador, la Ley de Educación Superior, su Reglamento, otras leyes, Estatuto, los Reglamentos y Resoluciones que expida el CONESUP y la Universidad Nacional de Chimborazo.

Actualmente cuenta, con tres campus, uno ubicado en la vía a Guano, el otro en la Dolorosa y su nuevo campus “Centro”, donde se encuentra la Carrera de Odontología y su correspondiente laboratorio de Microbiología, donde se realizará la presente investigación.

## **2.2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.**

### **2.2.1. Estructura dentaria.**

#### **2.2.1.1. Tejidos dentales.**

Los diferentes tejidos dentales son el esmalte, la dentina, y el cemento radicular. El esmalte dental es un tejido duro, acelular (por lo tanto no es capaz de sentir estímulos), que cubre la superficie de la corona del diente.

Está compuesto por:

- Un 96 % de materia inorgánica (cristales de hidroxiapatita).
- Un 2 % de materia orgánica.
- Un 2 % de agua.

La dentina es un tejido duro y con cierta elasticidad, de color blanco amarillento, no vascularizado, que está inmediatamente por debajo del esmalte. Es un tejido que en su parte más interna contiene los procesos de una célula llamada odontoblasto localizada en la pulpa.

Está compuesta por:

- 70 % de tejido inorgánico compuesto por cristales de hidroxiapatita.
- 18 % formado por materia orgánica (proteínas colágenas) responsables de esa elasticidad.



➤ 12 % de agua.

La pulpa dentaria o pulpa dental (que se llama también, erróneamente, “nervio”) es el tejido conectivo laxo localizado en el interior de un órgano dental y rodeado por dentina.

**Desarrollo:** desde el punto de vista del desarrollo, la pulpa dentaria emerge como resultado de la promoción de la lámina dental del mesodermo para formar la papila dental.

Su forma es determinada por el órgano de esmalte.

Cuando madura este tejido embrionario, se forman odontoblastos que depositan dentina en las puntas de las cúspides.

Cuando madura la papila dental, crea dentina y se dirige apicalmente, y el tejido se vuelve más celular y vascular. Con el establecimiento de más dentina, las fibras vasomotoras autónomas y sensitivas asumen sus posiciones.

Este tejido responde a cualquier agresión por medio de una agresión inflamatoria, la cual adquiere una característica especial en la pulpa debido al hecho de estar confinada en una cavidad de paredes mineralizada y con irrigación sanguínea terminal.

La estimulación de fibras nerviosas pulpares mediante calor, frío, acción mecánica o química, produce una sensación dolorosa casi pura; la estimulación eléctrica con el vitalómetro dental, también activa a dichas fibras.

**Composición:** dentro de la pulpa están los vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervios, células de defensa, sustancia base y fibroblastos. Sin embargo, otra característica de la pulpa es la presencia de odontoblastos, necesaria para la producción de dentina. La pulpa y la dentina no deben considerarse como tejidos separados, sino más bien como uno solo, no solo embriológica y anatómicamente, sino también en biológicamente.

**Importancia:** La pulpa mantiene la vitalidad de la dentina, conduce su sensibilidad y es la fuente de abastecimiento de las sustancias necesarias para su reparación. La dentina depende de la pulpa para su formación y mantenimiento, pero a su vez, actúa como barrera de defensa.

**Funciones:**

- Inductora: Sobre todo durante la formación del diente induce a las células vecinas para que se generen los tejidos que rodean al diente.
- Formativa: La pulpa forma dentina y la sigue formando durante toda la vida del diente.
- Reparativa: la pulpa reacciona ante agentes externos formando una dentina reaccionaria.
- Metabólica: porque la dentina es un tejido vivo en permanente formación.
- Sensitiva: está inervada con receptores de dolor. El dolor es un mecanismo de defensa del cual se obtiene un beneficio (si al pisar una espina duele, uno retira el pie y evita ruptura de tejido); pero en el caso de una pulpitis cabe preguntarse qué beneficio trae.

El cemento dental el cemento es un tejido dental mineralizado conectivo y no vascularizado cubre la raíz del diente que constituye la cubierta exterior de la raíz anatómica, su función principal es la de servir de medio de unión del diente al hueso alveolar mediante el ligamento periodontal.

- 55% de hidroxapatita cálcica
- 45% de agua.

Ligamento periodontal es un tejido conectivo blando, muy vascularizado y celular que rodea los dientes y une al cemento radicular con la lámina dura del hueso alveolar propio.

Funciones principales:

- Es el Principal Sostén del diente en el alvéolo dentario.

- Permite resistir las fuerzas masticatorias.
- Influye en los movimientos del diente.

Fibras principales:

- Oblicuas,
- De la Cresta Alveolar,
- Horizontales,
- Apicales,
- Transeptales.

### **2.2.2. Saliva como medio coadyuvante para la producción de caries y habidad de bacterias.**

La saliva (también conocida coloquialmente como baba) es un fluido orgánico complejo producido por las glándulas salivales en la cavidad bucal, y directamente involucrada en la primera fase de la digestión. La saliva puede ser vehículo de contagio de enfermedades en humanos, como el herpes labial o la mononucleosis.

#### **2.2.2.1. Producción.**

Se estima que la boca está humedecida por la producción de entre 1 y 1.5 litros de saliva al día, durante la vida de una persona se generan unos 34.000 litros. Esta cantidad de saliva es variable ya que va disminuyendo conforme avanzan los años y debido a diferentes tratamientos. La producción de saliva está relacionada con el ciclo circadiano, de tal manera que por la noche se segrega una mínima cantidad de saliva. D. MALE; J. BROSTOFF; D. BROTH; I. ROITT. (2007) La saliva es segregada por las glándulas salivares mayores parótida y submaxilar (80 % - 90 %) en condiciones estimuladas, mientras que las glándulas sublinguales producen solo el 5 % del total.

Las glándulas menores son responsables básicamente de la secreción en reposo y contribuyen al 5 % al 10 % del total de saliva secretada. La disminución patológica de saliva recibe el nombre de hiposalivación o hiposialia, mientras que la sensación de sequedad bucal se denomina xerostomía, y la producción excesiva, sialorrea. La medición de la producción de la saliva se llama sialometría.

#### 2.2.2.2. **Características y composición de la saliva.**

La saliva es un líquido transparente y de viscosidad variable, lo cual se atribuye al ácido siálico. Es inodora como el agua. La composición y pH de la saliva varían en función de los estímulos (como el olor o la visión de la comida). El pH salival normal oscila entre 6,5 y 7.

La composición de la saliva es similar a la del plasma y se caracteriza por los siguientes componentes:

- Agua: Representa un 99,5 %. Permite que los alimentos se disuelvan y se pueda percibir su sabor a través del sentido del gusto
- Iones cloruro: Activan la amilasa salival o ptialina.
- Bicarbonato y fosfato: Neutralizan el pH de los alimentos ácidos y de la corrosión bacteriana.
- Moco: El contenido de mucina, glicoproteína fundamental de la saliva, produce la viscosidad necesaria para funciones lubricantes y de formación del bolo alimenticio que facilita la deglución a lo largo del tubo digestivo, sin dañarlo.
- Lisozima: Es una sustancia antimicrobiana que destruye las bacterias contenidas en los alimentos, protegiendo en parte los dientes de la caries y de las infecciones.
- Enzimas: Como la ptialina, que es una amilasa que hidroliza el almidón parcialmente en la boca, comenzando la digestión de los hidratos de carbono. La lipasa lingual inicia también la digestión de grasas.

- Estaterina: Con un extremo amino terminal muy ácido, que inhibe la precipitación de fosfato cálcico al unirse a los cristales de hidroxiapatita. Además, también tiene función antibacteriana y antifúngica.
- Otras sustancias: La saliva contiene también, inmunoglobulinas específicas, transferrina y lactoferrina. En el 2006 investigadores franceses del Instituto Pasteur identificaron una sustancia en la saliva humana que llamaron Opiorfina, similar a la encontrada en ratas y vacas, que es hasta seis veces más potente que la morfina para calmar el dolor.
- Calcio: La saliva está saturada de  $\text{Ca}^{++}$ , con lo que se evita que los dientes lo pierdan y ayuda a digerir el alimento.

#### 2.2.2.3. **Funciones.**

- Mantener el pH neutro, es decir a 6,5. Esta capacidad taponadora del medio al neutralizar el medio ácido producido tras las comidas evita la desmineralización del esmalte dental y la acumulación de sarro que se produce con un pH básico.
- Cicatrización: Además de favorecer la mineralización del esmalte de los dientes por su capacidad taponadora, la saliva contiene también un factor de crecimiento epidérmico que facilita la cicatrización de la mucosa bucal lesionada.
- Función digestiva: Por el efecto de las enzimas que contiene, al mezclarse con el alimento junto con la masticación lo transforma en bolo alimenticio, iniciando la digestión de carbohidratos y grasas y facilitando la deglución.
- Función gustativa: La saliva permite que las partículas sápidas (responsables del sabor) de los alimentos alcancen y estimulen químicamente los corpúsculos gustativos en la cavidad oral especialmente en la lengua.
- Por eso la sensibilidad gustativa es menor cuando disminuye la secreción salival por la edad avanzada, efectos de ciertos medicamentos o por trastornos patológicos.
- Lubricar la cavidad oral, además de facilitar la primera fase de la digestión y la deglución en la especie humana es importante en la expresión oral al facilitar la articulación de las palabras.

- Mantener el equilibrio hídrico, al disminuir su producción por deshidratación envía un mensaje de alarma al organismo produciendo la sensación de sed.
- Protección: La saliva por su composición enzimática, especialmente por la lisozima, las inmunoglobulinas y las proteínas como la muramidasa y la lactoferrina, defiende la cavidad oral de la infección bacteriana.

### 2.2.3. Bacterias.

Las bacterias son microorganismos unicelulares que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros (entre 0,5 y 5  $\mu\text{m}$ , por lo general) y diversas formas incluyendo esferas (cocos), barras (bacilos), sacacorchos (vibrios) y hélices (espirilos).

Las bacterias son procariotas y, por lo tanto, a diferencia de las células eucariotas (de animales, plantas, hongos, etc.), no tienen el núcleo bien definido ni presentan, en general, orgánulos membranosos internos. Generalmente poseen una pared celular compuesta de peptidoglicano.

Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamiento y son móviles. Del estudio de las bacterias se encarga la bacteriología, una rama de la microbiología. Las bacterias son los organismos más abundantes del planeta. Son ubicuas, se encuentran en todos los hábitats terrestres y acuáticos; crecen hasta en los más extremos como en los manantiales de aguas calientes y ácidas, en desechos radioactivos, en las profundidades tanto del mar como de la corteza terrestre. PATRICK R. MURRAY (2006)

Algunas bacterias pueden incluso sobrevivir en las condiciones extremas del espacio exterior. Se estima que se pueden encontrar en torno a 40 millones de células bacterianas en un gramo de tierra y un millón de células bacterianas en un mililitro de agua dulce. En total, se calcula que hay aproximadamente  $5 \times 10^{30}$  bacterias en el mundo.

Las bacterias son imprescindibles para el reciclaje de los elementos, pues muchos pasos importantes de los ciclos biogeoquímicos dependen de éstas. Como ejemplo cabe citar la fijación del nitrógeno atmosférico. Sin embargo, solamente la mitad de los filos conocidos de bacterias tienen especies que se pueden cultivar en el laboratorio, por lo que una gran parte (se supone que cerca del 90 %) de las especies de bacterias existentes todavía no ha sido descrita.

En el cuerpo humano hay aproximadamente diez veces tantas células bacterianas como células humanas, con una gran cantidad de bacterias en la piel y en el tracto digestivo.

Aunque el efecto protector del sistema inmunitario hace que la gran mayoría de estas bacterias sea inofensiva o beneficiosa, algunas bacterias patógenas pueden causar enfermedades infecciosas, incluyendo cólera, difteria, escarlatina, lepra, sífilis, tifus, etc. Las enfermedades bacterianas mortales más comunes son las infecciones respiratorias, con una mortalidad solo para la tuberculosis de cerca de dos millones de personas al año. En todo el mundo se utilizan antibióticos para tratar las infecciones bacterianas. Los antibióticos son efectivos contra las bacterias ya que inhiben la formación de la pared celular o detienen otros procesos de su ciclo de vida. PATRICK R. MURRAY (2006)

También se usan extensamente en la agricultura y la ganadería en ausencia de enfermedad, lo que ocasiona que se esté generalizando la resistencia de las bacterias a los antibióticos. En la industria, las bacterias son importantes en procesos como el tratamiento de aguas residuales, en la producción de mantequilla, queso, vinagre, yogurt, etc., y en la fabricación de medicamentos y de otros productos químicos. Aunque el término bacteria incluía tradicionalmente a todos los procariotas, actualmente la taxonomía y la nomenclatura científica los divide en dos grupos. Estos dominios evolutivos, se denominan Bacteria y Archaea (arqueas). La división se justifica en las grandes diferencias que presentan ambos grupos a nivel bioquímico y genético. LANGA S. (2006)

### 2.2.3.1. **Estructura de la célula bacteriana.**

Las bacterias son organismos relativamente sencillos. Sus dimensiones son muy reducidas, unos 2  $\mu\text{m}$  de ancho por 7-8  $\mu\text{m}$  de longitud en la forma cilíndrica (bacilo) de tamaño medio; aunque son muy frecuentes las especies de 0,5-1,5  $\mu\text{m}$ .

Al tratarse de organismos procariotas, tienen las características básicas correspondientes como la carencia de un núcleo delimitado por una membrana aunque presentan un nucleoide, una estructura elemental que contiene una gran molécula circular de ADN.

