



UNIVERSIDAD DE CUENCA  
FACULTAD DE ODONTOLOGIA.

**“EFECTO ANTIMICROBIANO DEL PROPOLEO SOBRE EL STREPTOCOCO SANGUIS, STREPTOCOCO MITIS, STREPTOCOCO BETAHEMOLITICO A, Y PEPTOESTREPTOCOCO MICROS”.**

Tesis de investigación previa a la obtención del Título de Doctor en Odontología

**AUTORES:**

Juan Bernardo Solano Hermida.  
Liliana Abril.  
Grace Mejía.

**DIRECTORES DE TESIS:**

Dr. Fabricio Lafebre.  
Dra. Susana Calvo.

**CUENCA – ECUADOR  
2004**



La presente investigación es responsabilidad  
exclusiva del autor, Juan Bernardo  
Solano.

Las señoritas Liliana Abril y Grace  
Mejía

Son responsables de los cultivos,  
aislamiento, y pruebas de  
susceptibilidad de  
los de los microorganismos  
descritos en este  
trabajo.

Mis sinceros agradecimientos, al Doctor Fabricio Lafebre,  
Director de tesis, maestro y ejemplo.  
A la Doctora Susana Calvo, directora de tesis,  
maestra y amiga.  
Gracias a todos quienes  
intervinieron en la culminación de mi carrera.

A mi madre querida, luz  
constante que  
guía mi camino.  
A mi esposa e hija, la motivación  
en mi diario vivir.

Juan Bernardo.



## INDICE

<b>AUTORIA</b>	<b>i</b>
<b>AGRADECIMIENTO</b>	<b>ii</b>
<b>DEDICATORIA</b>	<b>iii</b>
<b>INDICE</b>	<b>iv</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>viii</b>
<b>CAPITULO 1.</b>	
<b>I. EL PROPOLEO</b>	
1. DEFINICIÓN	1
2. HISTORIA	1
3. EL PROPOLEO UN PRODUCTO NATURAL	5
4. PROCESAMIENTO Y PURIFICACIÓN	10
5. COMPOSICIÓN FÍSICO – QUÍMICA	12
6. PROPIEDADES DEL PROPOLEO.	16
7. EL PROPOLEO SUSTANCIA TERAPEUTICA.	21
8. USOS POR LA COLMENA.	24
9. RECOMENDACIONES PARA SU USO.	25
<b>II. EL PERIODONTO Y LA ENFERMEDAD PERIODONTAL</b>	
1. EL PERIODONTO.	27
2. CLASIFICACIÓN DE LAS ENFERMEDADES PERIODONTALES.	28
3. GINGIVITIS.	29
4. PERIODONTITIS.	36



5. CONTROL DE PLACA.	43
6. RELACIÓN ENFERMEDAD - RESPUESTA DEL PACIENTE	45
<b>III. LOS ESTREPTOCOCOS Y PRUEBAS DE SUCEPTIBILIDAD.</b>	
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES. DE LOS ESTREPTOCOCOS.	52
2. PRUEBAS DE SUCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA.	69
<b>CAPITULO 2</b>	
<b>I. METODOLOGIA.</b>	
1. OBJETIVO PRINCIPAL	73
2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.	73
3. VARIABLES.	73
4. MATERIALES Y MÉTODOS.	74
5. AISLAMIENTO.	77
6. PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA AISLAMIENTO DE ESTREPTOCOCO VIRIDANS.	84
7. DETERMINACIÓN DE S. VIRIDANS.	88
8. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LA BACITRACINA PARA ESTREPTOCOCOS DEL GRUPO A.	92
9. REACCIÓN DE BILIS ESCULINA PARA ESTREPTOCOCOS DEL GRUPO A.	94
10. IDENTIFICACIÓN DE ESTREPTOCOCOS ANAEROBIOS.	100
11. PRUEBA DE SUCEPTIBILIDAD	



CON PROPOLEO.	115
12. FLUJOGRAMAS DE TRABAJO.	119
CAPITULO 3.	
1. RESULTADOS.	126
CAPITULO 4.	
1. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.	132
ANEXOS.	
BIBLIOGRAFIA.	
RESUMEN DE CUADROS Y FIGURAS.	



## INTRODUCCIÓN

El propóleo es tan antiguo como la miel y es uno de los más sorprendentes productos de la colmena. Se le consideraba un remedio para los males de la piel, las llagas y las supuraciones. Tiene un uso terapéutico de más de 300 años A.C. donde muchas de sus propiedades ya eran reconocidas y aprovechadas, hasta encontrar su lugar en la farmacopea moderna con sobrados antecedentes sobre sus propiedades medicinales, su reconocimiento o no por parte de la medicina oficial, poco o nada tiene que ver con sus virtudes naturales.

Actualmente el propóleo en cualquiera de sus formas (sólo o combinado) posee propiedades eminentemente antibióticas, analgésicas, antioxidantes, bacteriostáticas, bactericidas, antivirales, fungicidas, fotoinhedoras, anestésicas, antiinflamatorias, regeneradoras o cicatrizantes, y su utilización en un organismo sano aumenta la inmunidad natural contra diversas enfermedades; así mismo actúa como agente terapéutico ante un sinnúmero de afecciones.

Estudios científicos de altísimo nivel donde las investigaciones no solo se realizan con la mayor seriedad, sino además libres de presiones, avalan la importancia del propóleo demostrada cientos de veces en el laboratorio gracias a las propiedades que posee, las bacterias han demostrado la misma sensibilidad al propóleo que a los principales antibióticos, pero con la marcada diferencia de no provocar efectos secundarios y con una eliminación absolutamente natural, sin alterar la flora intestinal ni el funcionamiento hepático. En los Estados Unidos de Norteamérica, los estudios e



investigaciones sobre el propóleo se han reflejado en una extensa bibliografía y publicaciones científicas sobre el tema.

Es por estas propiedades antibióticas del propóleo, vamos a analizar la actividad en bacterias como los estreptococos: *S.sanguis*; *S.mitis*; *S.pyogenes* y *Peptoestreptococo micros* (anaerobio) , bacterias sobre las cuales al interrumpir el ciclo de formación del biofilm dental, alteraríamos el desarrollo sobre el factor etiológico primario (placa madura) de las patologías de la encía, el resultado de este estudio esperamos detectar el porcentaje de propoleo, que es bactericida (es decir que destruye el crecimiento de estas bacterias). Las bacterias han sido seleccionadas de acuerdo su patogenicidad en infecciones periodontales, así como su importancia en el desarrollo de la placa madura, de modo que interfieran al inhibirlas con el desarrollo de la enfermedad.

La enfermedad periodontal es una de las afecciones más comunes en el sistema estomatognático, este tipo de patología tiene una etiología multifactorial, en el que las bacterias son el principal agente desencadenante. Siendo el factor necesario pero insuficiente (Page 2000). El desarrollo y la progresión de este tipo de patologías puede desencadenar graves consecuencias como: pérdida dental, necrosis de los tejidos peridontales, diseminación bacteriana, También esta asociado con enfermedades sistémicas como infarto al miocardio, bajo peso al nacer (Annals de Periodontología 1999). La utilización de fármacos ha sido una propuesta desde la década de los cincuenta, se utilizó desde antibióticos hasta compuestos con aceites esenciales , así como fenoles. Los mismos que por su uso causan efectos secundarios y adversos que no los hacen de uso rutinario. Todo esto hace

necesario la búsqueda de otros agentes terapéuticos que puedan contrarrestar este tipo de afecciones con un mínimo de efectos colaterales, reacciones adversas y costo bajo; para combatir este tipo de odontalgias de manera más eficaz en nuestro medio.

## CAPITULO 1

### MARCO TEORICO

#### I. EL PROPÓLEO

##### 1. DEFINICIÓN.

Es una sustancia resinosa de color pardo rojizo o amarillo verdoso, producida a partir de resinas vegetales recogidas por las abejas, de las yemas de los árboles y tratadas con ciertas secreciones de éstos insectos. Tiene sabor acre, frecuentemente amargo, y olor agradable y dulce, de forma que, cuando se quema, exhala una fragancia de resinas aromáticas.

Este polímero balsámico resinoso de las abejas contiene fundamentalmente, cera, aceites esenciales y es una sustancia muy compleja, tiende a oscurecerse, es soluble en alcohol y solventes tales como: éter, acetona, benceno, tricloroetileno y otros.<sup>1</sup>

##### 2. HISTORIA.

Existe evidencia de la presencia de las abejas en la tierra que data de hace más

---

<sup>1</sup> [www.apicultura.el/04producto/03propoleo/propoleo](http://www.apicultura.el/04producto/03propoleo/propoleo)



**Fig. 1. Propóleo procesado** 8





de 10.000.000 de años; dato que se determinó al analizar un pedazo de ámbar que está en el museo de Historia Natural de New York, en el que se encuentra atrapado un enjambre de abejas y por el cual se determinó esa edad.

El propóleo es conocido desde la antigüedad, en el antiguo Egipto los sacerdotes, quienes tenían a su cargo el estudio de la medicina, la química y el arte de embalsamamiento de los cadáveres; lo utilizaban para embalsamar a sus momias, también se encontró que era utilizado como laxante, y en ungüentos medicinales para quemaduras, úlceras o inflamaciones. En el Tanaj (Biblia), se le denomina Tzorì, y da referencia del propóleo como producto medicinal, y de ser un producto importante del comercio entre los reinos de Judá e Israel. Los griegos a quienes debemos su denominación de “propolis” que significa delante de la ciudad puesto que se encontraba recubriendo las colmenas. Aristóteles escribe sobre éste en su -Historia de animales-, y lo toma como “remedio para las infecciones de la piel llagas y supuraciones”. Galeno y Avicena también experimentaron con esta sustancia, este último en el siglo XI dice: “tiene la cualidad de eliminar las puntas de flecha, limpia fácilmente y ablanda fuertemente”.<sup>2</sup>

Ya en América Latina los incas lo utilizaban para combatir infecciones febriles, los franceses lo utilizaron en entre los siglos XIV y XVIII para curar llagas. Aunque su máximo empleo fue en la guerra de los Boers en el Sur de África, en los años 1899 - 1902, en el cual era utilizado por los soldados de las trincheras para curar sus heridas infectadas (“Propóleo Vasógeno” ungüento de propóleo mezclado con vaselina e impregnado en las vendas), y como cicatrizante.

---

<sup>2</sup> [www.ecoaldeas.com/apicultura/propolis.htm](http://www.ecoaldeas.com/apicultura/propolis.htm)



También fue utilizado en la Gran Guerra Patria en la Unión Soviética 1941 – 1945 (Segunda Guerra Mundial). Su uso decreció con el descubrimiento de los antibióticos y principalmente de la penicilina.

Su composición química y las sustancias que actúan en él, fueron un enigma, puesto que entre los años 1908 y 1947, la referencia de las investigaciones de su composición aún no podían determinar cómo y qué sustancias actuaban en él; sólo hasta el descubrimiento del ácido cinnámico y el alcohol cinnamínico en el año 1967, y a partir de éste se lograron descubrir numerosas sustancias orgánicas e inorgánicas, y que de éstas las más importantes pertenecen al grupo de los flavonoides, en un número mayor a 50.

**Cuadro No.1 COMPOSICION DEL PROPOLEO COMO SE DETERMINO ENTRE LOS AÑOS 1908 Y 1947. (Tomado de "Propóleo y demás productos de la colmena")**

Referencia	Años	Resinas Y Ceras	Aceites	Volátiles En Alcohol	Solubles	Insolubles
Helfenberg	1908	80.3		0	6.7	12.9
Bohrisch	1908	27.9		6.9		12.9
Dietrich	1908	64.6		6	12.9	6.5
Dietrich	1911	78.6	3 a 8		6	13.4
Heiduschka	1913	70.7	5	4.2		5.3
Caillas	1923	70				
Jungkungs	1932	68.9	4	0.5		4.3
Nicolás	1947	50				

Ya en la actualidad se ha retomado la investigación científica de esta sustancia en diferentes áreas, y varios de estos trabajos científicos reportan datos satisfactorios, y se habla de innumerables características como: antimicrobiana, antiséptica, antifúngica, antiinflamatoria, aumento en el desarrollo inmunológico, acción anestésica y cicatrizante etc.

### **La inmunidad de las abejas**

En la segunda mitad de la década del '60, el investigador francés Rémy Chauvin emprendió una serie de experiencias sobre los virus y bacterias que afectan a los insectos, constatando que las abejas (sus trabajos se centraron principalmente en algunas variedades de *Apis mellifera*), se encuentran libres de ciertos microorganismos nocivos que afectan severamente a otros insectos. Estas experiencias se repitieron bajo rigurosas condiciones de laboratorio, llegándose a la conclusión de que, de alguna forma, las abejas debían incorporar a su -metabolismo algún producto que las transformaba en seres prácticamente inmunes al ataque de virus y bacterias.

Motivado por la posibilidad de descubrir algún nuevo producto capaz de reemplazar con ventaja a la penicilina y las sulfas, Chauvin continuó sus experimentos, deduciendo finalmente de ellos que las abejas secretan ciertas sustancias antibióticas que les proporcionan una increíble resistencia a cualquier virus y bacteria, y que esos antibióticos se encuentran presentes precisamente en el propóleo. Ese fue el principio de una larga serie de experiencias llevadas a cabo por muchos investigadores de todo el mundo, dando así lugar a un redescubrimiento



**Fig. 2 Apis Mellifera**



de un producto que había sido desafortunada e injustamente olvidado durante mucho tiempo. <sup>3</sup>

### 3. EL PROPÓLEO. UN PRODUCTO NATURAL:

#### 3.1. ORIGEN

*Existen dos teorías sobre la procedencia del própolis elaborado por las abejas.*

**Primera teoría:** El própolis es recolectado por las abejas por más de 15 días que, con sus mandíbulas, toman las partículas resinosas que hay sobre las yemas de diferentes plantas como el álamo, sauce, abedul, aliso, castaño silvestre, pino, enebro y algunas plantas herbáceas, especialmente coníferas. Después de sujetar la partícula resinosa, la abeja mueve hacia atrás la cabeza hasta que logra desprenderla, almacenándola con sus patas en los cestitos del polen. Los enzimas de su boca participan también en la operación para evitar su adherencia. Cuando llega a la colmena con la carga, otras obreras le ayudan a descargar el própolis, misión que llega a durar varias horas. Si el material no es bastante maleable, la abeja recolectora se instala en la piquera, donde espera a que el calor del sol ablande la carga y pueda desprenderse mejor de ella. Los vuelos que realiza la abeja desde la colmena a la planta portadora de resina duran de 15 a 20 minutos, y la época de máxima recolección tiene lugar a final de verano. <sup>4</sup>

**Segunda teoría:** Se trata de un producto resultante de la digestión del polen y que se efectúa en un pequeño órgano que la abeja posee entre el buche y el

---

<sup>3</sup> GONZALES, Angel. Pág. 432-433.

<sup>4</sup> [www.tiatrini.com.mx/propoleo.htm](http://www.tiatrini.com.mx/propoleo.htm)



intestino medio. Aunque los avances en el estudio de la estructura interna de las abejas, desechó esta teoría.<sup>5</sup>

### 3.2. RECOLECCIÓN DEL PROPÓLEO POR LA ABEJA

El mecanismo de recolección del propóleo y de su descarga dentro de la colmena, muestra una vez más la organización y disciplina en la colmena. El proceso comienza en el momento en el que la abeja encuentra el propóleo en el brote y lo desprende valiéndose de sus mandíbulas y sus patas." En tiempo de frío la resina se encuentra más dura y la recolección se vuelve más difícil para la abeja, aquí es cuando la abeja utiliza sus glándulas mandibulares (ácido 10-hidroxi-2-decenoico) para lograr el ablandamiento del mismo.

La abeja tritura con sus mandíbulas la porción extraída y utilizando una de las patas del segundo par, la transfiere a la cestilla de la pata posterior del mismo lado. Esta actividad la realiza tantas veces como sea necesario para llenar la cestilla y lo puede hacer tanto en pleno vuelo como posada.<sup>6</sup>

Una vez completada la carga de una cestilla, continúa con la otra pata. Esta labor de recolección, le toma a la abeja entre 15 minutos, a una hora según la temperatura del ambiente. Una vez terminada la recolección, la abeja se encamina a la colmena y ahí espera a que se le asigne el lugar indicado para aplicarlo, las abejas recolectoras de propóleo (propolizadoras) nunca depositan sus propias cargas y cuando quedan libres de cargas, regresan inmediatamente a buscar más. En las regiones templadas estas abejas trabajan de 10:00 am a 4:00 pm aproximadamente, cuando hay mucho calor

---

<sup>5</sup>[www.tiatrini.com.mx/propoleo.htm](http://www.tiatrini.com.mx/propoleo.htm)

<sup>6</sup>[www.apicultura.el/04producto/03propoleo/propoleo](http://www.apicultura.el/04producto/03propoleo/propoleo)

comienzan más temprano y trabajan hasta muy tarde, en el otoño intensifican su labor aún más.

Una colmena media puede producir entre 150 y 300 gramos por año, aunque las cifras varíen según las condiciones del clima entre 30 y 450 gramos.

### 3.3. OBTENCIÓN DEL PROPÓLEO EN EL APIARIO:

Hay que considerar que la cantidad de própolis que produce una colmena dependerá de la raza de abeja, así como de su ubicación. Se ha observado que las colmenas situadas en bosques o al lado de ríos donde hay chopos (especie de álamo) contienen más própolis que las situadas en zonas llanas. La cantidad media que se puede producir por colmena y año oscila entre los 150 y los 300 gramos. Las abejas propolizan durante todo el año, pero a final de verano y otoño son las de mayor cuantía. El apicultor deberá recolectar el própolis pasado el invierno. La recogida se efectúa mediante una espátula, desprendiendo el própolis de aquellas zonas donde se encuentra adherido: ángulos, marcos, piezas metálicas, piqueras. No se recomienda la utilización de cuchillos ya que pueden desprenderse astillas de madera.<sup>7</sup>



**Fig. 3 recolección en la rejilla del apiario.**



**Fig. 4 Extracción del propóleo bruto.**

<sup>7</sup> [www.tiatrini.com.mx/propoleo.htm](http://www.tiatrini.com.mx/propoleo.htm)



Otra forma de obtención, consiste en colocar sobre los cuadros de la colmena una parrilla de plástico o una lámina metálica perforada, que rápidamente será propolizada por las abejas, siendo el propolis obtenido fácilmente por raspado. Para facilitar su recolección, se introduce la parrilla en el congelador hasta que quede rígido y así se desprenderá mucho mejor.<sup>8</sup> El propolis recogido se introduce en agua hirviendo de manera que separe la cera, las astillas y abejas muertas. El propolis obtenido tendrá una consistencia parecida al chicle y con un buen aroma. No deberá tener más de dos años de envejecimiento. El propolis de primera clase, que alcanza su máxima cotización en el mercado, ofrece el aspecto de un material seco, granuloso y laxo, con textura finamente laminar y color variable oscuro. El propolis debe conservarse en recipientes de vidrio al abrigo de la luz y el aire. No deben utilizarse bolsas de plástico para su conservación. El valor económico del propolis es elevado. Además de su utilización en medicina como grageas y jarabes, sirve para la fabricación de lacas finas para muebles e instrumentos musicales de cuerda. La resistencia de la laca de propolis es tan grande que la superficie de madera lacada resiste incluso el contacto con el agua hirviendo. El recoger el propolis no significa para el apicultor ningún bajo rendimiento en la miel, la cera, la jalea real o el polen. El propolis debe considerarse como un producto más de la colmena para obtener un nuevo ingreso.<sup>9</sup>

El propóleo se recoge de la colmena mediante unas rejillas de plástico semi-rígido que se colocan entre la última alza y el techo o la entretapa, donde las abejas intentan propolizar los huecos que la forman. Hay una técnica colectora de propóleos inteligente llamada Pirassununga, desarrollada en Brasil,

---

<sup>8</sup> [www.ecoaldeacommm/apicultura/propolis.htm](http://www.ecoaldeacommm/apicultura/propolis.htm)

<sup>9</sup> [www.ecoaldeacommm/apicultura/propolis.htm](http://www.ecoaldeacommm/apicultura/propolis.htm)



consistente en estimular la producción a través de unas aberturas laterales en las paredes de la colmena, llegando a aumentar su productividad hasta 600 g por mes.<sup>10</sup>

### 3.4 CONSERVACIÓN:

La conservación del propóleo esta regido a ciertas medidas que impiden que sus características físicas y químicas se alteren, estas son:

1. El propóleo nunca debe exponerse al calor externo puesto que éste inhibe compuestos químicos, por lo tanto al realizarse la extracción del propóleo de la colmena, debe ser antes de hacer algún tratamiento que implique calor extremo (como la utilización de un extractor solar).
2. Para evitar su contaminación, la extracción debe hacerse antes de cualquier fumigación o aplicación de una sustancia química toxica, (como el ácido acético u otro).
3. El propóleo no debe ser prensado ni comprimido en forma de tabletas o esferas o cualquier otra forma para ser consumido mientras tenga una consistencia fresca y pegajosa, es decir sin ser procesada adecuadamente.
4. Según el “ Journal Suisse d’ Apicultura” en su artículo “ La Propolis et sa récolte par l’ apiculture” el investigador Jeanne recomienda mantener

---

<sup>10</sup> [www.todomiell.com](http://www.todomiell.com)





una solución de propóleo de alcohol etílico a 75% en una proporción de 20cc por gramo de propóleo. Este frasco deberá ser agitado diariamente por tres horas durante una semana. En caso de que existan partes insolubles se acelera la disolución con un alcohol caliente, dejando el envase abierto para que el alcohol se volatilice.

5. Inmediatamente después de la extracción el propóleo debe ser envuelto en papel aluminio o en papel de polietileno y almacenarse en frascos de cristal de color caramelo o cajas de cartón herméticamente selladas.
  
6. El propóleo almacenado de esta forma, debe colocarse en un lugar fresco y libre de luz, especialmente luz solar hasta su procesamiento.

#### **4. PROCESAMIENTO Y PURIFICACIÓN**

Este método consiste en un proceso físico – químico de purificación de un producto bruto, por el cual podemos obtener propóleo en polvo liofilizado, libre de materias extrañas y en el cual estarán presentes todos los principios activos del propóleo bruto, lo que permitiría su aplicación en la medicina humana, animal, la cosmetología y en la industria de conservas. <sup>11</sup>

##### **4.1 METODO DE OBTENCIÓN DE PROPÓLEO PURIFICADO:**

Son conocidos diferentes métodos para la extracción de soluciones de Propóleos como es la patente soviética # 884703 que consiste en:

- Enfriamiento del producto bruto, desmenuzamiento, dilución en glicerina alcohol de 40 a 45°C durante 4 horas.

---

<sup>11</sup> [www.cipo.com.ar/especialidades/propoleo.htm](http://www.cipo.com.ar/especialidades/propoleo.htm)



- Enfriado a  $-8^{\circ}\text{C}$  durante 5 a 6 horas, agregando agua, filtrando al vacío, rediluyendo posteriormente el residuo en el filtro en aceite de visón 1:2 de  $0^{\circ}\text{C}$  a  $85^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas.
- Filtrando y obteniendo dos fases diferentes: alcohólica y oleosa.

Como deficiencia de este método podemos señalar que no se efectúa clasificación ni uniformación de los propóleos, por lo que, el producto obtenido carecerá de homogeneidad, las fracciones obtenidas no son miscibles entre si, al mantener presente la cera durante el proceso extractivo, esta retendrá parte de los principios activos de los propóleos y fracciones de la cera con acciones no deseadas que puedan pasar al producto final por ser solubles en alcohol, al utilizar temperaturas superiores a los  $70^{\circ}\text{C}$  pueden inactivarse algunos de los principios activos. Está reportada también la patente inglesa # 0109993 A y 61 K 7/48, que consiste en la dilución del propóleo en uno o más solventes orgánicos a  $0^{\circ}\text{C}$  después de 10 días, filtrado a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas, con posterior eliminación del solvente para obtener polvo o extracto seco de propóleos.

Como deficiencia podemos destacar además de las señaladas para el método reseñado anteriormente, el requerir un lapso de tiempo muy largo lo que estará en detrimento de su aplicación industrial.

La esencia de la invención consiste en un método que consta de los siguientes pasos:

- Análisis de la materia prima a emplear (propóleo bruto) según pruebas establecidas por la norma de control de calidad internacional RST 317-77 de la RFSS. \*

---

\* RFSS: Patente Rusa para el control de fármacos.



- Uniformación de los parámetros medibles por la misma haciendo combinaciones en peso de propóleos de distintas características.
- Enfriamiento a 0 °C de 300 a 500g de los mismos, desmenuzamiento, separación de la cera con 500 a 2500 ml de agua de 45 a 65°C entre 10 y 60 minutos.
- Posterior enfriamiento entre 2 y 15°C de 10 a 60 minutos; agregado de 50 a 450 ml de Propilenglicol, aplicando calor de 40° a 70°C de 1 a 6 horas.
- Filtrar obteniéndose la fase acuosa.
- Repitiendo el proceso hasta la extracción total de los principios hidrosolubles, lo que se determinara por el análisis de la concentración de las soluciones obtenidas.
- Disolver el residuo en el filtro en alcohol etílico 90° temperado a 60 - 70°C por 3 horas, filtrar obteniéndose la fase alcohólica.
- Repitiendo el proceso hasta la extracción total de principios activos alcohólicos solubles, lo que se determinara por el análisis de las concentraciones de las soluciones obtenidas.
- Uniendo ambas fases proporcionalmente obtendremos la solución hidro alcohólica.
- Eliminando el solvente de la solución total o de las Fases independientemente por: Liofilización, Incubación o evaporación al vacío, se obtendrá: polvo de principios activos totales de los propóleos, principios hidrosolubles o alcohólicos solubles que puedan ser



medibles para garantizar la dosificación de sus posteriores diluciones en cualquier solvente que sea necesario emplear.<sup>12</sup>

## 5. COMPOSICIÓN FÍSICO QUÍMICA

El propóleo no se presenta como un material resinoso fácil de disolver, sino más bien de difícil fraccionamiento - extracción. Por esta razón, en la mayoría de los análisis y pruebas para determinar sus elementos básicos constitutivos se usan disolventes orgánicos puros o conjugados: como alcohol de 70°, éter, cloroforno y otros. Pero la más eficaz y común hasta el momento es la del método del alcohol de 70°, que logra separar la llamada resina fraccionada, y la porción de cera insoluble en alcohol; según Ghisalberti “El bálsamo de propóleo referente a la resina fraccionada puede extraerse con el 70% de alcohol.”.

Debemos tener en cuenta lo mencionado anteriormente, y es que el propóleo no es una sustancia de estructura química invariable, por el contrario su composición química y características físicas, además de sus bondades medicinales dependerán de ciertas variables como: estación del año, condiciones ambientales, materia prima vegetal o propóleo vegetal disponible, tipo o variedad de abeja y necesidades de la colmena. Aunque se puede decir que aparecen una serie de sustancias en forma regular y constante que son:

Resinas y Bálsamos	50 – 55 %
Cera	25 – 35 %
Aceites Volátiles	10 %

<sup>12</sup> [www.avizora.com/publicaciones/ciencia.htm](http://www.avizora.com/publicaciones/ciencia.htm)



Polen	5%
Sustancias Orgánicas y Minerales	5%

**Cuadro 2. Composición general del propóleo.**

Actualmente se conoce la estructura química de algunos de los componentes del propóleo, se han identificado aproximadamente 19 sustancias de estructura química distinta.<sup>13</sup> Los principales principios activos identificados hasta ahora son:

- Flavonoides, dentro de ellos:
  - ✓ Flavonas: Ramnocitrina, kaempferol, crisina, galangina (3, 5, 7 trihidroxiflavona), isalpinina, tectocrisina, acacetina, apigenina, pectolinarigenina; 5, 7-dioxi- 3, 4 dimetoxiflavona; 3, 5-dioxi- 7, 4- dimetoxiflavona y 5-oxi- 7, 4- dimetoxiflavona.
  - ✓ Flavonoles: Kaempferido, quercetina, butelenol, rhamnacina, isorhamnetina, ermanina.
  - ✓ Flavononas: Pinoembrina, pinostrobina, sakuranetina, 5-oxi- 7, 4- dimetoxiflavonona.
- Terpeno del grupo del cariofileno: beta-bisabolol y alfa acetoxibutelenól.
- Aldehídos aromáticos: vanillina, isovanillina.

<sup>13</sup> [www.paginamedica.com/balcónalternativo](http://www.paginamedica.com/balcónalternativo).



- Ácidos aromáticos no saturados: ácidos cinámico y derivados (ácido cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico (4-oxi-3-metoxicinámico) y ácido isoferúlico).
- Ácidos orgánicos: ácido benzoico y derivados ( ac. Hydroxi-4-benzoico, ac. Metoxi-4-benzoico, ac. Protocatéquico y ac. Gálico).
- Sustancias tánicas.
- Cumarinas: ácido cumarínico, esculetolo, scopoletolo.
- Vitaminas: vitamina B1 (tiamina), Vitamina PP (ácido nicotínico), provitamina A.
- Microelementos: Calcio, potasio, sodio, magnesio, hierro, aluminio, fósforo, silicio, vanadio, estroncio. Algunos científicos han señalado además: Boro, Cromo, cobalto, manganeso níquel, selenio, zinc, molibdeno, plata, bario.

El propóleo tiene 14 ácidos carbónicos, entre los cuales son importantes los ácidos grasos poliinsaturados y el ácido linólico por su papel en la prevención de la arterioesclerosis, en la disminución en los riesgos de trombosis y en la elevación de las capacidades defensivas del organismo.

No contiene albúminas, ácidos nucleicos, lípidos ni hormonas.

La defensa antimicrobiana de las plantas es el principio general que explica la naturaleza antimicrobiana del propóleo.

