

MFN = 52406

R. 4/19  
R. 05/11/11  
TAZBF  
1986

UNIVERSIDAD DE VALPARAISO  
FACULTAD DE ODONTOLOGIA  
ESCUELA DE ODONTOLOGIA  
CATEDRA DE MICROBIOLOGIA  
VALPARAISO

0-100  
FRECUENCIA, AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LOS  
ENTEROCOCOS DE CONDUCTOS RADICULARES  
INFECTADOS Y SALIVA

SEMINARIO DE TESIS PARA OPTAR AL TITULO  
DE CIRUJANO DENTISTA

Profesor Guía: Prof. Auxiliar de Microbiología Dr.  
MANUEL VELASCO OLAVE

Profesor Informante: Prof. Adjunto de  
Anatomía Patológica Dr.  
CARLOS CIFUENTES S.

Profesor Colaborador: Prof. Auxiliar de Microbiología Dr.  
SERGIO INSINILLA

Alumnos : ANA MARIA ALFARO GUTIERREZ  
NORMA PEÑA AGUILAR  
JUANA QUIÑONES VALENCIA  
CARLOS RICHTER HENRIQUEZ

A nuestros Padres:

Todo florece en la vida,  
sus sabios consejos  
y sus tiernas esperanzas.

Hoy, que veo hecho mi sueño realidad,  
rindo un homenaje de amor y gratitud  
a la abnegación de mi Madre  
y el esfuerzo de mi Padre,  
por ser ellos quienes con sus cons-  
tantes  
sacrificios y desvelos, supieron  
entregarnos lo más  
hermoso de la vida:  
El claro sendero del porvenir.

## AGRADECIMIENTOS

Al profesor doctor Sergio Insinilla C., por la inmensa colaboración y ayuda prestada, así como también, quisiéramos dar las gracias a los siguientes doctores por su gran ayuda en la preparación de este Seminario:

- Dr. Manuel Velasco Ol, Profesor de Microbiología.
- Dra. Alicia Vera, Profesora de Microbiología.
- Dr. Vittorio Bianchetti, Profesor de Endodoncia.
- Dr. Eduardo Santamaría, Profesor de Endodoncia.
- Dr. Iván Nazarola, Director del Hospital del Salvador de Valparaíso.
- Dr. Jorge Bartolucci, Director del Hospital Gustavo Fricke.

Agradecemos también a la Sra. Margarita Báez y Patricia Carvajal, por su colaboración en la parte práctica de Laboratorio y a la Sra. Vilma Araya de la Biblioteca de la Facultad de Medicina.

Damos además las más expresivas gracias a la Sra. María Henríquez, Profesora de Castellano y a la Srta. Patricia Contreras, por la colaboración prestada en la redacción del Seminario.

## INDICE

	<u>Página</u>
INTRODUCCION . . . . .	8
OBJETIVOS . . . . .	10
 <u>CAPITULO I. MARCO TEORICO</u>	
A) Antecedentes Generales . . . . .	13
A.1 Taxonomía . . . . .	13
A.2 Generalidades . . . . .	13
A.2.1 Especie Enterococo . . . . .	13
A.2.2 Especie no Enterococo . . . . .	17
A.2.3 Distribución proporcional de los Enterococos . . . . .	22
A.3 Clasificación . . . . .	22
A.3.1 Por acción hemolítica . . . . .	22
A.3.2 Por acción fisiológica . . . . .	23
A.3.3 Inmunológica . . . . .	23
B) Microorganismos involucrados en las alteraciones pulpaes . . . . .	24
B.1 Microorganismos de las pulpas necróticas . . . . .	25
B.2 Microorganismos de diversas infecciones bucales de origen dentario . . . . .	27
C) Susceptibilidad de los enterococos orales y mecanismos de resistencia . . . . .	29
C.1 Susceptibilidad de los enterococos . . . . .	29
C.1.1 Antibiograma . . . . .	29
C.1.2 Elección del antibiótico . . . . .	30
C.2 Mecanismos de resistencia . . . . .	37
C.2.1 Plasmidios . . . . .	37
C.2.2 Resistencia a antibióticos . . . . .	38
D) Endocarditis Infecciosa (E.I.) . . . . .	43
D.1 Bacteremias causadas por procesos dentales . . . . .	44
D.5 Resultados de los Hemocultivos . . . . .	46

CAPITULO II. MATERIALES Y METODO

2.1	Introducción . . . . .	49
2.2	Materiales . . . . .	49
2.3	Metodología . . . . .	50
2.3.1	Aislamiento y cultivo de enterococos . . . . .	50
A.	Materiales . . . . .	50
B.	Metodología . . . . .	51
B.1	Consideraciones generales . . . . .	51
B.2	Fuentes de información . . . . .	51
B.3	Selección de la muestra . . . . .	52
B.4	Recolección de datos . . . . .	53
B.5	Toma de muestra de conducto y saliva . . . . .	53
B.6	Técnicas de laboratorio . . . . .	55
2.3.2	Antibiograma . . . . .	59
A.	Materiales . . . . .	59
B.	Metodología . . . . .	59
B.1	Elección del antibiótico . . . . .	59
B.2	Determinación "Solución stock" . . . . .	60
B.3	Procedimiento de la prueba . . . . .	60
B.4	Preparación del Inoculum . . . . .	61
B.5	Determinación de la CIM . . . . .	62
B.6	Determinación de la CBM . . . . .	62

CAPITULO III. RESULTADOS

3.1	Aislamiento y cultivo de enterococos . . . . .	67
3.2	Antibiograma . . . . .	71
3.2.1	Análisis e interpretación de los gráfi- cos . . . . .	80

CAPITULO IV. DISCUSION Y CONCLUSIONES 86

ANEXOS

-	Endocarditis Infecciosa . . . . .	93
-	Ficha Seminario de Tesis . . . . .	97

	<u>Página</u>
- Coloración Gram clásica . . . . .	98
- Procedimiento matemático para el cálculo de la solución stock . . . . .	99
- Espectros de acción de varios antibióticos y sus dosis en adultos . . . . .	102
- Medios de cultivo . . . . .	103
 BIBLIOGRAFIA . . . . .	 109

## INTRODUCCION

Los streptococos conforman un largo y complejo grupo de microorganismos que son parte de la microbiota normal, constituyendo una parte principal de las especies bacterianas de la cavidad oral, faringe y canal alimenticio (DEIBEL, 1964).

Un grupo de ellos, los streptococos clasificados por R. LANCEFIELD como el grupo D, son parte de la microbiota humana normal y usualmente uno de los mayores grupos bacterianos encontrados en la cavidad oral. Los microorganismos reconocidos en este grupo se dividen en dos subgrupos: enterococos y no enterococos.

De ellos, los enterococos, son más significativos por su alta frecuencia en la cavidad oral, su desarrollo en infecciones del tracto urinario (FRIEDMAN, 1963), su participación en la endocarditis infecciosa (CHERUBIN Y NEU, 1971) y en otras infecciones orales (MÖLLER, 1966).

El grupo D enterococos, lo caracterizan cinco especies reconocidas (*S. faecalis*, *S. faecalis* var. *liquefaciens*, *S. faecalis* var. *zymogenes*); *S. faecium* y *S. durans*, siendo el *S. faecalis* el más prevalente y representativo de este grupo (80%).

Su alta frecuencia en los conductos radiculares infectados, como también, su incidencia en muestras de infecciones endodónticas, la participación del *S. faecalis* en la producción de abscesos periapicales, su comportamiento variable, reflejado en la dificultad para efectuar una buena terapia endodóntica, su alta resistencia a ciertos desinfectantes químicos y antibióticos de uso clínico frecuente, especialmente la penicilina y su no menos importante participación en la endocarditis infecciosa; hacen muy interesante su estudio.

Por este motivo, existe gran interés de nuestra parte, en ampliar y actualizar el conocimiento del tema.

De este modo, es interesante llevar a cabo una investigación, al respecto, para analizar la frecuencia de los enterococos y su incidencia en diferentes patologías pulpares de mayor prevalencia en nuestro medio, así como también, analizar la susceptibilidad de los enterococos a determinados antimicrobianos de uso permanente en nuestra práctica diaria, con el propósito de entregar una información actualizada y lo más amplia posible sobre el tema.

Con miras a que este trabajo sea lo más sólido que se pueda conseguir, como asimismo permitir que los alumnos adquieran habilidades en la aplicación del método científico, trataremos de lograr que este seminario sea lo más completo posible, esperando entregar un aporte a este gran mundo científico.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GENERALES

2.1.1 Determinar la presencia y variedades de Enterococos mediante aislamiento y cultivo de muestras obtenidas de conductos radiculares infectados y saliva.

2.1.2 Estudiar, analizar y observar el comportamiento de los Enterococos de la cavidad oral.

2.1.3 Ampliar y actualizar antecedentes para la docencia.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1 a) Determinar la presencia de Enterococos de la saliva y conductos radiculares infectados.

b) Precisar frecuencia en diferentes patologías pulpares de mayor prevalencia en nuestro medio.

c) Caracterizar los Enterococos mediante pruebas bioquímicas de laboratorio.

2.2.2 Determinar mediante Antibiograma por dilución, la susceptibilidad de los Enterococos aislados, a cinco antibióticos "in vitro".

2.2.3 Presentar un resumen bibliográfico sobre aspectos actuales del conocimiento en Enterococos de la cavidad bucal.

2.2.4 a) Analizar la información obtenida en el laboratorio, para utilizarla en forma provechosa en el manejo clínico de patologías pulpares.

b) Adquirir habilidades y destrezas en el manejo y técnicas de laboratorio en microbiología.

c) Aplicar el método científico en la ejecución del seminario.

d) Adquirir habilidades en el manejo de material bibliográfico utilizados en la realización de un seminario.

e) Reconocer la importancia del trabajo en grupo para el logro de los objetivos planteados.