El citoplasma carece de orgánulos delimitados por membranas y de las formaciones protoplasmáticas propias de las células eucariotas. En el citoplasma se pueden apreciar plásmidos, pequeñas moléculas circulares de ADN que coexisten con el nucleoide, contienen genes y son comúnmente usados por los procariontes en la conjugación. PATRICK R. MURRAY (2006)

El citoplasma también contiene vacuolas (gránulos que contienen sustancias de reserva) y ribosomas (utilizados en la síntesis de proteínas). Una membrana citoplasmática compuesta de lípidos rodea el citoplasma y, al igual que las células de las plantas, la mayoría posee una pared celular, que en este caso está compuesta por peptidoglicano (mureína).

La mayoría de bacterias, presentan además una segunda membrana lipídica (membrana externa) rodeando a la pared celular. El espacio comprendido entre la membrana citoplasmática y la pared celular (o la membrana externa si esta existe) se denomina espacio periplásmico.

Algunas bacterias presentan una cápsula y otras son capaces de desarrollarse como endosporas, estados latentes capaces de resistir condiciones extremas. Entre las formaciones exteriores propias de la célula bacteriana destacan los flagelos y los pili.



#### 2.2.4. **Bacterias Gram positivas.**

Son bacterias que se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram: de aquí el nombre de "Gram-positivas" o también "grampositivas".

Esta característica Química está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular por lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana.

Son uno de los principales grupos de bacterias, y cuando se tratan como taxón, se utiliza también el nombre de Posibacteria. Las restantes son las bacterias Gram negativas. LANGA S. (2006)

La envoltura celular de las bacterias Gram-positivas comprende la membrana citoplasmática y una pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglucano, que rodea a la anterior. La pared celular se une a la membrana citoplasmática mediante moléculas de ácido lipoteicoico.

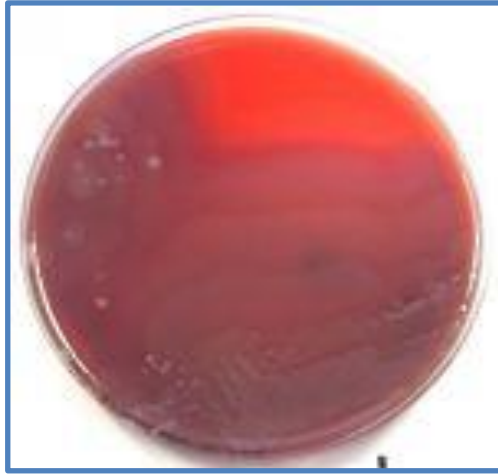
La capa de peptidoglucano confiere una gran resistencia a estas bacterias y es la responsable de retener el tinte durante la tinción de Gram. A diferencia de las Gram-negativas, las Gram-positivas no presentan una segunda membrana lipídica externa a la pared celular y esta pared es mucho más gruesa.

Incluyen especies tanto móviles (vía flagelos) como inmóviles con forma de bacilo (*Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Listeria*) o coco (*Staphylococcus*, *Streptococcus*); con gruesas paredes celulares o sin ellas (*Mycoplasma*).

Algunas especies son fotosintéticas, pero la mayoría son heterótrofas. Muchas de estas bacterias forman endosporas en condiciones desfavorables.

Realmente, no todas las bacterias del grupo son Gram-positivas (no se tiñen por la aplicación de ese método), pero se incluyen aquí por su similitud molecular con otras bacterias Gram-positivas.

### **Fotografía N° 1: Proteus vulgaris en agar sangre.**



Fuente: [www.microbitos.blogspot.com](http://www.microbitos.blogspot.com)  
Elaborado por: [www.microbito.blogspot.com](http://www.microbito.blogspot.com)

#### **2.2.5. Bacterias Gram negativas.**

Son aquellas bacterias que no se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram, y lo hacen de un color rosado tenue: de ahí el nombre de "Gram-negativas" o también "gramnegativas". Esta característica está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular, por lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana.

Son uno de los principales grupos de bacterias y cuando se tratan como taxón se utiliza también el nombre de Negibacteria. Las restantes son las bacterias Gram positivas. LANGA S. (2006)

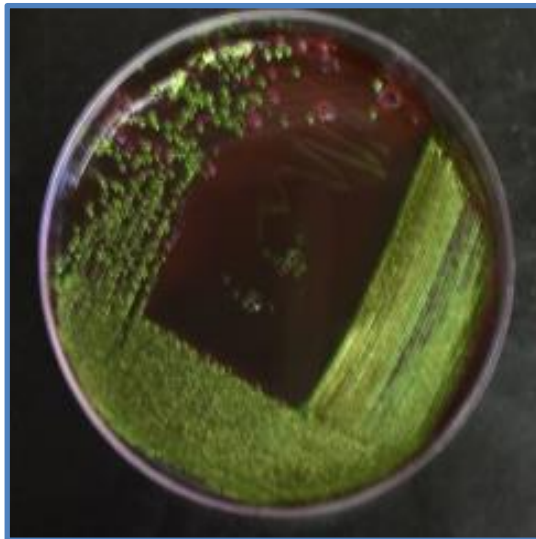
Las bacterias Gram-negativas presentan dos membranas lipídicas entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicano, mientras que las bacterias Gram-positivas presentan solo una membrana lipídica y la pared de peptidoglicano es mucho más gruesa.

Al ser la pared fina, no retiene el colorante durante la tinción de Gram. Muchas especies de bacterias Gram-negativas causan enfermedades.

Los cocos Gram-negativos causan la gonorrea (*Neisseria gonorrhoeae*), meningitis (*Neisseria meningitidis*) y síntomas respiratorios (*Moraxella catarrhalis*), entre otros. Los bacilos Gram negativos incluyen un gran número de especies. PATRICK R. MURRAY (2006)

Algunos de ellos causan principalmente enfermedades respiratorias y nosocomiales (*Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*), enfermedades urinarias (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*) y enfermedades gastrointestinales (*Helicobacter pylori*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*). Otros están asociadas a infecciones nosocomiales (*Acinetobacter baumannii*).

### **Fotografía N° 2: Gram Negativa Escherichia coli.**



Fuente: [www.microbitto.blogspot.com](http://www.microbitto.blogspot.com)  
Elaborado por: [www.microbitto.blogspot.com](http://www.microbitto.blogspot.com)

Aquellas capaces de adherirse a la película adquirida (formada por proteínas que precipitaron sobre la superficie del esmalte), y congregarse formando un "biofilm" (comunidad cooperativa), de esta manera evaden los sistemas de defensa del huésped que consisten principalmente en la remoción de bacterias saprófitas y/o patógenas no adheridas por la saliva, siendo estas posteriormente deglutidas. PATRICK R. MURRAY, KEN S. ROSENTHAL, MICHAEL A, PFALLER. (2009)

Inicialmente en el biofilm se encuentra una gran cantidad de bacterias Gram positivas con poca capacidad de formar ácidos orgánicos y polisacáridos extracelulares, pero estas posteriormente, debido a las condiciones de anaerobiosis de las capas más profundas, son reemplazadas por un predominio de bacterias Gram negativas, y es en este momento cuando se denominada a la placa "cariogénica", es decir capaz de producir caries dental. LANGA S. (2006)

Las bacterias se adhieren entre sí pero es necesario una colonización primaria a cargo del *Streptococcus*, perteneciente a la familia de los mutans, además se encuentran *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus*, etc. En condiciones fisiológicas la ausencia de uno de estos factores limita la aparición o desarrollo de caries.

#### 2.2.6. Clasificación de las principales bacterias de la cavidad bucal.

- *Actinomyces*,
- *Actinomyces naeslundii*,
- *Actinomyces viscosus*,
- *Candida albicans*,
- *Granilicatella adiacens*,
- *Haemophilus*,
- *Lactobacillus acidophilus*,
- *Streptococcus mitis*,
- *Streptococcus mutans* (más encontrado en cultivos de dientes maltratados),
- *Streptococcus oralis*,
- *Streptococcus salivarius*,
- *Streptococcus sanguis*,

➤ *Streptococcus sobrinus*.

#### 2.2.7. **Candida albicans.**

Es un hongo diploide asexual (forma de levadura) saprófito de la familia de los Sacaromicetos. Normalmente se encuentra en la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal y en la vagina. Está envuelta en un rol relevante en la digestión de los azúcares mediante un proceso de fermentación. *Candida albicans* puede asumir patogeneidad provocando la candidiasis; en ese caso se presenta como una afección vaginal (vaginitis), de la cavidad oral (muguet), del intestino o de la piel. En un físico debilitado, inmunodeprimido o convaleciente de un larga cura antibiótica, la *Candida* se multiplica en modo anómalo y, atraviesa el intestino, para entrar al torrente sanguíneo, donde libera sus propias toxinas provocando la candidemia. LANGA S. (2006)

Este fenómeno da lugar a síntomas algunos abdominales, mala digestión, gases e hinchazón, molestias intestinales (estreñimiento o diarrea), intolerancia alimentaria, irritabilidad, insomnio, pérdida de la memoria, dolores de cabeza y depresión. La candidosis induce también una disminución de la absorción de las sustancias nutritivas por lo que se podría producir un estado de malnutrición. PATRICK R. MURRAY, KEN S. ROSENTHAL, MICHAEL A, PFALLER. (2009)

#### 2.2.8. **Streptococcus mitis.**

Es una especie mesófila alfa hemolítica de *Streptococcus* que habita en la boca humana. Es un coco Gram positivo, anaerobio, facultativo y catalasa negativo. Puede provocar endocarditis. Esta bacteria sobrevivió más de dos años en un viaje a la Luna del Surveyor, que fue la tercera sonda lunar lanzado hacia 1967, para estudiar la composición de nuestro satélite.

No obstante, algunos científicos sugieren que podría tratarse de un caso de contaminación durante o tras el regreso del Surveyor a la Tierra. LANGA S. (2006)

#### 2.2.9. **Streptococcus mutans.**

Es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa que se encuentra normalmente en la cavidad bucal humana, formando parte de la placa bacteriana o biofilm dental. Se asocia al inicio y desarrollo de la caries dental. Es acidófilo porque vive en medio con pH bajo, acidogénico por metabolizar los azúcares a ácidos y acidúrico por sintetizar ácidos a pesar de encontrarse en un medio de tales condiciones. D. MALE; J. BROSTOFF; D. BROTH; I. ROITT. (2007)

Metaboliza la sacarosa para producir polisacáridos extracelulares (sustancia laxa que facilita su adhesión a las caras libres de las piezas dentarias) e intracelulares (metabolismo energético). En estado de salud, un recuento de estas bacterias en boca será de menos de 100.000 Unidades de Formación de Colonias.

#### 2.2.10. **Granulicatella adiacens.**

Se trata de cocos Gram positivos inmóviles, que desarrollan en cadenas en medios líquidos en condiciones nutricionalmente permisivas. Algunos investigadores señalaron las dificultades que demandaba el reconocimiento de estas bacterias, incluso a nivel de género. Bottone et al., describieron cepas que no revertían a las formas cocáceas, consideradas normales, y que, por el contrario, permanecían bajo formas aberrantes (filamentosas o con protuberancias), que podían confundirse con *Erysipelothrix rhusiopathiae* o *Streptobacillus moniliformes*.

La identificación a nivel de género resulta más sencilla cuando quedan claramente definidas como cocos Gram positivos catalasa negativos, que se disponen en cadenas al desarrollar en medios líquidos. LANGA S. (2006)

La característica primaria de mayor utilidad en la identificación a nivel de grupo (Granulicatella + Abiotrophia) es el ya señalado satelitismo en medios no permisivos para el desarrollo de estas bacterias: agar tripteína de soja o agar Mueller Hinton, en ambos casos con el agregado de 5% de sangre ovina. Como bacteria auxiliar o helper, generalmente se utiliza cualquier cepa de estafilococo. Esta prueba no debe realizarse con medios preparados con base de agar Columbia puesto que, como antes se indicó, muchas cepas de Abiotrophia y Granulicatella pueden desarrollar en ellos en forma de una fina pátina, sin necesidad de contar con una bacteria auxiliar. Esto podría valorarse erróneamente como "satelitismo negativo".

Las pruebas de PYR y LAP pueden dar resultados débilmente positivos, aunque son inconfundiblemente positivas en la batería de pruebas del API 20 Strep.

La especie *G. adiacens* da positiva la prueba de  $\beta$ -glucuronidasa y negativa la de  $\alpha$ -galactosidasa, y produce ácido a partir de Tagatosa pero no de lactosa, trehalosa y pululano, reacciones que la diferencian de *A. defectiva*. La poco reconocida especie *G. para-adiacens* tampoco produciría ácido de Tagatosa. A diferencia de las otras especies, *G. elegans* da positiva las pruebas de arginina deshidrolasa e hipurato, y no produce ácido de trehalosa, Tagatosa ni pululano.

#### 2.2.11. **Bacteria Haemophilus.**

Haemophilus es un género de bacterias Gram negativas con forma de cocobacilos pero muy pleomórficas. Aunque la forma típica es la cocobacilar, se consideran pleomórficas porque realmente pueden variar drásticamente su morfología. El género incluye organismos comensales con un cierto grado de patogenicidad:

➤ *H. influenzae* ocasiona septicemia y meningitis a niños pequeños; originariamente se le consideraba el agente causal de la gripe, lo que resultó erróneo, pues se trata de un ortomixovirus que, sin embargo, proporcionó el epíteto específico al taxón.

- *H. ducreyi* es un agente productor de chancros.