Como ya se describió en párrafos anteriores, luego del descubrimiento del ácido cinnámico y alcohol cinnamínico, por M Küstenmacher, usados como disolvente para investigación del propóleo se logró identificar numerosas



sustancias orgánicas e inorgánicas, y las de mayor enfoque o importancia son los que pertenecen al tipo de flavonoides que aparentemente se presentan en un número mayor a 50, y a los cuáles se les atribuye su acción medicamentosa. Investigaciones posteriores, sumaron otras sustancias además de las ya analizadas e identificadas; las más importantes de estas sustancias son:

Sustancias Tánicas analizadas por; A. I. Tikhonov, y S. V. Yavtuchenko, Ácido mirístico por W. Heinen y H. F. Linsken, Ácido ferúlico por Cizmarik y Mattel, Vainillina por Dietrich, Isovainillina, Acacetina, Kaempferida, Rhamnocitrina, Pectolinargerina, Pinostrobin, Sakuranetina, Ácidos P-oxibenzoico, P-metoxibenzoico, y P-cumarínico por Popravco, Tectochrisina, Galangina, Isalpinina, y Pinocembrina, por Villanueva, Ácido Benzoico por James y Bumba, Isosakuranetina, Kersetina-éter, Pinobankisina, 3-acetilpinobankisina, Pterostilbina, Xanthorroel, Alcohol bencilo, Ácido ascórbico y Eugenol por Ghisalberti. A este tipo de sustancias, los flavonoides se les atribuye, que ejercen funciones sobre los capilares sanguíneos, aumentan la acción de la vitamina C, y disminuyen la inflamación interna y externa, entre otras.

## 6. PROPIEDADES DEL PROPÓLEO:

Las propiedades antisépticas y cicatrizantes del propóleo son conocidas desde hace tiempo. Durante la guerra de Boers, fue utilizado en mezcla con vaselina.

Entre otras propiedades medicinales del propóleo, existe su poder antiinflamatorio y anestésico, así como su actividad bacteriostática y bactericida, éstas dos últimas debidas a una hidroxiflavona, la galangina.



Además tenemos:

- Antifúngico, antiparasitario y antiprotozoos.
- Analgésico y anestésico.
- Cicatrizante.
- Estimulante de la inmunidad. Por vía oral, el propóleo fortifica los sistemas corporales haciendo que el organismo tenga mayor resistencia a las agresiones corporales del medio ambiente, al mismo tiempo ejerce funciones reguladoras, antimicrobianas, inmunoestimulantes, citostáticas, analgésicas, hipotensorias, tonificantes, antiinflamatorias y de regeneración capilar.<sup>14</sup>
- Antitumoral, antioxidante.
- Antidepresivo, ya que su potente antioxidante, el propol, aumenta la capacidad de las células para neutralizar el estrés oxidativo y prevenir la apoptosis, éste compuesto contribuiría en forma significativa a los efectos antiinflamatorios del propóleo.
- Antiinflamatorias y antirreumáticas, los flavonoides del propóleo desarrollan una acción directa sobre los capilares sanguíneos, potencian la acción del ácido ascórbico y disminuyen la inflamación.
- Protector de la circulación, permeabilidad y fragilidad capilar.
- Antitrombótico.
- Protector de la mucosa gástrica en: Colitis aguda y crónica, gastritis y úlceras gastroduodenales, diarreas, disquinesias hepato-biliares.

---

<sup>14</sup> [www.tiatrini.com.mx/propoleo.htm](http://www.tiatrini.com.mx/propoleo.htm)





- Estimulante de la osteogénesis.
- Regulador y estimulante tiroideo en: Bocio difuso, bocio nodal, bocio mitótico y bocio congénito, obesidad asociada a hipotiroidismo.<sup>15</sup>

## 6.1 ACCIÓN TERAPÉUTICA

En la actualidad se han reportado varios trabajos sobre la acción farmacológica del propóleo, en sus diferentes aplicaciones en la ciencia medica, como son: antioxidante, antimicrobiana, bacteriostática y bactericida, antivirales, fungicida y fitoinhedoras, regeneradora y cicatrizantes, anestésicas, antiinflamatorias, y de aislamiento neurológica. Describiremos cada una de ellas.

### 6.1.1 ANTIOXIDANTES

Utilizando solventes de polaridad progresiva, los investigadores Ushkalova y Murikhnich, han realizado un estudio comparativo de las propiedades antioxidantes del propóleo y sus extractos, a partir de propóleo libre de ceras de la región de Kasan, ex Unión Soviética. De igual manera, Yanishleva y Marinova han determinado componentes del propóleo con propiedades antioxidantes, por medio de estudios cromatográficos.

### 6.1.2 ANTIMICROBIANAS, BACTERIOSTÁTICAS Y BACTERICIDAS.

---

<sup>15</sup> [www.enlared.es/abelleiro/abejas/propoleo](http://www.enlared.es/abelleiro/abejas/propoleo)



Muchos sostienen que la actividad antibacteriana del propóleo, están dadas por los ácidos benzoicos, metoxibenzoicos, y oxibenzoico, cafeico, y esterres del tipo cafeico. Para el científico cubano Moisés Asís, “..el secreto de uso de propóleos en la medicina humana, y veterinaria, en la protección de injertos y colmenas, y en la preparación de productos farmacéuticos, radican en sus propiedades antimicrobianas, bacteriostáticas y bactericidas, proporcionadas por los ácidos oxi, y metoxibenzoicos, cafeico, y ferúlico; los sesquiterpenos (particularmente el bisabolol) y las flavononas (principalmente la galangina)”.<sup>16</sup>

Se ha demostrado actividad de los propóleos, sobre la mayoría de los estafilococos, estreptococos y salmonelas, y específicamente sobre el *Proteus vulgaris*, y *Escherichia coli* o colibacilo, además de *Streptococo aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Helmintosporum*, *Estafilococo aureus*, *Bacillus antracis*, *Erisipelotrix rhusiopathiae*, *Bacillus shigae*, *B. pycianus* *B. pluton*, *B. subtilis*, *B. mycoides*, *Streptococo haemoliticus*, *Estafilococo epidermidis*, *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *Shigella*,, *Proteus mirabilis* y *Serratia marcescens*. Y poco activo sobre *Escherichia coli*, *Streptococo apis*, y *Bacillus larvae*, esto muy discutible según algunos investigadores.

Una de las primeras investigaciones de las que se tiene referencia, son las efectuadas por Kavalkina, quien demostró la acción bacteriostática del propóleo sobre el *Estafilococo aureus*, *Bacilo tifoideo*, y *Trichophyton rubrum*. Posteriormente P. Lavie del instituto Pasteur, descubrió que el propóleo tiene acción bacteriostática, sobre el *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris* y *B. alveii*,

---

<sup>16</sup> SINTES PROS Jorge. Virtudes Curativas de la Miel y polen. Pág 55, y 56.



con un efecto menos marcado sobre la *Salmonella gallinarum*, *S. pullorum* y *S. dublín*, y casi nula ante varios tipos de *Escherichia coli*.

La actividad del propóleo es mayor en los grampositivos que en los gramnegativos por lo tanto la dosificación en las gramnegativas debe ser mayor, el propóleo ha demostrado que en bacterias tanto gramnegativas como grampositivas, tiene una mayor acción que otros antibióticos como: Cloramfenicol, Eritromicina, Estreptomina, Penicilina, Tetraciclina, Kanamicina, Ampicilina y los antisépticos como el cetavión al 1%, tintura de timerosal a 0.1%, cloruro de benzalconio a 1:1000 e Hibitane a 1:1000. En estudios in Vitro.

Informes de tratamientos de enfermedades de la piel, por algunas cepas de Estafilococos, resistentes a los antibióticos; en tratamientos de vaginitis y cervicitis, y alteraciones de la microflora provocada por la cirugía de oídos; en experiencia realizadas utilizando un extracto acuoso del propóleo al 50%, como tratamiento de otitis supurante crónica, e infecciones del tracto respiratorio, también avalan su utilización como antibiótico.

La solución propóleo debe tener un ph de 2 – 3, para lograr una máxima acción antimicrobiana, ahora se aconseja utilizar propóleo de la variedad de abejas, *Apis mellífera*, puesto que tiene un mayor efecto inhibitor, que el producido por otras variedades como las abejas trigonas o meliponas.



Todavía en el momento no se establece la farmacocinética ni la farmacodinamia del propóleo; es decir la forma de acción del propóleo como metabolito dentro del organismo, se cree que tiene la capacidad de un agente no específico que estimula la inmunogénesis. E.L. Ghisalberti, del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Western, Australia ha realizado investigaciones sobre la identificación de los componentes del propóleo y su utilización con un fin terapéutico, llegando a la conclusión, de que el propóleo tiene propiedades bacteriostáticas y bactericidas, aumento de la resistencia orgánica, ante las diferentes agresiones del medio.

### **6.1.3 ANTIVIRALES**

Una de las actividades más importantes y más cuidadosamente investigada es la antiviral del propóleo, los investigadores coinciden en que dicha acción, radica en los compuestos flavonoides, sobre todo con las flavonas glucosiladas, que pueden usarse para reforzar y flexibilizar los vasos capilares y arterias escleróticas, y en la curación de enfermedades ulcerosas e inflamaciones.

Una de las pruebas más reconocidas es la acción del propóleo sobre el virus del mosaico del tabaco, gracias a los compuestos flavonoides de este, principalmente el que se sintetiza de el abedul y el álamo, puesto que tiene la particularidad de detener el desarrollo de formas patógenas de los microorganismos.

### **6.1.4 REGENERADORAS O CICATRIZANTES.**



El propóleo tiene la capacidad de acelerar la epitelización, estimulación de la división celular; que se relaciona directamente con sus compuestos flavonoides.

## 7. LOS PROPÓLEOS, SUSTANCIA TERAPÉUTICA:

Los propóleos o cola de abeja, es una sustancia resinosa, pardo verdosa. Hasta hace poco se estableció a partir de qué sustancias las abejas sintetizan el propóleo, se creía en otro tiempo que las abejas los recogían de los vástagos de los sauces, olmos, pinos, abetos, castaños de Indias, etc. Las investigaciones de estos últimos años demuestran de una manera segura que las abejas los preparan a partir del polen.<sup>17</sup>

En la Unión Soviética, durante la última Guerra Mundial, los propóleos fueron experimentados en 2 hospitales. El tratamiento de los heridos con una pomada de propóleo dio buenos resultados; pero terminadas las hostilidades, se abandonó el empleo de ésta pomada.

- Se han hecho ensayos de este producto en **veterinaria**. Se ha tratado con éxito la gangrena seca o necrosis de los animales de la granja con una pomada a base de aceite de vaselina, de girasol, y de beleño negro. Es probable que la pomada de propóleos pertenezca a las sustancias poco irritantes y que favorece a la nutrición normal de los tejidos.
- Se han realizado también ensayos sobre las propiedades **anestésicas** locales de los propóleos. Las experiencias han demostrado que una solución al 0.25 % de propóleo era más activa que una solución de cocaína o de novocaína, y que estas propiedades son debidas a aceites volátiles

---

<sup>17</sup> SINTES PROS Jorge. Virtudes Curativas de la Miel y polen. Pág 42, 43, 44, y 45.



contenidos en los propóleos; es así que una solución al 0.25 % de éstos aceites volátiles determina una anestesia total durante 12 ½ minutos. Tras destilación de éstos aceites, los propóleos pierden sus propiedades anestésicas.

- En **Odontología** se utiliza para el tratamiento de caries, abscesos bucales, aftas, estomatitis, enfermedades periodontales, glositis (inflamación de la lengua), en dolores después de extracciones dentales.
- Se han hecho investigaciones sobre las propiedades **antiprurito** de los propóleos, sin embargo se ha indicado que éste efecto sólo sería temporal.
- El uso de los propóleos en **inhalación** da excelentes resultados en las afecciones de las vías respiratorias superiores y de los pulmones (bronquitis, tuberculosis). Este modo de tratamiento es simple y puede ser fácilmente realizado en casa. Basta hacer fundir juntos al baño maría 60 gramos de propóleos de la mejor calidad y 40 gramos de cera {en un recipiente de aluminio, con capacidad para 3 a 4 decilitros que se coloca en otro más grande lleno de agua hirviendo). Las inhalaciones se harán mañana y tarde, 10 minutos durante un periodo de dos meses. La acción curativa sería debida a los bactericidas contenidos en los propóleos.
- Por otra parte .ha sido establecido que una solución alcohólica de propóleos al 10% poseía propiedades **antigripe**. Las experiencias hechas *in vitro* autorizan a recomendar la verificación clínica de las propiedades médico-profilácticas del extracto de propóleos contra la gripe viral y contra otras infecciones de virus y tumores malignos.
- Se ha experimentado también (sobre cobayos) las propiedades que poseen el extracto alcohólico y la pomada de propóleos, de acelerar la



**cicatrización de las quemaduras.** Según los experimentadores, la acción protectora y regeneradora sobre los tejidos conjuntivos pertenece al grupo de los flavonoides entre los cuales figura la galagina, sustancia activa de los propóleos.

- Se ha comprobado también en centros experimentales de **radiología y de oncología**, que la aplicación de la pomada de propóleos sobre la piel de los enfermos en tratamiento radioterápico -preservaba la mayoría de las veces a éstos de la acción peligrosa de las radiaciones sobre la epidermis.
- La pomada de propóleos calma las **irritaciones de la piel** debidas a estas radiaciones, y, permitiendo suprimir las interrupciones en el tratamiento, reduce la duración de éste. Por consiguiente, se puede ahora recomendar sin temor el empleo de esta pomada tanto como profiláctico que como curativo, contra los efectos de las radiaciones.
- **Afecciones ginecológicas:** Erosiones cervicales, leucorrea, llagas postoperatorias, vaginitis, tricomoniasis vaginal, moniliasis, infecciones bacterianas mixtas.
- **Afecciones urinarias:** Infecciones de vías urinarias y vejiga (cistitis, uretritis, etc.), prostatitis.
- **Afecciones neuro-psíquicas:** Esclerosis en placas, distrofia muscular progresiva, enfermedades de Parkinson, insuficiencias cerebro-vasculares, anorexia mental.
- **Afecciones oculares:** Blefaritis (inflamación de los párpados), blefaro conjuntivitis alérgica, úlcera de la córnea con iritis, queratopatías

Los propóleos aparecen pues como una de las más preciosas sustancias de la colmena y que la medicina no ha estimado aún en su justo valor.



## USOS POR LA COLMENA:

El propóleo es utilizado en la colmena con fines múltiples:

- ◆ Cierra las grietas que se forman en el interior de la colmena para evitar las corrientes de aire o que se cuele el frío.
- ◆ Construir obstáculos y reducir al mínimo las vías de acceso para impedir la entrada de los enemigos tales como mariposas y otros insectos.
- ◆ Embalsamar los cadáveres de los enemigos que se hayan introducido en la colmena y que las abejas no pudieron sacar debido al volumen. El propóleo tiene como propiedad fundamental su efecto bactericida y al recubrir de este los cadáveres (embalsamarlos) evitan que estos se descompongan dentro de la colmena.
- ◆ Consolidar los componentes estructurales en el interior de la colmena como cuadros, panales, tabiques, etc. y así aumentar su resistencia.
- ◆ Con el propóleo se barniza el interior de la colmena con fines desinfectantes. Después de que una abeja nace, las demás recubren con propóleo la celda de la cría y la hacen estéril. Esta aplicación al panal de la cría es lo que hace al propóleo ponerse tan oscuro y duro después de tantas temporadas.
- ◆ Evita las vibraciones de los panales cuando las colmenas están construidas sobre árboles que mueven sus copas con el viento. <sup>18</sup>

## 9. RECOMENDACIONES PARA SU USO Y PRECAUCIONES:

---

<sup>18</sup> [www.tiatrini.com.mx/propoleo.htm](http://www.tiatrini.com.mx/propoleo.htm)





Quando se ingiera propóleo por primera vez, habrá que proceder con cautela. Aunque solamente en casos raros produce alergia, hay que tomar todas las medidas de precaución, a fin de evitar incomodidad. Por ello, se recomienda tomar el primer día una pequeña dosis antes de acostarse, si al día siguiente por la mañana no se notan síntomas desagradables, es posible comenzar la cura. Se comienza el tratamiento despacio, aumentando gradualmente el consumo, durante 4 o 5 días hasta alcanzar la cantidad máxima requerida para tratar cada enfermedad y también se debe disminuir gradualmente su consumo, después de haberse iniciado una mejoría o la curación, de modo que se acabe en 8 – 14 días.

El propóleo es una sustancia inofensiva, pero de fuerte efecto, por lo que puede ocasionar trastornos (irritación de la cavidad bucal, malestar, eventualmente diarrea, etc.), en caso de utilización demasiado rápida. No existe ninguna contraindicación en cuanto a su uso, excepto en los casos de alergia al producto. Es compatible con cualquier otro tipo de terapia, siendo usado como complemento en muchas de ellas.

Puede utilizarse sin ningún peligro en niños, únicamente se tendrá que adaptar la posología según la edad. Aunque no es frecuente, puede aparecer alergia al propóleo, tanto en personas que trabajan directamente con él (apicultores), como en algunos pacientes, (uso externo o interno). Suelen presentarse más frecuentemente, en aquellas personas que sufren alergias a otras sustancias, medicamentos, polvos, etc. La dosis aconsejada, si se sigue un tratamiento es de unas 20 a 30 gotas disueltas en medio vaso de agua, 3 veces al día.<sup>19</sup>

---

<sup>19</sup> [www.paginamedica.com/balconalternativo](http://www.paginamedica.com/balconalternativo)



## II. EL PERIODONTO Y ENFERMEDAD PERIODONTAL

### 1. PERIODONTO.

#### 1.1 CONCEPTO.

El periodonto, también llamado aparato de inserción, o tejido de sostén del diente. Se considera al periodonto como los tejidos que rodean al diente, estos son del tipo conectivo aunque de diferente origen embrionario, y especializados entre si, cumplen con la función de sostén, soporte, y nutrición del diente.

#### 1.2 ESTRUCTURAS QUE CONFORMAN EL PERIODONTO.

El periodonto esta compuesto por:

El hueso alveolar, el ligamento periodontal, el cemento radicular que se desarrollan a partir del folículo dental y la encía, que rodea al diente y cubre al hueso alveolar.<sup>20</sup>

### 2. ENFERMEDAD PERIODONTAL

#### 2.1 CONCEPTO.

“El termino enfermedad periodontal tiene diferentes significados, y es usado de forma ambigua; en general sirve para abarcar todas las enfermedades del periodonto”.<sup>21</sup>

---

<sup>20</sup> Carranza Fermín, Periodontología Clínica de Glikman. Pág. 14.

Linde Jan, Periodontología Clínica. Pág. 19, y 54

<sup>21</sup> Carranza Fermín, Periodontología Clínica de Glikman. Pág. 216.



## 2.2 CLASIFICACIÓN GENERAL DE LAS ENFERMEDADES

### PERIODONTALES.

Para la clasificación de este tipo de patologías se subdividen en enfermedades gingivales, que se refieren a las afecciones de la encía, y enfermedades periodontales, que abarcan las patologías de estructuras de soporte dentario.

La Academia Americana de Periodoncia (AAP). En 1999 realizó un taller en el cual se definió una nueva clasificación de las enfermedades periodontales y que fue publicado en los anales de periodoncia en la edición de diciembre de 1999.

#### I. Enfermedad Gingival

##### A. Enfermedad Gingival Inducida por Placa Dental.

##### 1. Gingivitis asociada con Placa Dental únicamente.

- a. Sin otros factores locales asociados.
- b. Con otros factores locales asociados.

##### 2. Enfermedad Gingival Modificada por Factores Sistémicos.

##### 3. Enfermedad Gingival Modificada por Medicamentos.

##### 4. Enfermedad Gingival Modificada por Malnutrición.

##### B. Lesiones Gingivales No Inducidas por Placa.

##### 1. Enfermedad Gingival de Origen Bacteriano Específico.

- a. Lesiones Asociadas con *Neisseria Gonorrhoeae*.
- b. Lesiones asociadas con *Treponema Pallidum*.



- c. Lesiones Asociadas a Especies Streptocólicas.
- d. Otros.

2. Enfermedad Gingival de Origen Viral.
3. Enfermedad Gingival de Origen Fúngico.
4. Lesiones Gingivales de Origen Genético.
5. Manifestaciones Gingivales de Condiciones Sistémicas.
6. Lesiones Traumáticas.
7. Reacciones a Cuerpo Extraño.
8. Otras no Específicas.

## II. Periodontitis Crónica.

- A. Localizada.
- B. Generalizada.

## III. Periodontitis Agresiva

- A. Localizada.
- B. Generalizada.

## IV. Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas.

## V. Enfermedad Periodontal Necrotizante.

## VI. Absceso Periodontal.

## VII. Periodontitis Asociada con Lesiones Endodónticas.

## VIII. Condiciones o deformidades del desarrollo o adquiridas <sup>22</sup>

### 3. GINGIVITIS.

#### 3.1 CONCEPTO.

La clase más común de enfermedad gingival es la gingivitis marginal crónica, la cual es una inflamación simple producida por la placa bacteriana adherida a la

---

<sup>22</sup> Carranza Fermín, Periodontología Clínica de Glikman. Pág. 62, 63, 64, y 65.  
Dr. Cesar A. Olarte, “Enfermedad periodontal: una nueva clasificación”  
[www.encolombia.com/odontologia/foc/foc20202\\_enfermedad.htm](http://www.encolombia.com/odontologia/foc/foc20202_enfermedad.htm)



superficie dental. Este tipo de enfermedad puede permanecer sin cambio por un periodo indefinido de tiempo o evolucionar hasta el cuadro de periodontitis. Este paso de gingivitis a periodontitis puede estar asociado a cambios en la conformación de la placa bacteriana, a una respuesta hística alterada del paciente y a la composición celular del tejido conectivo infiltrado; es decir a la patogenicidad de la placa bacteriana y a la respuesta del huésped.<sup>23</sup>

### **3.2 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS.**

Podemos dividirla según sus estados de progresión histológica según Page y Schoeder:

#### **Lesión Inicial.**

No existe una manifestación clínica evidente, sino mas bien una reacción de los tejidos ante la acumulación de placa bacteriana, la respuesta mas importante del huésped es la vascular; se presenta una dilatación de los capilares que produce un aumento del flujo sanguíneo, y por ende incremento en la extravasación de liquido en el surco, la migración de leucocitos (neutrofilos polimorfonucleares) y linfocitos hasta lograr acumulos notables en el surco. En algunos casos podemos ver cambios muy sutiles del tejido, asociado a la perdida inicial de colágena por los productos de la placa bacteriana.

#### **Lesión Precoz.**

---

<sup>23</sup> Lindhe Jan, Periodontología Clínica. Pág. 135.



La dilatación vascular aumento y el eritema se hace presente por el éxtasis capilar, puede presentarse también sangrado al sondeo, por la fragilidad capilar existente, la pérdida de colágena se eleva en un 70%. En el infiltrado celular la defensa de choque estará dada por polimorfonucleares que siguen migrando a raíz de los estímulos quimiotácticos, logran llegar hasta la zona de la bolsa para fagocitar las bacterias. La producción citotóxica de las bacterias altera la capacidad del fibroblasto para producir colágeno.

### **Lesión Establecida**

La encía se presenta de color azulado, por la anoxemia tisular producida por un éxtasis arterial y venoso que hace mas lento el retorno del flujo sanguíneo, además la salida y destrucción del eritrocito y la descomposición de la hemoglobina, influyen también en el cambio de color. La pérdida de colágena aumenta aun mas, a expensas de el acumulamiento y migración constante de PNM y linfocitos, (neutrofilos, monocitos, mastocitos), que producen colagenaza, y unida a la colagenaza bacteriana; además de la presencia de hidoxilasas residuales provenientes los cuerpos lisosomales de los linfocitos degradados en los procesos de fagocitosis; todo esto nos da como resultado la destrucción inicial del epitelio de unión, y del tejido conectivo a partir de la pérdida de su sustancia fundamental.<sup>24</sup>

### **3.3 ETIOLOGIA BACTERIANA.**

Se entiende que la patología periodontal es una enfermedad infecciosa multifactorial y que la relación placa bacteriana (PB), a sido ampliamente

---

<sup>24</sup>Lindhe Jan, Periodontología Clínica. Pág. 151, 152, 153, 154, 155.



demostrada. Tanto con inflamación gingival, (Gingivitis experimental en el hombre; Loe y Cols) como en periodontitis.

La producción toxica de una placa bacteriana madura, será el principal factor etiológico que produce irritación sobre los tejidos del periodonto, y en un huésped susceptible se desencadena la destrucción del periodonto.

La placa bacteriana para ser el factor etiológico primario tiene que madurar y esto se produce al cabo de 48 horas, si no existe la alteración del proceso.<sup>25</sup>

En relación a la maduración de la PB y al crecimiento de las colonias bacterianas; se producen cambios como: el paso de saprofitas a patógenas; y la presencia de bacterias específicas, motivo por el cual se presentan diferentes tipos de enfermedad periodontal.

Por ejemplo: En condiciones normales existe aproximadamente un 75% de bacilos grampositivos y cocos. En gingivitis estos grupos decrecen al 44% y en la periodontitis al 10% - 13%. Dentro del grupo de estreptococos, el *S. sanguis* y *S. mitis* los de mayor proporción.

Los bacilos gramnegativos aumentan del 13% en estado saprófito, hasta un 40% en enfermedad gingival y 74% en enfermedad periodontal avanzada.

En salud periodontal podemos encontrar con mayor predominancia *Estreptococos* como *S. sanguis*, *S. mitis*, y *Actinomicetos* como *A. viscosus* y *A. naeslundii*, en menor proporción *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, y especies como *Capnocytophaga*, *Neisseria*, *Veillonella*, *espiroquetas* y *bacilos móviles*.

## **La Placa bacteriana.**

---

<sup>25</sup> Lindhe Jan, Periodontología Clínica. Pág. 92, y 93.



Es una capa constituida por bacterias y una matriz orgánica, que se adhiere a la superficie dental por medio de una película salival o adquirida que no es más que una capa de glucoproteínas, que no tiene bacterias y no puede ser retirada con el cepillado a diferencia de la placa bacteriana. Esta placa bacteriana o biofilm como es definida por otros autores logra resistir a la defensa del huésped gracias a una micro circulación que permite relaciones de producción química entre diferentes tipos de bacterias y que esta encapsulada por polisacáridos. Este biofilm permite diferentes ambientes en si mismo pues gracias a la producción bacteriana individual y sus reacciones químicas, existen diferentes relaciones bacterianas y ph, además de su ubicación. Se han identificado entre 300 a 400 especies diferentes de bacterias en la placa subgingival, de las que menos del 10% pueden ser patógenas gingivales, en su mayoría cocos y bacilos anaeróbicos Gramnegativos y espiroquetas. Usualmente la placa en condiciones normales podemos encontrar:

- *Streptococo sanguis G+*,
- *Streptococo mitis G+*,
- *Veillonella parvula G-*,
- *Actinomyces naeslundii*,
- *Actinomyces viscosus*.

Entre los más numerosos, Una placa patógena de gingivitis en cambio podemos ver:

- *Streptococo sanguis G+*.
- *Streptococo mitis G+*.
- *Veillonella parvula G-*.
- *Actinomyces naeslundii*.





- *Actinomyces odontoliticus.*
- *Actinomyces israeli*
- *Veillonella.*
- *Fusobacterium nucleatum.*
- *Porfiromona gingivalis.*
- *Prevotella intermedia.*
- *Eubacterium.*
- *Treponema Sp.*

En un estudio realizado por Løe y colaboradores demostraron cambios en la consistencia y organización de la PB. Con respecto a los sitios con salud periodontal en pacientes controlados, y sitios con gingivitis; aquí se lograron aislar grampositivos como: *S. Mitis*, *S. Sanguis*, *A. Viscosus*, *A. Naeslundii*, y *Peptostreptococo Micros*, en tanto que las especies gram negativas predominaban *F. Nucleatum*, *P. Intermedia*, *V. Parvula*, y especies de *Haemophilus*, y *Campylobacter*. Y Las proporciones crecimiento fueron casi iguales; de gram positivos fue del 56% y para gram negativos del 44%.<sup>26</sup>

“En la primera fase de la formación de placa, correspondiente a los 2 días iniciales del experimento, no solo creció la cantidad de todos los tipos de bacterias, sino que además se modificó su distribución proporcional. Los cocos y bacilos gramnegativos pasaron a constituir la proporción mayor de la flora. La segunda fase de generación de la placa, días 3 y 4, se caracterizó por la proliferación de fusobacterias y bacterias filamentosas. En la tercera fase, días 5-9, aparecieron espirilos y espiroquetas de modo que quedó establecida

---

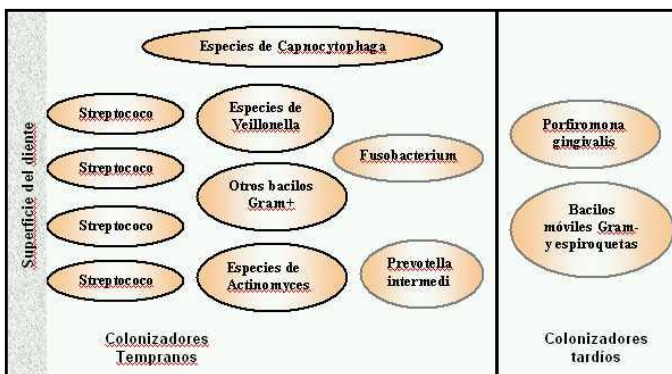
<sup>26</sup> Carranza Fermín, Periodontología Clínica de Glikman. Pág. 90,93, y 101.  
Lindhe Jan, Periodontología Clínica. Pág. 90, 91, 92, 93, 94, y 123.  
Dentality Group. “Etiología de la Enfermedad periodontal”  
[www.webinterdental.com/dentality/articulos/PE00008.htm](http://www.webinterdental.com/dentality/articulos/PE00008.htm).

la flora compleja observada en la placa vieja. Después de los 7 días, los diversos grupos de bacterias habían proliferado al punto al punto que los cocos y bacilos gramnegativos que predominaban inicialmente pasaron a constituir solo el 50%.”•

Al inhibir, los *streptococos*, con antimicrobianos; bloqueamos la maduración de la placa bacteriana, como consecuencia evitamos al factor etiológico primario de enfermedad periodontal.

“La colonización del surco gingival y la consiguiente formación de bolsa periodontal se inicia a partir de un depósito ya existente de placa supragingival. Así, la composición microbiana de la placa subgingival esta parcialmente influida por la ya existente, porción adyacente de depósito microbiano supragingival”•

La adhesión de bacterias en la superficie dental es un punto clave en la formación de la placa dental, los primeros colonizadores son el grupo de estreptococos, y por medio del cual se adhieren el resto de grupos bacterianos.