CAPITULO I

MARCO TEORICO

A) ANTECEDENTES GENERALES

A.1 Taxonomía:

Reino	Monera
Orden	Eubacteriales
Familia II	Streptococcaceae
Género I	Streptococcus
Grupo	D
Especie	Enterococos

A.2 Generalidades:

A.2.1 Especie Enterococo: (2) (3) (5) (16) (17).

Los streptococos grupo D de R. LANCEFIELD o grupo enterococos representados por el *S. faecalis*, son principalmente parásitos intestinales, pero, también se encuentran en la cavidad oral humana en hasta un 75% de todos los individuos, poco frecuentes en la lengua y promedian menos del 10% de los streptococos del surco gingival. También se pueden encontrar en la placa bacteriana, como agente etiológico en la formación de caries, y en la saliva.

Los enterococos se caracterizan por ser células alargadas de 0.5-1.2  $\mu$ m de diámetro, formando cadenas, en su mayoría pares o bien, formando cadenas cortas dando una reacción Gram (+). Las colonias son redondeadas, de color amarillas-grisáceas, pequeñas de 2-4 mm. de diámetro.

tro (en placas con agar sangre).

Se caracterizan por crecer bajo condiciones muy desfavorables y poseer requerimientos nutricionales complejos, a lo menos necesitan para su crecimiento 10 aminoácidos como mínimo. La mayoría de las especies requieren: biotina, nicotina, pantotenato, riboflavina y piridoxina.

Características comunes a todo el grupo D streptococo o enterococos, es la capacidad para crecer entre 10 °C y 45 °C y en medios como el NaCl al 6.5% en pH 9.6, agar bilis al 10 y 40% y en agar telurito de potasio entre otros.

Todos fermentan la glucosa, maltosa, manitol, pero no así la arabinosa y rafinosa.

Por otra parte, los enterococos producen proteínas extracelulares, tales como proteasas y hemolisinas, las cuales pueden ser tóxicas a los tejidos humanos y animales.

DEIBEL (1964), describió que las cepas pertenecientes al *S. faecalis* muestran frecuentemente actividad hemolítica y proteolítica baja. En tanto que UPDYKE (1967), describió que el 88% de 90 enterococos mostraron hemólisis en placas de agar sangre de conejo, caballo y humana.

La presencia de colonias enterocócicas está indicada por su hidrólisis de esculina, los productos de la cual, forman sales de hierro negra circunscribiendo las colonias de enterococos.

Para la clasificación de streptococos, la actividad hemolítica de éstos, es aún la más usada, no obstante, para la confirmación de esta clasificación, existen diversos test bioquímicos de mucha utilidad para tal fin. De estos test, el más importante es la identificación inmunológica de los grupos específicos de antígenos. Los streptococos del grupo D son caracterizados por un antígeno identificado como el ácido teitoicoglicerol glucosil glucosa. La localización del antígeno está asociada a la membrana citoplasmática, pareciendo este grupo ser el único, en el cual, el grupo antígeno no está localizado en la pared celular, como ocurre con otros grupos antigénicos de streptococos del grupo A, B, C y G (KRAUSE, 1972).

De los enterococos, para la diferenciación de especies de *S. faecalis*, *S. faecium* y *S. durans*, la determinación de la actividad de esterasas puede ser útil, ya que el *S. faecalis* posee esterasas muy activas en contraste a otros enterococos (LUND, 1965).

Los enterococos tienen un grado limitado de patogenicidad al igual que otros efectos más serios en infecciones con anaerobios. Estos microorganismos han sido establecidos en un gran número de infecciones mixtas

asociadas a la vavidad oral, incluyendo algunas como faringitis, sinusitis maxilares supurativas, endocarditis, bacteriana, etc. muchas de las cuales provienen de procedimientos dentales.

Sin lugar a dudas están entre los microorganismos más predominantes en conductas radiculares infectados, en numerosos estudios, se ha establecido que la especie enterocócica más común es el *S. faecalis*. Estos enterococos constituyen un problema en la terapia de conductos radiculares, sin embargo, se sabe poco acerca del modo por el cual el *S. faecalis* ejerce sus efectos destructivos en tejidos orales. Ellos tienen una relativa alta resistencia a un número de desinfectantes químicos y a la penicilina, con lo cual, son difíciles de eliminar y la aplicación aditiva de otros antibióticos como la estreptomina, no soluciona el problema.

Una de las variedades del *S. faecalis* que persiste más tenazmente, en comparación con el *S. faecalis* propiamente tal, es el *S. faecalis* variedad *liquefaciens*.

Predominan de manera considerable en la flora humana, mientras que los no enterococos, representados por el *S. bovis* y *S. equinus*, se encuentran preferentemente en animales.

Es menester señalar la importancia de aislar y caracterizar los streptococos del grupo D en vista de la diferenciación de los enterococos con los no enterococos

pertenecientes a este grupo, lo que es de mucha ayuda para conducir y evaluar la efectividad de la terapia antibiótica en diferentes estados clínicos. Por ello, se dará una reseña de las características, comportamiento y frecuencia entre otras cosas, de los no enterococos.

#### A.2.2 Especie no Enterococo: (5) (16).

Estudios serológicos han establecido definitivamente la presencia del antígeno D en este grupo no enterocócico. Sin embargo, la existencia de ciertas diferencias fisiológicas, separan a este grupo de los enterococos.

El *S. equinus*, muy rara vez causa enfermedad humana, por el contrario, el *S. bovis* es un conocido patógeno humano que ha sido aislado en casos de endocarditis bacteriana y otras infecciones humanas. La frecuencia y tipo de lesiones en forma precisa, no se conoce.

En relación al *S. bovis*, estudios microbiológicos de laboratorio dicen que aumenta la viscosidad en 5% de caldo sucrosa, pero no al gel. Crece rápidamente en agar sangre dentro de 24 horas a 35 °C.

La diferenciación preliminar del *S. bovis* de los enterococos, reside o puede ser llevado a cabo a través de una prueba de sensibilidad antibiótica. Generalmente es susceptible a la meticilina y clindamicina, sin embargo, los enterococos, con la posible excepción del *S.*

*durans*, son resistentes.

Sus características fisiológicas incluyen crecimiento a 45 °C, en medio bilis al 40%; y en medio NaCl al 6.5% o en pH 9.6 prácticamente no existe. Provoca la hidrólisis de esculina y de almidón, fermenta la rafinosa y melobiosa así como también, la lactosa con producción de ácido, es incapaz para fermentar piruvato y sorbosa fracasando en la hidrólisis de gelatina o arginina.

El *S. equinus* se lo diferencia del *S. bovis*, por su incapacidad para fermentar lactosa, e hidrolizar el almidón.

El *S. bovis* puede producir  $\alpha$ -hemólisis en agar sangre o mostrar una reacción no hemolítica.

En un estudio de una serie de casos de endocarditis causada por streptococos del grupo D, el *S. bovis* como se mencionó anteriormente, es el causante de casi la mitad de los pacientes, de esta patología, los cuales, presentaban historia de algún procedimiento odontológico.

Se puede obtener de la cavidad oral y en los casos en que puede ser aislado de la saliva en un número significativo son pocos, por otro lado, se los halla frecuentemente en la placa bacteriana dental, en algunas oportunidades, en gran número así como también en bacteremias causadas por maniobras dentales.

En relación a la susceptibilidad antibiótica de este grupo, es similar a especies de streptococos del tipo viridans, no obstante, los enterococos son más resistentes.

Es importante recalcar que la variedad bovis, es sensible a la penicilina, así como también a la clindamicina, lincomicina y oxacilina, en comparación con los enterococos que son más resistentes.

TABLA (1) REACCIONES FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DEL GRUPO D STREPTOCOCCOS

TEST	S. BOVIS	S. EQUINUS	S. AVIUM	S. DURANS	S. FAECIUM	S. FAECALIS	S. FAECALIS VAR: LIQUEFACTENS	S. FAECALIS VAR. ZYMOGENES
Crecimiento a:								
45°C	+	+	•	+	+	+	•	•
10°C	-	-	•	+	+	+	•	•
60°C por 30'	•	•	•	•	•	+	+	+
pH 9.6	-	-	•	d	+	+	+	+
6.5% del NaCl	-	-	+	+	+	+	+	•
Crecimiento en:								
ROGOSA	•	•	•	•	•	leve	leve	leve
TELURITO	-	-	•	-	-	+	•	•
10% bilis	+	+	•	+	+	+	•	•
40% bilis	+	+	•	+	+	+	•	•
Agar bilis-esculina	+	+	+	+	+	+	•	+
Hidrólisis de:								
ESCULINA	+	+	•	+	+	+	•	•
ARGININA	-	-	-	+	+	+	•	•
HIPURATO	-	-	•	d	d	d	•	•
PIRUVATO	-	-	+	-	-	+	•	•
Degradación de:								
GELATINA	-	-	•	-	-	d	•	•

TEST	S. BOVIS	S. EQUINUS	S. AVIUM	S. DURANS	S. FAECIUM	S. FAECALIS	S. FAECALIS VAR: LIQUEFACIENS	S. FAECALIS VAR. ZYMOGENES
Acidos de:								
ARABINOSA	-(d)	-	+	-	+	-	.	.
MALTOSA	+	+	.	+	+	+	.	.
TRETALOSA	d	-	.	d	+	+	.	.
RAFINOSA	+	-	.	-	-	-	.	.
SALICINA	+	+	.	d	+	+	.	.
GLICEROL	-	-	.	+	+	+	.	.
MANITOL	+(d)	-	+	-(+)	+(d)	+	.	.
SORBITOL	-	-	+	-	-	+	.	.
SUCROSA	+	+	.	d	+	+	.	.
GLUCOSA	+	+	.	+	+	+	.	.
SORBOSA	-	-	+	-	-	-	.	.
HEMOLISIS [sangre de caballo]	$\alpha/-$	$\alpha$	.	$\beta/-$	$\alpha/\beta$	$\beta/-(\alpha= \delta, \delta)$	$(\alpha= \delta, \delta)$	.
PRODUCCION DE nutriente en gelatina	.	.	.	.	.	-liquefacci3n	+liquefacci3n	+/-liquefacci3n
ANTIGENO DE LANCFIELD	D	D	D/Q	D	D	D	.	.
DISPOSICION	.	.	.	.	.	individual, pares, en ca dena	individual, pares, en ca dena	individual, pares, en cadena

Recopilaci3n de NORD, W3DSTR3M, NOLTE, HEINTZ y COL. (12) (16) (17)

- [d]: 27-79% cepas positivas (17)

- (-): 21-79% cepas positivas (17)

- [+]: seg3n NORD y COL. (17)

- [-]: seg3n HEINTZ y COL (12)

A.2.3 Distribución proporcional de los enterococos en varias superficies orales, en relación al total de microorganismos de la cavidad oral:  
(2) (3) (14) (16).