Las especies de *Haemophilus* se clasifican según las características de la cápsula: se han descrito siete serogrupos de la “A hasta la F”, junto con un e’. La cápsula tipo b es la más correlacionada con la virulencia de la bacteria. Estos organismos se cultivan en placas de agar sangre, medio rico que les proporciona toda clase de factores de crecimiento requeridos para su desarrollo: hemina (factor X) y/o factor V o dinucleótido de nicotinamida y adenina. El agar chocolate, también con un fuerte componente de sangre en su composición pero, tras sufrir un proceso térmico, acelera mucho su crecimiento. La presencia de CO<sub>2</sub>, una temperatura de 37 °C y un pH alcalino favorecen el crecimiento de *Haemophilus*. Es sensible a efectos exteriores como el frío, la desecación y la luz solar. Fermentan glucosa pero nunca lactosa ni manitol. PATRICK R. MURRAY, KEN S. ROSENTHAL, MICHAEL A, PFALLER. (2009)

También se ha cultivado con la técnica Staph streak, que permite cultivar *Staphylococcus* y *Haemophilus* en una misma placa. En este caso, *Haemophilus* presenta un patrón de crecimiento característico formando satélites en torno a las colonias de estafilococos; esta propiedad se denomina satelismo y muestra la necesidad de factores de crecimiento excretados por el estafilococo. Esta necesidad puede considerarse determinante en el desarrollo de patologías oportunistas producidas por *Haemophilus*.

#### 2.2.12. **La caries.**

Es una enfermedad multifactorial que se caracteriza por la destrucción de los tejidos del diente como consecuencia de la desmineralización provocada por los ácidos que genera la placa bacteriana. Las bacterias fabrican ese ácido a partir de los restos de alimentos de la dieta que se les quedan expuestos. La destrucción química dental se asocia a la ingesta de azúcares y ácidos contenidos en bebidas y alimentos.



La caries dental se asocia también a errores en las técnicas de higiene así como pastas dentales inadecuadas, falta de cepillado dental, o no saber usar bien los movimientos del lavado bucal, ausencia de hilo dental, así como también con una etiología genética. Se ha comprobado así mismo, la influencia del pH de la saliva en relación a la caries. Tras la destrucción del esmalte ataca a la dentina y alcanza la pulpa dentaria produciendo su inflamación, pulpitis, y posterior necrosis (muerte pulpar). Si el diente no es tratado puede llevar posteriormente a la inflamación del área que rodea el ápice (extremo de la raíz) produciéndose una periodontitis apical, y pudiendo llegar a ocasionar un absceso dental, una celulitis o incluso una angina de Ludwig. PETER REITHE (1990).

#### **2.2.12.1. Etiología.**

La caries dental es una enfermedad multifactorial, lo que significa que deben concurrir varios factores para que se desarrolle. Hasta el momento las investigaciones han logrado determinar cuatro factores fundamentales:

#### **2.2.12.2. Anatomía dental.**

La composición de su superficie y su localización hace que los dientes retengan más o menos placa dental. Por ejemplo, los dientes posteriores (molares y premolares), son más susceptibles a la caries ya que su morfología es más anfractuosa y además presentan una cara oclusal donde abundan los surcos, fosas, puntos y fisuras, y la lengua no limpia tan fácilmente su superficie; las zonas que pueden ser limpiadas por las mucosas y por la lengua se denomina zona de autoclisis. Además es necesario nombrar el rol del hospedero a una mayor o menor incidencia, debido a una susceptibilidad genética heredada o bien por problemas socioeconómicos, culturales y relacionados al estilo de vida (estos últimos condicionarán sus hábitos dietéticos y de higiene oral). PETER REITHE (1990).

#### 2.2.12.3. **Tiempo.**

La placa dental es capaz de producir caries debido a la capacidad acidogénica y acidúrica que poseen los microorganismos que la colonizan, de tal forma que los carbohidratos fermentables en la dieta no son suficientes, sino que además éstos deben actuar durante un tiempo prolongado para mantener un pH ácido constante a nivel de la interface placa - esmalte. De esta forma, el elemento tiempo, forma parte primordial en la etiología de la caries. Un órgano dental es capaz de resistir 2 hs por día de desmineralización sin sufrir lesión en su esmalte. La saliva tiene un componente buffer o amortiguador en este fenómeno, pero el cepillado dental proporciona esta protección, es decir, 20 minutos posterior a la ingesta de alimentos el órgano dental tiene aún desmineralización (según la curva de Stephan), la presencia de azúcar en la dieta produce 18 horas de desmineralización posterior al cepillado dental asociado como destrucción química dental independientemente de la presencia de un cepillado de calidad en el paciente. PETER REITHE (1990).

#### 2.2.12.4. **Dieta.**

La presencia de carbohidratos fermentables en la dieta condiciona la aparición de caries, sin embargo los almidones no la producen. Pero es necesario aclarar que el metabolismo de los hidratos de carbono se produce por una enzima presente en la saliva denominada alfa amilasa salival o ptialina, esta es capaz de degradar el almidón hasta maltosa y de acuerdo al tiempo que permanezca el bolo en la boca podría escindirla hasta glucosa, esto produce una disminución en el pH salival que favorece la desmineralización del esmalte.

Un proceso similar sucede a nivel de la placa dental, donde los microorganismos que la colonizan empiezan a consumir dichos carbohidratos y el resultado de esta metabolización produce ácidos que disminuyen el pH a nivel de la interface placa - esmalte. La persistencia de un pH inferior a 7 eventualmente produce la desmineralización del esmalte.

Además la presencia de hidratos de carbono no es tan importante cuando la frecuencia con la que el individuo consume, se limita a cuatro momentos de azúcar como máximo, de esta manera la disminución brusca del pH puede restablecerse por la acción de los sistemas amortiguadores salivales que son principalmente el ácido carbónico/bicarbonato y el sistema del fosfato.

### **2.2.13. Tipos de caries.**

#### **2.2.13.1. Caries coronal.**

La caries es un proceso infeccioso en el que varios microorganismos de la placa dentobacteriana como *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidófilus* producen ácidos que atacan principalmente el componente inorgánico del esmalte dental y provocan su desmineralización. De no ser revertido este fenómeno a través de la remineralización, propicia la pérdida de sustancia dentaria, que trae consigo formación de cavidades en los dientes. PETER REITHE (1990).

Regularmente el proceso de la caries se inicia en el esmalte de la corona de los dientes y cuando existe migración gingival el proceso carioso puede establecerse también en la porción radicular e invadir el cemento dentario y, posteriormente, la dentina radicular. La caries se define como un padecimiento multifactorial, en el que para iniciar el proceso de la enfermedad se establece la intervención simultánea de tres grupos de factores: microbianos, del sustrato y elementos propios del sujeto afectado. PETER REITHE (1990).

#### **2.2.13.2. Caries radicular.**

La caries es una enfermedad dentaria primaria, sin embargo, la radicular es secundaria a la exposición bucal del cemento por retracción gingival fisiológica, senil o por enfermedad periodontal.

La caries radicular es la más frecuente en los ancianos y será un reto muy grande en el futuro tanto para los pacientes como para los odontólogos. Hay grandes evidencias de que la caries impacta la salud endocrina, cardiovascular y pulmonar, particularmente en personas frágiles. PETER REITHE (1990).

#### 2.2.14. **Pulpitis.**

La pulpitis es la inflamación dolorosa de la pulpa dentaria, un tejido con numerosos nervios y vasos sanguíneos que está situado en el interior de los dientes.

##### 2.2.14.1. **Causas.**

Las causas más comunes de la pulpitis son la caries dental y las heridas. Dado que la pulpa está dentro del diente, no tiene espacio para hincharse cuando se inflama y por ello aumenta la presión dentro del diente.

Si una inflamación leve se trata adecuadamente, el diente no sufrirá un daño irreversible; sin embargo, una inflamación grave destruye la pulpa. El aumento de la presión puede empujar la pulpa hacia el extremo de la raíz, donde podría dañar el hueso de la mandíbula y los tejidos circundante

La pulpitis causa un dolor intenso. Para determinar si la pulpa está sana, el odontólogo realiza ciertas pruebas. Por ejemplo, puede aplicar un estímulo frío; si el dolor producido por el estímulo se interrumpe en pocos segundos, significa que la pulpa está todavía sana.

Entonces se procede a vaciar la parte dañada del diente y a empastarlo. Sin embargo, cuando la pulpa está tan afectada que no se puede salvar, el dolor persiste después del estímulo frío o incluso aparece espontáneamente.

### 2.2.15. **Periodontitis.**

El factor que hace que la periodontitis una enfermedad difícil de estudiar es que la respuesta del huésped humano también puede afectar a la reabsorción del hueso alveolar. La respuesta del huésped a la agresión bacteriana. Es principalmente determinado por la genética. La periodontitis consiste en la pérdida progresiva del hueso alveolar alrededor de los dientes si no se trata, puede conducir a la relajación y la consiguiente pérdida de los dientes.

La periodontitis es causada por microorganismos que se adhieren y crecen en las superficies de los dientes, junto con una respuesta inmune excesivamente agresivos en contra de estos microorganismos. Es una serie de enfermedades inflamatorias que afectan al periodonto es decir, los tejidos que rodean y sostienen los dientes

En algunas personas progresa la periodontitis con la destrucción de las fibras gingivales, los tejidos de las encías separadas del diente y profundizado el surco, llamada bolsa periodontal.

Microorganismo subgingival (las existentes en la línea de las encías) colonizan las bolsas periodontales y causar más inflamación en los tejidos de las encías y la pérdida progresiva del hueso. Ejemplos de etiología secundaria serían las cosas que, por definición, causa la acumulación de placa microbiana, como salientes de restauración y la proximidad de la raíz.

Si se deja sin tocar, la placa microbiana calcifica para formar el cálculo, que comúnmente se llama sarro. Cálculo por encima y por debajo de la línea de las encías deben ser removidos completamente por el higienista dental o dentista para el tratamiento de la gingivitis y la periodontitis.

Aunque la principal causa de tanto gingivitis y la periodontitis es la placa microbiana que se adhiere a la superficie del diente, hay muchos otros factores modificadores.

#### 2.2.15.1. **Los síntomas de periodontitis.**

En las primeras etapas, la periodontitis se ha muy pocos síntomas y en muchas personas la enfermedad ha progresado significativamente antes de buscar tratamiento. Los síntomas pueden incluir los siguientes:

- Enrojecimiento o sangrado de encías al cepillarse los dientes, usar hilo dental o morder alimentos duros (por ejemplo, manzanas) (aunque esto puede ocurrir incluso en la gingivitis, donde no hay pérdida de inserción)
- Inflamación de las encías que se repite
- La halitosis o mal aliento, y un persistente sabor metálico en la boca
- La recesión gingival, lo que resulta en aparente alargamiento de los dientes. (Esto también puede ser causada por la mano dura o el cepillado con un cepillo de dientes rígidos).
- Bolsillos profundos entre los dientes y las encías (bolsas son sitios donde se ha destruido poco a poco apego por el colágeno, la destrucción de enzimas, conocidas como colagenasas)
- Dientes flojos, en las etapas posteriores (aunque esto puede ocurrir por otras

#### 2.2.16. **La endocarditis.**

Es una infección del endocardio, es decir, el revestimiento interno que cubre completamente las estructuras cardíacas. Afecta normalmente a las válvulas, así como a dispositivos terapéuticos (marcapasos, desfibriladores implantables, prótesis valvulares o catéteres). D. MALE; J. BROSTOFF; D. BROTH; I. ROITT. (2007)

##### 2.2.16.1. **Causas de la endocarditis bacteriana.**

La endocarditis tiene su origen en un foco infeccioso fuera del corazón, por ejemplo, en heridas de las extremidades o amigdalitis (infección en las anginas).

Si la invasión microbiana no se controla los gérmenes entran en el torrente sanguíneo y viajan hasta el corazón donde afectan a las válvulas.

Las infecciones pueden ser causadas por:

**Bacterias:** las más comunes son los estreptococos (*Streptococcus viridans*), que pueden propagarse después de una intervención dental. La endocarditis más frecuente es la reumática, que suele tener su origen en una amigdalitis de repetición. Aunque el tratamiento antibiótico ha reducido drásticamente esta enfermedad en personas jóvenes. También los estafilococos (*Staphylococcus aureus*), habituales en enfermos crónicos con sondas permanentes, pueden causar la endocarditis.

**Hongos:** como la cándida.

**Microorganismos que viven en la piel, boca, intestinos o vías urinarias:** por esta razón se recomienda cobertura antibiótica a los pacientes con prótesis o alteraciones valvulares al hacer ortodoncias o intervenciones quirúrgicas bucales.

Las válvulas contagiadas pueden presentar vegetaciones. Son como pequeños grumos, formados por la acumulación de bacterias y restos de fibrina (productos derivados de la coagulación), pegados al borde de las válvulas cardíacas.

#### 2.2.16.2. **Cómo se diagnostica la endocarditis bacteriana.**

Además del examen y los antecedentes completos de su hijo, los procedimientos de diagnóstico pueden incluir los siguientes:

➤ **Ecocardiograma (eco)** - procedimiento que evalúa la estructura y la función del corazón utilizando ondas sonoras que se registran en un sensor electrónico para producir una imagen en movimiento del corazón y las válvulas cardíacas.

- Hemograma completo (complete blood count, CBC) - medición de tamaño, número y madurez de las diferentes células sanguíneas en un volumen de sangre específico.
- Cultivo de sangre - examen que evalúa y determina el tipo específico de bacterias en el torrente sanguíneo, si las hubiera.

#### **2.2.16.3. Cómo se previene la endocarditis bacteriana.**

Mantener una higiene oral excelente es un paso importante para prevenir la endocarditis bacteriana. Las visitas regulares al dentista para una revisión y limpieza dentales son esenciales. LANGA S. (2006)

Es recomendable que los pacientes con antecedentes de endocarditis, defectos congénitos o con alguna anomalía en las válvulas del corazón se sometan a revisiones periódicas y tomen antibióticos antes de cualquier procedimiento dental o quirúrgico.