**Fig. 5 Secuencia de colonización bacteriana.** Tomado de: Dentality Group. “Etiología de la Enfermedad periodontal” [www.webinterdental.com/dentality/articulos/PE00008.htm](http://www.webinterdental.com/dentality/articulos/PE00008.htm)

### 3.4 MEDIOS DE PREVENCION

- Tomado de: Lindhe Jan, Periodontología Clínica. Microbiología de la placa microbiana. Pág. 92.
- Tomado de: Lindhe Jan, Periodontología Clínica. Microbiología de la placa microbiana. Pág. 94.

AUTORES: Juan Bernardo Solano Hermida.  
Liliana Abril.  
Grace Mejía.



Los medios de prevención para la gingivitis van encaminados, a la intervención en la formación de PB. La remoción de esta por parte del paciente resulta difícil, además tenemos en cuenta que la formación de los primeros estadios de la PB, se producen casi inmediatamente después del cepillado dental, la ausencia total de PB, entonces en periodos prolongados es un objetivo no realizable. Lo que no debemos olvidar es que la maduración de la PB; implica una duración de 2 a 4 días, para que su irritación produzca gingivitis. Por esto si logramos reducir los niveles de placa, en un paciente y su maduración, podremos eliminar la enfermedad periodontal.

Para lograr este objetivo debemos concientizar al paciente sobre la enfermedad gingival, realizar un programa de motivación - enseñanza de cepillado dental, cada citas periódicas de mantenimiento, después de un tratamiento periodontal u odontológico.

#### **4. PERIODONTITIS.**

##### **4.1 CONCEPTO.**

La periodontitis se considera como una patología multifactorial, y como un estado de progresión avanzada de el proceso inflamatorio iniciado en la encía; esta evolución natural de la gingivitis a periodontitis, dependerá de la exacerbación de estos factores, es decir mayor presencia de placa, cambios en la comunidad microbiana que involucre el aumento de microorganismos periodonto-patógenos y sus productos, además de alteraciones en la respuesta del huésped; y factores locales que conjuntamente con los anteriores puedan facilitar esta progresión de la enfermedad como los mecánicos, (Traumatismo



oclusal, Obturaciones desbordantes o mal adaptadas, o cualquier otro que pueda retener PB). y sistémicos. (Enfermedades debilitantes, Alteraciones del sistema de defensa del organismo etc.)

#### **4.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.**

Las características de las enfermedades periodontales más comunes que podemos encontrar son:

- Pérdida de inserción, con formación de bolsa periodontal, que será de 3 a 4mm, en la periodontitis leve, de 4 a 5mm. en la periodontitis moderada y más de 5mm. en la periodontitis grave.
- Presencia de cálculos supragingivales y subgingivales.
- Inflamación gingival intensa, (edema, eritema, y aumento de la temperatura en el surco).
- Hemorragia espontánea, o por estímulos leves.
- Presencia de exudado purulento a la presión sobre las lesiones.
- Movilidad dental en sus diferentes grados, y que puede llegar a la exfoliación de la pieza.
- Presencia de factores locales predisponentes. (Trauma oclusal, restauraciones mal adaptadas, etc.)

Se debe tener en cuenta que las características clínicas estarán de acuerdo con los factores etiológicos de cada enfermedad, y por lo tanto existirán



características específicas para algunos tipos específicos de la enfermedad periodontal.<sup>27</sup>

### 4.3 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS.

Aquí se describe la fase cuatro o lesión avanzada; la característica principal es la de la pérdida del epitelio de unión, con el avance hacia el ligamento periodontal y destrucción del hueso alveolar, esto se traduce en una lesión periodontal. El tejido conectivo se presenta edematoso, las concentraciones plasmáticas de linfocitos, plasmocitos y leucocitos polimorfonucleares aumentan hasta un 80% por una mayor dilatación capilar y congestiónamiento de líquidos; pueden existir focos de necrosis simples o múltiples con intento de regeneración en la periferia, encontramos así fibroblastos, capilares en neoformación y fibras colágenas.<sup>28</sup>

La pared lateral de la bolsa muestra grados diferentes de degeneración, las prolongaciones de las células epiteliales se extienden más hacia apical que el epitelio de unión; los leucocitos y polimorfonucleares se infiltran hacia esas prolongaciones para reducir el avance de la invasión bacteriana, estos sufren una degeneración vacuolar y se destruyen formando así vesículas; todo esto se traduce en la degeneración aún más profunda de la lesión, producción supurativa, necrosis, y exposición del tejido subyacente. Lentamente la invasión bacteriana gana terreno, y sus productos comienzan a afectar a los fibroblastos del hueso alveolar, y a sus productos lo que se traduce en pérdida

---

<sup>27</sup> “Enfermedad periodontal: una nueva clasificación”  
[www.encolombia.com/odontologia/foc/foc20202\\_enfermedad5.htm](http://www.encolombia.com/odontologia/foc/foc20202_enfermedad5.htm).

<sup>28</sup> Lindhe Jan, Periodontología Clínica. Pág. 156.



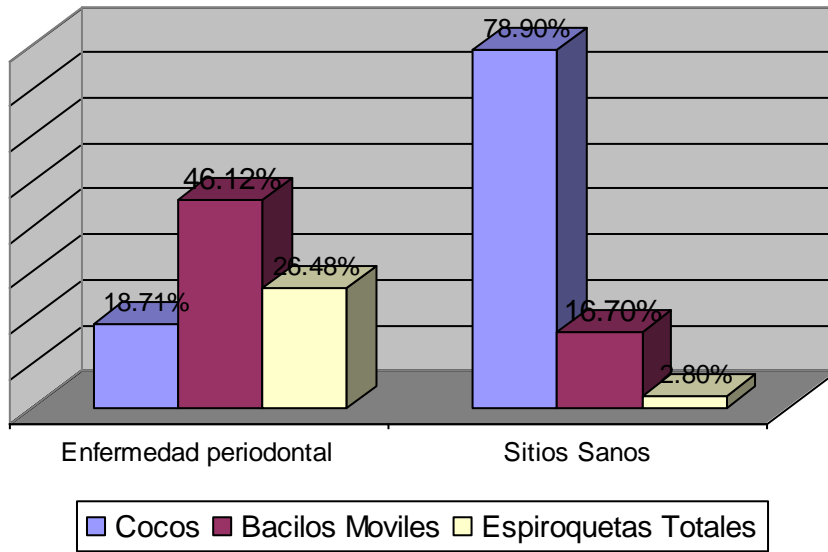
de hueso, es decir defectos óseos que según su progresión y extensión determinaran la movilidad de la pieza y la clase de lesión.

#### **4.4 ETIOLOGIA Y BACTERIAS ASOCIADAS.**

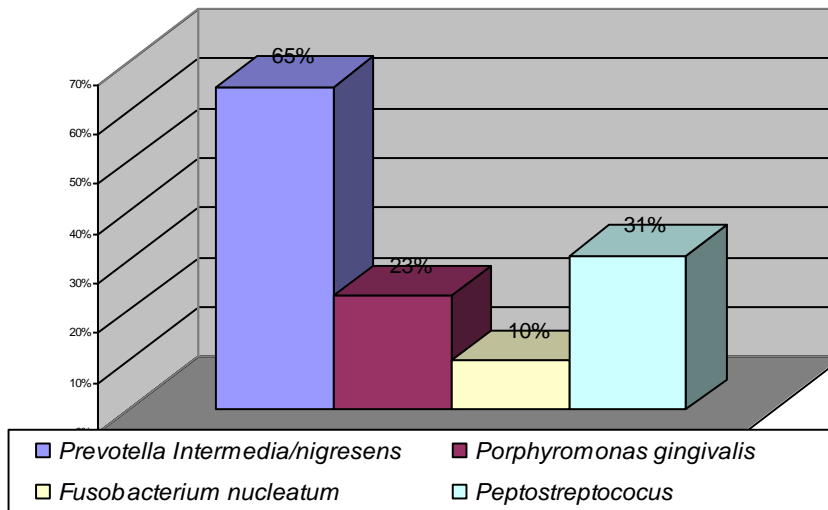
Las enfermedades periodontales son procesos infecciosos de orden multifactorial; es decir, no podemos reconocer un solo factor etiológico de esta, sino que mas bien, el conjunto de estos causan una alteración. Además de estos tenemos variables como: la respuesta del huésped que puede o no ser alterada por las diversas alteraciones sistémicas, y la presencia de factores mecánicos: Entre los cuales tenemos todos aquellos que físicamente causan irritación sobre la encía, o simplemente retengan placa bacteriana; como el traumatismo oclusal, iatrogénicas odontológicas, tratamientos ortodónticos (aparatología ortodóntica defectuosa), cálculos dentales, bruxismo, prótesis mal adaptadas, terceros molares en mala posición, y morfología dentaria anormal; entre otros.

Factor microbiológico: Aquí tenemos a los microorganismos patógenos de la enfermedad periodontal, que estará estrictamente ligado a la presencia de la placa bacteriana.

**Fig. 6 presencia de microorganismos en relación a encía sana y con lesión de enfermedad periodontal.<sup>29</sup>**



**Fig. 7 Microorganismos de mayor porcentaje presentes en la enfermedad periodontal.<sup>30</sup>**



En la

periodontitis, podemos encontrar una placa conformada por:

<sup>29</sup> Tomado de: “Estudio clínico y microbiológico de la enfermedad periodontal del adulto”.  
[www.drwebsa.com.ar/aam/rev\\_033\\_03/033\\_1.htm](http://www.drwebsa.com.ar/aam/rev_033_03/033_1.htm)

<sup>30</sup> Tomado de: “Estudio clínico y microbiológico de la enfermedad periodontal del adulto”.  
[www.drwebsa.com.ar/aam/rev\\_033\\_03/033\\_1.htm](http://www.drwebsa.com.ar/aam/rev_033_03/033_1.htm)



- *Porphyromona Gingivalis.*
- *Prevotella Intermedia.*
- *Eubacterium. Sp.*
- *Treponema Sp.*
- *Bacteroides Forsytus.*
- *Peptostreptococo micros.*
- *Campylobacter Rectus.*
- *Actinomyces actinomycetemcomitans.*
- *Eikenella Corrodens.*
- *Fusobacterium Sp.*
- *Selenomonas Sp.*

En la periodontitis del adulto las asociaciones de gérmenes más comúnmente encontrados son. *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsitus*, *Porphyromona gingivalis*, *Capnocytophaga rectus*, *Eikenella corrodens*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans*, especies de *treponemas* y *eubacterium*, estos se encuentran en lesiones activas.

En la periodontitis de avance rápido encontramos asociaciones de: *Porphyromona gingivalis*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Bacteroides forsitus*.

En periodontitis juvenil el *A. actinomycetemcomitans* representa el 90% de la microflora total cultivable, también podemos encontrar *Eubacterium brachy*, *Porphyromona gingivalis*, *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga rectus*, *F. nucleatum*, *Bacteroides capillus*.





En la periodontitis prepuberal podemos encontrar *Porphyromona gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*.<sup>31</sup>

#### 4.5 MEDIOS DE PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO.

Los medios de prevención de la enfermedad periodontal estarán enfocados a la eliminación de una excesiva cantidad de placa bacteriana y todo factor mecánico que implique su retención, además de una evaluación de cualquier factor traumático que pueda producir lesión periodontal (trauma oclusal, puntos de contacto prematuros, etc.,)

Los pacientes que presenten algún tipo de compromiso sistémico deberemos profundizar aun más en la motivación y la enseñanza del control de placa asociando esto al problema sistémico del paciente.

El tratamiento de la enfermedad periodontal debe cumplir con los siguientes objetivos: eliminación del dolor, la inflamación, la hemorragia gingival y la producción de la infección, motivación del paciente para conservar su salud periodontal y el adiestramiento necesario para su fase de mantenimiento.

La terapéutica periodontal se puede dividir en:

Fase Inicial: En la que se cumplirá motivación y enseñanza de la higiene bucal y los controles de placa correspondientes además de un raspado y alisado radicular y la eliminación de todo factor retentivo de placa y traumático.

Fase Correctiva: En la cual se realizará todo tipo de cirugías periodontales necesarias según el caso.

---

<sup>31</sup> Carranza Fermín, Periodontología Clínica de Glikman. Pág. 100, y101.  
Dentality Group. "Etiología de la Enfermedad periodontal"  
[www.webinterdental.com/dentality/articulos/PE00008.htm](http://www.webinterdental.com/dentality/articulos/PE00008.htm)



Fase de Mantenimiento: Esta se refiere a los controles posteriores al tratamiento los cuales se prolongaran dependiendo del caso.<sup>32</sup>

## 5. CONTROL QUIMICO DE LA PLACA

La idea del control químico de la placa se dio en 1950 por Gotlieb, quien experimento con los llamados aceites esenciales. El uso combinado de control mecánico (cepillado dental) con productos antimicrobianos que inhiban la formación de placa bacteriana se ha demostrado en varios estudios y están basados en la teoría de la placa específica; entre los cuales están:<sup>33</sup>

- Digluconato de clorhexidina.
- Triclosan.
- Compuestos fenólicos “Aceites Esenciales”<sup>34</sup>

### 5.3 EL PROPOLEO EN ODONTOLOGIA.

Como se dijo en párrafos anteriores, en odontología se están investigando las propiedades antimicrobianas de esta sustancia, las posibilidades de su uso odontológico son muy amplias, ya que en varios de los tratamientos odontológicos es necesario utilizar antimicrobianos de uso local y antibiòticoterapia sistémica.

Estudios realizados han demostrado su alto poder antibacteriano y antibiòtico, como es el caso de su uso para el tratamiento para la cura de heridas sépticas

---

<sup>32</sup> Lindhe Jan. Periodontología Clínica. Pág. 294, 295, 296.

<sup>33</sup> Lindhe Jan. Periodontología Clínica. Pág. 333, 334, 335, 336.

<sup>34</sup> Lindhe Jan. Periodontología Clínica. Pág. 338, 339, 340, 341.

Chester W. Douglas. “Papel de un Dentífrico con triclosán / Copolímero en la prevención y control de la enfermedad periodontal” Pág. 6 - 9.



faciales causadas por algún tipo de traumatismo, en el cual el Dr. Juan Quintana Díaz utilizó tintura de propóleos al 5% en vehículo alcohólico. Todas estas heridas faciales presentaban gérmenes patógenos, eritema y secreciones, y eritema. Las heridas fueron lavadas con suero fisiológico estéril y se aplicó la tintura de propóleo, siguiendo este procedimiento diariamente hasta la cura de las heridas, sin antibióticoterapia sistémica. Los resultados obtenidos fueron en el 90% de los casos se encontraron gérmenes Gram +, la cicatrización y curación de las heridas se produjo durante los primeros 7 días, y el 10% que correspondía a infección por gérmenes Gram -, cicatrizó y curó a los 13 días de comenzado el tratamiento.<sup>35</sup>

En otro estudio realizado por la Dra. Estela Gispert Abreu, en el cual compara una pasta dental con propóleo y un gel de clorofila, analizando la resistencia del esmalte a la desmineralización ácida, la capacidad individual de remineralización, el efecto de los compuestos ante la infección por *Streptococo mutans*, y su efecto en la capacidad buffer de la saliva; en relación a la resistencia del esmalte a la desmineralización ácida se obtuvieron resultados casi iguales y atribuyéndose esto al mejoramiento de la higiene bucal porque tanto el gel de clorofila, como el propóleo disminuían el acumulamiento de placa bacteriana. Con respecto a la capacidad individual de remineralización esta resulta favorecida por la menor acumulación de placa bacteriana, es decir que existe mayor absorción de los minerales aportados por vía salival.

En cuanto a la infección por *Streptococo mutans* al disminuir la cantidad de placa también disminuye el número de colonias de este microorganismo, por lo

---

<sup>35</sup> Quintana Juan "Empleo de la tintura de propóleo al 5 % en la cura de heridas sépticas faciales"  
[www.infomed.sld.cu/revistas/est/vol34\\_1\\_97/est05197.htm](http://www.infomed.sld.cu/revistas/est/vol34_1_97/est05197.htm)



tanto se le atribuye mayor acción antimicrobiana al propóleo, por último no se encontró un efecto significativo a la mejoría de la capacidad buffer salival.<sup>36</sup>

## 6. RELACIÓN ENFERMEDAD - RESPUESTA DEL PACIENTE

La gingivitis y la periodontitis son producidas por bacterias que colonizan el surco gingival y se fijan a las superficies dentarias. El potencial patógeno de las bacterias en la placa varía de un sujeto al siguiente y de un sitio gingival a otro. Cantidades reducidas de placa en una persona sana pueden ser toleradas sin causar enfermedad periodontal o gingival, tal vez debido al control que ejercen los mecanismos de defensa del huésped. Cuando bacterias específicas en la placa aumentan hasta alcanzar cifras relevantes y producen factores de virulencia que exceden el umbral de control del paciente individual, el equilibrio va desde la salud a la enfermedad. Esta también aparece como consecuencia de una reducción en la capacidad defensiva del huésped.

Las interacciones huésped-bacterias determinan la naturaleza y la extensión del trastorno resultante. Los microorganismos patógenos pueden influenciar el curso del proceso patológico elaborando sustancias tóxicas para los tejidos, mediante la invasión directa de los tejidos del huésped. Por lo general, los productos y la invasión bacterianos de los tejidos dañan al huésped, la reacción de este puede ser de: protección, o de destrucción. Los mecanismos mediante los cuales las bacterias subgingivales contribuyen a la patogenia del trastorno periodontal son variados:

### a) Invasión.

---

<sup>36</sup> Gispert Estela. ‘Estudio comparativo del efecto del cepillado con una crema dental con propóleos rojos y de un gel con clorofila’ [www.infomed.sld.cu/revistas/est/vol35\\_3\\_98/est08398.htm](http://www.infomed.sld.cu/revistas/est/vol35_3_98/est08398.htm)



Junto a la invasión bacteriana es posible observar alteración en la membrana basal del epitelio de una bolsa.

**b) Producción de exotoxinas.**

Detalladas en párrafos anteriores.

**c) Producción de constituyentes celulares.**

(endotoxinas, elementos de superficie, componentes capsulares, etc.). Tanto las bacterias grampositivas como las gramnegativas subgingivales elaboran diversos productos tóxicos que también poseen la capacidad de destruir tejido. Estos incluyen ácidos grasos y orgánicos como los ácidos butírico y propiónico, aminas, compuestos volátiles de sulfuro, indol, amoníaco y glucanos. El peptidoglucano, componente de la pared celular presente en especies gramnegativas y grampositivas, afecta en algunas ocasiones en algunas reacciones del huésped, incluyendo la activación del complemento, la actividad inmunosupresiva, la estimulación del sistema reticuloendotelial, así como las propiedades de inmunopotenciación. Material capsular y elementos de desecho aparecen en la superficie más externa de muchas células bacterianas y pudieran intervenir en la destrucción hística así como en la evasión bacteriana de los mecanismos de defensa del huésped.

**d) Producción de enzimas.**

Las bacterias que aparecen en la placa dental producen una diversidad de enzimas, de las cuales las que posiblemente contribuyen al proceso patológico incluyen las colagenasas, la hialuronidasa, la gelatinasa, las aminopeptidasas, las fosfolipasas y las fosfatasas alcalina y ácida.

**e) Evasión de las reacciones inmunitarias del huésped.**

Los factores bacterianos importantes en la evasión de las defensas del huésped son:

**1. Inhibición de PMN:**

- ◆ Leucotoxina
- ◆ Inhibidores de quimiotaxia
- ◆ Fagocitosis disminuida y muerte intracelular

**2. Alteraciones linfocitarias**

**3. Endotoxinidad**

**4. Proteasas IgA, IgG ( inactivan o destruyen inmunoglobulinas)**

**5. Fibrinólisis**

**6. Dismutasa superóxido**

**7. Catalasa<sup>37</sup>**

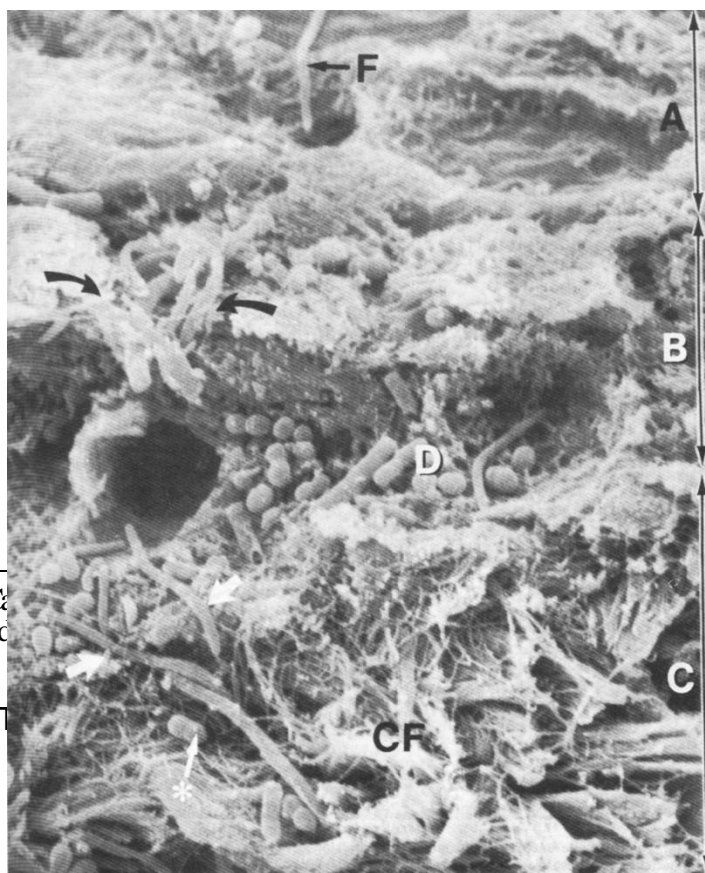


Fig. 8 Microfotografía electrónica de un corte de la pared de una bolsa en la periodontitis. (A) Superficie de la bolsa. (B) Epitelio seccionado. (C) Tejido conectivo. Flechas negras penetración bacteriana al epitelio. Flechas blancas penetración



#### **6.4 ENFERMEDADES CAUSADAS POR *S. mitis*, *S. sanguis* y *S. pyogenes*.**

##### **Endocarditis bacteriana**

Es una enfermedad de tipo infecciosa que puede ser producida por cualquier tipo de bacteria, aunque los estreptococos hemolíticos alfa la producen con más frecuencia que cualquier otro tipo de microorganismo conjuntamente con *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. intermedius* y *S. mutans*.

La secuencia de patogenicidad que conduce a la endocarditis bacteriana subaguda comienza con un daño del tejido conjuntivo subendotelial que contiene fibras de colágeno, al perder epitelio se agregan las plaquetas que al ser infectadas con estos microorganismos pueden llegar hasta las válvulas cardíacas. La endocarditis se desarrolla con más frecuencia en los sitios donde hay un mayor flujo de sangre y presión alta a un sitio de menor flujo sanguíneo y presión baja, por ejemplo: trastornos cardiovasculares como regurgitación



mitral, estenosis aórtica, defectos del tabique ventricular, conducto arterioso permeable y coaptación de la aórtica.

### **Faringitis estreptocócica**

Es la infección más común causada por estreptococos virulentos del grupo A, los cuales se adhieren al epitelio faringeo por medio de pelos de ácido lipoteicoico que cubren su superficie. En los niños de mayor edad y en los adultos la enfermedad es más aguda y se caracteriza por: nasofaringitis grave, amigdalitis con eritema y edema intenso de las membranas mucosas, exudado purulento, ganglios linfáticos cervicales dolorosos e hipertrofiados y (habitualmente) fiebre alta.

### **Fiebre reumática.**

La fiebre reumática se considera como una consecuencia o secuela no supurativa de una infección de las vías respiratorias superiores con estreptococos del grupo A. El inicio de la fiebre reumática se desarrolla de 1 a 4 semanas después de la infección por estreptococo del grupo A

Las lesiones inflamatorias afectan las articulaciones, el corazón, tejidos subcutáneos. El desarrollo de este tipo de patología requiere la infección previa con un microorganismo específico como el *S. pyogenes*. Aunque se desconoce el mecanismo de la infección existen tres teorías:

La primera se refiere a los productos tóxicos del estreptococo □ hemolítico específicamente con la estreptolisina S y O. estas son capaces de iniciar una respuesta tisular.





La segunda se refiere a una reacción inflamatoria producida por los complejos antígeno- anticuerpo que se encuentran en la lesión tisular. Se refiere al fenómeno autoinmune que son inducidos por la similitud de algunos antígenos estreptococales y algunos tejidos humanos.

### **Glomerulonefritis**

Es la infección del riñón, específicamente en el glomérulo de la nefrona que es consecuencia de una infección estreptocócica del grupo A.

Se desarrolla 3 semanas después de la infección por estreptococos, en particular con tipo M. 12, 4, 2 y 49.

Las características clínicas e histológicas de glomerulonefritis postestreptocócica se deben a depósitos granulares de complejos inmunológicos en los glomérulos. El antígeno más importante tal vez está en la membrana del protoplasto del estreptococo.

La enfermedad es más común en niños entre 3 a 12 años con una edad media de unos 7 años y es rara en la infancia y en adultos mayores de 50 años.

### **Fiebre escarlatina.**

Esta afección ocurre en pacientes con faringitis estreptocócica en quienes el microorganismo infectante produce una toxina eritrógena y que no es inmune esta toxina porque no han tenido una exposición previa a la misma. Esta enfermedad se observa rara vez en los adultos. El exantema de la fiebre escarlatina incluye un lengua que puede ser rojo brillante con grandes papilas



(lengua de frambuesa) o recubierta con papilas rojas salientes (lengua de fresa). El exantema aparece poco después del inicio de la faringitis, y afecta con mayor frecuencia el tronco y las caras internas de los brazos y muslos, pero en casos más leves sólo se observa en mulos e ingles.

Una característica de la fiebre escarlatina es la descamación de la piel, se inicia con una descamación fina de la cara y del cuerpo y suele terminar durante la segunda semana.<sup>38</sup>

### **III. LOS ESTREPTOCOCOS Y PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA**

#### **1. GENERALIDADES DE ESTREPTOCOCOS**

Los estreptococos son bacterias gram positivas de forma esférica, aparecen en pares o cadenas y algunas especies son patógenas para los seres humanos,

---

<sup>38</sup> WYNGAARDEN/ SMITH/ BENNETT. Tratado de medicina interna Cecil. Pág. 1296-1297.

atribuibles en parte a infección por estreptococos y en parte a sensibilización a ellos; mientras otros son miembros de la flora normal.

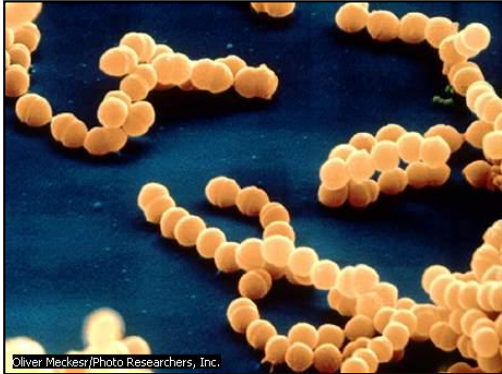


Fig. 9 Micrografía electrónica de *Streptococcus* \*

Los estreptococos son un grupo heterogéneo de bacterias, los cuales se distinguen entre si por combinaciones de características: morfología de las colonias, patrones de hemólisis sobre agar sangre (hemólisis  $\alpha$ ,  $\beta$ , o no hemólisis ( $\gamma$ )), composición antigénica de las sustancias de la pared celular específicas de grupo y reacciones bioquímicas.

### 1.1 CARACTERÍSTICAS DE ESTREPTOCOCOS IMPORTANTES DESDE EL PUNTO DE VISTA MÉDICO:

NOMBRE	SUSTANCIA ESPECÍFICA DE GRUPO	HEMOLISIS	HABITAT	CRITERIOS IMPORTANTES DE LABORATORIO	ENFERMEDADES COMUNES Y IMPORTANTES
<b>STREPTOCOCCUS PYOGENES</b>	A	$\alpha$	Faringe, piel.	PYR positivo, inhibido por bacitracina.	Faringitis, impétigo, fiebre reumática, glomérulo n



<b>STREPTOCOCCUS AGALACTIE</b>	B	<input type="checkbox"/>	Aparato genital femenino	Hidrólisis de hipurato, CAMP positivo	Septicemia meningitis neonatal.
<b>ENTEROCOCCUS FAECALIS (Y OTROS ENTEROCOCOS)</b>	D	<input type="checkbox"/> no hemólisis.	Colon	Crecimiento en presencia de bilis, hidroliza esculina, crecimiento en 6,5 % de ClNa, PYR positivo.	Absceso abdominal, infección de aparato urinario, endocarditis.
<b>STREPTOCOCCUS BOVIS (NO ENTEROCOCO)</b>	D	No hemólisis.	Colon	Crecimiento en presencia de bilis, hidroliza esculina, no crece en 6,5 % de ClNa, descompone el almidón.	Endocarditis comúnmente aislado de la sangre en el cáncer de colon.
<b>STREPTOCOCCUS ANGINOSUS (S. INTERMEDIUS, S. CONSTELLATUS, GRUPO S. MILLERI)</b>	F (A, C, G) y no tipificables	<input type="checkbox"/>	Faringe, colon, aparato genital femenino	Colonias pequeñas (diminutas), variantes de especies hemolíticas <input type="checkbox"/> Los del grupo A son resistentes a Bacitracina y PYR negativos.	Infecciones piógenas, absceso cerebral.