Población: enterococos

Mucosa bucal	0.1
Dorso lengua	0.01
Saliva	0.1
Placa supragingival	0.1
Crévice	0-10
Conductos radiculares infectados	10-30 (3)

Distribución porcentual: %

Saliva	82% <i>S. faecalis</i> 11% var. <i>liquefaciens</i>
Crévice	24%
Tonsilas	24%
Faringe	18.5%

Total de enterococos de la cavidad oral..... 75%

A.3 Clasificación: (3)

A.3.1 Clasificación por acción hemolítica: (BROWN).  
(Sobre sangre en un medio de agar)

- Streptococos  $\gamma$ -hemolíticos: no producen hemólisis dentro del medio o sobre él. El streptococo  $\gamma$ -hemo-

El tipo más común, es el *S. faecalis*.

3.2 Clasificación por actividad fisiológica:  
(SHERMAN)

Comúnmente los enterococos son residentes no hemolíticos del tracto intestinal, se colocan juntos en especie *S. faecalis*, no obstante, algunos sí producen hemólisis.

3.3 Clasificación inmunológica: (LANCEFELD)

Se clasifican como streptococos del grupo D, substituidos por los no enterococos y los enterococos, pueden ser o no hemolíticos. Para el caso del *S. faecalis*, posee 11 tipos antigénicos a diferencia del *S. faecalis* que posee 19 tipos.

B) MICROORGANISMOS INVOLUCRADOS EN LAS ALTERACIONES PULPARES

"Es difícil determinar el principal microorganismo causal de la pulpitis, en parte, debido a las dificultades técnicas asociadas con la obtención de muestras válidas para el cultivo y también debido a que el momento exacto de la infección inicial es difícil de determinar. Se encuentran bacterias con un potencial patogénico bastante alto con cierta regularidad en las pulpas dentarias que no muestran reacciones clínicamente demostrables en ellas. Por otra parte, no siempre es posible encontrar bacterias, aún cuando exista una pulpitis clínicamente obvia, que tampoco es atribuible fácilmente a otras formas de irritación fuera de la bacteriana" (3).

Las cepas únicas más comunes de microorganismos aislados de pulpas vitales sin inflamación o de pulpas en los primeros estadios de la inflamación, son streptococos, donde el *S. salivarius* generalmente constituye menos del 8% de los microorganismos del conducto radicular contaminado. En cuanto a los streptococos, que posiblemente sean difíciles de eliminar de los conductos radiculares, particularmente cuando se usan antibióticos, han aparecido en proporciones del 10 al 30% en los conductos radiculares infectados. El enterococo más comúnmente encontrado es el *Streptococcus Faecalis*.

Otros microorganismos hallados en el examen de muestras de conductos radiculares son bacilos, filamentos,

*fusobacterium*, formas de levaduras, bacilos difteroides, *actinomyces*, especies de *cándida*, lactobacilos típicos, etc.

B.1 Microorganismos de las pulpas necróticas (13)

Los microorganismos encontrados en pulpas necróticas, son básicamente de la misma variedad de los que se encuentran en las caries dentinarias profundas, puesto que la necrosis pulpar es el producto de la evolución de una lesión cariosa. Lo que sí se aprecia, es una variación cuantitativa de esta flora, que consiste en disminución de algunas especies y aumento de otras, fuera de la aparición de algunas especies de anaerobios.

En dientes con gangrenas pulpares abiertas, que han permanecido sin sintomatología dolorosa por largo tiempo, se encuentra el siguiente cuadro microbiano, según una recopilación de BROWN y RUDOLPH, MARINO y GUTIERREZ:

TABLA (2): MICROORGANISMOS PRESENTES EN DIENTES CON GAN -  
GRENAS PULPARES ABIERTAS:

Gram. (+) 60% a 80%	Microaerofílicos o facultativos	Enterococo
		Streptococo <u>Viri</u> <u>dans</u>
		Streptococo <u>Hemo</u> <u>lítico</u>
		Stafilococo <u>epi</u> <u>dermidis</u>
		Stafilococo <u>dora</u> <u>do</u>
		Lactobacilo <u>aci</u> <u>dófilo</u>
		Monilias
		Bacilos <u>difteroi</u> <u>des</u>
		Anaerobios-Formas filamentosas
		Gram. (-) 20%
Colibacilo		
Espiroquetas		
Anaerobios	Vibriones	
	Fusiformes	

Estos microorganismos que han sido enumerados, corresponden a gangrenas pulpares polimicrobianas, ya que se han realizado trabajos en que se ha visto que las reagudizaciones de antiguas gangrenas pulpares son generalmente de tipo monomicrobianas.

SHOVELTON, estudió el grado de invasión bacteriana de la dentina radicular en 97 dientes con diagnóstico de gangrena pulpar. Se extrajeron y fijaron en formolína, se hicieron cortes seriados de ellos con las funciones correspondientes con lo que se pudieron ver aproximadamente las bacterias en los cortes dentarios por descalcificación.

La invasión bacteriana fué considerada leve en 33 dientes, moderada en 20 y severa en 8 dientes.

También se observó una tendencia a la disminución del número de bacterias en el conducto a medida que se acercaba al foramen apical.

## B.2 Microorganismos de diversas infecciones bucales de origen dentario.

La flora microbiana predominante en infecciones bucales como abscesos, flegmones, adenitis, sinusitis, etc., es la Gram. (+) y dentro de ésta, los stafilococos aureus y epidermidis y los streptococos; ambas especies están incluidas dentro de los microorganismos piógenos, cuya característica fundamental, es la de producir procesos infecciosos superados.

Al cultivar muestras para un trabajo de investigación, tomadas de lesiones tales como abscesos submucosos, adenitis, osteomielitis, parotiditis, adeno-flegmo -

nes, osteoflegmones, furúnculos y otras infecciones maxilo faciales de origen dentario, de 100 casos estudiados, en 67 se obtuvo cultivos positivos que se distribuyeron en la siguiente forma:

TABLA (3): DISTRIBUCIÓN DE MICROORGANISMOS EN CULTIVOS DE 67 DE 100 CASOS DE PROCESOS INFECCIOSOS SUPURADOS:

Gram. (+)	56 casos = 84 %
Gram. (-)	1 caso = 1,5 %
Infección mixta	9 casos = 13,5 %
Hongos	1 caso = 1,5 %
	<u>67 casos = 100 %</u>

C) SUSCEPTIBILIDAD DE LOS ENTEROCOCOS ORALES Y MECANISMO DE RESISTENCIA

Los enterococos constituyen un problema en la terapia pulpar por su relativa alta resistencia a desinfectantes químicos y a determinados antibióticos y en especial a la penicilina. Se ha demostrado que la especie *liquefaciens* persiste más que el *S. faecalis* (16).

En un trabajo práctico, se vio que la persistencia de enterococos en el primer tratamiento con conducto abierto es de 18% y en conductos cerrados de 0%. En otro estudio, en 31 conductos cerrados con tratamiento inicial se encontraron en un 13% y en 25 conductos abiertos con tratamiento inicial, un 12%. La probabilidad de contaminación durante la toma de muestra, pudo afectar estos resultados (3).

Este hecho es el más significativo y el que reúne mayor interés en el estudio de los enterococos y su comportamiento variable a distintas drogas de uso rutinario en endodoncia.

C.1 Susceptibilidad de los enterococos:

C.1.1 Antibiograma:

Es un procedimiento de laboratorio que permite determinar "in vitro", la sensibilidad de una cepa mi

microbiana frente a los antibióticos y otras drogas quimioterápicas. Es un complemento necesario para el estudio de una cepa microbiana de una lesión patológica para permitir conocer "in vitro" su sensibilidad a diversos antibióticos de uso rutinario en la práctica médica y odontológica.

Este examen es muy importante, ya que últimamente han surgido muchas cepas resistentes a antibióticos, dando de este modo, una clara idea de las posibilidades de tratamiento de una infección determinada.

Se utilizan dos métodos para cuantificar la sensibilidad bacteriana:

a) Método de difusión en agar (sensidiscos):

Se basa en la propiedad de los antibióticos de difundir a través del agar de modo que las cepas sembradas quedan en contacto con el antibiótico.

b) Método de dilución en medio líquido o sólido:

Es el sistema más exacto y el que empleamos en el desarrollo del Seminario. Su explicación y técnica se detallan en el capítulo II, Materiales y Métodos.

C.1.2 Elección del antibiótico:

Factores a considerar: (15)

- Sensibilidad del microorganismo.
- Posibilidad de lograr niveles séricos o humorales.
- Adecuación a la CIM (concentración inhibitoria mínima) del microorganismo.
- Condiciones previas del paciente.
- Características farmacocinéticas del antibiótico.
- Reacciones adversas.
- Interrelaciones con otros microorganismos y/o drogas.
- Costos relativos del antibiótico.