#### **2.2.16.4. Concepto y expresión matemática del crecimiento bacteriano.**

A los fines de la investigación y del cumplimiento de los objetivos específicos, es necesario entender y comprender, cómo y porqué existen unidades de formación de colonias en los diferentes agares. Es por ello que en este apartado, se analiza el crecimiento microbiano, y cómo se da el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo. Por lo tanto, no nos referimos al crecimiento de un único microorganismo (ciclo celular) sino al demográfico de una población. En este tema nos centraremos en el crecimiento de bacterias, el estudio que se hace puede servir también para entender el crecimiento de levaduras y de otros hongos. El crecimiento de los virus se produce de otra forma. PATRICK R. MURRAY, KEN S. ROSENTHAL, MICHAEL A, PFALLER. (2009)



Denominamos ciclo celular al proceso de desarrollo de una bacteria considerada de forma aislada. A lo largo del ciclo celular, tiene lugar la replicación del material de la bacteria, la síntesis de sus componentes celulares, el crecimiento para alcanzar un tamaño doble del inicial y su división por bipartición de la bacteria para dar lugar a dos células hijas.

La duración del ciclo celular coincide con el tiempo de generación y depende, en general, de los mismos factores de los que depende este. El crecimiento de una población resulta de la suma de los ciclos celulares de todos sus individuos. Este crecimiento suele ser asincrónico puesto que cada microorganismo se encuentra en un punto diferente del ciclo celular. Por consiguiente, en un momento determinado en una población se encuentran células que acaban de dividirse, otras que están replicando su ADN y elongándose, otras que están iniciando la división celular, etc.

En un crecimiento sincrónico todas las células se encuentran simultáneamente en la misma fase del crecimiento celular. Los cultivos sincrónicos son muy difíciles de mantener por lo que su importancia está principalmente ligada a los estudios básicos de biología microbiana. Sin embargo, en la naturaleza, las bacterias del suelo se encuentran en condiciones de crecimiento próximas a la fase estacionaria (en la que se produce una cierta sincronización del cultivo) y, por consiguiente, durante cierto tiempo las poblaciones naturales probablemente se comporten como relativamente sincrónicas. LANGA S. (2006)

Las poblaciones de bacterias pueden crecer de una forma explosiva acumulando grandes números en un periodo de tiempo muy reducido. Puesto que el efecto nocivo (infecciones o intoxicaciones) de los microorganismos depende de su número en la mayoría de los casos, entender cómo se produce el crecimiento microbiano es importante para poder evitar o reducir dichos efectos nocivos. Se denomina crecimiento equilibrado, a aquél en el que toda la biomasa, número de células, cantidad de proteínas, de ADN, etc., evolucionan en paralelo. El crecimiento equilibrado probablemente ocurra en muy contadas ocasiones en condiciones naturales.

Por lo tanto, es principalmente un concepto de aplicación en el laboratorio. Sin embargo, es útil porque permite estudiar el crecimiento microorganismos. HOLT J. G. (1994).

Las bacterias crecen siguiendo una progresión geométrica en la que el número de individuos se duplica al cabo de un tiempo determinado denominado tiempo de generación ( $\tau$ ). De esta forma, podemos calcular el número de bacterias (N) al cabo de un número de generaciones (n) usando la ecuación siguiente:

$$N = N_0 2^n$$

Siendo  $N_0$  el número de células en el momento actual.

El número de generaciones se puede calcular de la siguiente forma:

$$n = t / \tau$$

Donde t es el tiempo transcurrido.

Los tiempos de generación de bacterias creciendo en ambientes favorables pueden ser muy cortos (valores de  $\tau$  de 20 min). Esto lleva a que una única célula ( $N_0 = 1$ ) creciendo con un  $\tau = 20$  min, llegue a poder producir  $4.7 \times 10^{21}$  células en 24 horas.

Si la bacteria crece en un medio líquido, las células que se producen en cada división continúan su vida independientemente en la mayoría de los casos formando una suspensión de células libres.

Cuando una célula aislada comienza a crecer sobre un substrato sólido, el resultado del crecimiento al cabo del tiempo es una colonia. Se denomina unidad formadora de colonia (UNIDADES DE FORMACIÓN DE COLONIAS) a una célula viva y aislada que se encuentra en un substrato y en condiciones ambientales adecuadas y produce una colonia en un breve lapso de tiempo. HOLT J. G. (1994).

Una Unidad de Formación de Colonia, también puede corresponder a más de una célula cuando éstas forman parte de grupos unidos fuertemente (estreptococos o diplococos, por ejemplo) ya que cada grupo formará una sola colonia.

Cuando algunos tipos de bacterias o de levaduras patógenas crecen sobre superficies forman biopelículas (biofilms) en los que las células se asocian entre sí, mediante capas de polisacáridos que forman una película que recubre la superficie sobre la que se encuentran las células.

Los biofilms son importantes porque los microorganismos que los forman resultan más resistentes a antibióticos y al ataque de células del sistema inmune y, por consiguiente, las infecciones que producen son más difíciles de tratar.

Además, dentro de los biofilms (que pueden estar formados por microorganismos de diferentes especies) se facilita la transferencia horizontal de genes entre lo que facilita la dispersión de factores de virulencia o de resistencias a antibióticos. La presencia de biopelículas es un problema serio en los implantes ortopédicos, catéteres, etc.

El sarro de los dientes es un ejemplo de biofilm. Cuando las bacterias crecen como unidades aisladas se habla de crecimiento planctónico para diferenciarlo del crecimiento formando un biofilm. Se denominan factores de virulencia a las características de un microorganismo que le permiten causar una enfermedad. Los factores pueden ser proteínas que faciliten el ataque al huésped, que permitan resistir la acción del sistema inmune, etc.

La formación de biofilms es importante en la génesis de diferentes patologías. Se están identificando genes que controlan el cambio de crecimiento libre (crecimiento planctónico) a crecimiento en forma de biofilm en distintos tipos de bacterias. Por ejemplo, se han identificado genes de este tipo en *Pseudomonas aeruginosa* que son responsables del aumento de la cronicidad de las infecciones con este patógeno. PATRICK R. MURRAY, KEN S. ROSENTHAL, MICHAEL A, PFALLER. (2009)

En otros microorganismos (tales como *Streptococcus mutans*) la formación de biofilms se ha asociado a la presencia de señales de quórum, de manera que bacterias competidoras de *S. mutans* son capaces de eliminar estas señales y reducir la formación de la biopelícula.

Algunas bacterias que comparten un mismo espacio físico pueden comunicarse entre sí mediante lo que se denomina señales de quórum. Estas son moléculas simples excretadas por las células. Cuando el número de células aumenta, la concentración de la señal de quórum también lo hace. Las células tienen receptores para estas señales de quórum que reaccionan en función de la concentración de la señal. LANGA S. (2006)

De esta forma, cuando la concentración de la señal de quórum es mayor, la respuesta es mayor. De esta forma, el comportamiento de una célula depende de que se encuentre sola o acompañada.

Las señales de quórum pueden ser reconocidas por especies diferentes de las emisoras. También hay bacterias capaces de degradar las señales de quórum de otras especies para interferir su comunicación. El estudio de las señales de quórum permite desarrollar productos que dificultan su formación. Por ejemplo, dentífricos con productos anticarro. HOLT J. G. (1994).

#### **2.2.16.5. Concepto de muerte de un microorganismo.**

Desde el punto de vista microbiológico, un microorganismo muere cuando pierde de forma irreversible la capacidad de dividirse. El fundamento de esta definición es que si un microorganismo ha perdido la capacidad de dividirse no podrá formar una colonia sobre un medio de cultivo y no será posible detectar su presencia por los métodos microbiológicos tradicionales.

Es decir, cuando no se produce aumento en el número de microorganismos no hay crecimiento. Sin embargo, un microorganismo puede estar muerto desde el punto de vista microbiológico y continuar desarrollando una actividad metabólica que se traduzca, por ejemplo, en liberación de toxinas (p.ej. el *Escherichia coli* es capaz de interferir la señal de quórum que permite a la bacteria patógena *Vibrio cholerae* calcular el tamaño de la población).

Esto es importante porque cuando la población de *V. Cholerae* es grande, se inhibe la producción de la toxina colérica y el patógeno se desprende del intestino para buscar nuevos individuos que infectar. Por lo tanto, la acción de *E. coli* afecta la patogenicidad de *V. Cholerae*).

Por otra parte, hay que considerar que la capacidad de multiplicación (crecimiento) de un microorganismo puede verse transitoriamente afectada por lesiones o por las condiciones físicas o químicas del entorno. HOLT J. G. (1994).

En estos casos, podríamos considerar como muertos microorganismos que pueden reanudar su crecimiento si las condiciones son de nuevo favorables.

#### 2.2.16.6. **Qué necesita un microorganismo para crecer.**

El aislamiento de bacterias a partir de muestras naturales se realiza, en la mayoría de los casos, mediante la producción de colonias aisladas en cultivos sólidos.

El crecimiento explosivo de las bacterias produce un gran número a partir de una única célula inicial de forma que, tras un periodo de tiempo de incubación en las condiciones ambientales adecuadas, se produce una colonia de individuos iguales. HOLT J. G. (1994).

Para crecer, un microorganismo necesita nutrientes que le aporten energía y elementos químicos para la síntesis de sus constituyentes celulares.

Dependiendo de la fuente de carbono que utilizan, los microorganismos se pueden clasificar en autótrofos si es el CO<sub>2</sub> atmosférico (microorganismos que fotosintetizan) y heterótrofos si utilizan carbono orgánico. Los microorganismos de importancia clínica son todos ellos heterótrofos. La fórmula elemental de un microorganismo es, aproximadamente, C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>N lo que supone que los componentes de las células son:

- Carbono que representa alrededor del 50% del peso seco,
- Oxígeno (32%), Nitrógeno (14%) y debe estar disponible, normalmente, en forma de NH<sub>4</sub> o de aminoácidos a los que se pueda tomar su grupo amino;
- Fósforo (3%) y debe estar en forma de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, azufre que representa en torno al 1% y procede de aminoácidos sulfurados o de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y,
- Otros elementos: Fe, K, Mg, Mn, Co, Mb, Cu y Zn.

La elaboración de medios de cultivo que permitan aislar microorganismos a fin de iniciar posteriores cultivos puro o axénicos requiere proporcionar los nutrientes antes citados y, en ciertos casos, algunos aminoácidos o vitaminas que determinados tipos de microorganismos no pueden sintetizar. Los medios de cultivo se pueden clasificar en definidos cuando su composición química se conoce totalmente y complejos cuando no es el caso porque están compuestos por mezclas de extractos de materiales complejos (extracto de levadura, extracto de carne, etc.). PATRICK R. MURRAY, KEN S. ROSENTHAL, MICHAEL A, PFALLER. (2009)

Por otra parte, los medios de cultivo pueden ser líquidos o bien sólidos si se añade algún agente solidificante que no sea consumible por los microorganismos (normalmente agar). En función de los microorganismos que pueden crecer en ellos, los medios pueden ser:

- Selectivos cuando favorecen el crecimiento de ciertos microorganismos mientras suprimen el de otros (por ejemplo, el medio SPS para clostridios),

- Diferenciales cuando alguno de sus componentes permite identificar las colonias de un tipo de microorganismos (p.ej. medios con hematíes para identificar colonias de microorganismos hemolíticos),
- Selectivo-diferenciales cuando combinan las dos características anteriores (p.ej. el agar de Mac Conkey para identificar *Escherichia coli*), y medios de enriquecimiento que permiten aislar un tipo determinado de microorganismo a partir de una mezcla una población mixta de gran tamaño.

#### 2.2.16.7. **Detección y medida del crecimiento.**

Existen diferentes sistemas para detectar y medir el crecimiento de microorganismos. Los principales, se enumeran a continuación:

#### 2.2.16.8. **Recuento directo.**

Consiste en la observación al microscopio de volúmenes muy pequeños de suspensiones de bacterias. Se usan unos portaobjetos especiales denominados cámaras de Petroff-Hausser. Para que la medida sea correcta es necesario que la densidad de células sea del orden de  $10^5$  por ml.

#### 2.2.16.9. **Medida de la masa de células.**

El sistema se basa en que las células en suspensión dispersan la luz causando la turbidez del cultivo. La turbidez depende de la masa en suspensión y, por tanto, midiendo esta se puede estimar aquella. Este es el parámetro de medida más fácil de usar en los cultivos de laboratorio. ***Atención: La densidad de células debe ser del orden de  $10^5$  por ml.***

#### 2.2.16.10. Recuento de viables.

Consiste en sembrar un volumen determinado de cultivo o muestra sobre el medio de cultivo sólido adecuado para estimar el número de viables contando el número de colonias que se forman puesto que cada una de estas deriva de una Unidad de Formación de Colonia.

*Atención: Para que la medida sea correcta desde el punto de vista estadístico, es necesario contar más de 300 Unidades de Formación de Colonias.*

En ciertas ocasiones en las que la densidad de microorganismos es demasiado baja, éstos se pueden recolectar por filtración a través de una membrana (de 0.2 µm de tamaño de poro) y posterior colocación de la membrana en un medio de cultivo adecuado para que se formen las colonias.

➤ Medida del número de partículas usando contadores electrónicos de partículas. Estos sistemas no nos indican si las partículas corresponden a células vivas o muertas; pero nos pueden dar una idea del tamaño de las partículas.

➤ Medida de parámetros bioquímicos tales como la cantidad de ADN, ARN, proteínas, peptidoglicano, etc. por unidad de volumen.