	Habitualmente no tipificado o intipificable.	<input type="checkbox"/> no hemólisis.	Faringe, colon, aparato genital femenino	Patrón de fermentación de carbohidratos.	No bien def
<b>STREPTOCOCCUS VIRIDANS (MUCHAS ESPECIES)</b>	Habitualmente no tipificado o intipificable.	<input type="checkbox"/> no hemólisis.	Boca, faringe, colon, aparato genital femenino	Resistente a Optoquina, colonias no solubles en bilis. Patrón de fermentación de carbohidratos	Caries dent (mutans), endocarditis abscesos (o muchas otra especies de bacterias)
<b>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</b>	Ninguno	<input type="checkbox"/>	Faringe	Susceptible a Optoquina. Colonias solubles en bilis, reacción Quellung positiva.	Neumonía, meningitis, endocarditis
<b>PEPTO STREPTOCOCCUS (MUCHAS ESPECIES)</b>	Ninguno	<input type="checkbox"/> no hemólisis	Boca, colon, Aparato genital femenino	Anaerobios obligados.	Absceso (o otras múltip especies de bacterias). <sup>39</sup>

## 1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS ESTREPTOCOCOS:

Durante muchos años la clasificación de los estreptococos se ha basado en una serie de observaciones:

1. Morfología de las colonias y reacciones hemolíticas sobre Agar sangre.
2. Especificidad serológica de la sustancia específica de grupo de la pared celular

<sup>39</sup> JAWETZ, MELNICK Y ADELBERG Microbiología Médica. Pag. 250

\* Microsoft ENCARTA



3. (Clasificación de Lancefield) y otros antígenos capsulares o de la pared celular.
4. Reacciones Bioquímicas y resistencia a factores físicos y químicos.
5. Características ecológicas. <sup>40</sup>

La siguiente es la clasificación de Bergey (1957) para estreptococos la cual se basa en las características fisiológicas y de esta manera diferencia las especies. <sup>41</sup>

**a. Anaerobios facultativos:**

**i. Grupo Piógenes:**

No hidrolizan el Hipurato de Sodio	Fermentan la lactosa	Sorbitol (-). Trehalosa (+): <i>S. pyogenes</i> (Grupo A de Lancefield)
		Sorbitol (+), Trehalosa (-): <i>S. Zooepidermicus</i> (Grupo C de Lancefield)
	Fermentación de lactosa variable	Trehalosa (-): <i>S. equi</i> . Trehalosa (+): <i>S. equisimilis</i> .
Hidrolizan el Hipurato de Sodio	<i>S. agalactiae</i> (Grupo B de Lancefield)	

**i. Grupo Viridans:**

<sup>40</sup> JAWETZ, MELNICK Y ADELBERG. Microbiología Medica. Pág. 253

<sup>41</sup> FREMAN, Bob Microbiología Burrows. Pág. 414



Fermentan la lactosa	No crecen a 50 °C	No hidrolizan el almidón, no toleran la bilis: <i>S. salivarius, S. mitis.</i>
		Hidrolizan el almidón, toleran la bilis: <i>S. Bovis.</i>
	Crece a 50 °C.	<i>S. termófilus.</i>
No fermentan la lactosa	<i>S. equinus.</i>	

**ii. Grupo Láctico:**

Maltosa (+), Dextrina (+), Produce amoníaco a partir de peptona: <i>S. lactis</i>	Maltosa (-), Dextrina (-) generalmente, no produce amoníaco a partir de peptona: <i>S. cremoris.</i>
--	---

**iii. Grupo Enterococo:**

No <input type="checkbox"/> hemolíticos	No hidrolizan la gelatina: <i>S. faecalis.</i>
	Hidrolizan la gelatina: <i>S. liquefaciens.</i>
<input type="checkbox"/> Hemolíticos	Manitol (+), Sorbitol (+): <i>S. zymógenes.</i>
	Manitol (-), Sorbitol (-): <i>S. durans.</i>

**b. Microaerófilos o Anaerobios obligados:**

- *S. anaerobius.*
- *S. foetidus.*
- *S. putridus.*



- *S. lanceolatus*.
- *S. micros*.
- *S. parvulus*.
- *S. intermedius*.
- *S. evolutus*.

La identificación de los gérmenes anaerobios es todavía una tarea difícil pues muchas de las pruebas bioquímicas necesitan adaptarse al ambiente respiratorio anaerobio en que se ha de efectuar. Pero de acuerdo a ciertas características como pueden ser los productos metabólicos (mezclas de alcoholes, ácidos orgánicos no volátiles, y ácidos graso volátiles) de estas bacterias, pueden ser estudiados por cromatografía de gas líquido y así diferenciarlos. Otras especies como los cocos anaerobios pueden diferenciarse morfológicamente, según estén formando pequeñas cadenas (*Peptostreptococcus*), en grupos irregulares (*Peptococcus*), o en octaedros (*Sarcina*). Este último no es considerado patógeno pero los otros dos sí. El género *Peptococcus* está constituido por una especie de interés clínico, y *Peptostreptococcus* por nueve.

Entre los cocos gramnegativos figura el genero *Veillonella*, con una morfología idéntica a la de su género aerobio *Neisseria*.<sup>42</sup>

### 1.3 ESTRUCTURA ANTIGÉNICA:

La composición de la pared celular de los estreptococos es similar a la de otras bacterias gram positivas y está compuesta fundamentalmente de

---

<sup>42</sup> ALVAREZ M/ BOQUET E/ DE FEZ M. Manual de Técnicas en Microbiología Clínica. Pág. 90





peptidoglicanos, en el cual se encuentran embebidos una variedad de hidratos de carbono, ácidos teicóicos, lipoproteínas y antígenos de proteínas de superficie.<sup>43</sup>

Los estreptococos hemolíticos pueden dividirse en grupos serológicos (A-U) dependiendo de los antígenos que posea. Se encuentran algunas sustancias antigénicas:<sup>44</sup>

a) **Antígeno de la pared celular específico de grupo:** Es un carbohidrato que se encuentra en la pared celular de muchos estreptococos y constituye la base de los grupos serológicos (grupos de Lancefield A-U):

- Estreptococos □ hemolíticos grupo A: *S. pyogenes*.
- Estreptococos □ hemolíticos grupo B: *S. agalactiae*.
- Estreptococos □ hemolíticos grupo C: *S. equisimilis*, *S. zooepidemicus* y *S. equi*.
- Estreptococos Grupo D: *S. Boris* y *S. equinus*.
- Estreptococos □ hemolíticos grupo F: *S. milleri* (Esquema Taxonómico Británico) y *S. anginosus*, *S. constellatus* y *S. intermedius* (Esquema Taxonómico Estadounidense).

Para los estreptococos del grupo A este azúcar de la pared celular es la ramnosa-N-acetilglucosamina; para el grupo B, el polisacárido de ramnosa-glucosamina; para el grupo C, la ramnosa-N-acetilgalactosamina; para el grupo D, el ácido glicerol teicoico que

---

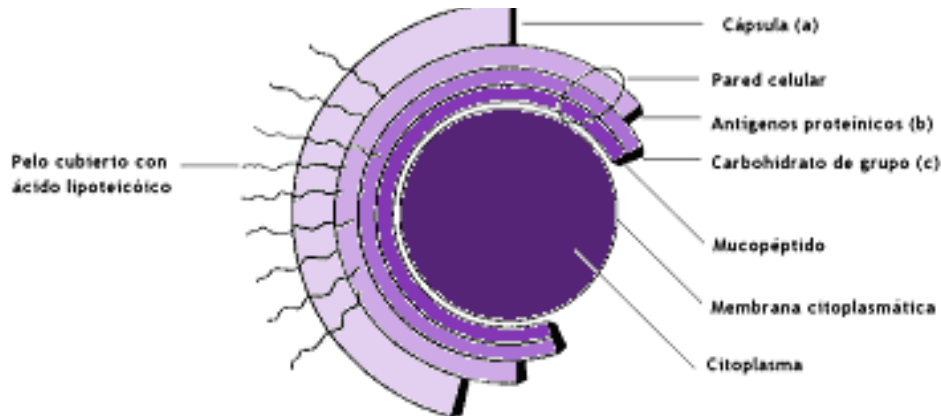
<sup>43</sup> KONEMAN

<sup>44</sup> JAWETZ, MELNICK Y ADELBERG



contiene D-alanina y glucosa; para el grupo F, la glucopiranosil-N-acetilgalactosamina.

- b) **Proteína M:** Es un factor importante de virulencia para el *S.pyogenes* del grupo A. La proteína M tiene apariencia de pelos de la pared celular del estreptococo. Cuando la proteína M está presente los estreptococos son virulentos y en ausencia de anticuerpos específicos tipo M pueden resistir la fagocitosis efectuada por los leucocitos polimorfonucleares. La inmunidad a la infección por estreptococos del grupo A se vincula con la presencia de anticuerpos de tipo específico a la proteína M.
- c) **Sustancia T:** Este antígeno no tiene interrelación con la virulencia de los estreptococos. La sustancia T permite diferenciar ciertos tipos de estreptococos por aglutinación con antisueros específicos en tanto que otros tipos comparten la misma sustancia T. Hay otro antígeno de superficie llamado: Proteína R.
- d) **Nucleoproteínas:** Son proteínas y otras sustancias con escasa especificidad serológica, denominadas: Sustancias P, talvez constituida por la mayor parte del cuerpo de las células estreptocócicas.

Fig. 10 estructura antigénica del *Streptococo*

Estructura antigénica de la célula estreptocócica del grupo A. (a) La cápsula es de ácido hialurónico. (b) Antígenos proteínicos M, T y R de la pared celular. (c) El carbohidrato específico de grupo de los estreptococos del grupo A es la ramnosa-N-acetilglucosamina.

#### 1.4 TOXINAS Y ENZIMAS.

- b. **Estreptocinasa (Fibrinolisisina):** Transforma el plasminógeno del plasma humano en plasmina, una enzima proteolítica activa que digiere la fibrina, colágena y otras proteínas.
- c. **Estreptodornasa:** Provee la viscosidad a los exudados purulentos. La mezcla de estreptocinas y estreptodornasa es útil para licuar exudados y retirar con mayor facilidad pus y tejido necrosado; así los antimicrobianos tienen mejor acceso y las superficies infectadas se recuperan con mayor rapidez.
- d. **Hialuronidasa:** Desdobla el ácido hialurónico, un componente importante de la sustancia fundamental del tejido conjuntivo. Por lo tanto ayuda a la propagación de los microorganismos.



- e. **Exotoxinas Pirógenas (Toxina eritrógena):** Existen 3 exotoxinas pirógenas estreptocócicas: A, B y C antigénicamente distintas.

La exotoxina A: Es producida por estreptococos del grupo A que portan un fago lisogénico y es un superantígeno. Está vinculado con el síndrome de choque tóxico estreptocócico, al igual que la exotoxina C, en tanto que la función de la exotoxina pirógena estreptocócica B no está clara.

- f. **Difosfopiridina nucleotidasa:** Esta sustancia puede vincularse con la capacidad de los organismos para matar los leucocitos.
- g. **Hemolisinas:** Muchos estreptococos pueden causar hemólisis de grado variable de los eritrocitos *in vitro*. La destrucción completa de los eritrocitos, con liberación de hemoglobina se denomina hemólisis  $\square$ , La lisis incompleta de los eritrocitos, con formación de pigmento verde se denomina: Hemólisis  $\square$ .

El *S. pyogenes*  $\square$  hemolítico del grupo A elabora 2 hemolisinas (estreptolisinas).

**Estreptolisina O:** Causa parte de la hemólisis observada cuando el crecimiento ocurre en cortes profundos dentro del medio en placas de agar sangre. Se combina cuantitativamente con la Antiestreptolisina O, un anticuerpo que aparece en humanos luego de la infección con cualquier estreptococo que produzca estreptolisina O. Este fenómeno



constituye la base de la prueba cuantitativa para el anticuerpo denominada: ASO, en la cual un título elevado de antiestreptolisina indica infección reciente por estreptococos.

**Estreptolisina S:** Es el causante de las zonas hemolíticas alrededor de las colonias de estreptococos que crecen sobre la superficie de placas de agar sangre. Se elabora en presencia de suero, de ahí su nombre: Estreptolisina S.

## 1.5 CARACTERÍSTICAS DE CULTIVO DE ESTREPTOCOCOS:

### 1.5.1 ESTREPTOCOCOS: SANGUIS, MITIS, PYOGENES.

#### Características generales:

- a) **Morfología:** Los cocos individuales son esféricos u ovoides miden aproximadamente 0.8 – 1  $\mu$  de diámetro y se disponen en cadenas, las cuales tienen una longitud variable y está condicionada por factores ambientales. Los estreptococos son gram positivos; sin embargo conforme el cultivo envejece y las bacterias mueren, pierden su gram positividad y se tornan gram negativas; ésto puede ocurrir después de incubación durante una noche.<sup>45</sup>

---

<sup>45</sup> JAWETZ, MELNICK Y ADELBERG. Microbiología Medica. Pág. 249

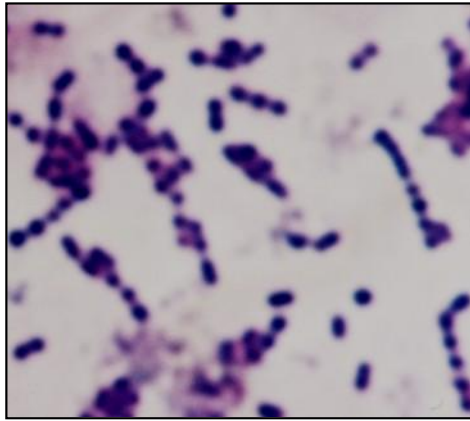


Fig. 11 Estreptococos vistos al microscopio

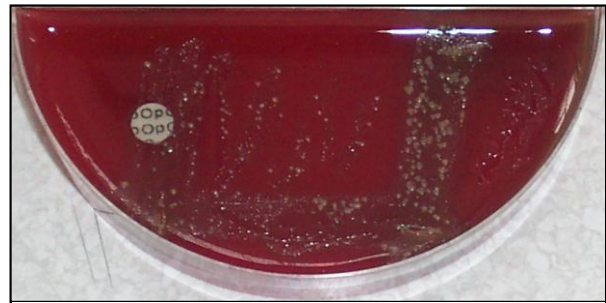


Fig. 12 Colonias de Estreptococos

**b) Requerimientos de crecimiento:** Las muestras en las que se supone puede haber estreptococos deben cultivarse en placas de un medio adecuado con sangre, que posea una base peptonada lo suficientemente rica para el desarrollo de éstos microorganismos exigentes. La base del agar debe ser un medio de infusión de peptonas, por ejemplo: Tripticasa-soja, proteosa peptona, sin el agregado de hidratos de carbono. Al medio basal se le agrega sangre de carnero al 5 % como indicador de hemólisis. Las concentraciones de sangre menores producen reacciones hemolíticas difíciles de distinguir, en tanto que las mayores pueden ocultar totalmente la hemólisis.<sup>46</sup>

**c) Cultivo:** Los estreptococos crecen a temperatura relativamente alta entre 10 a 42 °C. Los del grupo pyogenes, tienen temperatura óptima de 37 °C, con variación relativamente limitada; los del grupo viridans de 37-42 °C e incluyen una especie termófila que crece a 50 °C. La mayor parte de estreptococos son

<sup>46</sup>KONEMAN Elmer. Diagnóstico Microbiológico, Pág. 700.



anaerobios facultativos, pero hay algunas variedades de anaerobios obligados, muchos aislamientos también son estimulados por el aumento de CO<sub>2</sub>(5-10 %).<sup>47</sup>

- d) **Colonias:** La mayor parte de estreptococos crecen en medio sólido como colonias discoides, habitualmente de 1 – 2 mm de diámetro. Las colonias mates y brillantes de las cepas del grupo A del estreptococo pyogenes producen grandes zonas (1cm de diámetro) de hemólisis □ alrededor de las colonias: <sup>48</sup>
- e) **Características bioquímicas:** Fermentan varios azúcares e hidrolizan polisacáridos. El principal producto de la glucosa es el ácido láctico, formándose pequeñas cantidades de ácidos fórmico y acético y alcohol etílico. La hidrólisis del hipurato de sodio y polímeros como la inulina, almidón y dextrina, tienen cierta significación diagnóstica, junto con la fermentación de lactosa, sorbitol, glicerol, manitol, maltosa, sacarosa y rafinosa. Salvo raras excepciones, la inulina no es fermentada, y ni la bilis de buey, ni la solución de bilis de buey al 10% disuelven los estreptococos; estas características tienen importancia práctica considerable, para diferenciar estreptococos de □hemólisis, o verde, de los neumococos. <sup>49</sup>

---

<sup>47</sup> FREMAN, Bob Microbiología Burrows. Pág. 410.

<sup>48</sup> JAWETZ, MELNICK Y ADELBERG. Microbiología Medica. Pág. 250.

<sup>49</sup> FREMAN, Bob Microbiología Burrows. Pág. 410.



## 1.5.2 PEPTOESTREPTOCOCO MICROS.

### a) Requerimientos de crecimiento:

#### ❖ Anaerobiosis:

Es esencial la ausencia del oxígeno para el crecimiento de ciertas bacterias, estas son las bacterias anaerobias obligadas, que son aquellas, que se desarrollan en ausencia de oxígeno libre, y que por lo tanto, no pueden multiplicarse en presencia de oxígeno en la superficie de un medio nutricionalmente adecuado, incubado en presencia de aire ambiental o en una estufa de CO<sub>2</sub> (que contiene 5 al 10% CO<sub>2</sub> en aire).

La toxicidad del oxígeno molecular varía para las diferentes bacterias anaerobias, y no es un aceptor final de electrones para estas. En general, los anaerobios importantes en la clínica obtienen su energía por mecanismos fermentativos, en los que los compuestos orgánicos, como: los ácidos orgánicos, los alcoholes y otros productos, sirven como aceptores finales de electrones.

Los anaerobios se dividen en dos grupos principales:

1. Anaerobios obligados
2. Anaerobios aerotolerantes

#### 1. Anaerobios obligados:

Los anaerobios obligados fueron subdivididos en dos grupos según su capacidad de desarrollarse en presencia de oxígeno o de tolerarlo:





◆ **Anaerobios obligados estrictos:** No son capaces de crecer en la superficie del agar expuesto a niveles de  $O_2$  mayores del 0,5%. El oxígeno atmosférico es muy tóxico para estos microorganismos por razones que aún no se conocen por completo.

- ◆ **Anaerobios obligados moderados:** Pueden desarrollarse cuando se exponen a niveles de oxígeno que oscilan entre el 2% y el 8% (3% promedio).

## 2. Anaerobios aerotolerantes:

Son bacterias anaerobias que muestran un desarrollo limitado o escaso sobre agar incubado en aire ambiental o en una estufa con el 5 al 10% de  $CO_2$ , pero muestran buen desarrollo en condiciones anaeróbicas.

Los **anaerobios facultativos** crecen tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Es un organismo que prefiere vivir como aerobio, pero que se adapta a las condiciones anaeróbicas de crecimiento.

Los **microaerófilos** requieren oxígeno como aceptor terminal de electrones, crecen y se reproducen mejor en la presencia de una tensión reducida de oxígeno, con una pequeña cantidad de aire u oxígeno atmosférico.

- **Tolerancia al oxígeno:**

La tolerancia al oxígeno es variable y depende de la producción de enzimas en muchos anaerobios obligados. Entre estas enzimas encontramos a: la superóxido dismutasa, las catalasas, y posiblemente peroxidasas, que son protectoras contra los productos tóxicos de la reducción del oxígeno.



Un concepto aceptado es que la exposición al  $O_2$  atmosférico provoca una serie de reacciones mediadas por flavoproteínas dentro de las células bacterianas, que origina la producción de radicales superóxido cargados negativamente ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y otros productos de reducción del oxígeno. El anión superóxido y el  $H_2O_2$  pueden reaccionar en conjunto para producir radicales hidroxilo libres ( $OH^\cdot$ ) –los oxidantes biológicos más poderosos conocidos-.

La superóxido dismutasa cataliza la conversión de radicales superóxido a peróxido de hidrógeno menos tóxico y oxígeno molecular.

La catalasa cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno para formar agua y oxígeno. Varias especies de anaerobios obligados moderados aerotolerantes producen superóxido dismutasa (SOD), y el nivel de SOD se relaciona con el de tolerancia al oxígeno y la virulencia del microorganismo, sin embargo en otro estudio no se encontró esta relación, así cepas del género *Bacteroides*, varios cocos anaerobios, bacilos grampositivos anaerobios no esporulados y clostridios produjeron SOD pero no se encontró correlación entre la fuente del microorganismo, el nivel de patogenicidad supuesto y el nivel de SOD desarrollado.

Rolfe y colaboradores observaron que el grado de tolerancia al oxígeno de las bacterias anaerobias se relaciona con la proporción de bacterias en la población que sobrevive después de la exposición. En la práctica es a menudo esencial utilizar grandes inóculos cuando se siembran o se subcultivan medios de cultivo anaeróbicos, lo que probablemente sirve para reducir el efecto dañino de los múltiples factores tóxicos del oxígeno limitantes del desarrollo.



- **Potencial de óxido reducción:**

El potencial de oxido reducción ( $E_h$ ), expresado en voltios o milivoltios influye en el crecimiento del microorganismo. El  $E_h$  es afectado por el pH; por lo tanto, el potencial redox con frecuencia se expresa a pH neutro (pH 7) como  $E_h$ . Los agentes reductores como el **tioglicolato y la L-cisteína**, pueden ser agregados al medio de transporte anaerobio y a ciertos medios de cultivo para mantener las condiciones de reducción (o un bajo  $E_h$ ) en el medio.

Un potencial de oxido reducción positivo (p. ej. como lo indica un color rosa del indicador **resazurina** en ciertos medios, o un color azul del indicador azul de metileno en otros medios) significa que el medio está oxidado. Las condiciones oxidantes prevalecen en los tejidos humanos bien oxigenados y tienen un aporte sanguíneo intacto ( por ejm el  $E_h$  es de alrededor de +150 mV). Un ambiente anaeróbico (como un absceso o un tejido necrótico) o un medio de cultivo rico en hidrógeno pueden tener un  $E_h$  muy bajo (en la naturaleza el valor de  $E_h$  más bajo es -420mV).<sup>50</sup>

- **Cultivo:**

El medio de cultivo tiende a ser más rico y a tener una alta proporción de peptonas e hidratos de carbono, porque el metabolismo anaeróbico es menos eficiente que el aeróbico para obtener energía del sustrato.<sup>51</sup> (Se incuban en una atmósfera anaerobia durante 48 horas mínimo; pues el crecimiento de anaerobios es lento sobre todo cuando se siembra en agar, la temperatura óptima para el aislamiento primario de bacterias anaerobias a partir de muestras clínicas es de 35° a 37° C.

---

<sup>50</sup> KONEMAN Elmer. Diagnóstico Microbiológico Pág. 689.

<sup>51</sup> IOVINE- SELVA. El laboratorio en la clínica Pág: 1131.

- **Morfología:**

El *Peptostreptococcus micros* se presenta como cocos grampositivos que se agrupan en parejas y cadenas de 6 a 20 elementos. Los cocos presentan un diámetro de 0,3 a 0,7 micras. Debe diferenciarse de *P. magnus* el cual se caracteriza por ser más grande (0,7 a 1,2 micras de diámetro) y además los cocos pueden presentarse aislados, en parejas, tétradas y racimos.<sup>52</sup>



**Fig. 13** Peptostreptococo visto al microscopio



**Fig 14** Colonia de Peptostreptococo

- **Colonias:**

Los cocos anaerobios grampositivos forman colonias pequeñas a diminutas, convexas de color gris a blanco y opacas, con bordes enteros; la superficie puede aparecer “picada” o “marcada por depresiones”. El tamaño de la colonia oscila usualmente entre menos de 0,5 a 2mm de diámetro y puede observarse un halo de decoloración a su alrededor (*P. micros*).<sup>53</sup>

## 2. PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

<sup>52</sup> BARON/ FINEGOLD. Diagnóstico BAILEY- SCOTT Pág. 500

<sup>53</sup> IOVINE- SELVA. El laboratorio en la clínica Pág. 1139.



Antiguamente los pacientes eran tratados en forma empírica cuando se trataban infecciones bacterianas, es decir que se utilizaba un antibiótico para combatir cualquier tipo de bacteria, sólo luego del surgimiento de las cepas resistentes, los microbiólogos comenzaron a probar la sensibilidad de un microorganismo infectante frente a los agentes antimicrobianos.<sup>54</sup>

En la actualidad, el antibiograma es una técnica perfectamente estandarizada que permite, *in vitro*, definir claramente los conceptos de sensibilidad y resistencia, relacionándolos con lo que ocurre *in vivo*.

- Un microorganismo se considera sensible a un determinado antibiótico cuando éste puede alcanzar niveles plasmáticos iguales por lo menos a concentración inhibitoria mínima (CIM), en el lugar de la infección. Se considera como CIM, la mínima cantidad de microbiano capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo.
- Un microorganismo se considera resistente a un antibiótico cuando la concentración máxima de antimicrobiano que se puede conseguir en el lugar de la infección no es suficiente para afectarla, es decir, que la concentración de la droga en aquel punto es inferior a la CIM necesaria para eliminar el germen y que por efectos secundarios tóxicos es imposible elevar la dosis.<sup>55</sup>

Un agente antimicrobiano es activo contra los microorganismos y en general puede ser producido en forma natural por microorganismos o sintéticamente en el laboratorio.

---

<sup>54</sup> BARON/ FINEGOLD. Diagnóstico BAILEY- SCOTT Pág. 191.

<sup>55</sup> ALVAREZ M. / BOQUET E. / DE FEZ M. Manual de técnicas en microbiología clínica. Pág. 226.



Es importante no efectuar un antibiograma con mezclas de gérmenes, ni directamente del producto patológico, es por ello que primero debe aislarse el microorganismo.

## 2.1 CLASES DE PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA:

De acuerdo al método que se utilice tenemos:

- Métodos de difusión en agar
- Métodos de dilución en agar
- Métodos de elusión de discos en caldo
- Métodos de dilución en caldo

- **Métodos de difusión en agar (Kirby –Bauer):**

Consiste en colocar discos de papel filtro que contienen antibiótico el cual ha sido estandarizado y correlacionado con las CIM, usando un gran número de cepas bacterianas siendo un método cualitativo.<sup>56</sup>

- **Métodos de dilución en agar:**

Sirve para investigar la CIM, y es más fácil y mejor manipulación que la técnica que utiliza el medio líquido, para lo cual se preparan placas, a las que se añade la dilución del antimicrobiano incluido en proporciones de 1:10 en agar Muller Hinton, fundido y enfriado a 47-50° C.<sup>57</sup>

- **Métodos de elusión de discos en caldo:**

---

<sup>56</sup> BARON / FINEGOLD. Diagnóstico BAILEY- SCOTT Pág. 197.

<sup>57</sup> ALVAREZ M. / BOQUET É. / DE FEZ M. Manual de técnicas en microbiología clínica. Pág. 233



Emplean discos de papel filtro impregnados en las drogas como fuente de agentes antimicrobianos para las pruebas de dilución en caldo.<sup>58</sup>

- **Métodos de dilución en caldo:**

Proporciona un resultado cuantitativo de la concentración de agente antimicrobiano necesario para inhibir el desarrollo de un organismo dado.

En los métodos de dilución en caldo se colocan concentraciones decrecientes del agente antimicrobiano, generalmente diluciones al medio (1:2), en tubos con un caldo de cultivo que sostendrá el desarrollo del microorganismo.

Los agentes antimicrobianos se preparan en soluciones concentradas en un diluyente y luego se diluyen en caldo hasta obtener las concentraciones apropiadas, las cuales posteriormente se inoculan en el medio. Debe notarse que al agregar la suspensión bacteriana se diluirá tanto la concentración bacteriana como la del antimicrobiano, esto debe tenerse en cuenta al preparar el inóculo y las diluciones del agente antimicrobiano.

Un tubo de caldo se mantiene sin inocular como control negativo de crecimiento. Luego de la incubación adecuada (24 horas) se observa la turbidez de los tubos que indicará el desarrollo bacteriano. El microorganismo crecerá en el tubo control y en todos los otros que no contengan suficiente agente antimicrobiano como para inhibir el desarrollo. La menor concentración del agente, detectada por falta de turbidez se designa concentración inhibitoria mínima. Los resultados de las pruebas *in vitro* están sujetos a muchas variables, como tamaño del inóculo, velocidad de crecimiento de una bacteria,

---

<sup>58</sup>BARON/ FINEGOLD. Diagnóstico BAILEY- SCOTT Pág. 202.



periodo de incubación, naturaleza del medio usado y estabilidad del agente antimicrobiano.

La CIM mide la capacidad del agente antimicrobiano para inhibir la multiplicación del microorganismo.<sup>59</sup>

---

<sup>59</sup> BARON/ FINEGOLD. Diagnóstico BAILEY- SCOTT Pág. 194





## CAPITULO 2

### METODOLOGIA.

El presente estudio fue realizado con carácter descriptivo, en los pacientes que asisten al área de periodoncia de la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Cuenca.

#### 1. OBJETIVO PRINCIPAL:

Determinar el efecto antimicrobiano del propoleo sobre los microorganismos *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. pyogenes*, *P. micros*.

#### 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ◆ Toma de muestra de líquido sulcular, contenido de la bolsa periodontal, cara dorsal de la lengua y carrillos.
- ◆ Cultivar las muestras e identificar las cepas puras de los microorganismos de este estudio.



- ◆ Establecer a qué porcentaje mínimo de dilución el propóleo tiene acción sobre las bacterias de este estudio.

### 3. VARIABLES

- ◆ Muestra.
- ◆ Tipo de microorganismo.
- ◆ Medio de cultivo.
- ◆ Temperatura de crecimiento.
- ◆ Método de susceptibilidad bacteriana.
- ◆ Concentración de la dilución de propóleo.

### 4. MATERIALES Y METODOS.

#### TOMA DE MUESTRA:

Luego de la preparación del medio de cultivo adecuado y de los materiales necesarios para la toma de la muestra, se seleccionaron pacientes en los cuales se realizó un previo diagnóstico odontológico por parte de los estudiantes de cuarto año y con la respectiva supervisión del profesor de la Facultad de Odontología, se procedió a la toma de la muestra, en el área de clínica de Periodoncia de la facultad de odontología, y fue procesada en el laboratorio de microbiología de esta facultad.

1. Verificación del diagnóstico de la enfermedad periodontal o gingival.
2. Identificación de la lesión para la toma de la muestra.
3. Aislamiento relativo con rollos de algodón estéril.
4. Toma de la muestra para el *S. viridans* y *S. pyogenes*
  - 4.1 Con un hisopo estéril, se recoge un poco de placa bacteriana de la zona de la lesión.