Como regla general, para una terapia efectiva, la concentración del antibiótico debe ser en el suero, o sitio de infección, a lo menos 2-4 veces la CIM del microorganismo causante de la infección.

Las combinaciones de antibiótico pueden dar efecto sinérgico antagónico, indiferencia o sólo de adición. En el caso de combinación de aminoglicósidos y  $\beta$ -lactámicos, en el tratamiento de la endocarditis por enterococo, se ejerce una buena acción sinérgica, para ello, el enterococo deberá ser sensible al menos a 2000  $\mu\text{gr.}/\text{ml.}$  del aminoglicósido para considerarlo como sensible (15).

El Dr. FRANCISCO MONTIEL y COL., confeccionaron un breviario de la terapia antimicrobiana, uno de los datos, de importancia en nuestro seminario, es lo que respecta a la interpretación de las CIM de los antibióticos de uso habitual.

Para los cinco antibióticos empleados por nosotros, las cifras son:

TABLA (4): CONCENTRACION INHIBIDORA MINIMA DE 5 ANTIBIOTICOS DE USO HABITUAL: (15)

ANTIBIOTICO	CIM	
	<u>RESISTENCIA (a)</u>	<u>SENSIBILIDAD (b)</u>
PENICILINA G	> 16	≤ 0.12
TETRACICLINA	> 8	≤ 1
CEFALEXINA	> 16	≤ 8
AMPICILINA	> 4	≤ 2
CAF	> 16	≤ 8

a) Resistente:

El microorganismo infectante no es inhibido a los niveles habitualmente alcanzables en sangre por el antibiótico.

b) *Sensible:*

El microorganismo infectante es inhibido por los niveles alcanzados en sangre o tejidos, por el antibiótico, a las dosis usuales, incluyendo la administración oral cuando ésta es apreciable.

Los valores entre ambos rangos, se consideran intermedios.

1) Penicilina G:

Es el primero de los antibióticos que se usa generalmente en infecciones inespecíficas orofaciales. Especialmente efectivo contra los anaerobios en dosis de 2-3 millones de UI/4 hrs. intravenosa. Con respecto a los aerobios, existe una resistencia relativa bajo 4-6% (7).

Se ha demostrado que algunas cepas de enterococos han aumentado su resistencia a la penicilina, motivo por el cual, existe interés de muchos investigadores y de parte nuestra en determinar la sensibilidad de los enterococos a este antibiótico.

2) Ampicilina:

Posee una idónea actividad a concentración de 500 mgr./6 horas, actividad notable contra aerobios orofaríngeos excepto algunas cepas de *H. influenzae*,

muy resistentes a las penicilinas (7).

Es levemente menos activa que la bencilpenicilina, pero levemente más activa contra los enterococos. Sin embargo, posee más efectos colaterales que otras penicilinas como ser intolerancia gástrica adicional, rash alérgico, etc. (SHAPIRO y COL. 1969) (18).

### 3. Cefalosporinas (Cefalexina):

Muy eficaz contra *B. Melaninogénicus*, *Fusobacterium*, *Peptococcus* y *Peptoestreptococos* en concentración terapéutica de 0.51 gr./8 hrs. (7).

A diferencia de otras cefalosporinas, la cefalexina se puede dar por vía oral. Se ha relatado además, que dá alta concentración en el hueso y ha sido usado para el tratamiento de la osteomielitis (KANYUCK y COL. 1971). Sin embargo, existen trabajos que demuestran una resistencia a los enterococos a la cefalexina, la cual, probablemente nunca será usada en infecciones enterococcicas (18).

### 4) CAF y derivados:

El Cloranfenicol y su análogo el Tianfenicol, poseen alta actividad frente a todas las especies anaeróbicas y aerobios bucales, superior al resto de los antibióticos estudiados, pero, debido a su toxicidad, su uso debe limitarse a situaciones concretas (7).

5) Tetraciclina:

Un alto número de anaerobios son resistentes a la Tc. Las concentraciones habituales son de 250 mgr./6 horas, dando concentraciones plasmáticas insuficientes para erradicar la mayor parte de las formas anaerobias (7).

Alrededor de un tercio de las cepas de enterococos son resistentes a la Tc. Por esto, los enterococos muestran variaciones de sensibilidad a las tetraciclinas y sus análogos (TOALA y COL 1969). Desde que las Tc. producen efectos colaterales como hipoplasia, daño hepático, y alta distribución gastrointestinal, han sido limitadas en su uso (16) (18).

6) Eritromicina:

En los casos de alergia a las penicilinas y cefalosporinas, el uso de la eritromicina en infecciones streptocóccicas, es recomendable (GARRED y O'GRADY, 1971). Sin embargo, para combatir la infecciones enterocóccicas, es limitada, ya que algunas cepas son resistentes a la eritromicina y se ha relatado un fracaso en tratamientos de septicemias enterocóccicas con eritromicina (BENGSTROM y COL. 1972) (18).

7) Eficacia de diversos desinfectantes endodónticos sobre los enterococos:

a) Tiempos bactericidas efectivos del paraclorofenol y formalina en streptococos faecalis (in vitro).

- Pequeñas concentraciones de paraclorofenol de 0,5%, y 1% y 2% en glutaraldehído, no mostraron efectos bactericidas después de 24-72 horas en incubación. Concentraciones de 10%, 20% y 30% de paraclorofenol y 25% de formalina sí mostraron efectos bactericidas pasados las 72 horas de incubación (19).

b) Actividad bacteriostática y bactericida de otros medicamentos:

- En un trabajo efectuado por ELLERBRUCH y MURPHY, en 1977, sobre la actividad antimicrobiana de medicamentos vaporosos llegaron a los siguientes resultados sobre los enterococos:

1 ml de yoduro de potasio posee la mayor actividad bactericida seguida en orden decreciente por 0.1 ml de hipoclorito de sodio, 0.1 ml de glutaraldehído y con igual acción 0.001 ml de formocresol y 0.1 ml de solución acuosa al 2% de paraclorofenol; 0,1 ml de paramonoclorofenol alcanforado al 30%, mostró mínima a nula actividad bactericida; con respecto a la actividad bacteriostática en orden decreciente, el formocresol mostró mayor actividad seguida por hipoclorito de sodio y yoduro de potasio, con igual acción;

el glutaraldehído presentó mínima actividad bacteriostática, por último, la solución acuosa de paraclorofenol y el paramonoclorofenol alcanforado, no mostraron actividad bacteriostática (6).

Esta experiencia fue realizada empleando el sistema de sensidiscos.

## C.2 Mecanismos de Resistencia

La habilidad de una bacteria para tolerar un antibiótico, reside en la capacidad de modificar las estructuras que las unen con el antibiótico, produciendo enzimas que inactivan el antibiótico o alteran la membrana celular con el fin de que el antibiótico no pueda penetrar en la bacteria. Esta capacidad se aloja en los genes localizados en los cromosomas o elementos extracromosomales (plasmidios y factor "R").

### C.2.1 Plasmidios (14)(19)

Son entidades extracromosomales separadas de lo que es el cromosoma de la bacteria y que contribuye a la virulencia convirtiendo características no patológicas en patológicas.

Clinicamente, la resistencia a un antibiótico está asociada frecuentemente con la presencia de estas entidades (factor "R"). Según Mc. CRACKEN, se han identifi

cado distintas especies moleculares de plasmidios en el grupo D:

1. Determinantes genéticos para la transferencia-conjugación.
2. Producción de bacteriocina.
3. Síntesis de hemolisina.
4. Resistencia a antibiótico.

Además, agrega que el rol de estos plasmidios en la producción de enfermedad, aún no se ha demostrado.

La resistencia a un antibiótico que se asocia a estos cromosomas bacterianos que producen mutaciones, es rara (1 en varios millones) y depende de la división celular para transmitirlas dentro de una célula hija.

#### C.2.2 Resistencia a antibióticos:

##### a) Transferencia-conjugación: (4)

Este mecanismo, en los streptococos, juega un rol importante en el desarrollo de múltiples resistencias a antibióticos.

- FRANCKE y CLEWELL, en estudios hechos en el streptococo faecalis, designado como DS16, descubrieron una resis -

tencia marcada a la tetraciclina (Tc), probablemente debida a un sistema de conjugación, este elemento lo llamaron Tn 916 (segmento de ADN de 16 Kb) y es el prototipo de la conjugación-transferencia. Los mismos estudios detectaron en el DS16, dos plasmidios, designados como el pAD1 (58 Kb) que determina la actividad hemolisina-bacteriocina y el pAD2 (25 Kb) que confiere la resistencia a eritromicina, streptomycin, y kanamí cina.

- LE BLANC y LEE, también reportaron en el streptococo faecalis hemolítico, designado como JH1, dos plasmidios, el pJH1 que se aloja en los determinantes de resistencia de los cromosomas, confiriendo la resistencia a la tetraciclina y el pJH2 que determina la actividad hemo losina.
- Mientras que BURDETT y COL., hallaron 3 clases de deter minantes que confieren resistencia a la Tc designados como tet L, tet M, y tet N.

b) Control extracromosomal de resistencia a antibióticos:

(10)

Otros estudios dicen que la resistencia a un antibiótico, es el resultado de la producción de una proteína (enzima) que posee la capacidad de inactivar la droga ya sea por fosforilación, acetilación, hidrólisis o adenilación.