➤ Medida de actividad metabólica de las bacterias como que respiran producen una disminución del potencial redox del medio en que se encuentran como consecuencia del consumo de oxígeno (utilización de colorantes sensibles a oxidación-reducción tales como el azul de metileno). PATRICK R. MURRAY, KEN S. ROSENTHAL, MICHAEL A, PFALLER. (2009)

#### 2.2.16.11. Ciclo de crecimiento de poblaciones.

En un cultivo bacteriano en medio líquido, se pueden diferenciar cuatro fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano:



- Fase lag o de adaptación: Durante la que los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (de abundancia de nutrientes) para poder iniciar el crecimiento exponencial.
- Fase exponencial o logarítmica: en ella la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta fase las bacterias consumen los nutrientes del medio a velocidad máxima.
- La evolución del número de células durante esta fase se explica con el modelo matemático descrito anteriormente. Esta fase corresponde a la de infección y multiplicación dentro del organismo del agente infeccioso.
- Fase estacionaria: en ella no se incrementa el número de bacterias (ni la masa u otros parámetros del cultivo). Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente al de la fase de exponencial y durante ella se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios que pueden tener importancia en el curso de las infecciones o intoxicaciones producidas por bacterias.

Los microorganismos entran en fase estacionaria bien porque se agota algún nutriente esencial del medio, porque los productos de desecho que han liberado durante la fase de crecimiento exponencial hacen que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano o por la presencia de competidores u otras células que limiten su crecimiento. La fase estacionaria tiene gran importancia porque probablemente represente con mayor fidelidad el estado metabólico real de los microorganismos en muchos ambientes naturales.

- Fase de muerte: se produce una reducción del número de bacterias viables del cultivo.

Las fases, parámetros y cinética de crecimiento discutidas para el caso de los medios líquidos se presentan también en los sólidos. La cinética de crecimiento, en este caso, solo se puede seguir utilizando unos sistemas de detección especiales siendo el más sencillo, la medida del número de células viables por unidad de superficie o por unidad de masa. HOLT J. G. (1994).

#### 2.2.16.12. Factores físicos y químicos que influyen en el crecimiento.

Temperatura: Cada microorganismo tiene una temperatura de crecimiento adecuada. Si consideramos la variación de la velocidad de crecimiento en función de la temperatura de cultivo, podemos observar una temperatura mínima por debajo de la cual no hay crecimiento; a temperaturas mayores se produce un incremento lineal de la velocidad de crecimiento con la temperatura de cultivo hasta que se alcanza la temperatura óptima a la que la velocidad es máxima. Por encima de esta temperatura óptima, la velocidad de crecimiento decae bruscamente y se produce la muerte celular.

El aumento de la velocidad de crecimiento con la temperatura se debe al incremento generalizado de la velocidad de las reacciones enzimáticas con la temperatura. Se denomina coeficiente de temperatura a la relación entre el incremento de la velocidad de reacción y el de temperatura. En términos generales, la velocidad de las reacciones bioquímicas suele aumentar entre 1.5 y 2.5 veces al aumentar 10 °C la temperatura a la que tienen lugar. La falta de crecimiento a temperaturas bajas se debe a la reducción de la velocidad de las reacciones bioquímicas y al cambio de estado de los lípidos de la membrana celular que pasan de ser fluidos a cristalinos impidiendo el funcionamiento de la membrana celular.

La muerte celular a altas temperaturas se debe a la desnaturalización de proteínas y a las alteraciones producidas en las membranas lipídicas a esas temperaturas. Es importante tener en cuenta que a temperaturas bajas, el metabolismo celular es lento y las células paran de crecer; aunque suelen morir.

Sin embargo, cuando la temperatura es superior a la óptima, se produce la muerte celular rápidamente y las células no pueden recuperar su capacidad de división si baja posteriormente la temperatura. Esto permite esterilizar por calor y no por frío. Hay varios tipos de microorganismos en función de sus temperaturas de crecimiento mínima, máxima y óptima. PATRICK R. MURRAY, KEN S. ROSENTHAL, MICHAEL A, PFALLER. (2009)

**Tabla N° 1: Microorganismo en función de sus temperaturas.**

<b>Tipo de microorganismo</b>	<b>Temperatura mínima</b>	<b>Temperatura óptima</b>	<b>Temperatura máxima</b>
<b>Psicrófilo</b>	< 5 °C	5 °C	12 a 15 °C
<b>Psicrótrofo</b>	5 °C	5 °C	25 a 30 °C
<b>Mesófilo</b>	5 °C	15 °C	45 °C
<b>Termófilo</b>	40 a 45 °C	55 a 60 °C	75 a 90 °C

Fuente: Investigación propia.

Elaborado por: Betzy J. Maza M.

Los microorganismos psicrótrofos son mesófilos que pueden crecer a temperaturas bajas. Por tanto, se les puede considerar como Psicrófilos facultativos. Esto es importante desde el punto de vista aplicado porque cuando se encuentran contaminando alimentos, son capaces de crecer en condiciones de refrigeración (4 – 8 °C) y de producir infecciones en los consumidores del alimento (30 - 35 °C). Desde el punto de vista clínico, los microorganismos capaces de producir infecciones en pacientes son los mesófilos y algunos psicrótrofos ya que sus temperaturas óptimas de crecimiento coinciden con las corporales.

Actividad de agua (aw): Se denomina actividad de agua a la relación entre la presión de vapor de agua del substrato de cultivo (P) y la presión de vapor de agua del agua pura (P0). El valor de la actividad de agua está relacionado con el de la humedad relativa (HR). El valor de la actividad de agua nos da una idea de la cantidad de agua disponible metabólicamente. Por ejemplo: comparemos el agua pura donde todas las moléculas de agua están libremente disponibles para reacciones químicas con el agua presente en una disolución saturada de sal común (NaCl) donde una parte importante de las moléculas de agua participa en la solvatación de los iones de la sal disuelta. En este último caso, la actividad de agua mucho menor que en el primero, conforme aumenta la cantidad de solutos en el medio, disminuye su actividad de agua.

El agua es un sustrato en muchas reacciones bioquímicas (proteasas y lipasas, por ejemplo). Cuando no hay agua disponible, estas reacciones se detienen y el metabolismo se para. Esta falta de agua también detiene muchas de las enzimas que podrían degradar las estructuras biológicas. Por ello, las células que no crecen por falta de agua no mueren rápidamente: los sistemas de degradación tampoco funcionan y no las degradan. Es decir, cuando un microorganismo se encuentra en un sustrato con actividad de agua menor que la que necesita, su crecimiento se detiene. Esta detención del crecimiento no suele llevar asociada la muerte del microorganismo, sino que éste se mantiene en condiciones de resistencia durante un tiempo más o menos largo. En el caso de las esporas, la fase de resistencia puede ser considerada prácticamente ilimitada. D. MALE; J. BROSTOFF; D. BROTH; I. ROITT. (2007)

La gran mayoría de los microorganismos requiere valores de actividad de agua muy altos para poder crecer. Los valores mínimos de actividad para diferentes tipos de microorganismos son, a título orientativo, los siguientes:

- Bacterias  $a_w > 0.90$ ,
- Levaduras  $a_w > 0.85$ ,
- Hongos filamentosos  $a_w > 0.80$ .

Como puede verse, los hongos filamentosos son capaces de crecer en sustratos con actividad de agua menor (más secos) de la que permite el crecimiento de bacterias o de levaduras. Por esta razón se puede producir la colonización de sustratos con baja actividad de agua (por ejemplo, alimentos como el queso o almíbar o la piel) por mohos (hongos filamentosos) mejor que por bacterias.

En función de su tolerancia a ambientes con baja  $a_w$ , los microorganismos que pueden crecer en estas condiciones se clasifican en halotolerantes, halófilos y xerófilos según toleren o requieran condiciones salinas o hipersalinas, respectivamente. La reducción de la actividad de agua para limitar el crecimiento bacteriano tiene importancia aplicada en industria alimentaria. PATRICK R. MURRAY, KEN S. ROSENTHAL, MICHAEL A. PFALLER. (2009)

La utilización de almíbares, salmueras y salazones reduce la actividad de agua del alimento para evitar su deterioro bacteriano.

pH: Es un parámetro crítico en el crecimiento de microorganismos ya que cada tipo de microorganismo tiene un rango de pH en el que puede vivir adecuadamente, fuera de este rango muere. El pH intracelular es ligeramente superior al del medio que rodea las células ya que, en muchos casos, la obtención de energía metabólica depende de la existencia de una diferencia en la concentración de protones a ambos lados de la membrana citoplásmica. El pH interno en la mayoría de los microorganismos está en el rango de 6,0 a 8,0.

Los rangos de pH tolerables por diferentes tipos de microorganismos son, también, distintos. Hay microorganismos acidófilos que pueden vivir a pH=1.0 y otros alcalófilos que toleran pH=10.0. Hay que considerar que, como consecuencia del metabolismo, el pH del medio de crecimiento suele tender a bajar durante el cultivo. Por otra parte, la bajada del pH del medio que producen ciertos microorganismos les confiere una ventaja selectiva frente a otros competidores. Así, por ejemplo, las bacterias lácticas que producen grandes cantidades de ácido láctico como consecuencia de su metabolismo primario reducen el pH del medio a valores inferiores a los soportables por otras bacterias competidoras (llegan a bajar el pH del medio hasta 4.5). HOLT J. G. (1994).

De esta forma, las bacterias competidoras mueren y las lácticas se convierten en la población dominante. La bajada del pH se puede deber a varios factores, uno de los cuales es la liberación de ácidos orgánicos de cadena corta (fórmico, acético, láctico) por ciertas bacterias.

En este sentido, hay que tener en cuenta que la acción bactericida de estos ácidos orgánicos de cadena corta es más potente que la debida únicamente a la bajada del pH que producen. Esto es, los ácidos orgánicos de cadena corta son tóxicos para algunas bacterias por sí mismos. El efecto letal del pH ácido sobre los microorganismos tiene aplicación en la conservación de alimentos acidificándolos.

De esta forma, la adición de ácido acético en forma de vinagre permite la conservación de alimentos perecederos (escabeches, por ejemplo) y la producción de ácidos en el curso de fermentaciones naturales permite alargar la vida de los alimentos (p.ej. coles fermentadas).

Potencial redox: nos indica la capacidad del sustrato para aceptar o donar electrones, esto es: sus características oxidantes o reductoras. Uno de los factores que intervienen en el potencial redox, aunque no el único, es la concentración de oxígeno [O<sub>2</sub>].

Hay microorganismos que requieren ambientes oxidantes para crecer, mientras que otros necesitan ambientes reductores. El metabolismo de ambos tipos de microorganismos presenta diferencias notables. El requerimiento de condiciones oxidantes o reductoras no debe confundirse con la necesidad de presencia o ausencia de oxígeno para que se produzca el crecimiento. D. MALE; J. BROSTOFF; D. BROTH; I. ROITT. (2007)

En general, cuando un microorganismo requiere un ambiente oxidante se dice que desarrolla un metabolismo oxidativo (o respirativo), mientras que los microorganismos que requieren ambientes reductores (o menos oxidantes), realizan un metabolismo fermentativo.

Un microorganismo es aerobio cuando necesita oxígeno para vivir y es anaerobio cuando o bien no lo necesita (anaerobios facultativos como las bacterias entéricas, o como *Saccharomyces cerevisiae*; o anaerobios aerotolerantes como las bacterias lácticas), o cuando muere en presencia de oxígeno (anaerobios estrictos como los clostridios). Hay microorganismos que, aunque viven en presencia de oxígeno, no son capaces de utilizarlo como aceptor final de electrones y deben desarrollar un metabolismo fermentativo (p.ej. *Streptococcus*).

Por otra parte, hay microorganismos que pueden desarrollar ambos tipos de metabolismo. Esto es en presencia de oxígeno desarrollan un metabolismo oxidativo y en su ausencia, fermentativo.

El rendimiento de los procesos fermentativos es menor que el de los respirativos: las bacterias y las levaduras crecen menos cuando lo hacen fermentando que cuando lo hacen respirando. En el curso de ciertas reacciones metabólicas redox se forman compuestos altamente reactivos (radicales libres, formas superóxido) que pueden dañar las proteínas, membranas y ácidos nucleicos produciendo la muerte de las células.

Las células se defienden de estos compuestos reactivos mediante las enzimas siguientes: Superóxido dismutasa (SOD) y catalasa. Los anaerobios estrictos carecen de SOD y de catalasa o tienen niveles muy bajos de estas enzimas de forma que no pueden sobrevivir en presencia de oxígeno. La detección de estas enzimas tiene valor taxonómico. PATRICK R. MURRAY, KEN S. ROSENTHAL, MICHAEL A, PFALLER. (2009)

### **2.2.17. Medios de cultivos bacterianos.**

#### **2.2.17.1. Placas de agar.**

Una placa de agar es una placa de Petri que contiene un medio de cultivo (comúnmente agar más nutrientes) usada en microbiología para cultivar microorganismos o pequeñas plantas como la briofita *Physcomitrella patens*. Se pueden agregar compuestos como antibióticos, para hacer el medio selectivo.

Microorganismos individualmente colocados en la placa crecerán en colonias individuales, cada réplica del microorganismo es genéticamente idéntico a su antecesor (excepto por la baja e inevitable tasa de mutación). Por lo tanto, la placa se puede usar para estimar la concentración de microorganismos en un cultivo o una solución de ese cultivo, usando un contador de colonias.

También se puede usar para generar cultivos genéticamente puros a partir de un cultivo mixto, con diferentes especies de microorganismos, usando una técnica llamada «estriado».