- 4.2 El tubo que contiene el medio de cultivo adecuado (caldo de enriquecimiento), temperado a 37° C, se sostiene con la mano izquierda.
  - 4.3 Se retira la tapa sosteniéndola con la palma y el meñique de la mano derecha.
  - 4.4 Se flamea la boca del tubo sobre la llama de una lámpara de alcohol.
  - 4.5 Con la mano derecha se introduce el hisopo con la muestra dentro del tubo, sumergiéndolo en el medio de cultivo.
  - 4.6 Se cierra herméticamente el tubo y se procede a su rotulación.
  - 4.7 Con una sonda periodontal, de la casa comercial Hu-Fredy, de punta roma se recoge un poco mas de placa supragingival y se realiza un frotis.
  - 4.8 Se coloca el tubo en la incubadora del laboratorio de microbiología de la Facultad de Odontología a 37 °C.
  - 4.9 Se realiza la tinción de Gram de las correspondientes muestras.
5. Toma de muestra para el *Peptostreptococo micros*.
    - 5.1 Con una punta de papel para endodoncia # 20 estéril, se recoge un poco del contenido de la zona de la lesión, o exudado de bolsa periodontal.
    - 5.2 El tubo que contiene el medio de cultivo adecuado (Tioglicolato), temperado a 37° C, se sostiene con la mano izquierda.
    - 5.3 Se retira la tapa sosteniéndola con la palma y el meñique de la mano derecha.
    - 5.4 Se flamea la boca del tubo sobre la llama de una lámpara de alcohol.
    - 5.5 Con la mano derecha se introduce la punta de papel con la muestra dentro del tubo, sumergiéndolo en el medio de cultivo.
    - 5.6 Se cierra herméticamente el tubo y se procede a su rotulación.



5.7 Con la sonda periodontal, de punta roma se recoge un poco mas del contenido subgingival y se realiza un frotis.

5.8 Se coloca el tubo en la jarra Gaspack.

5.9 Se prepara el sobre de Anaerobiosis Anaerocult<sup>R</sup> A, de la casa comercial Merk, según las especificaciones del producto.

5.10 Se cierra herméticamente la jarra Gaspack y se la introduce en la incubadora del laboratorio de microbiología de la Facultad de Odontología a 37 °C.

5.9 Se realiza la tinción de Gram de las correspondientes muestras.

#### **4.2 TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN:**

El método para transportar depende de la fuente de la muestra y el tiempo que se espera durante el transporte de la misma, si este no pasa de dos horas, no son necesarias precauciones especiales.

Para el traslado de estreptococos al laboratorio debe usarse un medio de transporte como el Stuart o un selectivo para estreptococos.

La mayoría de estreptococos sobrevive varios meses en agar sangre bien tapado y conservado a 10<sup>o</sup> C. son excepciones las cepas neumocócicas y algunas cepas viridans que no sobreviven más de una semana. Ninguna cepa de estreptococos sobrevive bien en caldos de cultivo.

#### **4.3 ENRIQUECIMIENTO:**

##### **Caldo de enriquecimiento de estreptococos**

Este caldo se utiliza para el enriquecimiento y aislamiento selectivo de estreptococos, a partir de diversos tipos de muestras; que son objeto de investigación, y que se presentan contaminados con flora acompañante.



Forma de actuación:

La azida y el sulfito inhiben la flora gramnegativa acompañante. Los gérmenes gram-positivos ya son considerablemente inhibidos por la pequeña concentración de violeta cristal, en tanto que los Estreptococos no resultan aún inhibidos por esta concentración.

### Composición g/l

Peptona de caseína	14.4
Peptona de harina de soja	5.0
Cloruro sódico	4.0
D(+) glucosa	5.0
Citrato sódico	1.0
L-cistina	0.2
Sulfito sódico	0.2
Azida sódica	0.2
Violeta cristal	0.0002
Agar-agar (ausente en el caldo)	13.0

Preparación: Disolver 30g/litro (para el Caldo de enriquecimiento), o bien 43g/litro (para el agar selectivo), distribuir eventualmente en tubos y esterilizar en autoclave (15min a 121° C). no recalentar. El agar selectivo se vierte en placas.



pH 7.4 ± 0.1

Los medios de cultivos preparados, listos para el uso, son claros e incoloros.<sup>60</sup>

## 5. AISLAMIENTO:

Con el crecimiento obtenido en los tubos procedemos a sembrar en agar sangre.

### 1. Agar sangre (base):

Su abundante base nutritiva ofrece condiciones óptimas de crecimiento a todos los microorganismos presentes. El valor del pH de 6,8 es especialmente favorable para la conservación de los eritrocitos y para la formación de halos hemolíticos claros, para la determinación de las formas de hemólisis es adecuado añadir sangre de oveja recién obtenida, desfibrinada.

### Composición g/l:

Sustrato nutritivo (Extracto de corazón y peptonas) 20,0; cloruro sódico 5,0;

Agar- agar 15,0.

Aditivo: sangre 50-80ml.

### Preparación:

Disolver 40g/litro, esterilizar en autoclave (15min a 121° C), dejar enfriar a 45-50° C, incorporar 5 a 8% de sangre desfibrinada y verter en placas.

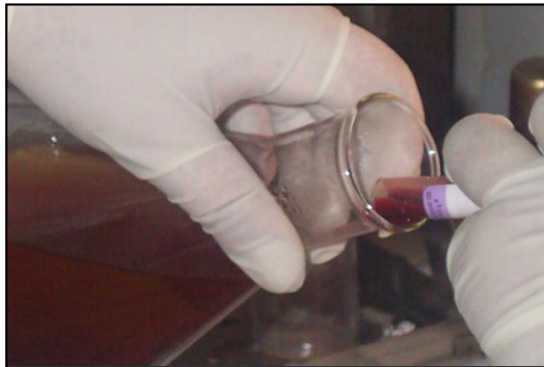
pH: 6,8 ± 0,2

---

<sup>60</sup>MERCK. Manual de Cultivos Merk. Pág. 158

El medio de cultivo preparado es, antes de la adición de la sangre, claro y amarillo parduzco y posteriormente a la adición de la sangre del color de la misma y no hemolizado.

Guardadas en fundas plásticas selladas, en la nevera, las placas de agar-sangre preparadas, listas para el uso, son utilizables durante tres meses como máximo<sup>61</sup>



**Fig. 15 Adición de sangre de oveja al agar**

## **2. Sangre para la base de agar**

En agar sangre se detecta la capacidad de ciertas bacterias para producir enzimas extracelulares que actúan sobre los glóbulos rojos ya sea por la lisis completa (□- hemólisis) o por coloración verdosa alrededor de las colonias (□- hemólisis) o por ausencia de alteración (□- hemólisis). La producción de hemólisis por las bacterias depende de muchos factores ambientales como pH y atmósfera de incubación. Para leer la hemólisis hay que ver la placa contra la luz.

Para preparar agar sangre se debe usar sangre de oveja sana, por las siguientes razones:

---

<sup>61</sup> MERCK. Manual de Cultivos Merk. Pág. 148-149

1. La sangre de oveja contiene factor X (hemina) indispensable para el desarrollo de algunos microorganismos
2. Tiene factor V (nicotina adenín nucleótido NAD) también muy importante para el desarrollo.
3. La sangre de oveja inhibe el crecimiento de *H. haemolyticus*, *H. parahaemolyticus* (□- hemólisis) que no serán confundidos con los estreptococos.
4. Esta es preferida por los estreptococos de reacción hemolítica, no dando los mismos resultados con otras sangres.
5. No se debe usar sangre humana porque contiene inhibidores específicos y no específicos para el crecimiento bacteriano (anticuerpos, complemento, antibióticos). Además no se debe usar las pintas de sangre porque contienen exceso de citrato que inhibe el crecimiento de Gram positivos.



**Fig. 16 Obtención de sangre de oveja con vacutainer**

### **3. Fijación de la Placa:**

Si el medio es líquido, tomamos una asada y colocamos en la placa portaobjeto. En el caso del agar (medio sólido) se coloca una gota de agua estéril sobre la placa portaobjetos y sobre ella una asada de la colonia





problema. Secamos con el calor de la llama de una lámpara de alcohol, para fijar la muestra.

Para la preparación de los portaobjetos para la coloración de Gram, la fijación con metanol es mucho mejor que con el calor.<sup>62</sup> (

Nosotros utilizamos la fijación con metanol pues no se pierde la muestra al hacer la tinción de Gram, de manera especial cuando la muestra proviene de un medio de cultivo líquido.

#### 4. Tinción Gram:

Luego del enriquecimiento y aislamiento de la muestra, realizamos un análisis microscópico por tinción de Gram.

#### Reacción química de la coloración de Gram:

- **Violeta Cristal:** En el proceso de reacción química de la coloración de Gram, cuando una bacteria se tiñe con el violeta de cristal se dice que ha tomado la coloración Gram, y se presenta de un color violeta característico, por esta reacción las bacterias se denominan GRAM POSITIVAS.

Las bacterias Grampositivas tienen proteoglicanos y ácido teicoico, y es a éstos últimos que se fija el complejo violeta cristal-yodo.

- **Solución Yodo:** En el proceso de tinción el violeta de cristal se combina con el yodo, y forma un complejo insoluble en la estructura bacteriana que está constituido por magnesio-ácido ribonucleico-proteína-hidrato de

---

<sup>62</sup> KONEMAN Elmer. Diagnóstico Microbiológico. Pág 699.



carbono, el cual no puede ser liberado al exterior, por la acción del alcohol que actúa como disolvente.

- **Alcohol:** En el caso de las bacterias Grampositivas, que son menos permeables a las moléculas pequeñas y no pueden atravesar su pared, el alcohol cierra los poros de la membrana celular y no deja escapar al exterior el complejo violeta de cristal-yodo, dando el color violeta a la célula.

En las bacterias Gramnegativas, la constitución de la pared es diferente, pues contiene un alto contenido de lípidos que son disueltos y extraídos por el alcohol. El alcohol aumenta también la porosidad de la membrana celular y penetra en el interior de la bacteria para extraer el complejo violeta de cristal-yodo que se elimina fácilmente al exterior.

- **Fucsina:** Así la bacteria queda momentáneamente incolora, pero al añadir el colorante secundario o de contraste, como la fucsina o safranina, éste se fija y tiñe la bacteria de color rojo o rosado, que es el característico de las bacterias gramnegativas.

Entonces la observación de las bacterias en el campo microscópico, las grampositivas se ven siempre de color violeta y las gramnegativas se presentan de color rojo o rosado<sup>63</sup>

## Reactivos

---

<sup>63</sup> SALAZAR Wilson. Guía de prácticas de laboratorio. Pág 699.

**Solución de violeta cristal**

Violeta de genciana.....2g

Oxalato de amonio..... 20ml

Alcohol de 95° GL..... 20ml

Agua destilada.....80ml

Disolver el violeta en alcohol. Añadir la solución de oxalato en el agua. Mezclar las soluciones y filtrar después de 24 horas.

**Solución de yodo:**

Cristal de yodo.....1g

Yoduro de potasio.....2g

Agua destilada.....30ml

Disolver el yoduro en un poco de agua y añadir poco a poco los cristales de yodo, agitar hasta disolución total y agregar el resto del agua.

**Alcohol acetona:**

Acetona.....30ml

Alcohol absoluto.....70ml

Mezclar y homogenizar.

**Fuscina básica:**

Fuscina básica.....1g

Alcohol absoluto.....90cc

Disolver la fuscina en el alcohol absoluto.



## TINCIÓN:

1. Colocamos la placa sobre un soporte.
3. Se coloca solución de violeta de cristal de tal manera que cubra toda la muestra, esperamos 1 minuto y se enjuaga.
4. Se aplica la solución de yodo por 1 minuto para luego enjuagar.
5. Luego se agrega alcohol-cetona, se espera 30 segundos y se enjuaga.
6. Finalmente se pone unas gotas de fuscina se deja 30 segundos y se lava.
7. Se seca el portaobjetos al ambiente o con un papel absorbente sin remover la muestra.

## 6. PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESTREPTOCOCOS VIRIDANS

### ❖ PRUEBA DE LA OPTOQUINA

#### **Optoquina. Discos de diferenciación**

Los discos de optoquina son elaborados de papel impregnados con una solución de clorhidrato de hidroetil - cupreína, se utiliza para diferenciar *Streptococcus pneumoniae* (neumococos); de estreptococos  $\alpha$  hemolíticos.

#### **Bases Bioquímicas:**

El clorhidrato de hidroetilcupreína es un derivado del alcaloide hidroquinina, que se prepara por demetilación, hidrogenación y etilación de la quinina.

La optoquina tienen una sensibilidad específica para el *S. neumoniae* y es bacteriostática en concentración de 1: 500.000 a 1:100.000. Las otras especies de estreptococos  $\alpha$  hemolíticos requieren una concentración de 1:500 o mayor para inhibir el crecimiento.

El neumococo, como otros estreptococos, es un habitante común de las vías respiratorias, ha sido implicado en infecciones respiratorias, endocarditis bacteriana subaguda y neumonía. En agar sangre, los neumococos proporcionan reacciones hemolíticas que son indistinguibles de las de otros estreptococos  $\alpha$  hemolíticos. Por ello la diferenciación e identificación de estos microorganismos, requiere métodos serológicos o bioquímicos. La prueba serológica más aceptada es la reacción de Neufeld Quellung<sup>64</sup>. Se encontró que aunque algunas cepas de estreptococos  $\alpha$  hemolíticos daban pequeñas zonas de inhibición, eran claramente distinguibles de las zonas de los neumococos, que eran más amplias, bien definidas y marcadas.

### Procedimiento.

1. Rayar las placas con un asa o una torunda lo suficiente como para obtener un crecimiento confluyente.
2. Utilizando técnica aséptica, colocar el disco en la superficie inoculada y presionar suavemente el disco sobre el agar.
3. Invertir e incubar las placas a 35 a 37 °C durante 18 - 24 horas hasta que aparezca crecimiento.
4. Observar si aparece zona de inhibición alrededor de los discos.

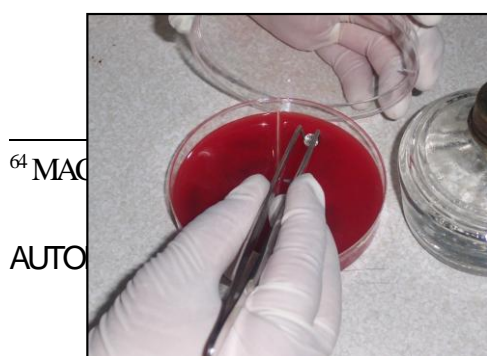


Fig. 18 Optoquina resistente

**Fig. 17 Colocación del disco de optoquina**

### **Interpretación:**

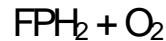
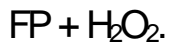
La ausencia de un halo de inhibición es una reacción positiva para los estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos y excluye al neumococo.

### **❖ CATALASA:**

**Principio.** La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en oxígeno y agua, salvo los estreptococos, la mayoría de bacterias aerobias y anaerobias facultativas poseen actividad catalasa.

### **Bases Bioquímicas:**

El peróxido de hidrógeno es uno de los productos oxidativos finales del metabolismo aerobio de los carbohidratos. La flavoproteína reducida reacciona directamente con el oxígeno gaseoso por medio de la reducción de electrones, para formar peróxido de hidrógeno.

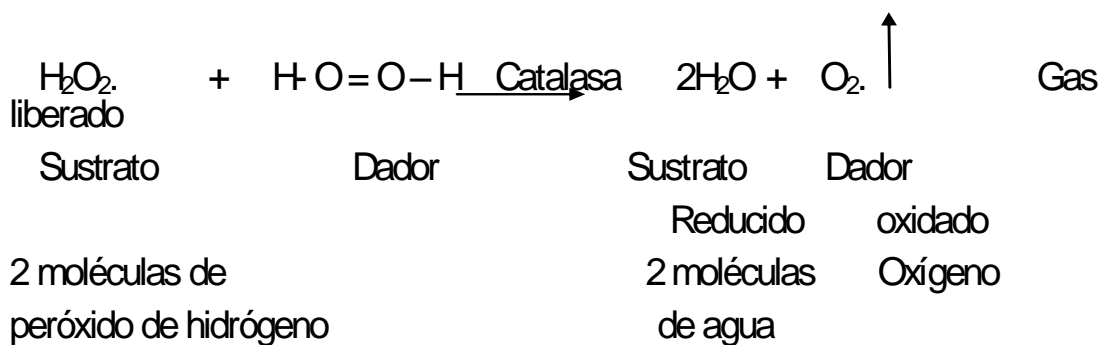


Flavoproteína reducida      Flavoproteína oxidada



El peróxido de hidrógeno si se deja acumular, es tóxico para las bacterias y provoca su muerte. La catalasa descompone el peróxido de hidrógeno u oxida los sustratos secundarios.

En la descomposición del peróxido de hidrógeno una molécula actúa como el sustrato y la otra como el dador; el sustrato reducido por los átomos de hidrógeno cedidos por el dador, da como resultado un sustrato reducido y un dador oxidado.



### Método.

**Procedimiento.** La prueba se realiza en porta-objetos, se coloca una gota de agua oxigenada 10V sobre una asada de la colonia a analizarse y se observa cuidadosamente la aparición de burbujas.

### Interpretación:

La rápida aparición y sostenida producción de burbujas de gas o efervescencia constituye un resultado positivo. Como algunas bacterias pueden tener otras enzimas que descompongan al peróxido de hidrogeno, la producción de unas pocas burbujas después de 20 - 30" no se considera positivo. Se emplea para



diferenciar los estreptococos (negativo) de los estafilococos (positivo), o para diferenciar los bacilos gram-positivos de las micobacterias.

**Precaución.** La catalasa esta presente en los eritrocitos y hay que tomar precauciones para evitar que se produzca una falsa reacción positiva, si se toma de un cultivo de agar sangre.<sup>65</sup>

## 7. DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES DEL ESTREPTOCOCO VIRIDANS

La mejor manera de diferenciar especies dentro del grupo viridans, es la utilización de carbohidratos, ya que cada especie tiene su predilección.

### ❖ Hidratos de Carbono.

Los carbohidratos son fuente de energía para las bacterias y además sirven para la identificación de especies. La capacidad de un organismo para atacar un carbohidrato en particular es una característica definida de especies bacterianas y, bajo condiciones controladas, permanece constante para el organismo a través de generaciones de cultivo en medios.

### **Bases Bioquímicas.**

Los hidratos de carbono se clasifican como:

Monosacáridos: en el caso de terrosas, pentosas, hexosas; por ejemplo:

---

<sup>65</sup> MAC FADDIN J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias. Pág. 39 - 41.

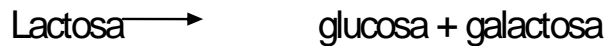




4 carbonos (tetrosa:  $C_4H_8O_4$ ) *Eritrosa*

Polisacáridos u oligosacáridos:

Disacáridos: compuestos por dos unidades de monosacáridos, glucosa más otro monosacárido:



El trisacárido *rafinosa* ( $C_{18}H_{32}O_{16}$ ) está compuesto por tres monosacáridos: glucosa, fructosa y galactosa.

Un ejemplo de polisacárido es la inulina que está formada por muchos polímeros del monosacárido fructosa.

Los alcoholes que colectivamente reciben el nombre de “azúcares” son el adonitol, dulcitol, manitol y sorbitol; todos son alcoholes polihídricos que son producto de la reducción de un monosacárido.



Los polisacáridos, trisacáridos y disacáridos son demasiado complejos para entrar en una célula bacteriana para su degradación; por lo tanto, primero son catabolizados en monosacáridos menos complejos por enzimas exocelulares (permeasas) de manera que puedan penetrar en la célula.

La fermentación es un proceso metabólico de oxidación-reducción *anaeróbico* en el cual un sustrato orgánico sirve como aceptor de hidrógeno final (aceptor de electrones) en lugar del oxígeno. La fermentación de sustratos orgánicos como los carbohidratos dan productos finales reducidos y oxidados.



No todos los monosacáridos son degradados por todas las especies bacterianas; sus formas de fermentación difieren, ayudando a la identificación del grupo, género o especie.

Así mismo, las bacterias muestran diferencias en los ciclos utilizados para la fermentación del mismo sustrato, dando como resultado diferentes productos finales. La forma y el grado en que es desasimilado un sustrato dependen de la especie bacteriana y de las condiciones de cultivo.

El ciclo de fermentación que produce como producto final el ácido láctico es el más difundido.<sup>66</sup>

### **Método:**

Se prepara un medio libre de azúcar, generalmente un caldo de fermentación. Aparte se prepara ampollas de 10 ml de agua destilada estéril, con 1 g de carbohidrato.

Se añade los carbohidratos en una concentración de 0,5 a 1% en un caldo de fermentación. El medio es luego inoculado con el organismo a probar e incubado a 35 +/- 2°C. Las lecturas se realizarán generalmente a las 18 - 24 horas y a las 40 - 48 horas. La lectura más temprana se efectúa para detectar una posible reversión de las reacciones y la última se realiza para detectar bacterias de reacción más lenta.

### ❖ **Caldo De Fermentación:**

#### **Fórmula:**

---

<sup>66</sup> MAC FADDIN J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias. Pág. 27,28.

Extracto de carne	0.5 g
Proteosa peptona	1 g
Agua destilada	100 cc

### Procedimiento:

Calentar hasta ebullición total de los ingredientes. Añadir 1 cc de Indicador de Andrade. Distribuir el caldo a razón de 8cc. en cada tubo y colocar un tubo Durhan. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 15lbs de presión. Al momento de usar añadir 0.8cc de una solución de azúcar preparada al 10 %.



Fig. 19 Adición de azúcar al caldo de fermentación

### Indicador de Andrade:

#### Fórmula:

Fushina ácida	0.5 g
Agua destilada	100 ml
Solución NaOH 1 N	12 cc

- Mezclar la fushina ácida con el agua y añadir poco a poco la Solución Normal de NaOH hasta producir una solución rosa a pardo (más o



menos 12 cc). Agregar por agitación 1 cc de NaOH hasta que la solución sea incolora, se añade 1 cc por cada 100 cc de caldo de fermentación.

## 8. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LA BACITRACINA PARA ESTREPTOCOCOS DEL GRUPO A

Prueba desarrollada por Maxted en 1953 en la que se observa que los estreptococos del grupo A son inhibidos por concentraciones bajas de bacitracina (0,02 a 0,04 U) en discos de papel sobre el medio de agar.

**Método.** Se utiliza bajas concentraciones de bacitracina en un disco colocado directamente sobre la placa de aislamiento primario. Es necesario utilizar cultivos puros ya que la técnica no es adecuada para cultivos mixtos.

La susceptibilidad a bajas concentraciones del antibiótico polipeptídico bacitracina proporciona un método sencillo y económico para la identificación presuntiva de estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos de los grupos A y B. Los estreptococos del grupo A son sensibles a concentraciones relativamente bajas de bacitracina. Los estreptococos del grupo B en cambio son resistentes.

### Reactivos:

- A. Placa con agar sangre de carnero
- B. Discos diferenciales de bacitracina "Taxo" A (0,04 unidades/disco).

**Procedimiento:**

1. Tomar tres o cuatro colonias aisladas de estreptococos  $\square$  hemolíticos y estriar el inóculo hasta el centro de la mitad de una placa de agar sangre (trazando un radio).
2. Con un asa diseminar el inóculo sobre toda la mitad de la placa, cruzando en zig-zag sobre el trazo anterior.
3. Colocar en forma aséptica un disco de bacitracina “Taxo” A sobre el área sembrada. Utilizando un pinza flameada, golpear con suavidad los discos para que se adhieran a la superficie del agar.
4. Incubar la placa en aire ambiental a 35° C.



**Fig. 20 Colocación del disco de Bacitracina**

**Interpretación:**

1. Sensible: cualquier tamaño de halo alrededor del disco.
2. Resistente: Desarrollo hasta el borde del disco.
3. El resultado se informa como “estreptococo  $\square$  hemolítico, presumiblemente grupo A, por prueba de bacitracina” o “estreptococo  $\square$  hemolítico, presumiblemente no grupo A, por prueba de bacitracina”.

4. Debido a que estas pruebas se realizan sobre aislamiento de fauces, en los cuales se sospecha la presencia de estreptococos grupo A, la presunción de grupo B por lo general no se informa, en el caso de una muestra de S. O. F. (secreción orofaríngea).



Fig. 21 Bacitracina resistente

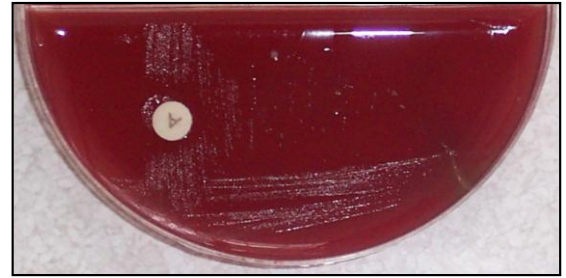


Fig. 22 Bacitracina sensible

### Limitaciones de la prueba:

Deben probarse solamente los estreptococos  hemolíticos, ya que muchos estreptococos  hemolíticos (incluidos los neumococos) son susceptibles a bajas concentraciones de bacitracina.

La capa de inóculo bacteriano debe ser confluyente. Un inóculo demasiado diluido puede hacer que los estreptococos no pertenecientes al grupo A parezcan sensibles a la bacitracina<sup>67</sup>

## 9. REACCIÓN SOBRE EL MEDIO DE BILIS ESCULINA PARA ESTREPTOCOCOS DEL GRUPO D.

Se recomienda el uso de este medio para aislamiento e identificación presuntiva de estreptococos del grupo D.

El valor de la Hidrólisis de la Esculina en la identificación de enterococo es muy grande, en medio biliar, proporciona la mejor prueba diferencial. Se encontró que 61 de 62 cepas de enterococos hidrolizaban esculina en medio

<sup>67</sup> KONEMAN Elmer. Diagnóstico Microbiológico. Pág. 1260, 1261.



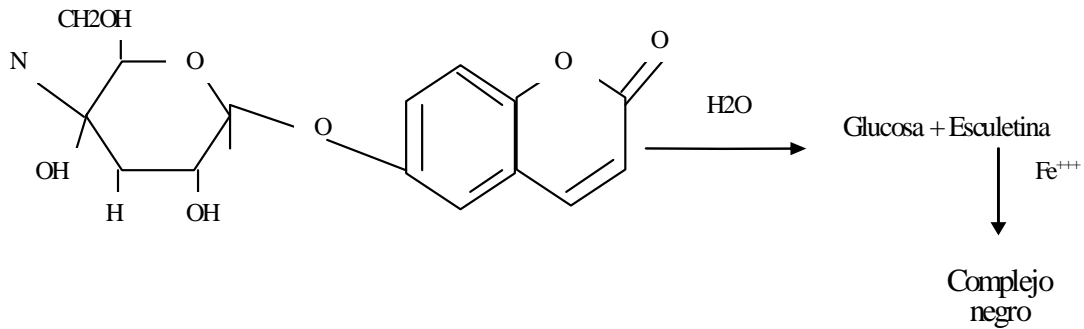
conteniendo bilis. Se observaron reacciones positivas solo con *Streptococcus* del grupo D y grupo Q.

Los estreptococos del grupo D crecen rápidamente en el agar de esculina biliar e hidrolizan la esculina, lo que da un color marrón oscuro al medio. Esta reacción denota su tolerancia biliar, capacidad de hidrolizar la esculina, y constituye una reacción positiva. Unos pocos estreptococos toleran la bilis, pero no hidrolizan la esculina, no impartiendo coloración al medio.

Las bacterias gramnegativas son inhibidas por la azida de sodio y las bacterias positivas, distintas del grupo D, son inhibidas por las sales biliares. El color marrón, resultado de la hidrólisis de la esculina aparece luego de las 18 - 24 horas de incubación a 35 – 37 °C.

### **Bases bioquímicas:**

Las bacterias capaces de crecer en bilis y de hidrolizar la esculina producen glucosa y esculetina de aglucona (7,7 dihidroxicuramina) en un medio apropiado. La esculetina reacciona con las sales de hierro y forma un complejo marrón oscuro o negro que resulta en un ennegrecimiento difuso del medio de bilis esculina, que contiene citrato férrico como fuente de iones férricos.



La Fórmula exacta del complejo de hierro fenólico formado con la esculetina no se conoce. Algunas formulaciones de bilis esculina incluyen también azida de sodio para inhibir el crecimiento de microorganismos gramnegativos; lo que forma el medio selectivo para estreptococos. Los medios de cultivo sin azida de sodio por lo general contienen 4% de sales biliares que los vuelve inhibitorios de algunos microorganismos gram negativos pero más selectivos para los estreptococos del grupo D.

**Medios y reactivos:** Agar base con esculina y Bilis. Para identificación de estreptococos del grupo D.

**Fórmula:**

Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Bilis de buey	40 g
Esculina	1 g
Citrato férrico	0.5 g
Agar	15 g

pH final: 6.6 +/- 0.2 a 25 °C.



**Modo de Preparación:**

1. Suspendeda 63 g en un litro de agua destilada o desionizada y caliente hasta ebullición para que se disuelva por completo.
2. Dispense en tubos o frascos, tal como desee.
3. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión. El sobre calentamiento puede causar oscurecimiento del medio. Enfriar a 50 – 55 °C y dispense en placas petri estériles. Si se pone en tubos, el medio ha de solidificarse en posición inclinada.

**Procedimiento:**

Se toman muestras de 2 ó 3 colonias de medios de aislamiento primario con un alambre Inoculador o una asa. Se inocula la superficie de un agar inclinado en forma de S o se siembra en la superficie de una placa de agar.

**Interpretación:**

La esculetina al ser soluble en agua difunde en el medio de agar. La prueba se considera positiva cuando se observa el ennegrecimiento difuso en el agar inclinado, o un halo negro o marrón alrededor de las colonias en la placa de agar, el ennegrecimiento se observa en la zona de reacción con los microorganismos que hidrolizan la esculina.<sup>68</sup>

---

<sup>68</sup> KONEMAN Elmer. Diagnóstico Microbiológico. Pág. 1261,1262



❖ **Prueba de crecimiento en Caldo Hipersalino al 6,5 % (Tolerancia al cloruro de sodio)**

En ésta prueba se determina la capacidad que tienen algunos microorganismos de desarrollar en medios de cultivo con una concentración de ClNa 6,5 %.