- GOLDSTEIN y MACRINA, descubrieron en el *streptococo faecalis*, dos factores "R", el pAMB1 que confiere la resistencia a eritromicina y lincomicina y el pAM $\alpha$ 1 que confiere la resistencia a la Tc.
- La prevalencia de este factor "R", es un modo de generar resistencia a las drogas y es un problema en el tratamiento de infecciones bacterianas, así tenemos por ejemplo que la mutación de un cromosoma, puede afectar la síntesis de pared celular, dando resistencia a la penicilina, porque ésta inhibe el desarrollo celular por bloqueo de la síntesis de la pared.

c) Cambios en la susceptibilidad de los sitios blancos:

(9)

- El CAF, eritromicina, Tc o los aminoglicósidos, antibióticos usados regularmente en la terapia endodóntica, afectan la síntesis de proteínas de las bacterias. Los ribosomas son los elementos que sintetizan las proteínas (estructuras que se encuentran unidas a macromoléculas de proteínas y al ARN, formado por dos subunidades: 30S y 50S).
- GOLDSTEIN, propone un mecanismo de acción que explicaría de algún modo, este mecanismo de resistencia:
  1. Síntesis de proteínas a partir de aminoácidos.

2. La síntesis de proteínas se inhibe por el antibiótico a nivel de la subunidad 30S.
  3. El ribosoma se ha hecho resistente a la acción del antibiótico por el cambio de composición en la subunidad 30S que permite la síntesis de proteínas.
- En el caso de la eritromicina, la acción es a nivel de la subunidad 50S.

Los *streptococos faecalis*, junto con los *stafilococos aureus*, poseen este tipo de resistencia.

d) Enzimas que inactivan antibióticos: (9)

- Se ha discutido si la adquisición de resistencia ocurre antes de la formación de los ribosomas o no, en el caso de la penicilina, la molécula de ribosoma, se divide antes, interfiriendo en la síntesis celular de la bacteria.
- Las enzimas que modifican el antibiótico, en la formación de los ribosomas, pueden transferir ciertos grupos como fosfato, acetato, adenilato, etc., usados por la bacteria como fuente de energía.
- En el caso del CAF, la inactivación enzimática se completa a nivel de la acetil-transferasa en los sitios 1 y 3 de acetilación del CAF. Primero se inicia en 3 y luego en 1. (9) (16).

- Para la penicilina, actúan dos enzimas, la  $\beta$ -lactamasa y amidasa (ampicilina) inactivándola por división molecular en distintos sitios.

e) Otros: (9)

Las dosis de antibióticos, se pueden absorber en presencia de pus, tejidos necróticos, fibrina de la pared de abscesos, etc., contribuyendo de este modo a otro modo de resistencia frente a los antibióticos.

D) ENDOCARDITIS INFECCIOSA (EI)

- A pesar del mayor avance tecnológico en lo que a procedimientos de diagnóstico respecta, la EI continúa siendo, en muchos casos, un problema de difícil solución en la práctica.
- Numerosas publicaciones mencionan que este cuadro ha experimentado cambios en su presentación clínica, asociado fundamentalmente al aumento en frecuencia de agentes etiológicos poco comunes. Uno de ellos, de interés para nosotros, es la prevalencia de los enterococos (1).

Es por ello, que consideramos importante, hacer un estudio bibliográfico de la incidencia de este grupo bacteriano y observar de que manera los procedimientos odontológicos incrementan su manifestación.

- Es importante considerar la variada terminología que se usa para definir este cuadro. A fin de que el lector use adecuadamente su vocabulario; por mucho tiempo, se llamó "Endocarditis bacteriana", término mal empleado, ya que se ha comprobado que la variedad de microorganismos es tal, que se prefiere llamarla "Endocarditis Infecciosa". Otros autores la mencionan como "Endocarditis stafilocócica" o "Endocarditis enterocócica", ambos términos se usan solo para saber que terapia antimicrobiana emplear. Otros prefieren el uso de "aguda" "subaguda" y "crónica", terminología asociada a la sos-

pecha de algún microorganismo en particular, así tenemos por ejemplo, si el agente etiológico fundamental es el *S. viridans*, la llamaremos "subaguda" y "crónica", en caso de ser el *stafilococo* coagulasa (+) la llamaremos simplemente "aguda":

- . Aguda: coagulasa (+) del *stafilococo*, *streptococo* grupo A,  $\beta$  hemolítico, *S. pneumoniae*, *N. gonorrhoeae*, especies de *brucellas*, etc. (16).
- . Subaguda y crónica: *S. viridans*, coagulasa (-) del *stafilococo*, *enterococos*, *haemophilus*, *candida*, *histoplasma* y otros (16).

D.1 Bacteremias causadas por procesos dentales:  
(16) (14) y (1)

- Las causas odontológicas son variadas y van desde simples procedimientos profilácticos a exodoncias múltiples.
- 10% - 50% de los casos relatan un foco dental previo a exodoncia, restauraciones o profilaxis. Otros autores mencionan alrededor del 50 a 85% causadas por exodoncias y un 40% causadas por tratamientos profilácticos. Mc. CRACKEN entrega cifras similares: 40-80% por exodoncias, siendo el 6 a 10% de todos los factores etiológicos.

El 24% se debe a causas periodontales fundamentadas

principalmente por la presencia de una gran cantidad de microorganismos en el surco crevicular que son impulsados al torrente sanguíneo por manejo exagerado de fórceps y elevadores, destruyendo la integridad del ligamento periodontal.

- AGUERO, en un estudio de 32 casos, da cifras más bajas aún: sólo un 12.5% (4 casos) son causadas por maniobras dentarias.

Los tratamientos endodónticos también cumplen un rol preponderante, toda manipulación exagerada del conducto que sobrepase el apex, provoca bacteremia. NOLTE menciona un 83% causadas por colgajos mucoperiosticos y un 33% por curetaje apical.

- Finalmente Me CRACKEN cita un 30% de mortalidad causada por maniobras dentales. Es por ello, importante considerar, ante cualquier procedimiento odontológico, la potencialidad de producir una Endocarditis infecciosa. Como consecuencia de una descuidada maniobra dental y la importancia que reviste la profilaxis antibiótica.

D.2                    Antecedentes epidemiológicos y cardiopatía de base. (Ver Anexo, pág. 93).

D.3                    Cuadro clínico, frecuencia de síntomas y signos. (Ver Anexo, pág. 94).

D.4 Exámenes de laboratorio. (Ver Anexo, pág.95).

D.5 Resultados de los Hemocultivos (1) (14) (16) y (20).

En un trabajo médico efectuado por los doctores AGUERO, ESCOBAR y AGUAYO, concluyeron que la principal etiología, continúa siendo el *S. viridans* (47% de los casos con hemocultivos positivos), aunque ha experimentado cierto descenso en relación a publicaciones previas en nuestro medio. Este hecho podría atribuirse por otro lado, a error en el diagnóstico de streptococos grupo D, ya que algunas especies de éste, exhiben hemólisis de tipo alfa, característica reconocida del *S. viridans*, requiriéndose entonces pruebas adicionales para su diferenciación (1).

- Esta sería una posible explicación al aumento de los enterococos como agentes causales de Endocarditis infecciosa.
- Debido a la escasa literatura en relación a los enterococos como agentes etiológicos, esta revisión bibliográfica sólo dará información acerca de la frecuencia de microorganismos comunes en la Endocarditis infecciosa, basándonos en publicaciones científicas y textos de importancia en nuestro medio. Los resultados de esta revisión, se grafican en la siguiente tabla:

TABLA (5): RESULTADOS DE LOS HEMOCULTIVOS

MICROORGANISMOS	%
<i>Streptococos:</i>	60 - 80 %
- <i>S. viridans</i>	10 - 47 %
<i>enterococos</i>	2.9 - 10 %
<i>otros (grupo A β-hemolítico microaerófilo y anaeróbico)</i>	20 - 30 %
<i>Stafilococos:</i>	10 - 30 %
- <i>coagulasa (+)</i>	9 - 27 %
- <i>coagulasa (-)</i>	1 - 3 %
<i>Otros:</i> ( <i>entericos, neumococos, difteroides, haemophilus, cándida, histoplasma, aspergillus, naiseria gonorrhoea, brucella, meningococo, etc</i> ).	

Referencias bibliográficas: (1) (16) (20)

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

## 1 INTRODUCCION

Para aproximarse con la mayor exactitud al conocimiento de una posible explicación de hechos complejos variados e influidos por múltiples causas, se hace necesario realizar una investigación, cuya base principal es el método científico que nos permite una conducción metódica y sistemática de la problemática planteada. La etapa básica es la determinación de objetivos y consecutivamente una metodología, aspectos que fueron considerados en el desarrollo del presente Seminario de Tesis. Para ello se seleccionó un grupo de pacientes con determinadas características, a los cuales se les tomó muestras de conto y saliva, que posteriormente fueron analizados en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina.

## MATERIALES

La Escuela de Odontología aportó los siguientes materiales:

- 3 lts. acetona
- 3 lts. alcohol 95%
- 3 kgs. algodón
- 100 tubos ensayo 140 x 14
- 100 tubos ensayo 120 x 12
- 150 porta-objetos

b) Materiales aportados por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina y los alumnos:

- 1 libra de Soya-Trypticase
- Medios de cultivo para enterococos (líquidos y sólidos)
- batería de azúcares (en la determinación de las especies de enterococos)
- Placas Petri
- Pipetas
- Conos de papel (de los usados por Endodoncia)
- goma dique
- solución antiséptica (Timerosal)
- 5 antibióticos
- medios de cultivo para antibiograma
- matraces

## 2.3 METODOLOGIA

### 2.3.1 Asilamiento y Cultivo de Enterococos:

#### A) MATERIALES

a) Medios líquidos y sólidos:

- caldo cerebro corazón
- caldo presuntivo para enterococos
- caldo cloruro de Sodio al 6.5%
- batería de azúcares: Sorbitol, Manitol y Arabinosa

- bilis-esculina
- Agar Mitis - Salivarium con "telurito de K"

b) Instrumentos:

- pipetas
- tubos de ensayo 140 x 14 y 120 x 12
- porta objetos
- conos de papel
- goma dique
- solución antiséptica

B) METODOLOGIA

B.1 Consideraciones generales:

En Abril de 1986, los seminaristas se reúnen por primera vez con el Profesor Guía, dando a conocer normas y reglamentos que regirán el desarrollo de este seminario. En su parte práctica de laboratorio, se dispuso de un entrenamiento de dos meses aproximadamente, suficientes para adquirir habilidad y destreza en el manejo de laboratorio.