En esta técnica, una gota de del cultivo es tomada de la muestra, mediante un instrumento llamado «asa bacteriológica», estéril; después se distribuye la muestra sobre la superficie del medio de cultivo dibujando estrías (de ahí el nombre), dejando de esta forma un gran número de microorganismos al principio y una baja cantidad al final de colonias aisladas. Luego, las colonias que crecieron pueden removerse individualmente con otra asa estéril, y así determinar a qué especie corresponde cada colonia individual. Este método es además, usado prácticamente en todos los laboratorios de microbiología para hacer cualquier cultivo bacteriológico.

#### 2.2.17.2. **Tipos.**

Como otros medios de cultivo, las formulaciones de agar usadas en placas pueden ser clasificadas como definidos e indefinidos. Un medio definido es aquel creado a partir de sustancias químicas individuales, requeridas específicamente por el microorganismo, así que la composición molecular exacta es conocida; mientras que un medio indefinido está hecho de productos naturales, donde la composición exacta es desconocida.

Las placas de agar pueden ser elaboradas como no selectivas, donde puede crecer cualquier organismo sin especificación, o pueden ser selectivas, donde solo crecen organismos específicos. Esta especificidad, puede ser por un requerimiento nutricional (por ejemplo lactosa como única fuente de carbono, permitiendo crecer de esta manera solo microorganismo capaces de metabolizar lactosa), o agregando antibióticos u otras sustancias con el fin de volver al medio selectivo. Esto se relaciona con las definiciones de medios definidos e indefinidos; los medios indefinidos hechos de productos naturales, contienen una gran variedad de moléculas orgánicas, y es más permisivo en sentido que provee de nutrientes a una amplia gama de microorganismos, mientras que los medios definidos pueden ser precisamente elaborados para seleccionar microorganismos con propiedades específicas. PATRICK R. MURRAY, KEN S. ROSENTHAL, MICHAEL A, PFALLER. (2009)



Las placas e agar, también actúan como indicadores, donde los organismos no son seleccionados en base al crecimiento, sino por un cambio de color en algunas colonias, generalmente causada por la acción de una enzima del microorganismo, sobre un componente del medio.

#### 2.2.17.3. **Agar sangre.**

Contiene sangre de mamíferos (generalmente oveja, conejo, humanos) a una concentración de 5 a 10%. El agar sangre, es un medio enriquecido, diferencial, usado para aislar microorganismos fastidiosos y detectar actividad hemolítica. La  $\beta$ -hemolisis, se manifiesta como una lisis y digestión completa de los eritrocitos que rodean la colonia, por ejemplo algunas bacterias del genero Streptococcus. La  $\alpha$ -hemolisis, aparece solo como lisis parcial (los eritrocitos, no son lisados completamente o la digestión no fue completa), por tanto la hemoglobina aparece como una halo verdoso alrededor de la colonia. Contiene extracto de carne, triptona, cloruro de sodio y agar.

#### 2.2.17.4. **Agar chocolate.**

Es un tipo de agar sangre, donde las células sanguíneas han sido lisadas por calentamiento a 56 °C. El agar chocolate se usa para cultivo de bacterias respiratorias fastidiosas como por ejemplo Haemophilus influenzae. No contiene chocolate, solo es llamado así por la coloración.

#### 2.2.17.5. **Agar Thayer-Martin**

Agar chocolate diseñado para aislar Neisseria gonorrhoeae.

#### 2.2.17.6. **Agar TCBS**

TCBS (Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa,) agar enriquecido, permite el crecimiento de todas las especies patógenas del género *Vibrio* spp.

#### 2.2.18. **Medios bacteriológicos de uso general.**

##### 2.2.18.1. **Agar bilis esculina con azida.**

Es usado para aislar *Enterococcus* así como *Streptococcus*.

##### 2.2.18.2. **Agar CLED (Agar cistina-lactosa deficiente en electrolitos).**

Es un medio de cultivo diferencial para aislar y contar las bacterias presentes en la orina. Favorece el crecimiento de los patógenos y contaminantes urinarios aunque, debido a la ausencia de electrolitos, impide la indebida proliferación de especies de *Proteus*).

##### 2.2.18.3. **Agar entérico de Hektoen.**

Este es un medio ideal para el aislamiento selectivo de *Salmonella* y *Shigella*, a partir de heces y alimentos.

##### 2.2.18.4. **Agar McConkey.**

Este medio se utiliza para el aislamiento de bacilos Gramnegativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos. Permite diferenciar bacterias que fermentan lactosa (L+) de las no fermentadoras (L-) en muestras clínicas, de agua y alimentos.

Todas las especies de la familia Enterobacteriaceae se desarrollan en el mismo. Contiene sales biliares y cristal violeta, lo que inhibe el crecimiento de bacterias Grampositivas, lo que convierte en un medio diferencial poco selectivo.

#### 2.2.18.5. **Agar Manitol salado.**

Medio de cultivo selectivo y diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos. Es recomendado para el aislamiento de estafilococos patogénicos a partir de muestras clínicas, alimentos, productos cosméticos y otros materiales de importancia sanitaria.

También, este medio puede utilizarse para el cultivo de especies halófilas de Vibrio, si no se dispone de medios apropiados (TCBS Medio, Medio Marino, etc.), aunque algunas especies pueden no desarrollar.

#### 2.2.18.6. **Agar Mueller-Hinton.**

Este medio de cultivo ha sido recomendado universalmente para la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos. Además es útil con el agregado de sangre para el cultivo y aislamiento de microorganismos nutricionalmente exigentes.

#### 2.2.18.7. **Agar nutritivo.**

Medio de cultivo utilizado para propósitos generales, para el aislamiento de microorganismos poco exigentes en lo que se refiere a requerimientos nutritivos. Su uso está descrito en muchos procedimientos para el análisis de alimentos, aguas y otros materiales de importancia sanitaria.

#### 2.2.18.8. **Agar Önöz.**

El agar Önöz permite un diagnóstico bacteriológico rápido de Salmonella y Shigella. Las colonias son fácilmente diferenciables de otras Enterobacterias.

#### 2.2.18.9. **Agar Feniletíl alcohol.**

Este agar selecciona especies de Staphylococcus mientras inhibe bacilos Gram negativos como Escherichia coli, Shigella, Proteus, etc.

#### 2.2.18.10. **Agar Trypticosa soya (TSA).**

TSA es un medio multiuso, producido por la digestión enzimática de soya y caseína. Es la base de otros tipos de agar, por ejemplo el agar sangre está hecho de TSA enriquecido con sangre. TSA permite crecer muchas bacterias semifastidasas incluyendo algunas especies de Brucella, Corynebacterium, Listeria y Vibrio.

#### 2.2.18.11. **Agar Xilosa, Lisina, Desoxicolato.**

Es utilizado para el aislamiento y diferenciación de bacilos entéricos Gram negativos, especialmente del género Shigella y Providencia.

#### 2.2.18.12. **Agar cetricimida.**

Medio utilizado para el aislamiento selectivo de Pseudomonas aeruginosa y de otras especies del género Pseudomonas.

#### **2.2.18.13. Agar glucosado de Sabouraud.**

El agar glucosado de Sabouraud es usado para cultivar hongos y tiene un pH bajo que inhibe el crecimiento de la mayoría de bacterias, además tiene un antibiótico (gentamicina) que inhibe específicamente el crecimiento de bacterias gramnegativas.

#### **2.2.18.14. Agar Infusión cerebro corazón.**

Es un medio muy rico en nutrientes, que proporciona un adecuado desarrollo microbiano. La infusión de cerebro de ternera, la infusión de corazón vacuno y la peptona, son la fuente de carbono, nitrógeno, y vitaminas.

La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el fosfato disódico otorga capacidad buffer.

#### **2.2.18.15. Agar papa dextrosa.**

Es un medio utilizado para el cultivo de hongos y levaduras a partir de muestras de alimentos, derivados de leche y productos cosméticos.

#### **2.2.18.16. Tioglicolato.**

Las sustancias reductoras como tioglicolato de sodio, el sulfito de sodio y cisteína disminuyen el potencial de óxido reducción y proporcionan una anaerobiosis suficiente y debido a los grupos -SH- de estos compuestos, se neutralizan los efectos bacteriostáticos de los derivados mercuriales, arsenicales y de otros metales pesados que pudieran estar presentes en la muestra en estudio. El bajo contenido de agar le otorga la propiedad de ser un medio fluido y retarda la dispersión de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>.

### 2.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS.

**Absceso dental:** Un flemón dental es un absceso localizado en una encía, debida principalmente a la inflamación de una pieza dental dañada por traumatismo, por caries o por periodontitis.

**Ácido láctico:** Es un compuesto químico que desempeña importantes roles en varios procesos bioquímicos, como la fermentación láctica.

**Ácido lipoteicoico:** Son polímeros de glicerol o ribitol unidos mediante enlaces fosfodiéster. Estos ácidos se encuentran en la pared celular de las bacterias Gram-positivas, tales como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium* y *Listeria*, extendiéndose sobre la superficie de la capa de peptidoglicano.

**Aminoácido:** Es una molécula orgánica con un grupo amino (-NH<sub>2</sub>) y un grupo carboxilo (-COOH). Los aminoácidos más frecuentes y de mayor interés son aquellos que forman parte de las proteínas.

**Angina de Ludwig:** Es una infección severa y mortal de origen dental, en la que el pus invade gravemente cara, cuello, vías respiratorias y pulmones.

**Candidiasis:** Infección fúngica (micosis) de cualquiera de las especies *Candida* (todas las levaduras), de las cuales la *Candida albicans* es la más común.

**Eucariotas:** Células con un núcleo celular delimitado dentro de una doble capa lipídica: la envoltura nuclear, la cual es porosa y contiene su material hereditario, fundamentalmente su información genética.

**Peptidoglicano:** Es un copolímero formado por una secuencia alternante de N-acetil-glucosamina y el Ácido N-acetilmurámico unidos mediante enlaces  $\beta$ -1,4.

**Tagatosa:** Monosacárido de seis carbonos con un grupo cetona por lo que pertenece al grupo de las cetosas y dentro de este al de las cetohehexosas

**Triptona:** Es un digerido pancreático de caseína, se utiliza como fuente de nitrógeno en los medios de cultivos. Es capaz de soportar el crecimiento exigente y no exigente de microorganismos.

**UFC:** Unidad de Formación de Colonias.

## 2.4. HIPÓTESIS Y VARIABLES.

### 2.4.1. Hipótesis.

**H<sub>i</sub>: (Hipótesis de la investigación):** Mediante el estudio in vitro del hisopado bucal en diferentes cultivos en placas de Agar, se puede verificar su relación con el desarrollo de las caries.

### 2.4.2. Variables.

#### 2.4.2.1. Variable dependiente.

- Caries dental.

#### 2.4.2.2. Variables independientes.

- Bacterias patógenas:
  - *Streptococcus mitis*,
  - *Streptococcus mutans*,
  - *Streptococcus sanguis*,
  - *Candida albicans*,
  - *Granulicatella adiacens*.

## 2.5. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES.

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	CATEGORIAS	INDICADORES	TÉCNICAS E INST.
<p><i>Dependiente</i></p> <p><b>Caries dental</b></p>	<p>Enfermedad multifactorial que se caracteriza por la destrucción de los tejidos del diente</p>	<p>Caries coronal</p> <p>Caries radicular</p>	<p>Dolor</p> <p>Mal aliento</p> <p>Dolor en las encías</p> <p>Cambio de color</p>	<p>Análisis visual</p>
<p><i>Independiente</i></p> <p>Bacterias patógenas</p>	<p>Bacterias Gram positivas y Gram negativas</p>	<p>Anaerobias facultativas</p>	<p>Crecimiento medible en Unidades de Formación de Colonias</p>	<p>Cultivos en laboratorio y lectura en Microscopio</p>

Fuente: Investigación propia.

Elaborado por: Betzy Jaqueline Maza Merchán.



## CAPÍTULO III

### 3. MARCO METODOLÓGICO.

#### 3.1. MÉTODO

Los métodos que se utilizarán en esta investigación son:

- Experimental,
- Deductivo y,
- Descriptivo.

**Experimental:** Este método consiste en hacer un cambio en el valor de una variable (variable independiente) y observar su efecto en otra variable (variable dependiente). Esto se lleva a cabo en condiciones rigurosamente controladas (Laboratorio), con el fin de describir de qué modo o por qué causa se produce una situación o acontecimiento particular.

**Deductivo:** A través de éste método se analizara el tema partiendo de sus generalidades hasta llegar a sus particularidades.

**Descriptivo:** Por medio de este método se discernirá en el tema planteado detallando las características del mismo. Para describir lo que se investiga es necesario asociar las variables independientes y dependiente entre sí.

##### 3.1.1. Tipo de investigación.

Se desarrollará una investigación de tipo bibliográfica, de laboratorio y descriptiva, que se encuentra orientada fundamentalmente a definir, de una manera detallada las características microbiológicas que generan la formación de caries dental.

### 3.1.2. **Diseño de la investigación.**

**Bibliográfico:** Para que una investigación tenga un contenido científico es indispensable partir de un análisis crítico y doctrinario de fuentes bibliográficas

**Laboratorio:** Es una recopilación de datos primarios (Observaciones) y secundarios (Estadísticas) en el laboratorio y no en el campo (Cavidad bucal).

**Descriptiva:** La Investigación descriptiva, también conocida como la investigación estadística, describen los datos y este debe tener un impacto en las vidas de la gente que le rodea.

### 3.1.3. **Tipo de estudio.**

Es un estudio prospectivo, porque posee una característica fundamental, que es la de iniciar con la demostración de una supuesta causa o variable independiente (Desarrollo de bacterias patógenas), para luego seguir a través del tiempo determinando o no, la aparición del efecto (caries dental).