**Medios y reactivos:** El medio de cultivo utilizado es el caldo de tripticasa de soya adicionado 6,5 % de ClNa.

Medio Tripticasa Soya:

Triptosa	17 g
Peptona de Soya	3 g
Fosfato dipotásico	2.5 g
Glucosa	2.5 g
ClNa	65 g
Agua destilada	1 l

pH : 7.3

**Adaptación de la fórmula:**

Utilizamos como medio de prueba el caldo BRAIN con adición de 6.5 % de ClNa.

**Medio de Brain Heart Infusión**

AUTORES: Juan Bernardo Solano Hermida.  
Liliana Abril.  
Grace Mejía.

**Fórmula:**

Infusión de Cerebro	12.5 g
Infusión de Corazón	5 g
Proteosa Peptona	10 g
D (+) glucosa	2 g
CINa	5 g
Bifosfato disódico	2.5 g

pH: 7.4 +/- 0.2

**Preparación:** Se disuelve 37 g del medio en 1000 cc de agua destilada (añadimos también 6.5% de CINa para el análisis), calentar en autoclave 15 minutos a 121 °C, enfriar a 45 – 50 °C, distribuir en tubos.

**Procedimiento:** Inocular con 1 o 2 asadas del cultivo problema en un tubo de prueba con caldo tripticasa de soya, o el medio de adaptación de BRAIN. Incubar a 35 – 37 °C durante 24 – 48 horas, esperando a las 72 horas para darlo como negativo.

**Interpretación:** El crecimiento (turbidez) en el caldo se considera como positivo. Si no se observa crecimiento, al cabo de las 48 horas, se incuba hasta 72 horas, si el crecimiento no se manifiesta, se da por negativa la prueba<sup>69</sup>

## 10. IDENTIFICACIÓN DE ESTREPTOCOCOS ANAEROBIOS

### 10.1 TOMA DE LA MUESTRA:

---

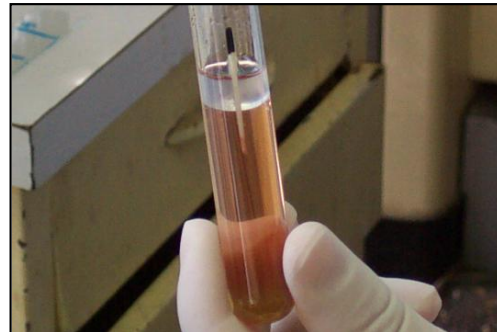
<sup>69</sup> KONEMAN Elmer. Diagnóstico Microbiológico. Pág. 1344

En bolsas gingivales y periodontales, las puntas de papel estériles son una alternativa, se introduce una fina punta de papel en la profundidad de la bolsa y se deja por 10 segundos, luego se coloca inmediatamente en diluyente pre-reducido (caldo de carne, Tioglicolato, el de Ringer, o extracto de levadura). Debido a la naturaleza fastidiosa y sensible al oxígeno de los anaerobios el procesamiento que se sugiere (preferentemente en una cámara de anaerobiosis) es esencial para obtener resultados clínicamente relevantes.<sup>70</sup>

La recolección de las muestras con hisopos debe ser desechada debido a que se desecan y a que se exponen los anaerobios presentes al oxígeno ambiental. Una vez realizada la recolección, debe tomarse precauciones particulares para proteger las muestras de la exposición al oxígeno, y derivarlas con rapidez al laboratorio.



**Fig. 23 Toma de muestra para anaerobios con punta de papel**



**Fig. 24 Colocación de punta de papel con la muestra en tioglicolato**

<sup>70</sup> SUMMANEN. Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual. Pág. 25.



## 10.2 ENRIQUECIMIENTO

El tioglicolato enriquecido es un medio líquido no inhibitorio, permite el buen desarrollo de todos los anaerobios encontrados con frecuencia en los materiales clínicos.

Es recomendado especialmente para conservar colonias procedentes de cultivos en placas.<sup>71</sup>

### ❖ MEDIO DE CULTIVO TIOGLICOLATO (ENRIQUECIDO):

Para el crecimiento y cultivo de microorganismos anaerobios. Este medio puede utilizarse para diversos fines en el aislamiento e identificación de estos gérmenes.

#### **Forma de actuación:**

Las sustancias reductoras tioglicolato, cisteína y sulfito sódico producen una anaerobiosis suficiente para los anaerobios exigentes. Al igual que otros medios, tioglicolato, es adecuado tanto para la investigación de muestras clínicas como para materiales o conservantes que contengan metales pesados. Una eventual penetración de oxígeno atmosférico se hace visible por el viraje a rojo del indicador redox Resazurina.

---

<sup>71</sup> KONEMAN Elmer. Diagnóstico Microbiológico. Pág. 702.

**Composición (g/litro)**

Peptona de caseína	17
Peptona de harina de soja	3
D (+)-glucosa	6
Cloruro sódico	2,5
Sulfito sódico	0.1
Tioglicolato sódico	0.5
L-cisteína	0.5
Agar-agar	0.3

pH: 7.0 +0,1

Aditivos: Vitamina K<sub>1</sub> 0.001g/l; Hemina 0.005 g/l.

**Preparación.**

Disolver 30g/litro, añadir 0,5 ml de solución de Hemina al 1% y 0,1ml de solución de Vitamina K<sub>1</sub> al 1%. Distribuir la mezcla en tubos y esterilizar en autoclave (15 min a 121° C). Después de la esterilización en autoclave no debe colocarse de forma inmediata en el refrigerador, sino que hay que esperar que se enfríe a temperatura ambiente. De esta manera se evita la penetración de oxígeno atmosférico. Inmediatamente después del enfriamiento recubrir el contenido de los tubos con una capa de 1cm de altura de parafina líquida

AUTORES: Juan Bernardo Solano Hermida.  
Liliana Abril.  
Grace Mejía.



estéril o bien colocarlos en una atmósfera anaeróbica (obtención con Anaerocult<sup>R</sup> A) y cerrarlos herméticamente, por ejemplo con tapas de rosca.

Los tubos preparados y listos para el uso conservarlos en la nevera.

No puede utilizarse cuando debido a la penetración de oxígeno muestre un color rosa en más de un tercio y este color no haya podido eliminarse calentando hasta ebullición por una sola vez.

*Preparación de la solución de Vitamina K1 (1%):* Disolver 1g de vitamina K1 (Konakion-Roche) en 99ml etanol absoluto.

*Preparación de la solución de Hemina (1%):* Disolver 1g de Hemina en 5ml de NaOH 1N y a continuación completar con agua destilada hasta 100ml.

### **Empleo e interpretación:**

El material objeto de estudio se siembra en los tubos hasta el fondo real del medio de cultivo.

Incubación: de 3 a 5 días a 35° C.

Los gérmenes anaerobios se desarrollan en la parte inferior del tubo.<sup>72</sup>

### **10.3 OBTENCIÓN DE ANAEROBIOSIS**

Para la obtención de un ambiente anaerobio en la jarra para Anaerobios utilizamos Anaerocult<sup>R</sup> A que consta de un soporte plástico, en el que se coloca un sobre que contiene una mezcla de reactivos que fija el oxígeno y libera

---

<sup>72</sup>MERCK. Manual de Medios de Cultivo. Pág. 250

dióxido de carbono simultáneamente. La adición de agua al sobre, inicia la reacción que consiste, en lo esencial, en una oxidación del hierro finamente dividido. La reacción transcurre sin ayuda de catalizador.

### Componentes:

Gel de sílice (tierra silíceo)

Polvo de hierro

Ácido cítrico

Carbonato sódico

### Empleo

Las placas de Petri sembradas se colocan en la jarra para anaerobios. En el interior de la misma se coloca una bolsa de Anaerocult<sup>®</sup> A, humedecida con 35ml de agua al lado del cesto para la jarra de anaerobios. Se cierra la jarra y se somete a incubación.<sup>73</sup>

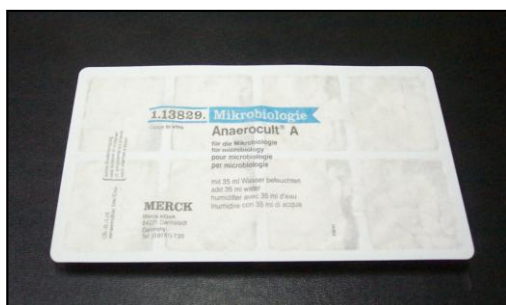


Fig. 25 Sobre de anaerobiosis

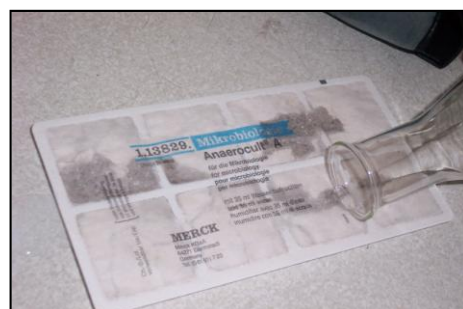


Fig. 26 Preparación con sobre de anaerobiosis

<sup>73</sup> MERCK. Manual de Medios de Cultivo. Pág. 297.





## 10.4 AISLAMIENTO:

### ❖ Agar Sangre para Anaerobios

Utilizamos el agar sangre base para anaerobios de los CDC (Centers for Disease Control). Es un medio para placas de agar sangre no selectivo para el aislamiento primario de todos los tipos esenciales de anaerobios encontrados en los materiales clínicos. Consta de agar base de tripticasa soya con 5% de sangre de carnero; suplementado con extracto de levadura, hemina, vitamina K1 y L- cistina para el desarrollo de anaerobios que requieren factores de crecimiento adicionales.

### Composición:

Agar Tripticasa soya	15g
Cloruro de sodio	5g
Agar	20g
Extracto de levadura	5g
Hemina	5mg
Vitamina K1	10mg
L- Cistina	400mg
Agua destilada	1 L

AUTORES: Juan Bernardo Solano Hermida.  
Liliana Abril.  
Grace Mejía.



Sangre (de carnero o conejo) desfibrinada. 50ml

pH: 7,4+ 0,1. <sup>74</sup>

**Preparación:**

Pesar los componentes y disolverlos en el agua. Esterilizar en autoclave (15 min a 121 °C). Tras enfriamiento a 45-50° C, añadir los 50 ml de sangre de carnero estéril y verter en placas.

## 10.5 PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESTREPTOCOCOS ANAEROBIOS

❖ **Reacción de Esculina:**

**Principio:** El medio de esculina sin bilis es útil para diferenciar varias especies de bacilos no fermentadores. La esculina es un glucósido sustituido que puede ser hidrolizado por ciertas bacterias para producir glucosa y esculetina. La esculina es un compuesto fluorescente bajo luz ultravioleta a 360 nm. Cuando se hidroliza la fluorescencia se pierde y el medio vira al negro, debido a la reacción de la esculetina con los iones férricos presentes en el medio.

**Medios y reactivos: Agar base con bilis esculina:**

- Agar esculina modificado:

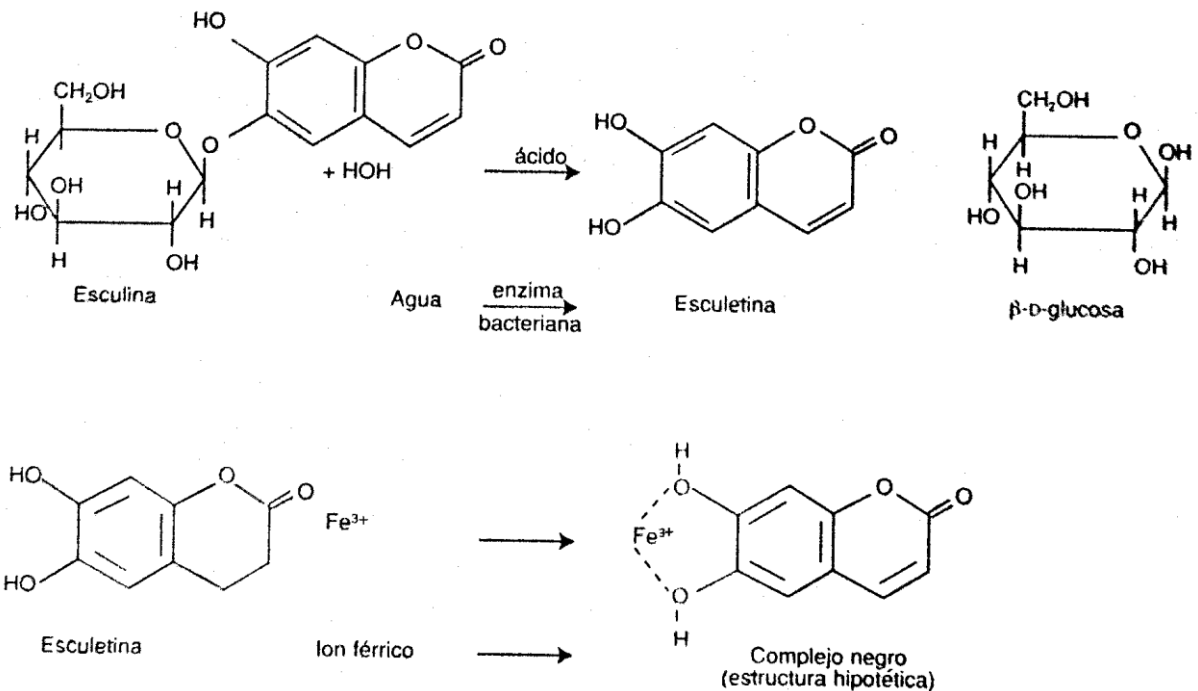
---

<sup>74</sup> KONEMAN Elmer. Diagnóstico Microbiológico. Pág. 700.

Esculina	1 g.
Citrato férrico	0.5 g.
Agar infusión corazón	40 g.
Agua destilada csp.	1 L

**Interpretación:** El desarrollo de un color negro o la pérdida de fluorescencia bajo luz ultravioleta (360 nm.) se interpreta como un resultado positivo. La presencia de fluorescencia o la ausencia de color negro indican un resultado negativo.<sup>75</sup>

### MECANISMO PROPUESTO DE LA REACCIÓN DE ESCULINA



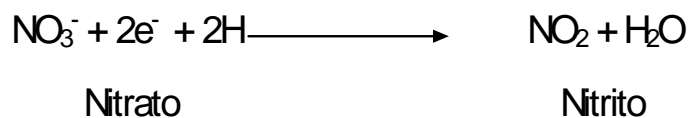
### ❖ Reducción del Nitrato:

<sup>75</sup> KONEMAN Elmer. Diagnóstico Microbiológico. Pág. 1290, 1291.



**Fundamento:** La capacidad de un microorganismo para reducir los nitratos a nitritos es una característica importante, que se utiliza para identificar y diferenciar especies de muchos grupos. Todas las Enterobacteriaceae, excepto ciertos biotipos de *Paratuberculosis* agglomerans y algunas cepas de *Serratia* y *Yersinia* producen reducción de los nitratos. La prueba también es de utilidad para identificar miembros de los géneros *Haemophilus*, *Neisseria* y *Moraxella*. Los microorganismos que reducen los nitratos tienen la capacidad de extraer oxígeno de aquellos para formar nitritos y otros productos de reducción.

La ecuación química es:



La presencia de nitritos en el medio de prueba se detecta por el agregado de  $\alpha$ -naftilamina y ácido sulfanílico, con formación de un colorante rojo de diazonio, el p-sulfobencenoazo- $\alpha$ -naftilamina.

#### Medio de cultivo y reactivos:

- Caldo o agar (pico de flauta) para nitratos:

Extracto de carne	3 g.
Peptona	5 g.
Nitrato de Potasio (KNO <sub>3</sub> )	1 g.
Agar (libre de nitritos)	12 g.
Agua destilada csp.	1 L.



- Reactivo A:

□-Naftilamina	5 g.
Acido acético (5N), 30 %	1 L

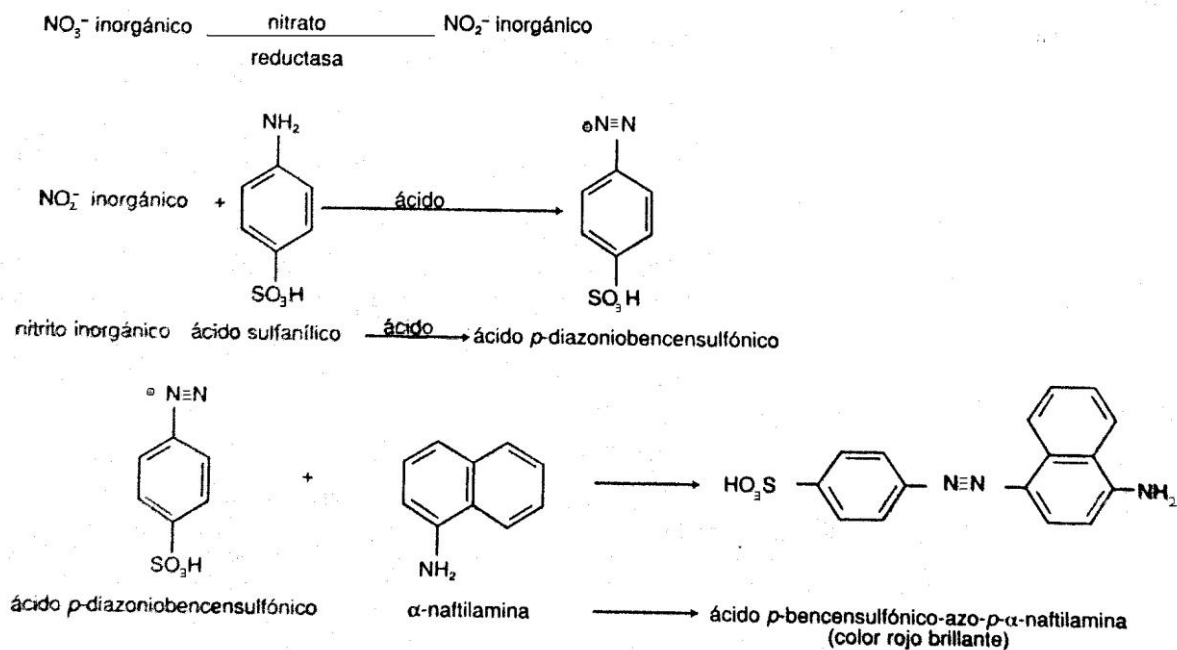
- Reactivo B:

Acido Sulfanílico	8 g.
Acido acético (5N), 30 %	1 L

**Interpretación:** El desarrollo de un color rojo dentro de los 30 segundos después de agregar los reactivos de prueba indica la presencia de nitritos y presenta una reacción positiva para reducción de nitratos. Si no se observa color después de agregar los reactivos de prueba, puede ser que no se hayan reducido los nitratos a nitritos (reacción realmente negativa), o que hayan sido reducidos a productos diferentes a los nitritos, como amoníaco, nitrógeno molecular (desnitrificación), óxido nítrico (ON) u óxido nitroso ( $N_2O$ ), e hidroxilamina. Debido a que los reactivos de prueba solo detectan los nitritos, los últimos procesos dan resultados falsos negativos. Por lo tanto es necesario agregar una pequeña cantidad de polvo de zinc a todas las reacciones negativas. Los iones zinc reducen los nitratos a nitritos, y el desarrollo de un

color rojo después de agregar el agente indica la presencia de nitratos y confirma que la reacción es verdaderamente negativa.<sup>76</sup>

### MECANISMO PROPUESTO PARA LA REACCIÓN DE REDUCCIÓN DE NITRATOS



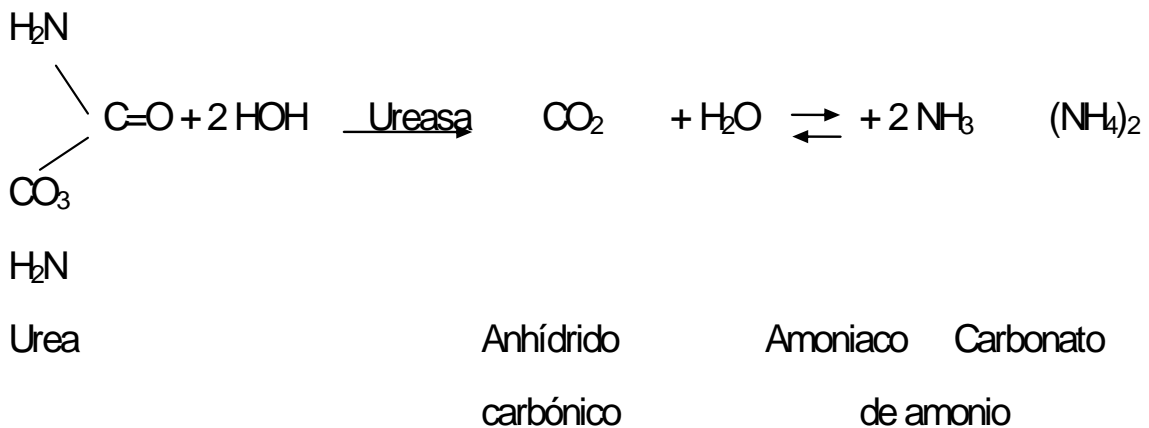
### ❖ Ureasa

#### Bases Bioquímicas:

<sup>76</sup> KONEMAN Elmer. Diagnóstico Microbiológico. Pág. 1327, 1328.

AUTORES: Juan Bernardo Solano Hermida.  
Liliana Abril.  
Grace Mejía.

El sustrato urea es una diamina del ácido carbónico, a la que frecuentemente se menciona como carbamida. La hidrólisis de la urea es catalizada por una enzima específica, la ureasa para dar dos moléculas de amoníaco. En solución, el amoníaco reacciona dando carbonato de amonio como producto final.



Todas las amidas se hidrolizan fácilmente, con liberación de amoníaco y dióxido de carbono. La ureasa es una enzima que poseen muchas especies de microorganismos. La ureasa actúa sobre los enlaces C-N del compuesto, con excepción de los que contienen enlaces peptídicos.

### Caldo urea de Stuart

#### Ingredientes

Extracto de levadura	0.1g
Fosfato monopotásico	9.1g
Fosfato disódico	9.5g
Urea	20g

AUTORES: Juan Bernardo Solano Hermida.  
Liliana Abril.  
Grace Mejía.



Rojo fendl	0.01g
Agua destilada csp	1L

**Procedimiento:**

El medio líquido se siembra con una ansada del cultivo puro del microorganismo a probar. Se incuba a 35° C durante 18 a 24 horas.

**Interpretación:**

Los microorganismos que hidrolizan la urea producen rápidamente reacciones positivas dentro de 1 a 2 horas; las especies menos activas pueden requerir 3 días o más. La reacción en el caldo se determina por la presencia de un color rojo en todo el medio que indica alcalinización e hidrólisis de la urea.<sup>77</sup>

**❖ Hidrólisis de la Gelatina:****Principio:**

Determinar la capacidad de un organismo de producir enzimas de tipo proteolítico (gelatinasas) que licuan la gelatina.

**Bases Bioquímicas**

Ciertas bacterias son capaces de producir enzimas de tipo proteolítico que actuará después sobre las proteínas (que naturalmente son demasiado grandes para entrar en la célula bacteriana) para convertirlas en moléculas más pequeñas capaces de entrar en la bacteria. Ya que son específicas las

---

<sup>77</sup> KONEMAN Elmer. Diagnóstico Microbiológico. Pág. 1350, 1351.





bacterias que tienen esta capacidad de desdoblar las proteínas, esta característica ayuda a la identificación bacteriana.

El catabolismo de las proteínas por las gelatinazas es un proceso en dos etapas, y el resultado final da una mezcla final de aminoácidos individuales.



### Medio de gelatina con tioglicolato:

El medio de gelatina puede prepararse agregando simplemente una concentración de gelatina al 5% a un medio de tioglicolato deshidratado. Este medio permite la determinación de la licuefacción bacteriana de la gelatina sin tener en cuenta los requerimientos de oxígeno; por lo tanto, no se necesitan métodos de incubación especiales (por ejemplo, anaerobiosis).

Peptona de caseína	17g
Peptona de harina de soja	3g
D (+)-glucosa	6g
Cloruro sódico	2,5g
Sulfito sódico	0.1g

<sup>78</sup> MAC FADDIN J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias Pág. 84, 87.



Tioglicolato sódico	0.5g
L-cisteína	0.5g
Agar-agar	0.3g
Gelatina	50g

**Medio deshidratado comercial:** (Medio en polvo listo para usar)

- Pesar la cantidad indicada en el envase (128g/litro).
- Rehidratar con agua destilada o desmineralizada.
- Calentar suavemente hasta su disolución
- Distribuir en tubos.
- Esterilizar a 121° C durante 15 minutos.
- Enfriar en posición vertical y refrigerar para su conservación (4-10° C).

**Procedimiento:**

- Mantener en el refrigerador los tubos de gelatina hasta el momento de su inoculación. El medio debe estar solidificado.
- Con una aguja de inoculación se toma colonias de un cultivo puro de 18 a 24 h en un cultivo conveniente.
- Hacer una punción en el medio hasta una profundidad de 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> a 2<sup>1</sup>/<sub>2</sub> cm.
- Preparar un tubo de control para hacer la prueba junto con los de la batería en estudio. Rotular control.



- Incubar los tubos simultáneamente los tubos de prueba y control a 35° C/ 24h.

### **Interpretación.**

Observar si hay crecimiento (turbiedad) y licuefacción. Al término de cada periodo de 24 h, colocar ambos tubos (bacteria y control) en un refrigerador durante periodo suficiente (aproximadamente 2h) para determinar si se ha producido o no la digestión de la gelatina (licuefacción).

Hacer el traspaso de la incubadora al refrigerador sin agitar los tubos.

#### **1. Positivo:**

- a) Organismo en estudio: medio licuado.
- b) Tubo de control: el medio se mantiene sólido.

#### **2. Negativo**

- a) Organismo en estudio: el medio se mantiene sólido.  
Tubo de control: el medio se mantiene sólido. <sup>79</sup>

## **11. PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD CON PROPÓLEO**

Para la realización de la prueba de susceptibilidad con el propóleo, se utilizó el método de dilución del antibiótico natural (propóleo) en caldo en cantidades decrecientes, a la cual se adicionó la suspensión estandarizada de bacterias ajustada al Factor 0,5 Mac Farland, para luego sembrar en agar sangre y

---

<sup>79</sup> MAC FADDIN J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias Pág. 88.

realizar el conteo de colonias según inhibición bacteriana en mayor o menor grado.

### 11.1 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE PROPÓLEO:

Debido a la naturaleza de tipo resinosa del propóleo este es soluble en alcohol de 60° GL. La solución de propóleo se preparó al 60%, para luego con las diferentes diluciones en caldo se obtengan las concentraciones en estudio como son: 10, 15, 20, 25 y 30% en el caso de: *S. sanguis*, *S. pyogenes*, y *P. micros*; y 20, 25, 30, 35 y 40 % en el caso de *S. mitis*.

#### Procedimiento:

1. Pesar 60g de propóleo en una caja petri estéril.
2. Adicionar 100 ml de alcohol de 60° GL para obtener una solución de propóleo al 60%.
3. Proteger la solución de la luz y el calor, colocándola en un envase ámbar.
4. A partir de la solución madre de propóleo se realiza las siguientes concentraciones:

CANTIDAD DE MUESTRA AJUSTADA AL FACTOR 0.5 MAC FARLAND	SOLUCIÓN DE PROPÓLEO AL 60 %	MEDIO DE BHI	CONCENTRACION TOTAL DE SOLUCIÓN DE PROPÓLEO A INOCULAR EN EL MEDIO
500 $\mu$ l	500 $\mu$ l	-	30 %

500 ml	400 ml	100 ml	25 %
500 ml	350 ml	150 ml	20 %
500 ml	250 ml	250 ml	15 %
500 ml	150 ml	350 ml	10 %



Fig. 27 Dilución de propóleo

## 11.2 PREPARACIÓN PATRÓN 0.5 MAC FARLAND:

El patrón Mac Farland, es un estándar de turbidez, consiste en una suspensión de Sulfato de Bario estándar con agua estéril, preparado agregando: 0.5 ml de una solución de Cloruro de Bario al 1 % (11.7 g /L de  $\text{BaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) a 99.5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 1 %, el cual representa un número de  $1,5 \times 10^8$ /ml de bacterias suspendidas en una solución, las mismas que después fueron cuantificadas por recuento de colonias.<sup>80</sup>

<sup>80</sup> SUMMANEN. Wadsworth anaerobic Bacteriology Manual.



### 11.3 ESTANDARIZACIÓN DE COLONIAS CON PATRÓN 0.5 MAC

#### **FARLAND:**

Esta estandarización se logra con un cultivo puro, inoculando colonias idénticas en 1 a 2 ml de BHI y ajustar su turbidez al Factor 0,5 Mac Farland, esto garantiza una concentración constante de microorganismos la cual equivale a aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  organismos/mililitro.

### 11.4 SIEMBRA EN AGAR SANGRE:

#### **a) *S. viridans* y *S. pyógenes*:**

Obtenida la solución resultante entre la muestra y las diferentes concentraciones de propóleo, esta se mezcla hasta que sea homogénea y con un hisopo estéril escurrido se procede a la siembra en el medio de cultivo adecuado para la prueba de susceptibilidad (Agar Sangre), realizando estriaciones en tres sentidos: horizontal, vertical y transversal.

**Incubación:** Se realiza a 35 °C por 24 horas, con un 5 – 10 % de CO<sub>2</sub>, logrado colocándolos en una caja de metal, con una vela encendida, la misma que consume el oxígeno presente en la caja y se obtiene de esta manera las condiciones requeridas.

#### **b) *P. micros*:**

Obtenida la solución resultante entre la muestra y las diferentes concentraciones de propóleo, esta se mezcla hasta que sea homogénea y con una micro pipeta se toman 20  $\mu$ l y se los deposita en un extremo del medio de

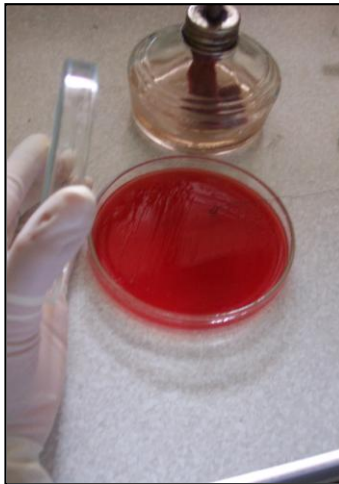
cultivo destinado para la prueba de susceptibilidad (Agar Sangre para anaerobios), para luego con el ayuda de una asa, se lleva esta solución desde la parte superior del medio hacia abajo en forma vertical, y se realiza una estriación en un solo sentido.