B.2 Fuentes de información:

Con el objeto de consultar en literatura pertinente en la confección del marco teórico, así como para conocer la existencia de algún trabajo sobre el tema,

se recurrió a bibliotecas y consultas:

- Biblioteca de la Facultad de Medicina, U. de Valparaíso.
- Biblioteca de la Escuela de Odontología, U. de Valparaíso.
- Biblioteca del Departamento de Ciencias Básicas dependiente de la Facultad de Medicina, U. de Valparaíso.
- Intercambio con Biblioteca de la Facultad de Odontología de la U. de Concepción y la U. de Sao Paulo, Brasil.

### B.3 Selección de la muestra:

Para cumplir con los objetivos del seminario, se seleccionaron pacientes tomados al azar, de las clínicas de Endodoncia, Cirugía y Prótesis Fija de la Escuela de Odontología, como asimismo de la clínica dental del Hospital Salvador y del Servicio Odontológico del Hospital Dr. Gustavo Fricke. También fué necesario definir aquellas variables que irán en un instrumento confeccionado por nosotros:

- (1) Identificación del paciente: Sólo aporta datos estadísticos de edad, sexo y aspectos socio-culturales (domicilio). No influyen directamente con los resul-

tados.

- (2) Diagnóstico: Este dato, el más importante, entrega información sobre aquellas patologías pulpares de mayor prevalencia en nuestro medio (diagnóstico específico); en algunos casos, también entregará antecedentes generales (diagnóstico integral).
- (3) Higiene oral: También son variables secundarias que solo entregarán una ayuda complementaria en los resultados finales.

Estas variables solo permiten ordenar los datos de cada paciente entrevistado mediante una ficha (Ver Anexo, Tabla: 11 pág. 97 ).

#### B.4 Recolección de datos:

Para la realización del trabajo práctico, se reunieron los datos de cada paciente por medio de la ficha de Seminario de Tesis (Ver Anexo, Tabla: 11 pág.97).

#### B.5 Toma de muestra de conducto y saliva:

- a) Requisito para la toma de muestra: El o los dientes deben tener comunicación con el o los conductos, asimismo, libres de premedicación o cualquier solución irrigadora y libre de caries, es decir, conductos infectados.

b) Técnica para la toma de muestra de conducto:

- Aislar diente en forma absoluta.
- Se pincela diente y goma con solución antiséptica (Timerosal).
- En cono de papel estéril se toma la muestra de conducto dejando el cono en el conducto por 1 minuto.
- Se retira el cono y se deposita en caldo cerebro co razón.
- Se rotula el tubo de acuerdo a número de ficha de Seminario de Tesis.

c) Técnica para la toma de muestra de saliva:

- Con tubo ensayo estéril, se pide al paciente que sa live.
- Se tapa el tubo y se rotula siguiendo igual numeración que ficha de Seminario.
- Se debe tener sumo cuidado en las medidas de asepsia en la toma de muestra para evitar contaminación con otros microorganismos.

B.6 Técnicas de Laboratorio:

- a) Las muestras de conducto y saliva se incuban a 37 °C por 24 horas, en caldo cerebro corazón.
- b) Después de pasadas las 24 horas, se hace un "frotis" de los cultivos positivos con la coloración de Gram clásica (Ver Anexo, Tabla: 12 pág:98) con el propósito de observar los gérmenes presentes en la muestra.
- c) Ensayo presuntivo: Este ensayo, se practica en caldo Presuntivo para Enterococos que tiene su base en la investigación de agua dulce o salina y alimentos naturales. La prueba de presunción, consiste en producir ácido y turbidez en el medio enriquecido con azida de sodio. Tan pronto como se observa una reacción positiva que se manifiesta por el cambio del bromotimol al amarillo, (su fórmula y usos, se explican en Anexo, pág:103), indica presencia de enterococos.

Los cultivos positivos se traspasan a este medio y se dejan por 24 horas a 45 °C (temperatura suficiente para el desarrollo de enterococos).

- 
- Ensayo presuntivo (+) = Enterococo
  - Ensayo presuntivo (-) = No Enterococo
- 

- d) Los ensayos (+), se traspasan a cloruro de Sodio al 6.5%, los cuales se dejan por 24 horas a 37 °C. Pasadas las 24 horas:



Estos tres mencionados medios son complementarios en la batería.

→: viraje

- 
- Caldo sorbitol(+) = (rojo)→amarillo
  - Caldo manitol (+) = (rojo fenol)→amarillo
  - Caldo arabinosa (+) = (rojo fenol)→amarillo
  - Caldo manitol, sorbitol o arabinosa (-) = (rojo)  
→rojo.
- 

Los cultivos (+) indican hidrólisis del azúcar con producción de ácido por la especie de enterococo y cambio de color del reactivo al amarillo.

En pág.: 58 se muestra el esquema general de las técnicas de laboratorio.

---

NOTA: Para el interesado en la composición y uso de los medios de cultivo empleados por nosotros, así como también otros medios dedicados a la detección del enterococo, Ver en Anexo, pág. 103 a pág. 108.

FIGURA (1): ESQUEMA AISLAMIENTO Y CULTIVO

(1) Toma de la muestra

(2) Caldo cerebro corazón por 24 horas a 37 °C

(+) → Turbidez

Frotis

(3) Caldo presuntivo para enterococos por 24 hrs. a 45 °

(+) → amarillo

(4) Caldo cloruro de sodio (NaCl) al 6.5% por 24 horas a 37 °C

(+) → turbidez

4.2.

Bacteria x 24 hrs.

S. Faecalis

S. Faecium

S. Durans

(A) Bilis-esculina

+

+

+

(+) → negro-marrón

(B) Caldo sal

+

+

+

(+) → turbidez

(C) Sorbitol

+

-

-

(+) → amarillo  
(acidez)

(D) Manitol

+

+

-

(+) → amarillo  
(acidez)

(E) Arabinosa

-

+

-

(+) → amarillo  
(acidez)

(F) Agar Mitis-Salivarium con "Telurito de K"

(+) → desarrollo de colonias

desarrollo en Telurito de K del enterococo

→ 4.1 Caldo cerebro corazón por 24 horas a 37 °C para Antibiograma.

### 2.3.2 Antibiograma

#### A) MATERIALES:

##### a) Medios líquidos y sólidos:

- Caldo soya-tripticase
- Caldo cerebro corazón
- Solución stock con 5 antibióticos
- Agar nutritivo licuado

##### b) Instrumentos:

- Pipetas
- Tubos de ensayo 140 x 14 y 120 x 12
- Pipetas graduadas estériles
- Placas petri estériles
- 5 matraces con las soluciones de antibióticos.

#### B) METODOLOGIA:

En la determinación de la susceptibilidad a 5 antibióticos "in vitro", empleamos el método de dilución en tubo que nos da una medida cuantitativa más exacta que el método de los sensidiscos.

##### B.1 Elección del antibiótico:

- Penicilina G sódica: 1.000.000 U.I., 1 ampolla F.N. Lab. Chile S.A.

- Tetraciclina: 250 mgr. Cápsulas. Richezon Laboratories Inc. Philadelphia.
- Cafalexina: (Ospexin): 500 mgr. Tabletas Lab. Astorga Chile.
- Ampicilina (sal sódica): 500 mgr., 1 ampolla. Lab. Saval S.A.
- Cloranfenicol succinato (Sintomecítina): 1 gr. inyectable. Ab.liofilizado, 1 ampolla, Lab. Le Petit.

B.2 Determinación "Solución Stock":

Cada antibiótico se diluye en caldo soya-triplicase hasta lograr una concentración de 1.000  $\mu\text{gr/ml}$  y 1.000 U.I. en el caso de la penicilina G.

(En Anexo, pág.99 se explica el procedimiento matemático).

B.3 Procedimiento de la prueba:

- a) Diluir la Solución stock 1:5 en caldo soya: se toma 1 ml de la solución Stock al cual se le agregan 4 ml de caldo para obtener 200  $\mu\text{gs}$ . que corresponde a la "solución de trabajo".

- Con los cinco antibióticos se procede de igual manera.
- b) Disponer en una gradilla, 10 tubos estériles rotulados del 1 al 10 (Fig.: 2 pág. 65).
- c) Colocar 0.5 ml de caldo soya-tripticase en los tubos 2 al 10.
- d) Agregar 0.5 ml de la Solución de Trabajo (200 µg/ml) a los tubos 1 y 2.
- e) Mezclar el contenido del tubo 2 y traspasar 0.5 ml al 3, mezclar y traspasar 0.5 ml al 4. Se continúa de igual manera hasta el tubo 9. Eliminar 0.5 ml del tubo 9. El tubo 10 no tiene antibióticos y servirá de control.

En cada traspaso, usar pipetas nuevas.

#### B.4 Preparación del Inoculum:

- a) Cada cepa a realizar el antibiograma, se incuba en estufa a 37 °C por 18 horas. (Ver fig. 1 (4.1) pág.: 58).
- b) Después de las 18 horas, se ajusta el cultivo al Nefelómetro 2.

Cada cultivo debe presentar igual turbidez que el nefelómetro que es un indicador de concentración de micro-

organismos.

- c) Posteriormente, se diluye el cultivo en caldo cerebro corazón al 1:1.000 para obtener una concentración de 100.000 a 1.000.000 de organismos/ml.