## 3.2. **POBLACIÓN Y MUESTRA**

### 3.2.1. **Población**

La investigación fue realizada en 10 muestras de diferentes pacientes extraídas de caries dental, y 4 muestras de saliva de los mismos pacientes, las cuales todas ellas, se sometieron en cuatro diferentes cultivos, Agar Tioglicolato, Agar Mac Conkey, Agar Sangre, Agar Cromo cándida, de los cuales obtuve 40 placas Petri, para determinar: Bacterias patógenas.

Luego de éstos, se observará la aparición de unidades de formación de colonias, y se analizarán los resultados para la comprobación de la hipótesis de la investigación ( $H_i$ )

### 3.2.2. Muestra

Al ser una investigación in vitro, no se trabajará sobre pacientes; por lo tanto, no será necesario el cálculo de la muestra.

### 3.3. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

La técnica a utilizarse para este proyecto de investigación es la observación directa de las muestras obtenidas de los pacientes que presentaban caries dentales, sometidas a los diferentes cultivos bacterianos, para luego ser observados y analizados bajo el microscopio, transcribir los datos y las conclusiones sobre los resultados obtenidos.

El estudio fue realizado en el laboratorio de Microbiología de la Carrera de Odontología de la UNACH, ubicado en el campus centro en el período de Diciembre 2013 a Mayo 2014.

El procedimiento realizado se detalla a continuación:

1. Se ha citado a los pacientes al consultorio y se les ha explicado el objetivo de la investigación.
2. La toma de la muestra realizando el hisopado en la caries del paciente (4 hisopados)
3. Se realizó también hisopado bucal general en 4 pacientes, para mayor control y conocimiento, de la microbiota bucal existente.
4. Se realiza el raspado en las placas de diferentes agares (4 placas Petri cada paciente)
5. Luego de colocó las placas Petri en la estufa de cultivo.
6. La temperatura de cultivo fue de 35 °C.
7. El tiempo de cultivo fue de 72 horas.
8. Luego se procede al correspondiente análisis bajo el microscopio con lente de 2 x 250 que es el de mayor aumento con el que contamos.

9. Se realiza el conteo de UNIDADES DE FORMACIÓN DE COLONIAS, con un contador manual para tal fin, según criterios internacionales (Elemento de laboratorio) LANGA S. (2006)

### **3.4. TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

Luego de observar los resultados de laboratorio, se utilizará el método estadístico, el cual es una ciencia formal que estudia la recolección, análisis e interpretación de datos de una muestra representativa, ya sea para ayudar en la toma de decisiones o para explicar condiciones regulares o irregulares de algún fenómeno o estudio aplicado, de ocurrencia en forma aleatoria o condicional.

## CAPÍTULO IV

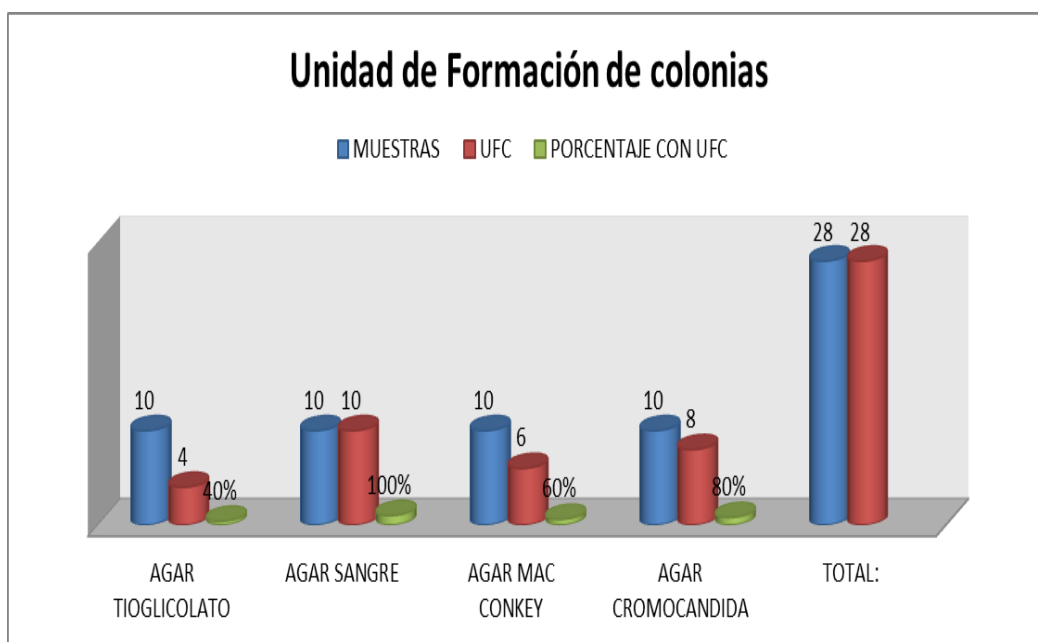
### 4. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

**Tabla N° 1: Cultivos realizados en el laboratorio de la UNACH.**

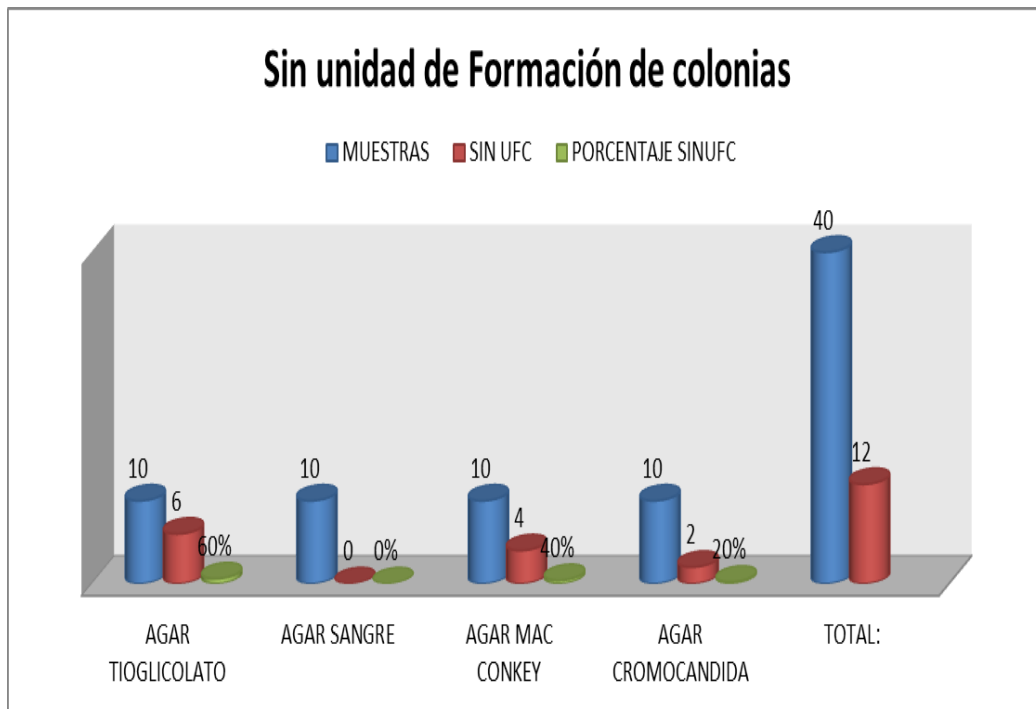
Tipos de agar	Mues- tras	Sin UFC	UFC	% con UFC	% sin UFC	Total %
<b>AGAR TIOGLICO-LATO</b>	10	4	6	40 %	60 %	100 %
<b>AGAR SANGRE</b>	10	10	0	100 %	0 %	100 %
<b>AGAR MAC CONKEY</b>	10	6	4	60 %	40 %	100 %
<b>AGAR CROMO-CANDIDA</b>	10	8	2	80 %	20 %	100 %
<b>TOTAL:</b>	<b>40</b>	<b>28</b>	<b>12</b>			

Fuente: Investigación Propia.  
Elaborado por: Betzy J. Maza M.

**Gráfico N° 1: Cultivos realizados en el laboratorio de la UNACH.**



**Gráfico N° 2: Cultivos realizados en el laboratorio de la UNACH**



**Análisis e interpretación:** En la presente investigación, se realizaron 10 muestras bacterianas en 4 diferentes tipos de Agar a saber: el Tioglicolato demostró 4 UFC y 4 sin UFC, el Agar sangre demostró 10 UFC y en todas hubo formación de colonias, el Agar MacConkey demostró 6 UFC y 4 sin UFC, el Agar Cromo cándida demostró 8 UFC y 2 sin UFC.

Existieron 12 cultivos sin UFC, lo cual indica que muy posiblemente, se debería realizar la investigación en un período mayor de tiempo y en mejores condiciones técnicas.

Se interpreta que el agar sangre es el mejor medio de cultivo porque se obtuvo el 100% de efectividad.

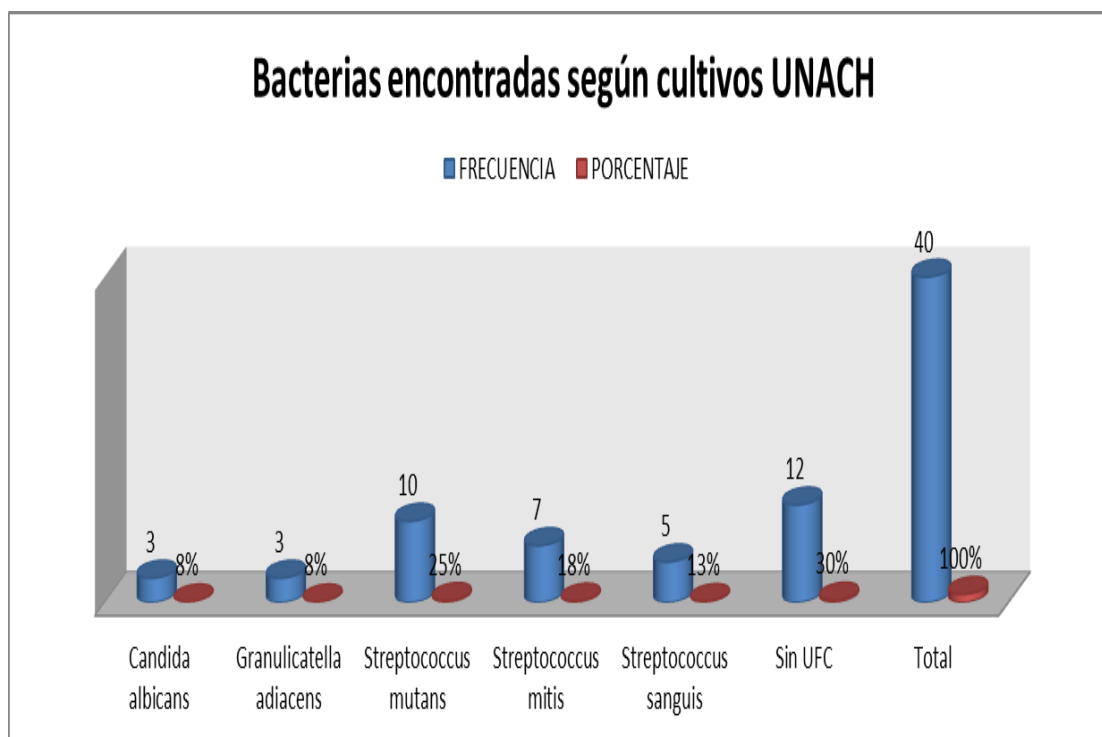
**Tabla N° 2: Bacterias encontradas según cultivos UNACH.**

<b>RESULTADOS LABORATORIO</b>		
<b>UNACH</b>	<b>FRECUENCIA</b>	<b>PORCENTAJE</b>
<b>Candida albicans</b>	3	8 %
<b>Granulicatella adiacens</b>	3	8 %
<b>Streptococcus mutans</b>	10	25 %
<b>Streptococcus mitis</b>	7	18 %
<b>Streptococcus sanguis</b>	5	13 %
<b>Sin UFC</b>	12	30 %
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>100%</b>

Fuente: Investigación Propia.

Elaborado por: Betzy J. Maza M.

**Gráfico N° 3: Bacterias encontradas según cultivos UNACH.**



**Análisis e interpretación:** Las bacterias identificadas en los cultivos realizados en el laboratorio de la UNACH, fueron:

- ✓ *Candida albicans* (3 UFC) representando el 8 % de las muestras,
- ✓ *Granulicatella adiacens* (3 UFC) representando el 8 % de la muestra,
- ✓ *Streptococcus mutans* (10 UFC) representando el 25 % de las muestras,
- ✓ *Streptococcus mitis* (7 UFC) representando el 18 % de las muestras,
- ✓ *Streptococcus sanguis* (5 UFC) representando el 13 % de la muestra.

Se interpreta que el *Streptococcus mutans*, es la bacteria con mayor actividad en boca, con cultivos en el 25 % de las muestras.