**Incubación:** Se realiza a 35 °C por 24 horas, en una jarra que provee de anaerobiosis a los cultivos (Jarra Gas – Pack), y se utiliza además sobres de Anaerocult obteniéndose de esta manera las condiciones requeridas.

**Fig. 28** Colocación de muestra con propóleo sobre agar sangre para anaerobios



**Fig. 29** Estriación de la muestra con propóleo con una asa



**Fig. 30** Jarra de anaerobiosis con sobre de Anaerocult®



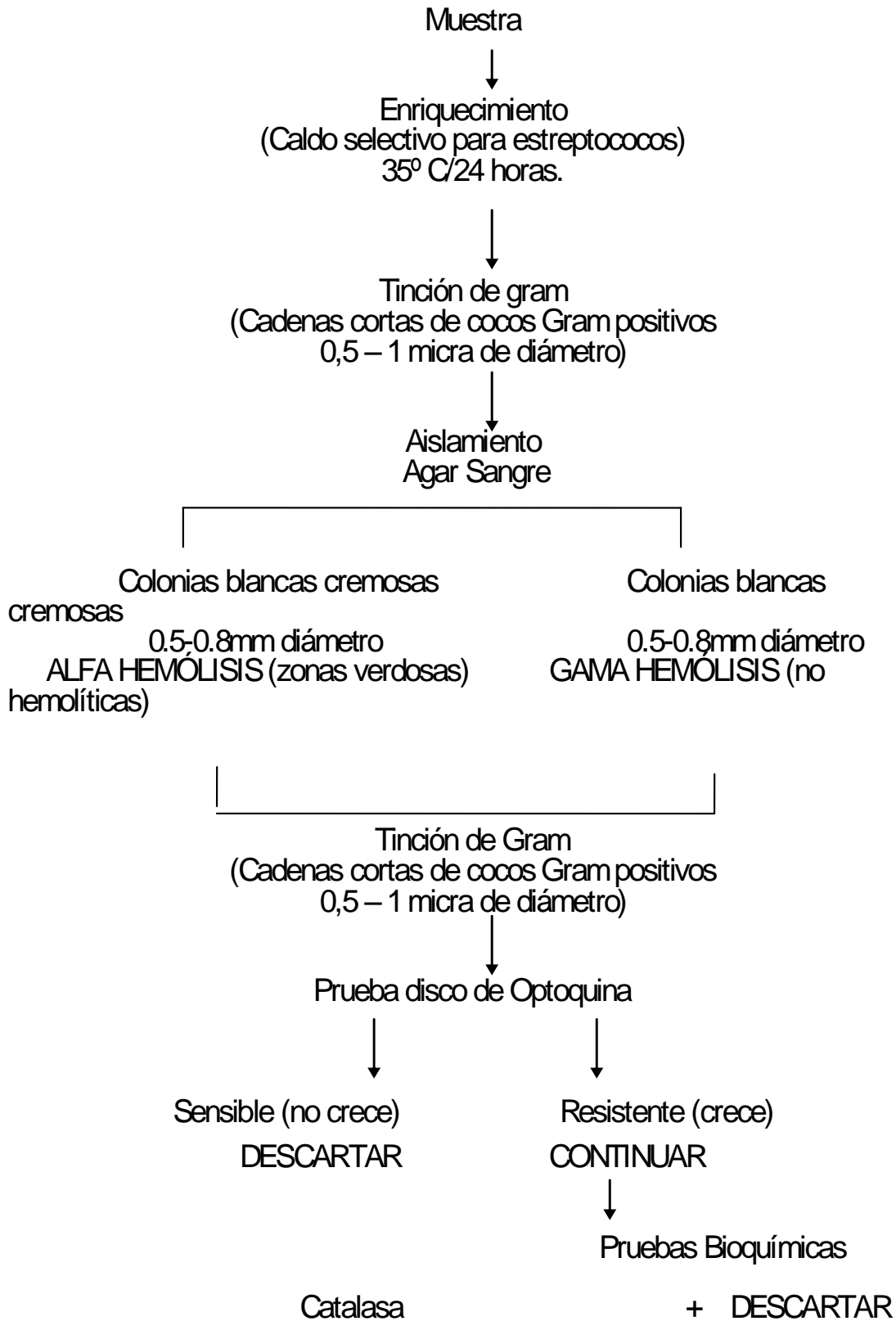
## 12. FLUJOGRAMA DE TRABAJO

a) **S. viridans:**  
*Streptococo sanguis*

AUTORES: Juan Bernardo Solano Hermida.  
Liliana Abril.  
Grace Mejía.



*Streptococo mitis*



AUTORES: Juan Bernardo Solano Hermida.  
Liliana Abril.  
Grace Mejía.





- CONTINUAR



Bilis Esculina

+ DESCARTAR

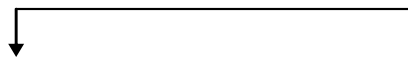
- CONTINUAR



Tolerancia al NaCl

+ DESCARTAR

- CONTINUAR



Pruebas de fermentación:

- ◆ Manitol
- ◆ Sorbitol
- ◆ Inulina
- ◆ Rafinosa

Hemólisis

Especie	α	β	γ	FD	CINa 6.5%	Arginina	Almidón	Lactosa	Manitol	Sorbitol	Inulina	Rafinosa
S. mutans	-*	+	+	-*	-	-*	-	+	+	+	+*	+*
S. sanguis	+	-	-*	-*	-	+*	+*	+	-	-*	-*	-*
S. salivarius	-*	-	+	-*	-	-	-*	+*	-	-	+*	+*
S. mitis.	+	-	-*	-	-	-	-	+	-	-	-	-

+ Reacción Positiva  
- Reacción negativa

\* Existen excepciones ocasionales

Aislamiento agar sangre

AUTORES: Juan Bernardo Solano Hermida.  
Liliana Abril.  
Grace Mejía.



BHI 35° C/24 horas.



Prueba Sensibilidad 35° C/24 horas.



CANTIDAD DE MUESTRA (microorganismo) AJUSTADA AL FACTOR 0.5 MAC FARLAND	SOLUCION DE PROPOLEO AL 60 %	MEDIO DE BHI	CONCENTRACION TOTAL DE SOLUCIÓN DE PROPOLEO A INOCULAR EN EL MEDIO
500 $\mu$ l	500 $\mu$ l	-	30 %
500 $\mu$ l	400 $\mu$ l	100 $\mu$ l	25 %
500 $\mu$ l	350 $\mu$ l	150 $\mu$ l	20 %
500 $\mu$ l	250 $\mu$ l	250 $\mu$ l	15 %
500 $\mu$ l	150 $\mu$ l	350 $\mu$ l	10 %

Nota: El procedimiento para la prueba de sensibilidad es el mismo para el resto de microorganismos.

**b) S.  $\alpha$  hemolítico Grupo A:**

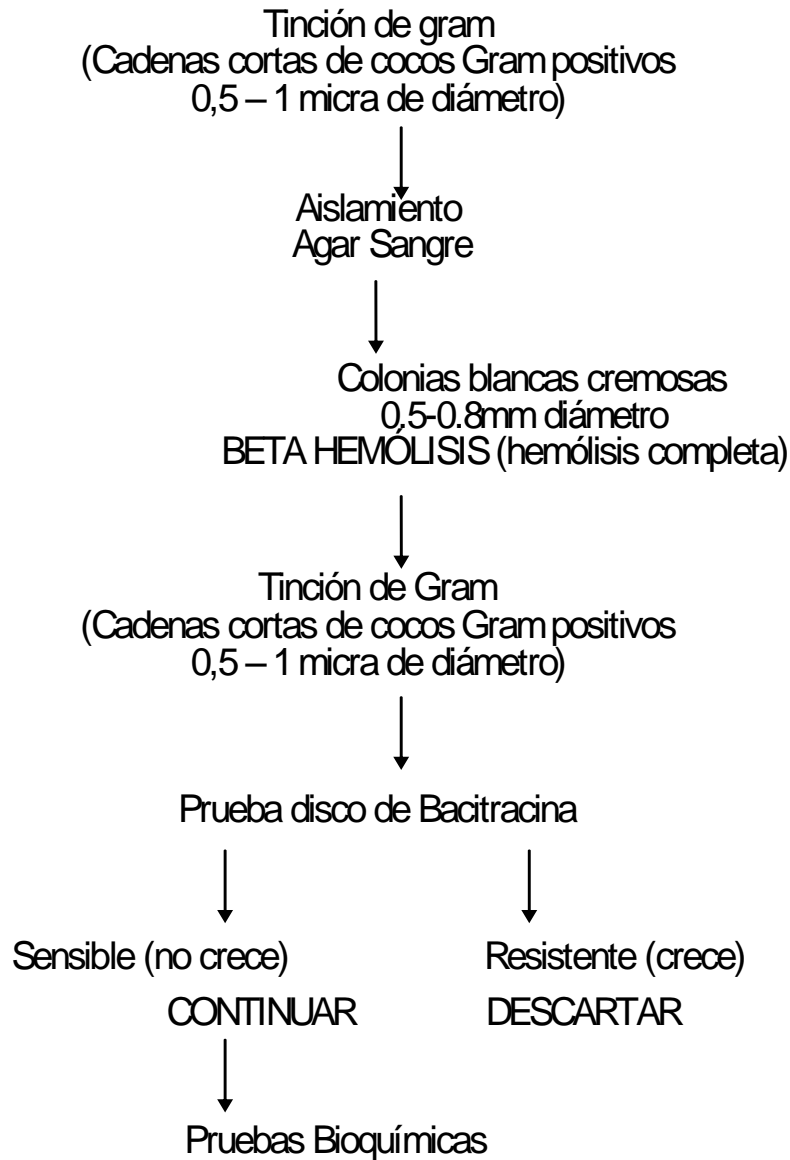
Muestra



Enriquecimiento  
(Caldo selectivo para estreptococos)  
35° C/24 horas.



AUTORES: Juan Bernardo Solano Hermida.  
Liliana Abril.  
Grace Mejía.

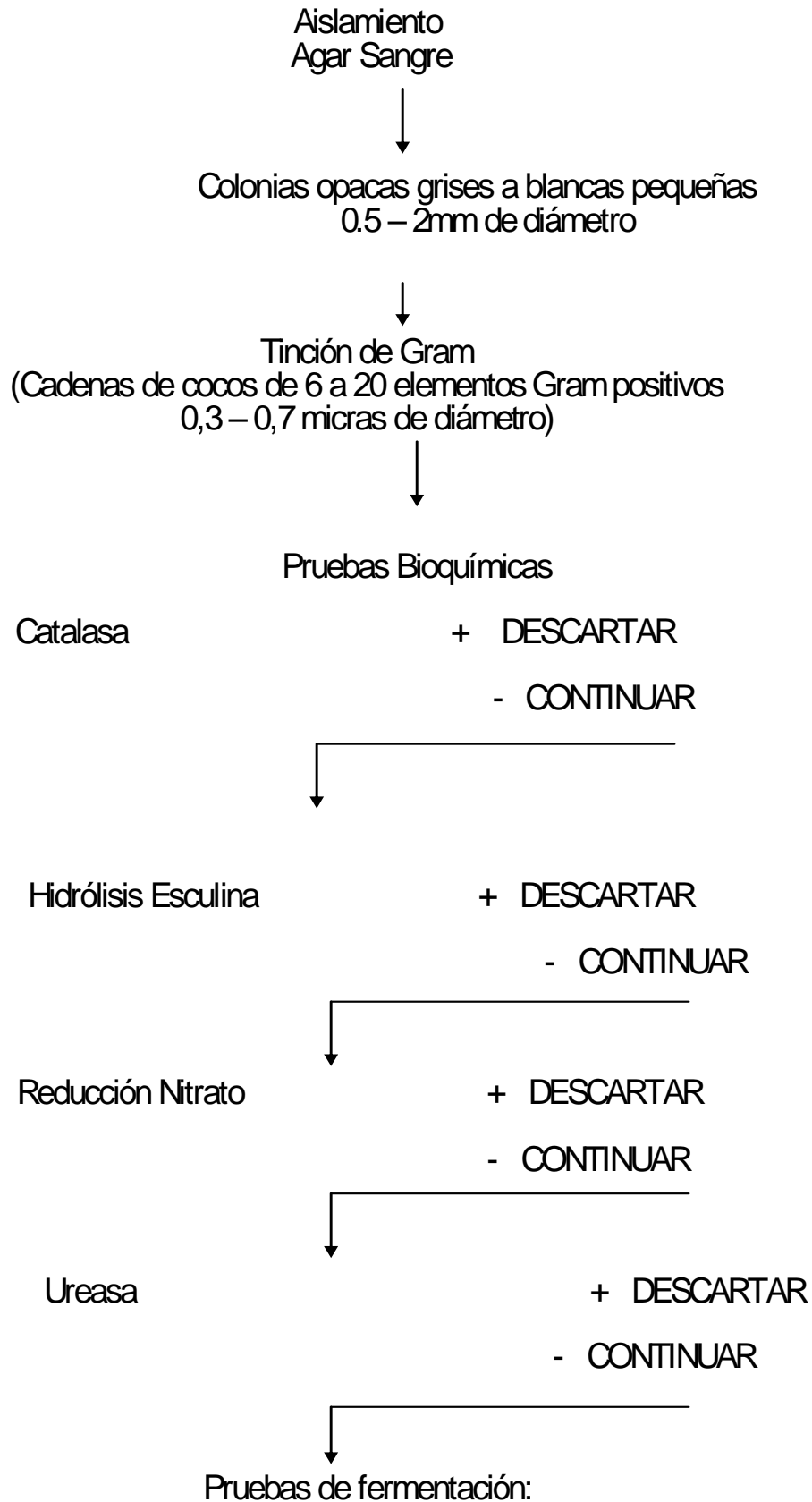


Catalasa + DESCARTAR  
- CONTINUAR

Bilis Esculina + DESCARTAR  
- CONTINUAR

AUTORES: Juan Bernardo Solano Hermida.  
Liliana Abril.  
Grace Mejía.







- Glucosa
- Maltosa
- Lactosa
- Manosa
- Sacarosa

Especie	Reducción	Hidrólisis	Catalasa	Ureasa	Glucosa	Maltosa	Lactosa	Manosa
<i>P. anaerobius</i>	-	-	-	-	- o débil	- o débil	-	-
<i>P. micros</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. productus</i>	-	+	-	V	+	+	+	+
<i>P. asaccharolyticus</i>	-	-	V	-	-	-	-	-
<i>P. magnus</i>	-	-	V <sup>+</sup>	-	- o débil	-	-	-
<i>P. prevotii</i>	-	-	V	V	+ o débil	- o débil	-	V
<i>P. indolicus</i>	+	- o débil	-	-	-	-	-	-
<i>P. tetradius</i>	-	-	V	+	+	+	-	+

+ Reacción Positiva

- Reacción negativa V Existen excepciones ocasionales  
Aislamiento agar sangre

↓  
BHI 35° C/24 horas.

↓  
Prueba Sensibilidad 35° C/24 horas.

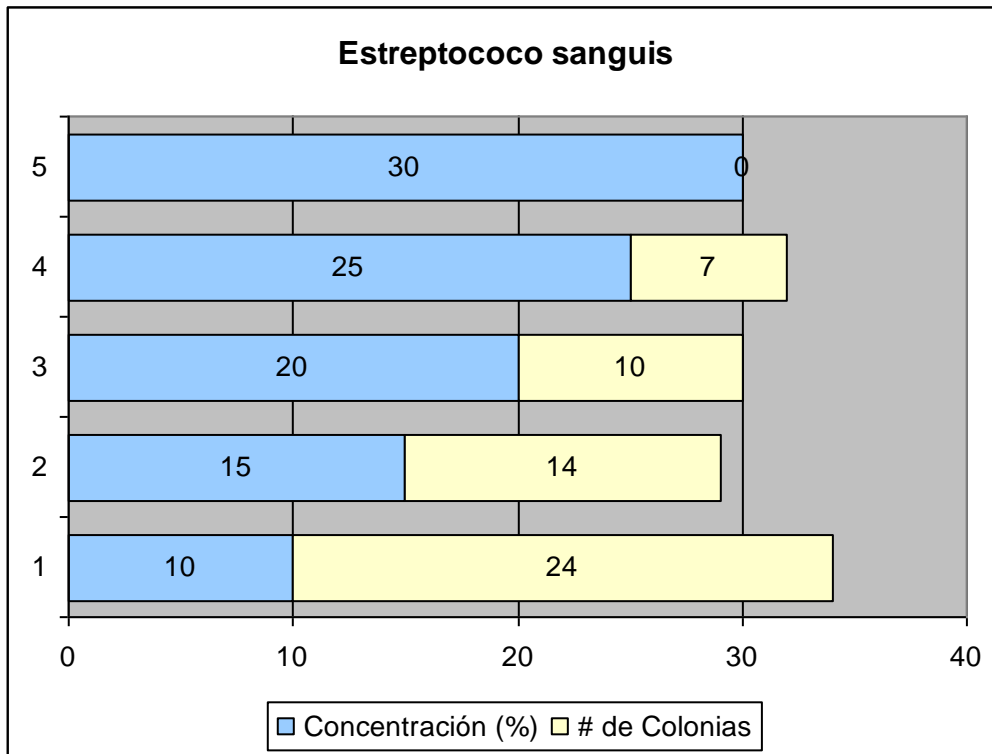
## CAPITULO 3

### RESULTADOS

#### PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA CON PROPÓLEO

##### ❖ ESTREPTOCOCO SANGUIS

g% Propóleo	# de Colonias
10	24
15	14
20	10
25	7
30	0

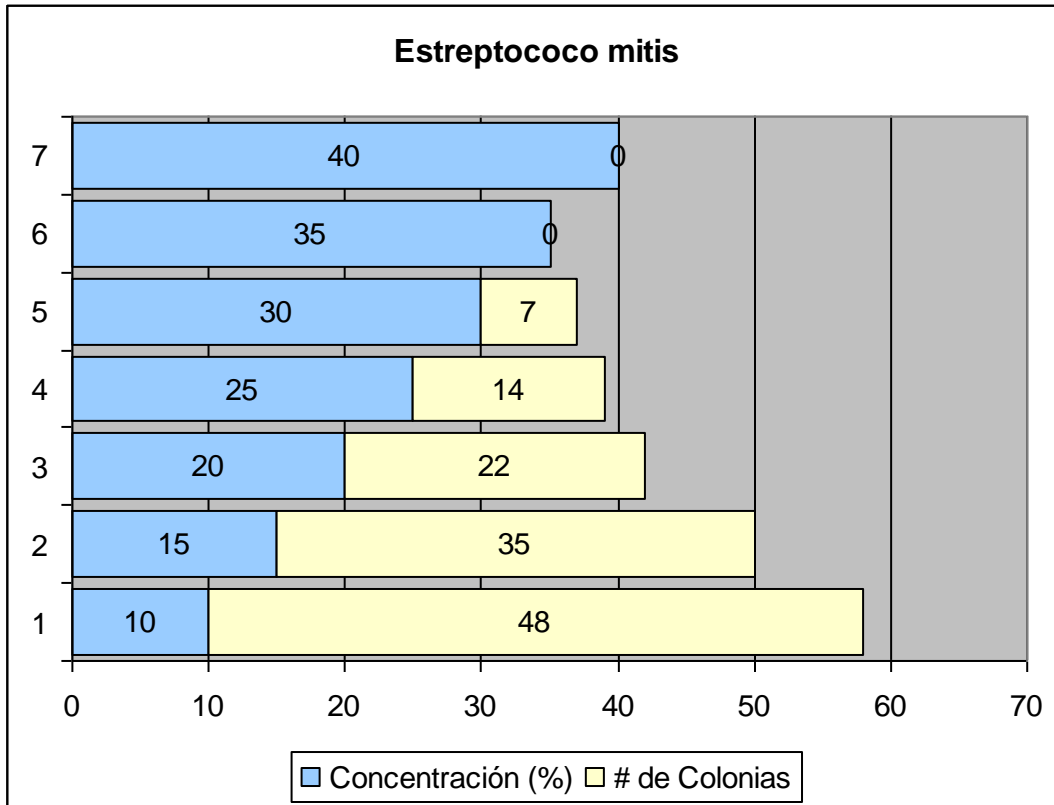


❖ **ESTREPTOCOCO MITIS**

g% Propóleo	# de Colonias
10	48
15	35
20	22
25	14
30	7
35	0
40	0

AUTORES: Juan Bernardo Solano Hermida.  
Liliana Abril.  
Grace Mejía.

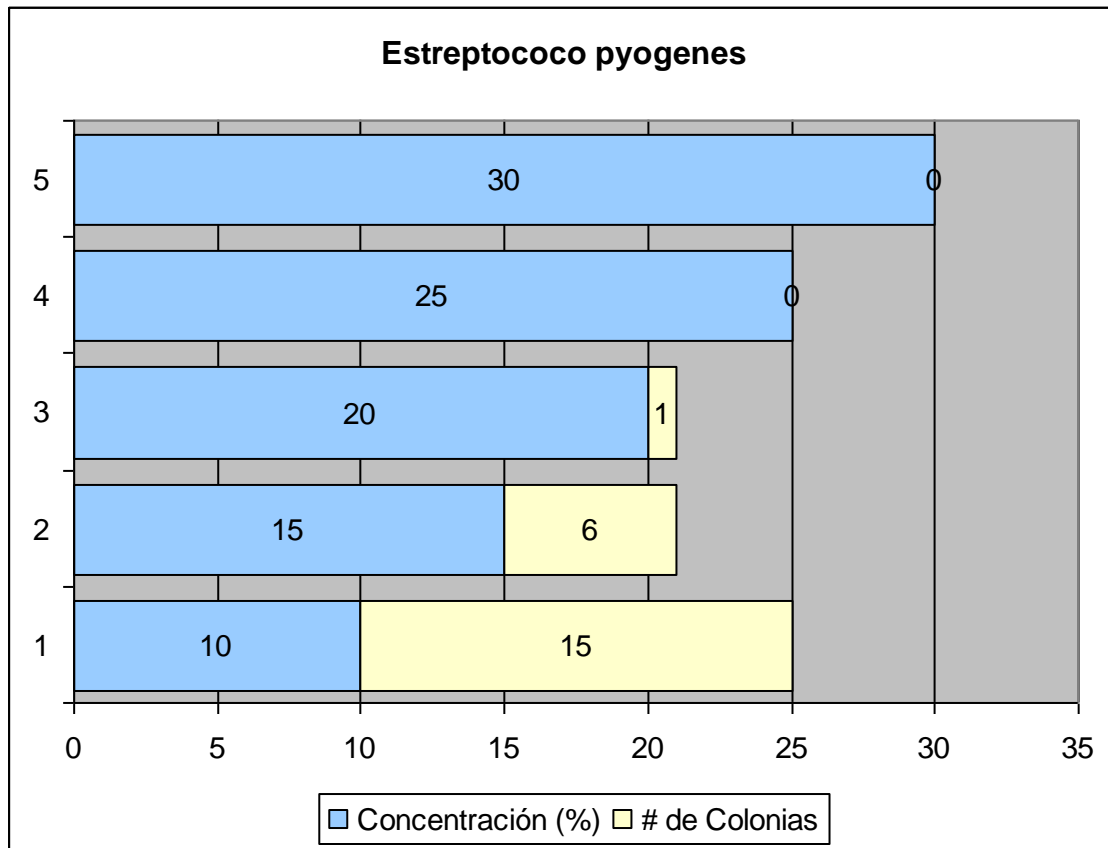




❖ **ESTREPTOCOCO PYOGENES**

g% Propóleo	# de Colonias
10	15
15	6
20	1
25	0
30	0

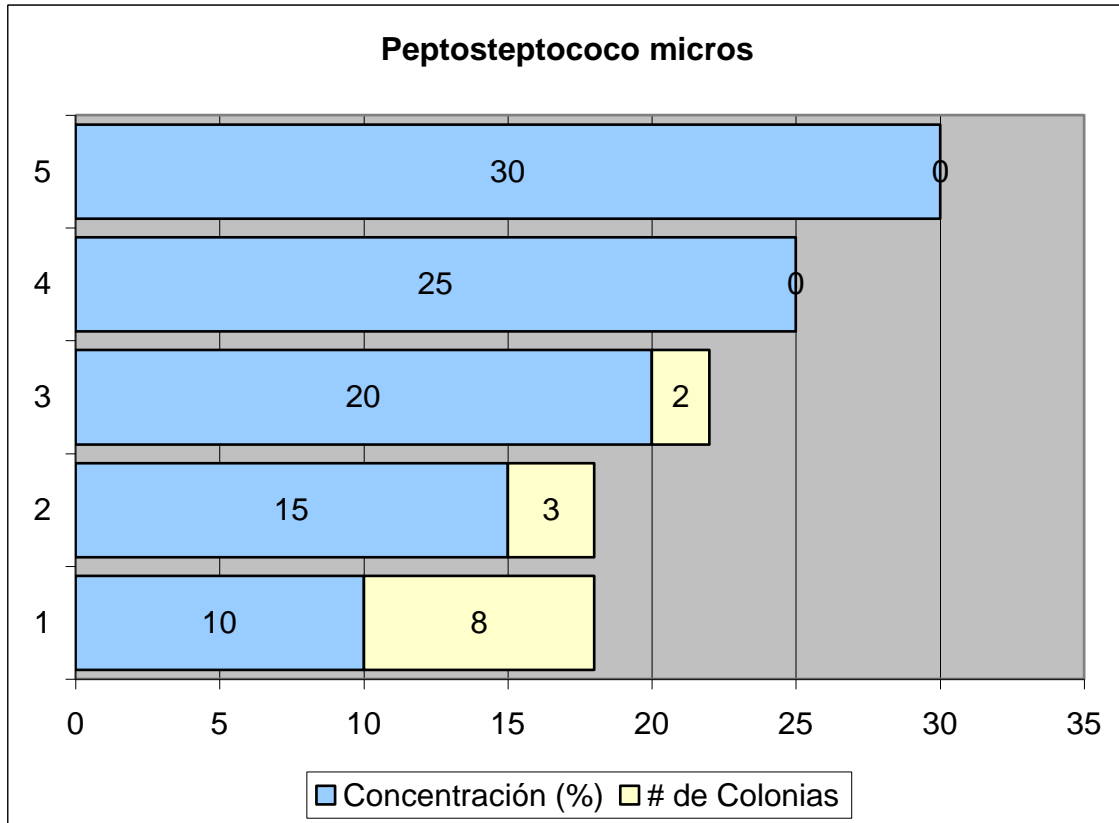
AUTORES: Juan Bernardo Solano Hermida.  
Liliana Abril.  
Grace Mejía.



❖ **PEPTOSTREPTOCOCO MICROS**

g% Propóleo	# de Colonias
10	8
15	3
20	2
25	0
30	0

AUTORES: Juan Bernardo Solano Hermida.  
Liliana Abril.  
Grace Mejía.



**INTERVALO DE CONFIANZA**

MICROORGANISMO	X MEDIA	$\sigma$	INTERVALO DE CONFIANZA (g%)	
			MAX	MIN
Estreptococo sanguis	23.33	7.46	28.20	18.46
Estreptococo mitis	20	7.071	26.19	13.81

AUTORES: Juan Bernardo Solano Hermida.  
Liliana Abril.  
Grace Mejía.



Estreptococo pyogenes	17.5	5.59	22.98	12.02
Peptostreptococo. micros	17.5	5.59	22.98	12.02

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum x^2}{N} - \left[ \frac{\sum x}{N} \right]^2}$$

$$X \text{ media} = \pm \frac{z \sigma}{\sqrt{n}}$$

Siendo:

$\sigma$  = Desviación estándar

N = Número de concentraciones

Siendo:

X media = Media de las concentraciones de propóleo.

$\sigma$  = Desviación estándar

n = Número de concentraciones

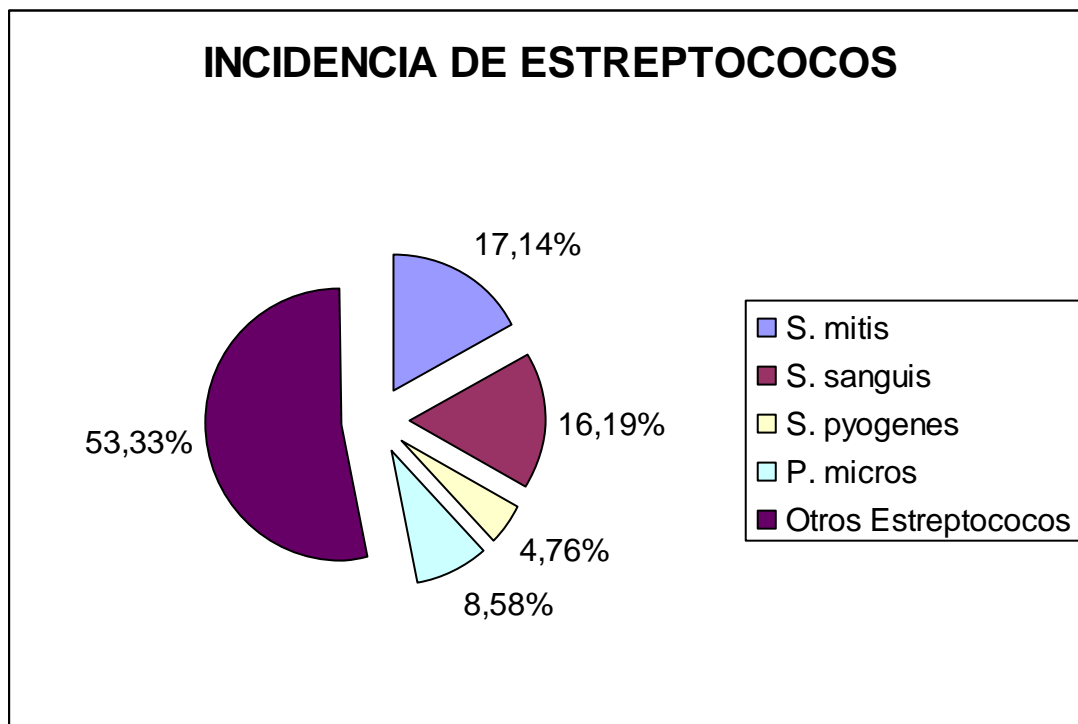
### INCIDENCIA DE ESTREPTOCOCOS

MICROORGANISMOS	# DE MUESTRAS	PORCENTAJE (%)
S. mitis	18	17.14
S. sanguis	17	16.19
S. pyogenes	5	4.76

AUTORES: Juan Bernardo Solano Hermida.  
Liliana Abril.  
Grace Mejía.