B.5 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC):

- La batería con los diez tubos se incuba a 37 °C (por lo general, en los streptococos, el tiempo de incubación, es de 6 - 8 horas hasta 18 horas máximo). Después de este tiempo se examina macroscópicamente para ver evidencia de desarrollo. El tiempo de incubación es solamente el suficiente para observar turbidez y desarrollo en el tubo control.
- El último tubo que no muestra desarrollo, se considera el MIC que se expresa en  $\mu\text{gr/ml}$  y en UI/ml en el caso de la penicilina G.

B.6 Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (MBC):

- Para determinar la MBC, se dispone de agar nutritivo lícuado calentando a baño María hasta pasar de estado sólido a líquido.
- Se toman 0.5 ml de cada tubo que no muestra desarrollo

(2 a 3 tubos por cada batería). El contenido de los tubos se deposita en las placas petri estériles, previamente rotuladas.

- Sobre las placas, se deposita el agar nutritivo licuado extendiéndolo en toda la superficie de la placa.
- Se incuban por 24-48 horas a 37 °C.
- La placa que no muestra desarrollo de colonias se considera la MBC.

---

NOTA: La solución stock, para su conservación, se almacena en matraces a -20 °C permaneciendo estable por 8 semanas. Si se conserva a 5 °C, permanece estable por una semana.

TABLA (6): DILUCIONES DEL ANTIBIOTICO PARA DETERMINACION DE CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA POR METODO DE DILUCION EN TUBO

TUBO	MEDIO (CALDO MUE- LLER HINTON)	ANTIBIOTICO AGREGADO	CULTIVO AGREGADO	CONCENTRACION DEL AN- TIBIOTICO $\mu\text{g}/\text{ml}$
1	0	0.5 ml Sol. Trabajo	0.5	100
2	0.5	0.5 ml Sol. Trabajo	0.5	50
3	0.5	0.5 ml tubo 2	0.5	25
4	0.5	0.5 ml tubo 3	0.5	12.5
5	0.5	0.5 ml tubo 4	0.5	6.25
6	0.5	0.5 ml tubo 5	0.5	3.125
7	0.5	0.5 ml tubo 6	0.5	1.56
8	0.5	0.5 ml tubo 7	0.5	0.78
9	0.5	0.5 ml tubo 8	0.5	0.39
(Control) 10	0.5		0.5	0

FIGURA (2): ESQUEMA ANTIBIOGRAMA

- 1) Solución stock (1.000 µgr/ml)  
Solución trabajo (200 µgr/ml)

2) Procedimiento de la prueba

diluir soluc. stock 1:5  
↓  
0.5 ml caldo en tubos 2 al 10  
↓  
0.5 ml solución trabajo en tu-  
bos 1 y 2  
↓  
Mezclar y traspasar hasta tu-  
bo 9

3) Preparación Inoculum

Incubación por 18 hrs. a 37°C  
↓  
Ajuste nefelómetro 2  
↓  
Diluir cultivo al 1:1.000

4) Determinación de la MIC

Incubación a 37 °C por 6-18  
horas  
↓  
Determinación de la MIC

5) Determinación de la MBC

0.5 ml cultivo en placa petri  
estéril  
↓  
Agregar agar nutritivo profun-  
do  
↓  
Incubar por 24-48 hrs. a 37°C  
↓  
Determinar MBC

---

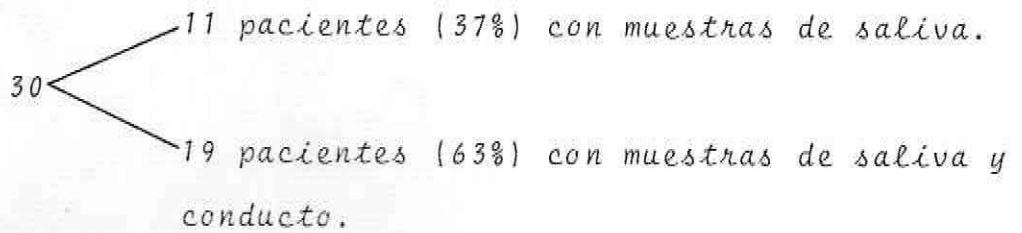
NOTA: El caldo Mueller Hinton, se ha reemplazado por el caldo Soya Trypticase.

CAPITULO III

RESULTADOS

### 3.1 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE ENTEROCOCOS

a) Para la realización del presente estudio, se tomó como Universo un total de 30 pacientes tomados al azar con edades que fluctuaban entre los 15 y 68 años:



- La mayoría de los pacientes (70%), se obtuvieron de las clínicas de Endodoncia.

- El total de muestras obtenidas fué de 37:

18 muestras de saliva (49%)

19 muestras de conducto (51%)

b) Los resultados extraídos de la ficha Seminario de Tesis, no fueron de utilidad, salvo los datos de Diagnóstico específico:

(1) Identificación del paciente: El promedio de edad fluctuaba entre los 30 y 40 años distribuidos en igual cantidad de hombres y mujeres. El 90% de los pacientes provenía de los sectores populares de Valparaíso.

## (2) Diagnóstico específico:

	<u>Nº Pacientes</u>	<u>%</u>
Absceso dentoalveolar crónico (ADAC).	3	16
Absceso dentoalveolar Agudo (ADAA)	1	5
Gangrena pulpar (GP).	15	79
	<hr/> 19	<hr/> 100

- Diagnóstico integral: Ningún paciente portaba cardiopatía de base como para sospechar una posible Endocarditis infecciosa o alguna otra alteración que pudiera asociarse con Enterococos.

(3) Higiene oral: El 100% de los pacientes, presentaban higiene oral regular o mala. El 90% con antecedentes periodontales (60% con gingivitis marginal simple, 20% con periodontitis marginal simple y el 20% restante sin antecedentes).

- c) En la metodología, habíamos planteado la necesidad de hacer un frotis (remitirse a pág.58) con el único objetivo de lograr una visión más específica de los microorganismos que portaba el paciente, los resultados en su mayoría fueron:

Formas cocáceas G (-) y G (+)

Bacilos G (-) y G (+)

d) Resultados de las técnicas de laboratorio:

d.1) Resultados cultivos en caldo cerebro corazón:

- Pasadas las 24 horas de incubación, los resultados arrojaron un 100% de desarrollo.

d.2) Resultados ensayo presuntivo:

- Enterococos:

30 muestras (81%)  $\left\{ \begin{array}{l} 13 (43\%) \text{ de saliva} \\ 17 (57\%) \text{ de conducto} \end{array} \right.$

- No Enterococos:

7 muestras (19%)  $\left\{ \begin{array}{l} 5 (7\%) \text{ de saliva} \\ 2 (29\%) \text{ de conducto} \end{array} \right.$

- Solo un 10% presentaron positividad escasa (leve cambio de color).

d.3) Resultados cultivos en NaCl al 6.5%:

- El 100% de las muestras de enterococos mostraron desarrollo, sólo un 17% mostró un leve desarrollo.

## d.4) Resultados de la batería:

Estos resultados no fueron variados como se pensó en un comienzo, la mayoría de las especies identificadas correspondieron al *S. Faecalis*.

Del total de 30 muestras de Enterococos:

- 28 muestras	<i>S. Faecalis</i>	(93.3%)
- 2 muestras	<i>S. Faecium</i>	( 6.7%)

Resultados bacteriológicos de las tres patologías pulpaes testadas:

ADAC: 5 muestras      ADAC: absceso dentoalveolar crónico  
 ADAA: 2 muestras      ADAA: absceso dentoalveolar agudo  
 G.P.: 15 muestras      G.P.: gangrena pulpar  
 Total muestra: 22 cepas

PATOLOGIA	ENTEROCOCOS:				NO ENTEROCOCOS:	
	<i>S. faecalis</i>		<i>S. faecium</i>		Nº	%
	Nº	%	Nº	%		
ADAC	2	40	2	40	1	20
ADAA	-	-	-	-	2	100
G.P.	15	100	-	-	-	-

Resultados bacteriológicos de las muestras de saliva:

ENTEROCOCOS		NO ENTEROCOCOS	
S. FAECALIS			
Nº	%	Nº	%
7	64	4	36

TOTAL MUESTRA: 11 CEPAS

3.2 ANTIBIOGRAMA

Los resultados del antibiograma están graficados en las Tablas:

Rangos de susceptibilidad de los antibióticos empleados:

MIC: Concentración Inhibitoria Mín.

MBC: Concentración bactericida Mín.

ANTIBIOTICO	MIC ( $\mu\text{gr/ml}$ )		MBC ( $\mu\text{gr/ml}$ )	
Pen. G	0,78	- 6,25 (o)	3,125	- 25
Tetraciclina	3,125	- 100	6,25	- (+)
Cefalexina	25	- 100	50	- (+)
Ampicilina	0,78	- 3,125	3,125	
CAF	3,125	- 12,5	12,5	- 50

(o) Los resultados se expresan en UI/ml

(+) Resultados mayores de 100  $\mu\text{gr/ml}$

MIC -MBC DE LOS CINCO ANTIBIOTICOS EMPLEADOS

Ab	MIC	Nº CULTIVOS	MBC	Nº CULTIVOS
P.G.	0,78	1	3,125	1
	1,56	8	6,25	8
	3,125	9	12,5	9
	6,25	12	25	12
<u>TETRACICLINA</u>				
	3,125	2	6,25	1
	6,25	3	12,5	3
	12,5	5	25	2
	25	5	50	4
	50	6	100	7
	100	9	---	-
<u>CEFALEXINA</u>				
	25	5	50	1
	50	10	100	4
	100	15	---	-
<u>AMPICILINA</u>				
	0,78	9	3,125	6
	1,56	10	6,25	9
	3,125	11	12,5	3
<u>CAF</u>				
	3,125	2	12,5	2
	6,25	10	25	10
	12,5	18	50	8

INTERPRETACION DE LAS CONCENTRACIONES INHIBITORIAS MINIMAS  
DE LOS CINCO ANTIBIOTICOS EMPLEADOS (+)

AB.	RESISTENTE	INTERMEDIO (o)	SENSIBLE
Penicilina	-	100	-
Tetraciclina	83,3	16,7	-
Cefalexina	100	---	-
Ampicilina	---	36,6	63,3
CAF	---	60	40

Los resultados se expresan en porcentaje de cultivos (cepas).