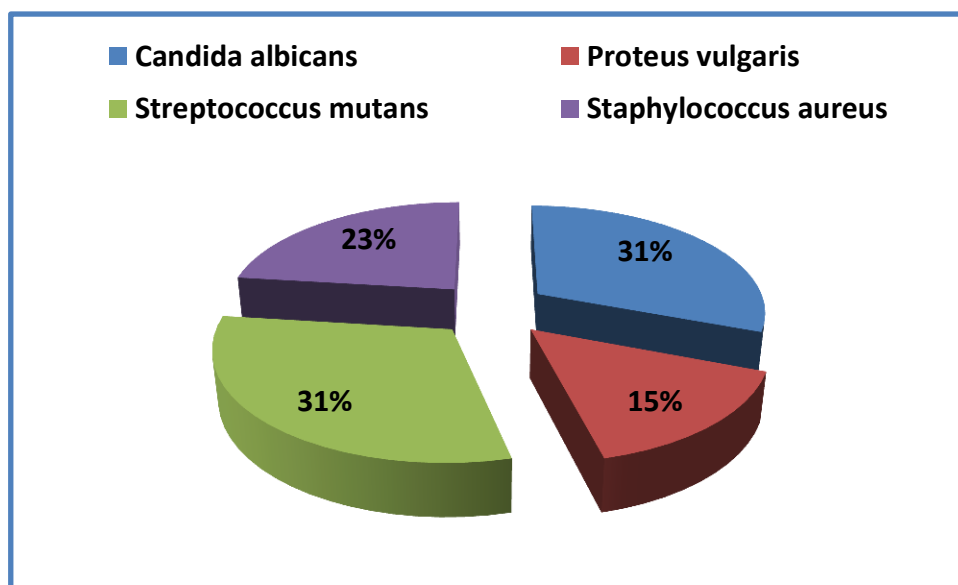
**Tabla N° 3: Microorganismos en cultivos en saliva.**

Resultados laboratorio	FRECUENCIA	PORCENTAJE
<b>Candida albicans</b>	4	31 %
<b>Proteus vulgaris</b>	2	15 %
<b>Streptococcus mutans</b>	4	31 %
<b>Staphylococcus aureus</b>	3	23 %
<b>Total</b>	13	100 %

Fuente: Investigación Propia.  
Elaborado por: Betzy J. Maza M.



**Gráfico N° 4: Microorganismos en cultivos en saliva.**



**Análisis e interpretación:** En el análisis de la saliva de las muestras obtenidas, se pudo comprobar, que los microorganismos que habitan en la saliva, son *Candida albicans* en el 31 % de las muestras, *Proteus vulgaris* en el 15 %, *Streptococcus mutans* 31 % y *Staphylococcus aureus* con el 23 %.

## CAPÍTULO V

### 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

#### 5.1. CONCLUSIONES.

- Las bacterias identificadas en la microbiótica bucal, fueron: *C. albicans* en el 31 % de las muestras de saliva, *P. vulgaris* en el 15 % de las muestra de saliva, *S. mutans* en el 31 % de la muestra de saliva y *S. aureus* con el 23 % en la muestra de saliva; mientras que en las muestras de la caries específicamente fueron: *C. albicans* (3 UFC), *G. adiacens* (3 UFC), *S. mutans* (10 UFC), *S. mitis* (7 UFC) y, *S. sanguis* (5 UFC).
- Se concluye que el *Streptococcus mutans* (25 %) y el *Streptococcus mitis* (18 %), son las bacterias con mayor actividad en boca, generando la caries dental.
- Los hisopados realizados en saliva y en caries específicamente, tomados y analizados in-vitro en el laboratorio, demostraron según la bibliografía consultada, que existe una estrecha relación entre la microbiótica bucal y las patologías, ya que se demostró la existencia de bacterias que generan la caries e inclusive endocarditis.

#### 5.2. RECOMENDACIONES.

- Que el profesional odontólogo, realice un análisis de laboratorio con cultivos sobre el tipo de bacterias, para definir de manera precisa el tratamiento y/o la medicación correcta y adecuada para las diferentes patologías.
- Conocer las causas y consecuencias que provocan el *Streptococcus mutans* y el *Streptococcus mitis* mediante la actividad bacteriana.
- Educar a la población sobre los riesgos reales de una excesiva actividad bacteriana con la consecuente formación de caries, para evitar a patologías como la endocarditis.

## BIBLIOGRAFÍA

BECKER M.R., PASTER B.J., LEYS E.J., MOESCHBERGER M.L., KENYON S.G., GALVIN J.L., BOCHES S.K., DEWHIRST F.E., GRIFFEN A.L. (2002) Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol*; 40: 1001-1009.

BRAMBILLA E., FELLONI A., GAGLIANI M., MALERBA A., GARCÍA-GODOY F., STROHMENGER L. (2003) Caries prevention during pregnancy: Results of a 30-month study. *J Am Dent Assoc.*; 129(7): 871-7.

CUENCA SALA E., MANAU NAVARRO C., SERRA MAJEM L. (2001). *Manual de odontología preventiva y comunitaria*. Barcelona: Ed. Masson.

D. MALE; J. BROSTOFF; D. BROTH; I. ROITT. (2007) *Inmunología*. España. Séptima edición. Editor Elsevier Mosby. 535 p.

ERCAN E., DULGERGIL C.T., YILDIRIM I., DALLI M. (2007) Prevention of maternal bacterial transmission on children's dental caries development; 4-year results of a pilot study in a rural child population. *Arch Oral Biol.*; 52(8): 748-52.

ERICKSON P. R., MAZHARI E. (1999) Investigation of the role of human breast milk in caries development. *Pediatric Dent*; 21(2):86-90

GROZDANOV L., RAASCH C., SCHULZE J., SONNENBORN U., GOTTSCHALK G., HACKER J., DOBRINDT U. (2004) Analysis of the genome structure of the non-pathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J. Bacteriol*; 186: 5432-5441.

HOLT J. G. (EDITOR) (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9th ed. Williams & Wilkins.

ISOKANGAS P., SÖDERLING E., PIENIHÄKKINEN K., ALANEN P. (2000) Occurrence of dental decay in children after maternal consumption of xylitol chewing gum: A follow-up from 0 to 5 years of age. *J Dent Res*; 79(11): 1885-9.

KÖHLER B, ANDRÉEN I, JONSSON B. (2002) The effects of caries preventive measures in mothers on dental caries and the oral presence of the bacteria *Streptococcus mutans* and lactobacilli in their children. *Search Oral Biol.* 1984; 29(11): 879-83.

LANGA S. (2006) Interacciones entre bacterias lácticas, células del epitelio intestinal y células del sistema inmunitario. Desarrollo de modelos in vitro. Tesis doctoral. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.

MUSHER D. M. (1996). *Haemophilus Species*. In: *Baron's Medical Microbiology* (Barron S. et al., eds.) edición. 4th ed. Univ of Texas Medical Branch.

PATRICK R. MURRAY (2006) *Microbiología Médica*. España, 5ta edición. Editor Elsevier Mosby. 963 p.

PATRICK R. MURRAY, KEN S. ROSENTHAL, MICHAEL A, PFALLER. (2009) *Microbiología Medica*, 6ta Edición. Elsevier España, S.L

PETER REITHE (1990). *Atlas de profilaxis de la caries y tratamiento conservado*. Ed. Salvat. Barcelona, España.

RAMOS-GOMEZ F. J., WEINTRAUB J.A., GANSKY S.A., HOOVER C.I., FEATHERSTONE J.D. (2002) Bacterial, behavioral and environmental factors associated with early childhood caries. *J Clin Pedi Dent*; 26(2):165-73.

SANZ Y., COLLADO M.C., DALMAU J. (2006) Contribución de la microbiota intestinal y del género *Bifidobacterium* a los mecanismos de defensa del huésped frente a patógenos gastrointestinales. *Acta Pediatr Esp*; 64: 74-8.

## ANEXOS

### FOTOGRAFÍAS DE LA INVESTIGACIÓN.

#### Fotografía N° 3: Materiales de la investigación.



Fuente: Investigación Propia.  
Elaborado por: Betzy J. Maza M.

#### Fotografía N° 4: Hisopado del paciente.



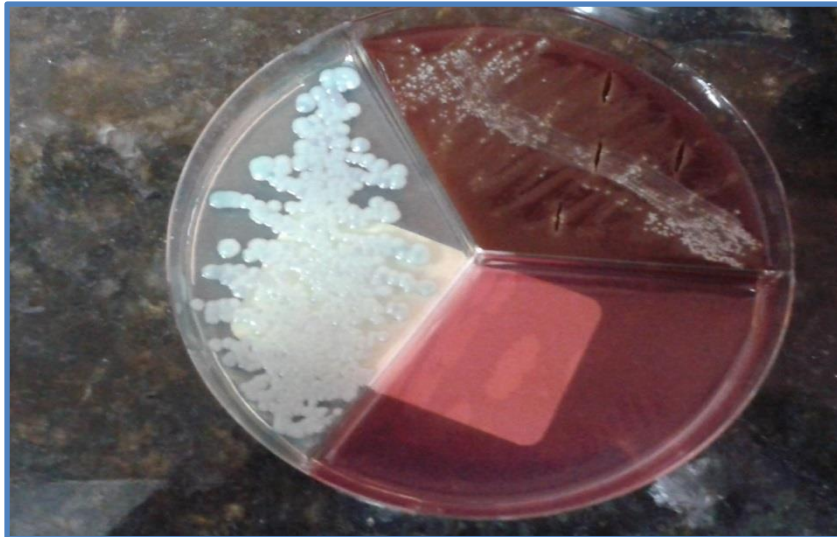
Fuente: Investigación Propia.  
Elaborado por: Betzy J. Maza M.

**Fotografía N° 5: Cultivo en estufa.**



Fuente: Investigación Propia.  
Elaborado por: Betzy J. Maza M.

**Fotografía N° 6: Agares con Unidad de Formación de Colonias.**



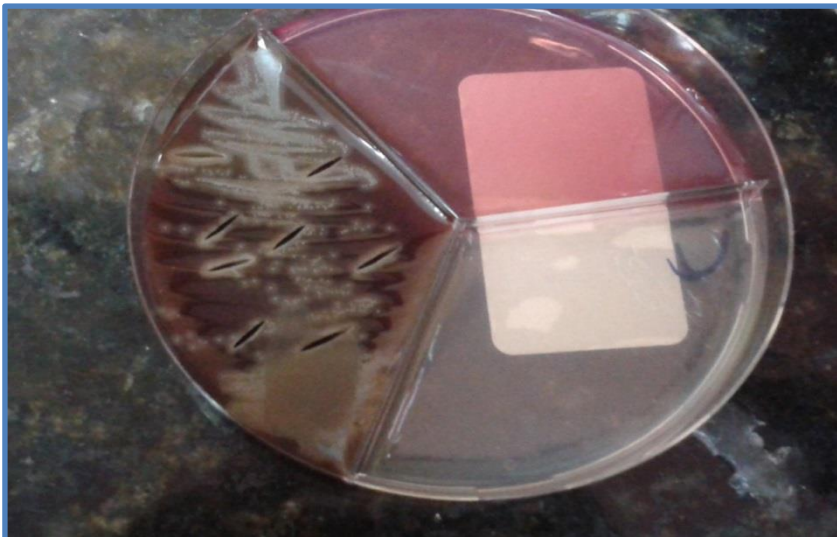
Fuente: Investigación Propia.  
Elaborado por: Betzy J. Maza M.

**Fotografía N° 7: Agares con Unidad de Formación de Colonias.**



Fuente: Investigación Propia.  
Elaborado por: Betzy J. Maza M.

**Fotografía N° 8: Agares con Unidad de Formación de Colonias.**



Fuente: Investigación Propia.  
Elaborado por: Betzy J. Maza M.

**Fotografía N° 9: Análisis de Unidad de Formación de Colonias bajo el microscopio.**



Fuente: Investigación Propia.  
Elaborado por: Betzy J. Maza M.



## CERTIFICADO DEL LABORATORIO.



Laboratorio Clínico de Especialidades

ESTUDIO IN VITRO DE LAS BACTERIAS DE MICROBIÓTICA BUCAL Y SU RELACIÓN CON LAS CARIES DENTAL, REALIZADO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE LA UNACH EN EL PERÍODO DICIEMBRE 2013-MAYO 2014

Nombre: Betzy Jaqueline Maza.

Resultados obtenidos

Se analizaron 10 muestras de caries dentales y se obtuvo los siguientes resultados:

Muestra de caries 1.- *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*.

Muestra de caries 2.- *Candida albicans*, *Streptococcus mitis*

Muestra de caries 3.- *Candida albicans*, *Granulicatella adiacens*

Muestra de caries 4.- *Granulicatella adiacens*

Muestra de caries 5.- *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*

Muestra de caries 6.- *Streptococcus mitis*

Muestra de caries 7.- *Streptococcus mutans*

Muestra de caries 8.- *Streptococcus mutans*

Muestra de caries 9.- *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*.


Muestra de caries 10.- *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*.

Las muestras fueron sembradas en los siguientes medios:

- TIOGLICOLATO
- Agar sangre de Cordero
- Agar MacConkey
- Agar CromoCándida

Para la identificación se utilizó el equipo vitek 2 compact.

  
Bq Jorge montero  
edu.razen@gmail.com

  
Dra. Carmen Narváez

LABORATORIO CLÍNICO  
**PAZMIÑO NARVÁEZ**  
Dra. Carmen Narváez  
JEFE DE LABORATORIO

**MATRIZ:** Av. Gran Colombia N14-65 y Hnos. Pazmiño esq. frente a la Maternidad Isidro Ayora • Telefax: (02) 2 569-911 / (02) 2 541-891 / (02) 2 500-775 - Quito - ATENCIÓN LAS 24 HORAS LOS 365 DÍAS DEL AÑO  
**SUCURSAL 1:** Edificio "SOLEMNI" Av. Eloy Alfaro N30-58 y Alemania - Quito  
**SUCURSAL 2:** Edificio "LIVENZA MEDICAL CENTER" Vozandes N39-34 y Juan Diguja, planta baja, Ofic. 106 • Telf.: (02) 3 319-089 - Quito  
**CUMBAYÁ:** Clínica La Primavera • Teléfono: (02) 3 550-992 / 3 550-993 ext. 115 • Fax: 3 551-051 - Quito  
**RIOBAMBA:** Pichincha 21-48 entre Guayaquil y 10 de Agosto • Telefax: (03) 2 964-120 • Telf.: (03) 2 965-491  
**WEB:** www.labpaznar.com **E-MAIL:** labpaznar@andinanet.net / clientes@labpaznar.com