P. micros	9	8.58
Otros Estreptococos	56	53.33



## CAPITULO 4



## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### CONCLUSIONES:

- ◆ El propóleo tiene actividad antibacteriana sobre las siguientes bacterias aisladas: *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. pyogenes* y *P. micros*.
- ◆ Al realizar el blanco de propóleo hubo ausencia de crecimiento, observándose solamente una película blanca característica de este compuesto al incubarse en este tipo de medios.
- ◆ En el blanco de alcohol se observó crecimiento de microorganismos, ya que a esta concentración (35°) no actuó como antiséptico, sino como diluyente del propóleo, lo cual comprueba la actividad antimicrobiana del mismo sobre los microorganismos de este estudio.
- ◆ Las concentraciones de propóleo inferiores al 10 % no inhiben el crecimiento de los microorganismos mencionados.
- ◆ Las concentraciones de propóleo del 10 – 30 % inhiben el crecimiento de microorganismos en grado variable.



- ◆ Para el *Streptococo mitis* el intervalo de confianza de las concentraciones de propóleos es: mínimo 18.4gr % y máximo 28.20gr. %
- ◆ Para el *Streptococo sanguis* el intervalo de confianza de las concentraciones de propóleos es: mínimo 13.81gr% y máximo 26.19gr. %
- ◆ Para el *Streptococo pyogenes* y el *P. micros* el intervalo de confianza de las concentraciones de propóleos es: mínimo 12.02gr% y máximo 22.28gr. %
- ◆ La concentración existente en el mercado (Extracto de propóleo al 20%) está dentro del rango de concentraciones de propóleo utilizados en esta tesis, la cual ha demostrado una actividad de grado variable para los diferentes microorganismos.
- ◆ Los resultados obtenidos en esta tesis, se refieren específicamente a la actividad del propóleo de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Cuenca, ya que el propóleo es una sustancia que varía su actividad según su composición que está dada por las especies de árboles que existan en el lugar donde se encuentre la colmena, además del tipo de abeja, y estación del año.

## RECOMENDACIONES:

AUTORES: Juan Bernardo Solano Hermida.  
Liliana Abril.  
Grace Mejía.



- ◆ El propóleo pierde actividad al ser expuesto a la luz, por lo que se debe guardar en frascos ámbar.
- ◆ Para la toma de la muestra de *P. micros* se recomienda usar puntas de papel, estériles, puesto que facilita la toma y no afecta el microorganismo.
- ◆ En la preparación de medios de cultivo para el aislamiento y pruebas bioquímicas de *P. Micros* (anaerobio), es apropiado la inclusión de tioglicolato en medio base, para mantener las condiciones de anaerobiosis, y potencial de oxido reducción adecuado con lo cual se obtiene un mejor crecimiento.
- ◆ Reactivos como □naftilamina, y ácido sulfanílico, para prueba de nitrato deben conservarse en refrigeración y protegidos de la luz.
- ◆ La sangre utilizada para agar sangre, debe ser de carnero, para poder apreciar mejor la hemólisis y no debe estar hemolizada.
- ◆ Es preferible usar la sangre desfibrinada de cordero, para la preparación de agar sangre, porque de esta manera no se hemoliza fácilmente en la preparación del medio.
- ◆ Para la realización de pruebas bioquímicas y más aun de prueba de susceptibilidad es necesario utilizar las cepas puras del microorganismo en estudio.
- ◆ Según investigadores, el propóleo presenta mejor actividad antimicrobiana a un ph de 2 a 3 se recomienda tomar en cuenta este punto en posteriores análisis.



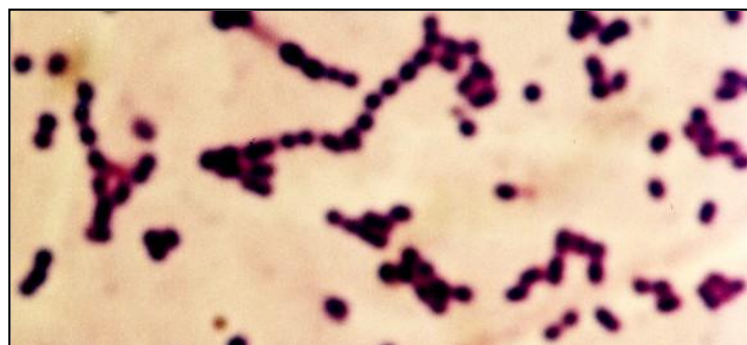


**ANEXOS.**

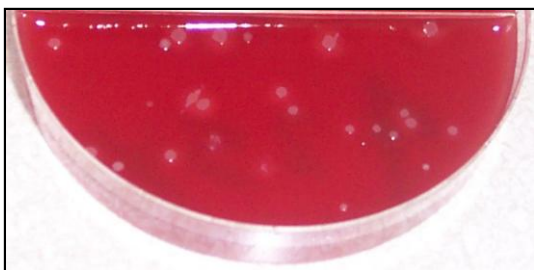
AUTORES: Juan Bernardo Solano Hermida.  
Liliana Abril.  
Grace Mejía.

ANEXO # 1

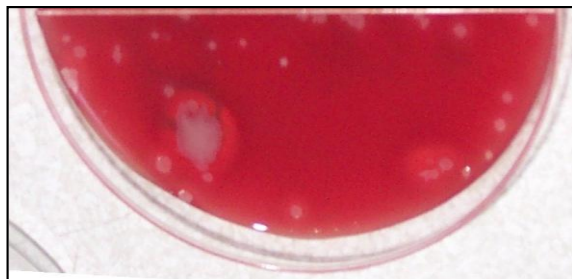
PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD DE *ESTREPTOCOCO SANGUIS*



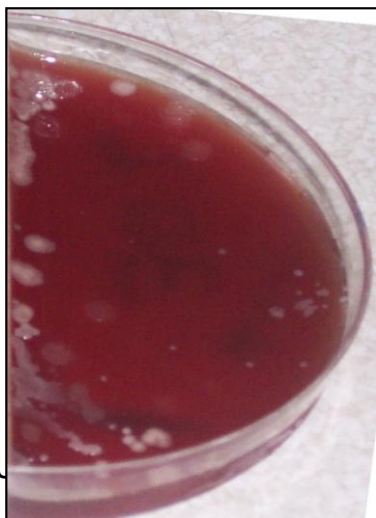
*S. sanguis* al microscopio



10 %

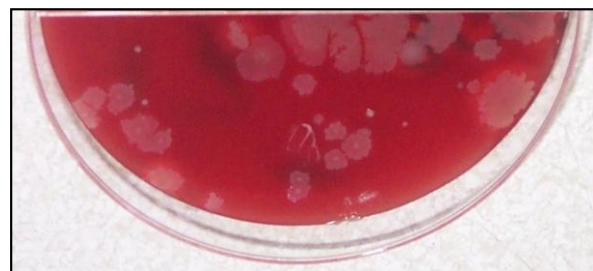


15 %



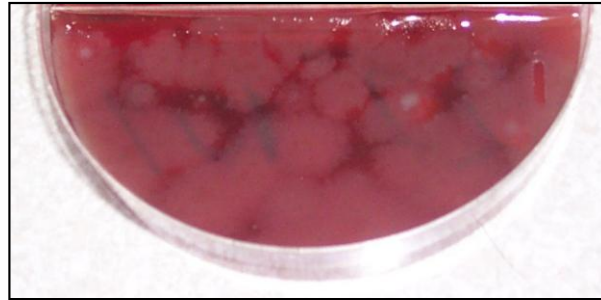
AL... p Hermida.

Grace Vieja.



25 %

20 %

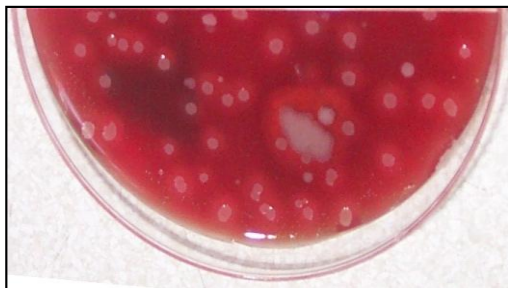


30 %

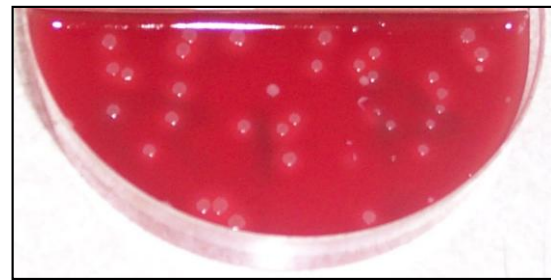
**PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD DE ESTREPTOCOCO *MITIS***



*S. mitis* al microscopio

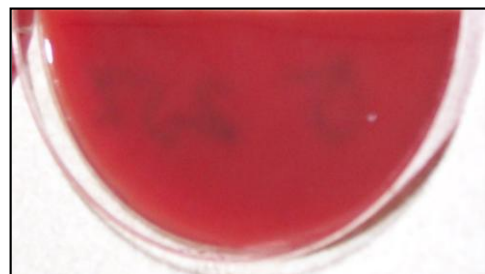
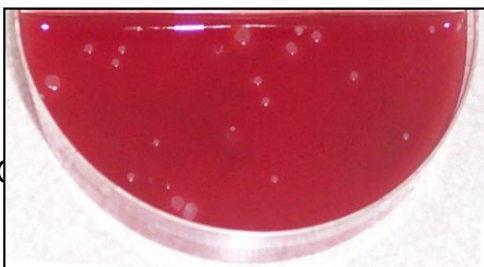


10 %

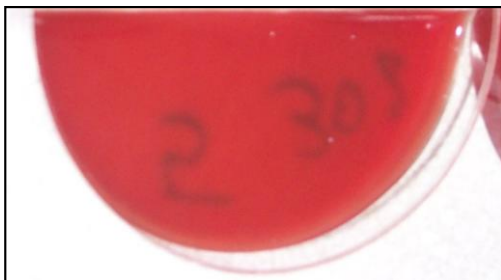


20 %

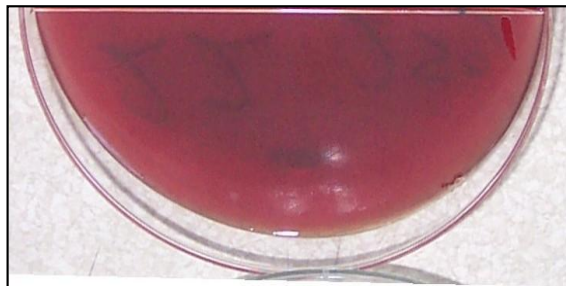
AUTO



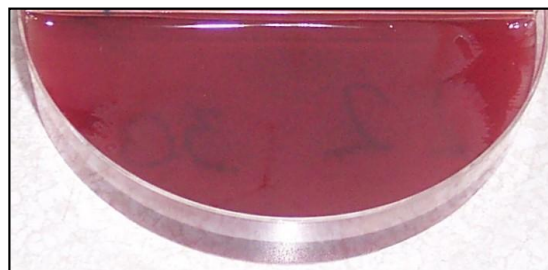
15%



25%



30%



35%

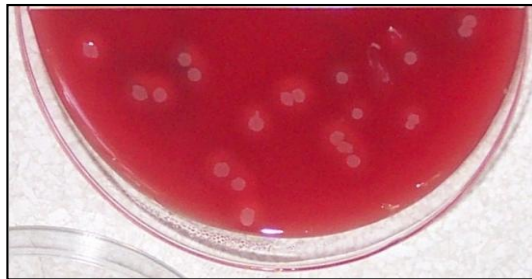
40%

### PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD DE *ESTREPTOCOCO PYOGENES*

*S. pyogenes* al  
microscopio

AUTORES: Juan Bernardo Solano  
Liliana Abril.  
Grace Mejía.





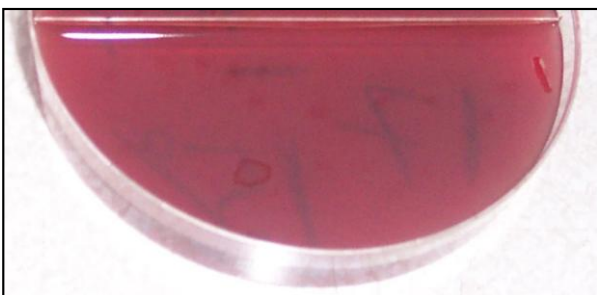
10 %



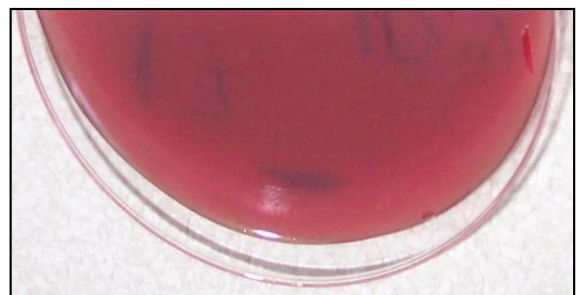
20 %



15 %



Liliana Abril.  
Grace Mejía.



25 %

APTIBILIDAD DE PEPTOS

30 %

MICROS



*P. micros* al microscopio



10 %



AUTORES: Juan Bernardo Solano Hermida.  
Liliana Abril.  
Grace Mejía.

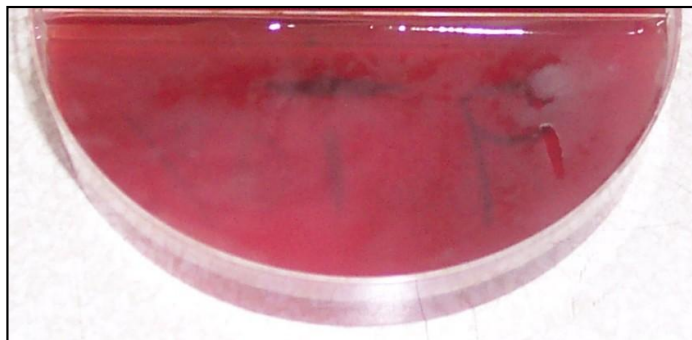
20 %



25 %

30 %

### BLANCO DE PROPÓLEO



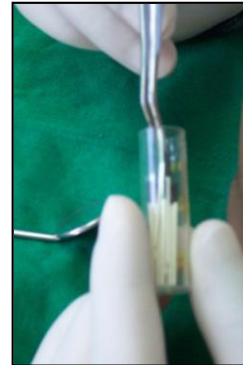
AUTORES: Juan Bernardo Solano Hermida.  
Liliana Abril.  
Grace Mejía.

## ANEXO # 2

### TOMA DE MUESTRAS



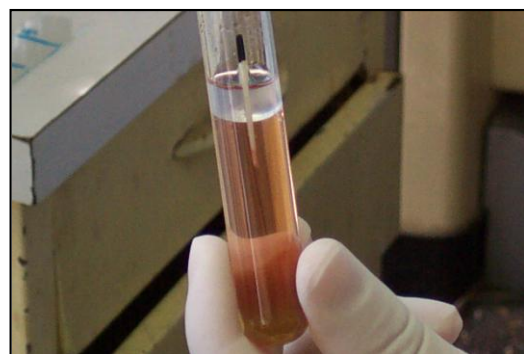
Instrumental para toma de muestra



Puntas de papel



Recolección de la muestra



Inmersión de la muestra en el medio de transporte





Frotis directo



Incubando las muestras

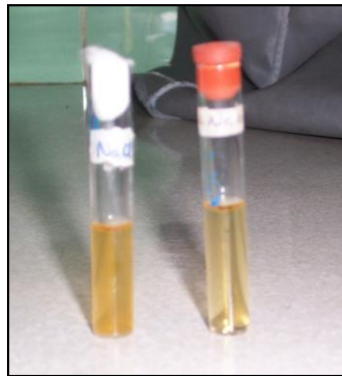


Crecimiento en tioglicolato

**PRUEBAS BIOQUÍMICAS**



Bilis esculina  
positivo (izq.) y  
negativo (der.)



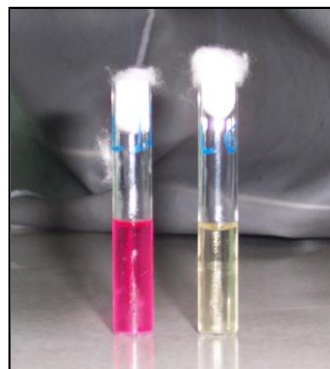
ClNa 6,5 % positivo  
(izq.) y negativo  
(der.)



Rafinosa positivo (izq.)  
y negativo (der.)



Sorbitol positivo (izq.)  
y negativo (der.)

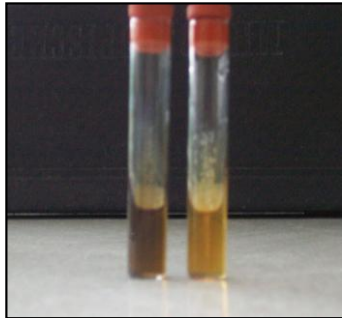


Lactosa positivo (izq.)  
y negativo (der.)

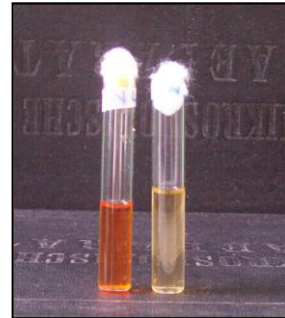


Azúcares: Lactosa,  
Inulina, Rafinosa y  
Sorbitol

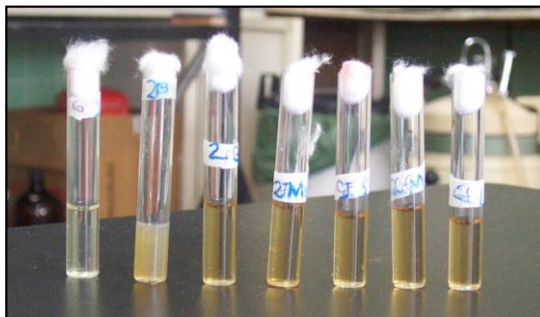
AUTORES: Juan Bernardo Solano Hermida.  
Liliana Abril.  
Grace Mejía.



Esculina (izq.) y Bilis  
(der.) positivos



Nitrato positivo  
(izq.) y negativo  
(der.)



Pruebas bioquímicas P. micros:  
Gelatina, Bilis, glucosa, manosa,  
sacarosa, maltosa y lactosa negativas



## BIBLIOGRAFÍA

1. ALVAREZ Victoria./ BOQUET Ernesto./ DE FEZ .Isabel.

**Manual de Técnicas en Microbiología Clínica.**

Edición Primera. 1995.

2. BARON/ FINEGOLD

**Diagnóstico Microbiológico BAILEY – SCOTT.**

Editorial Panamericana. Argentina. 1989.

3. CARRANZA, A. Fermín.

**Periodontología Clínica de GLIKMAN.**

Octava edición. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. México. 1997.

4. FREMAN, Bob A.

**BURROWS Microbiología.**

Editorial Interamericana. 22ª Edición. 1986.

5. IÓVINE – SELVA.

**El Laboratorio en la Clínica.**

Editorial Panamericana. 3º Edición. 1985. Buenos Aires.



6. JAWETZ/ MELNICK/ ADELBERG.

**Microbiología médica.**

Editorial. Manual Moderno. 16ª Edición. 1999.

7. KONEMAN, Elmer.

**Diagnóstico Microbiológico.**

Quinta Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. 1999.

8. LINDHE, Jan.

**Periodontología Clínica.**

Segunda Edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires 1992.

9. MAC FADDIN, Jean F.

**Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias.**

Editorial Panamericana. Buenos Aires. 1980.

10. **Manual de Medios de Cultivo.** MERCK. 1994.

11. SALAZAR, Wilson.

**Guía de Prácticas de Laboratorio**

Universidad Central del Ecuador. Quito. 1985.

12. SINTES, Jorge.

**Virtudes Curativas de la Miel y polen.**

Biblioteca Naturista. Edición Sintés. 1977.

13. SUMMANEN/ BARON/ CITRON/STRONG.

**Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual.**

Publishing Company Star. Fifth Edition.

14. TOLEDO, Angel.

**Propóleo y demás productos de la colmena.**

Ediciones Nauta. España. 1984.

15. WYNGAARDEN/ SMITH/ BENNETT.

**Tratado de Medicina Interna. CECIL**

19° Edición. Volumen 2. 1992.

**PÁGINAS DE INTERNET**

16. [www.apicultura.el/04producto/03propoleo](http://www.apicultura.el/04producto/03propoleo).

17. [www.Ecoaldea.com/apicultura/propolis.htm](http://www.Ecoaldea.com/apicultura/propolis.htm).

18. [www.avizora.com/publicaciones/ciencia.htm](http://www.avizora.com/publicaciones/ciencia.htm).

19. [www.cipo.com.ar/especialidades/propoleo.htm](http://www.cipo.com.ar/especialidades/propoleo.htm).



20. [www.comercializadora.md/bronkitose\\_mielimon.htm](http://www.comercializadora.md/bronkitose_mielimon.htm).
21. [www.drwebsa.com.ar/aam/rev\\_033\\_03/033\\_1.htm](http://www.drwebsa.com.ar/aam/rev_033_03/033_1.htm).
22. [www.enlared.es/abelleiro/abejas/propoleo](http://www.enlared.es/abelleiro/abejas/propoleo).
23. [www.encolombia.com/odontologia/foc/fo20202\\_enfermedad.htm](http://www.encolombia.com/odontologia/foc/fo20202_enfermedad.htm)
24. [www.exagono.com.mx/doc/productos/propoleo.htm](http://www.exagono.com.mx/doc/productos/propoleo.htm).
25. [www.infomed.sld.cu/revistas/est/vol34\\_1\\_97/est05197.htm](http://www.infomed.sld.cu/revistas/est/vol34_1_97/est05197.htm).
26. [www.infomed.sld.cu/revistas/est/vol35\\_3\\_98/est08398.htm](http://www.infomed.sld.cu/revistas/est/vol35_3_98/est08398.htm).
27. [www.páginamédica.com/balconalternativo](http://www.páginamédica.com/balconalternativo).
28. [www.tiatrini.com.mx/propoleo.htm](http://www.tiatrini.com.mx/propoleo.htm).
29. [www.todomiel.com](http://www.todomiel.com).
30. [www.webinterdental.com/dentality/articulos/PE00008.htm](http://www.webinterdental.com/dentality/articulos/PE00008.htm).



## RESUMEN DE CUADROS Y FIGURAS.

- Figura No.1 Propóleo procesado. Pág. 1.
- Figura No.2 Apis Mellifera. Pág. 4
- Figura No.3 Recolección en la rejilla del apiario. Pág. 7.
- Figura No.4 Extracción del propóleo bruto. Pág. 7.
- Figura No.5 Secuencia de colonización. Pág. 35.
- Figura No.6 Presencia de microorganismos en relación a encía sana. Pág. 40.
- Figura No.7 Microorganismos de mayor porcentaje presentes en la enfermedad periodontal. Pág. 40.
- Figura No.8 Microfotografía electrónica de de un corte de la pared de una bolsa en periodontitis. Pág. 48.
- Figura No.9 Microfotografía electrónica de Streptococos. Pág. 52.
- Figura No.10 Estructura antigénica de los Streptococos. Pág. 59.
- Figura No. 11 Estreptococo visto al microscopio. Pág. 62.
- Figura No. 12 Colonias de Streptococos. Pág. 62
- Figura No. 13 Peptostreptococo visto al microscopio. Pág. 68.
- Figura No.14 Colonias de Peptostreptococo Pág. 68.
- Figura No. 15 Adición de la sangre de oveja en agar. Pág. 80.
- Figura No. 16 Obtención de la sangre de oveja con vacutainer. Pág 81.
- Figura No. 17 Colocación de disco de Optoquina. Pág. 86.





- Figura No. 18 Prueba de Optoquina resistente. Pág. 86.
- Figura No. 19 Adición de azúcares al caldo de fermentación. Pág. 92
- Figura No. 20 Colocación de disco de Bacitracina. Pág. 94.
- Figura No. 21 Prueba de Bacitracina resistente. Pág. 95.
- Figura No. 22 Prueba de Bacitracina sensible. Pág. 95.
- Figura No. 23 Toma de muestra para anaerobios con punta de papel. Pág. 101.
- Figura No. 24 Colocación de punta de papel con la muestra en tioglicolato. Pág. 101.
- Figura No. 25 Sobre de anaerobiosis. Pág. 105.
- Figura No. 26 Preparación con sobre de anaerobiosis. Pág. 105.
- Figura No. 27 Dilución de Propóleo. Pág. 117.
- Figura No. 28 Colocación de muestra con Propóleo sobre agar sangre para anaerobios. Pág. 119.
- Figura No. 29 Estriación de la muestra con Propóleo. Pág. 119.
- Figura No. 30 Jarra de anaerobiosis con sobre de anaerocult. Pág. 119.
- Figura No. 31 Prueba de susceptibilidad de *S. sanguis*. Pág. 128.
- Figura No. 32 Prueba de susceptibilidad de *S. mitis*. Pág. 129.
- Figura No. 33 Prueba de susceptibilidad de *S. piógenes*. Pág. 130.
- Figura No. 34 Prueba de susceptibilidad de *Peptostreptococo micros*. Pág. 131.
- Figura No. 35 Incidencia de Estreptococos. Pág. 133.
- Figura No. 36 *S. sanguis* al microscopio. Anexos.



- Figura No. 37 Antibiograma con propóleo, de *S. sanguis* al 10%. Anexos.
- Figura No. 38 Antibiograma con propóleo, de *S. sanguis* al 15%. Anexos
- Figura No. 39 Antibiograma con propóleo, de *S. sanguis* al 20%. Anexos
- Figura No. 40 Antibiograma con propóleo, de *S. sanguis* al 25%. Anexos
- Figura No. 41 Antibiograma con propóleo, de *S. sanguis* al 30%. Anexos
- Figura No. 42 *S. mitis* al microscopio. Anexos.
- Figura No. 43 Antibiograma con propóleo, de *S. mitis* al 10%. Anexos
- Figura No. 44 Antibiograma con propóleo, de *S. mitis* al 15%. Anexos
- Figura No. 45 Antibiograma con propóleo, de *S. mitis* al 20%. Anexos
- Figura No. 46 Antibiograma con propóleo, de *S. mitis* al 25%. Anexos
- Figura No. 47 Antibiograma con propóleo, de *S. mitis* al 30%. Anexos
- Figura No. 48 Antibiograma con propóleo, de *S. mitis* al 35%. Anexos
- Figura No. 49 Antibiograma con propóleo, de *S. mitis* al 40%. Anexos
- Figura No. 50 *S. piógenes* al microscopio. Anexos.
- Figura No. 51 Antibiograma con propóleo, de *S. piógenes* al 10%.  
Anexos
- Figura No. 52 Antibiograma con propóleo, de *S. piógenes* al 15%.  
Anexos
- Figura No. 53 Antibiograma con propóleo, de *S. piógenes* al 20%.  
Anexos
- Figura No. 54 Antibiograma con propóleo, de *S. piógenes* al 25%.  
Anexos
- Figura No. 55 Antibiograma con propóleo, de *S. sanguis* al 30%. Anexos



- Figura No. 56 *S. piógenes* al microscopio. Anexos.
- Figura No. 57 Antibiograma con propóleo, de *Peptostreptococo micros* al 10%. Anexos
- Figura No. 58 Antibiograma con propóleo, de *Peptostreptococo micros* al 15%. Anexos
- Figura No. 59 Antibiograma con propóleo, de *Peptostreptococo micros* al 20%. Anexos
- Figura No. 60 Antibiograma con propóleo, de *Peptostreptococo micros* al 25%. Anexos
- Figura No. 61 Antibiograma con propóleo, de *Peptostreptococo micros* al 30%. Anexos
- Figura No. 62 Blanco de Propóleo. Anexos
- Figura No. 63 Instrumental para toma de muestra. Anexos
- Figura No. 64 Puntas de papel. Anexos
- Figura No. 65 Recolección de la muestra. Anexos
- Figura No. 66 Inmersión de la muestra en le medio de transporte. Anexos
- Figura No. 67 Frotis directo. Anexos
- Figura No. 68 Incubando las muestras. Anexos
- Figura No. 69 Crecimiento en tioglicolato. Anexos
- Figura No. 70 Pruebas Bioquímicas, Bilis esculina. Anexos
- Figura No. 71 Pruebas Bioquímicas, Cloruro de sodio. Anexos
- Figura No. 72 Pruebas Bioquímicas, Rafinosa. Anexos



- Figura No. 73 Pruebas Bioquímicas, Sorbitol. Anexos
- Figura No. 74 Pruebas Bioquímicas, Lactosa. Anexos
- Figura No. 75 Pruebas Bioquímicas, Azúcares. Anexos
- Figura No. 76 Pruebas Bioquímicas, Esculina. Anexos
- Figura No. 77 Pruebas Bioquímicas, Nitratos. Anexos
- Figura No. 78 Pruebas Bioquímicas, para estreptococo micros. Anexos
- Cuadro No. 1 Composición del propóleo como se determinó entre los años 1908, y 1947. Pág 3.
- Cuadro No. 2 Composición General del Propóleo. Pág. 13.
- Cuadro No. 3 Características de los estreptococos. Pág 53.
- Cuadro No. 4 Grupo Piógenes. Pág. 54.
- Cuadro No. 5 Grupo Viridans. Pág. 55.
- Cuadro No. 6 Grupo Láctico. Pág. 55.
- Cuadro No. 7 Grupo Enterococo. Pág. 55.
- Cuadro No. 8 Prueba de susceptibilidad de *S. sanguis*. Pág. 128.
- Cuadro No. 9 Prueba de susceptibilidad de *S. mitis*. Pág. 129.
- Cuadro No. 10 Prueba de susceptibilidad de *S. piógenes*. Pág. 130.
- Cuadro No. 11 Prueba de susceptibilidad de *Peptostreptococo micros*. Pág. 131.
- Cuadro No. 12 Intervalo de Confianza. Pág. 132.
- Cuadro No. 13 Incidencia de Estreptococos. Pág. 133.