(+) Los datos se basan en recomendaciones del Sub-Comité de Sensibilidad Antimicrobiana del "NCCLS". Adaptadas a nuestras condiciones.

(o) Los resultados están dentro del rango dado por el NCCLS para resistente y sensible.

---

NOTA: Remitirse a pág.32 Tabla (4) y Bibliografía (15).

RESULTADOS DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD DE LAS CEPAS TESTADAS:

Cd: conducto

SL: saliva

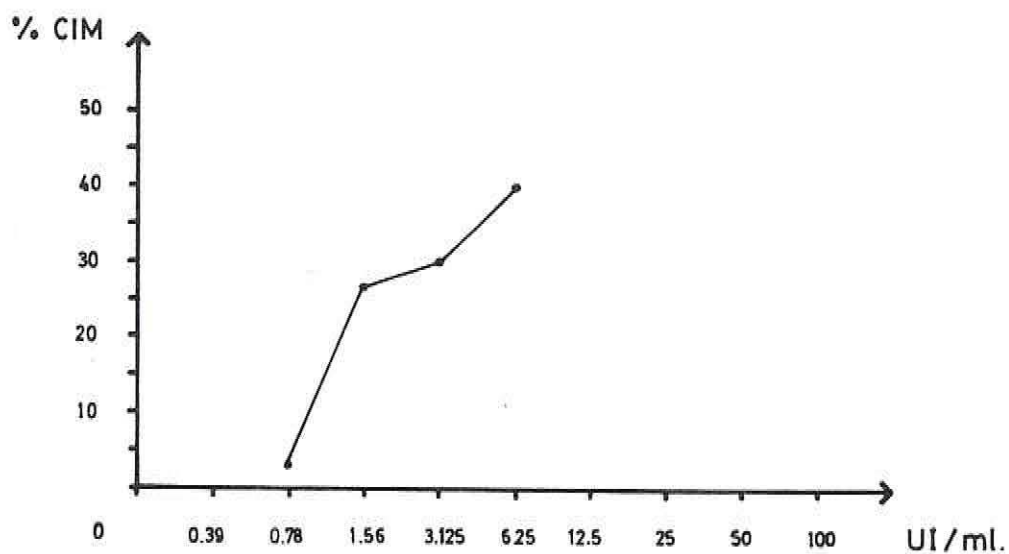
CEPAS	(1)		(2)		(3)		(4)		(5)	
	P.G.		TETRA		CEFALEXINA		AMP. (+)		CAF	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
1 (Cd)	3.125	12.5	6.25	12.5	50	//	1.56	6.25	12.5	50
2 (SL)	3.125	12.5	50	//	25	100	1.56	6.25	12.5	50
3 (SL)	3.125	12.5	12.5	50	50	//	0.78	6.25	12.5	50
6 (SL)	0.78	3.125	25	100	50	//	0.78	3.125	6.25	25
8 (SL)	3.125	12.5	3.125	12.5	25	100	0.78	3.125	6.25	25
9 (SL)	6.25	25	3.125	6.25	100	//	0.78	3.125	12.5	50
10 (SL, Cd)	6.25	25	50	100	100	//	1.56	6.25	6.25	25
	6.25	25	50	100	100	//	1.56	6.25	6.25	25
(*) 12 (SL, Cd)	1.56	6.25	100	//	100	//	0.78	3.125	12.5	50
	1.56	6.25	100	//	100	//	0.78	3.125	12.5	50
13 (SL, Cd)	1.56	6.25	100	//	50	//	1.56	6.25	12.5	50
	1.56	6.25	100	//	50	//	1.56	6.25	12.5	50
14 (SL, Cd)	3.125	12.5	50	//	100	//	1.56	6.25	12.5	50
	3.125	12.5	50	//	100	//	1.56	6.25	12.5	50
15 (SL, Cd)	1.56	6.25	100	//	100	//	3.125	12.5	3.125	12.5
	1.56	6.25	100	//	100	//	3.125	12.5	3.125	12.5
17 (SL)	6.25	25	100	//	50	//	0.78	3.125	6.25	25
18 (SL)	3.125	12.5	50	//	50	//	3.125	12.5	12.5	50
20 (Cd)	6.25	25	100	//	25	100	0.78	-	12.5	50
21 (Cd)	6.25	25	100	//	100	//	3.125	-	6.25	25
22 (Cd)	6.25	25	25	100	50	//	0.78	-	12.5	50
23 (Cd)	3.125	12.5	12.5	50	50	//	3.125	-	6.25	25
24 (Cd)	1.56	6.25	6.25	25	25	50	3.125		12.5	50
25 (Cd)	6.25	25	12.5	25	25	100	1.56	-	12.5	50
26 (Cd)	6.25	25	25	100	100	//	3.125		6.25	25
27 (SL, Cd)	6.25	25	12.5	50	100	//	3.125	-	12.5	50
	6.25	25	12.5	50	100	//	3.125	-	12.5	50
28 (Cd)	1.56	6.25	25	100	100	//	1.56	-	6.25	25
29 (Cd)	3.125	12.5	6.25	12.5	50	//	3.125		6.25	25
30 (Cd)	6.25	25	25	100	100	//	3.125	-	12.5	50
TOTAL	30	30	30	17	30	5	30	18	30	30

(\*) *S. Faecium*

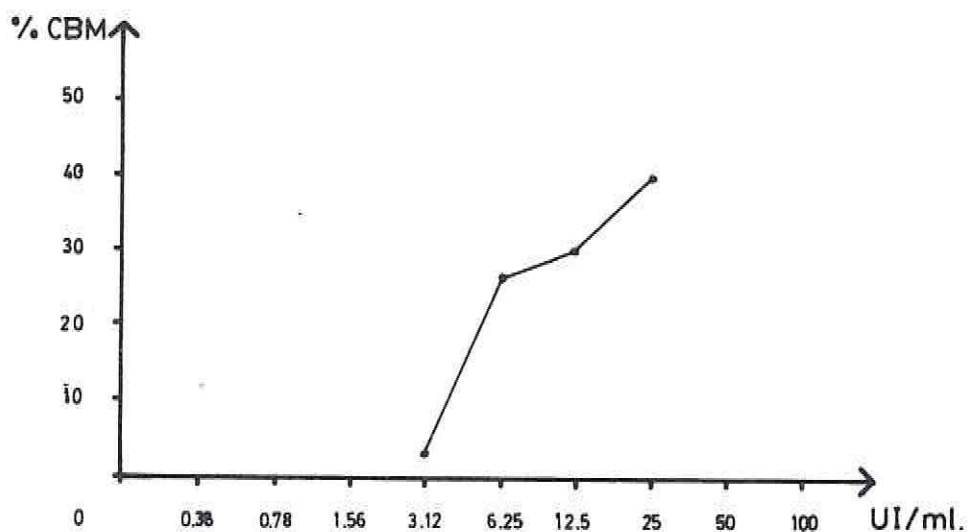
(+) Sólo se hicieron el 60% de las pruebas de laboratorio para determinarla (CBM).

# 1- PENICILINA.

CIM	N	%
0.78	1	3.3
1.56	8	26.6
3.125	9	30.0
6.25	12	40.0
	30	99.9

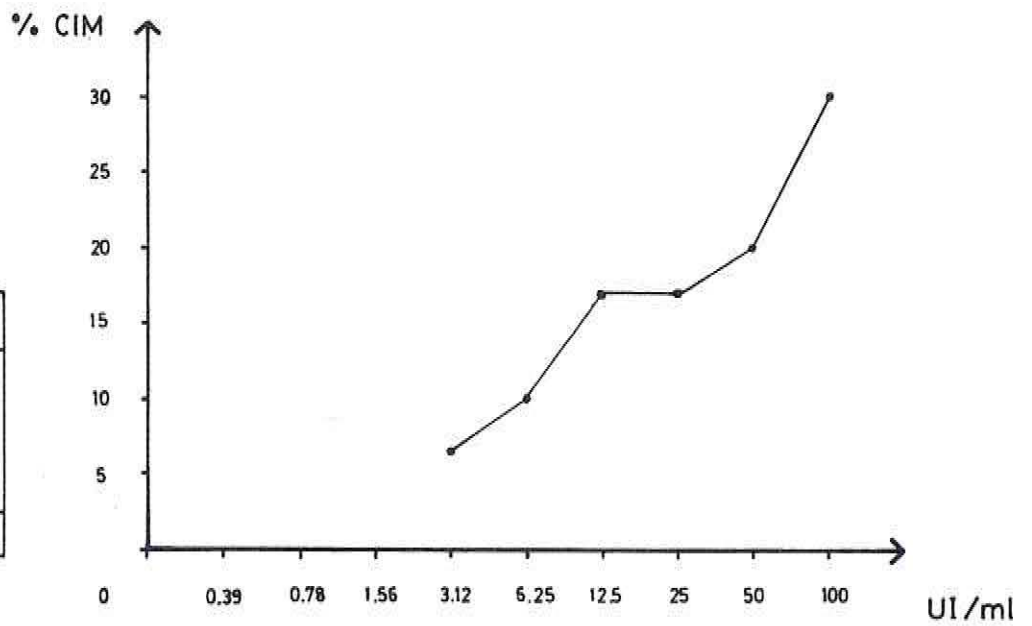


CBM	N	%
3.125	1	3.3
6.25	8	26.6
12.5	9	30.0
25	12	40.0
	30	99.9

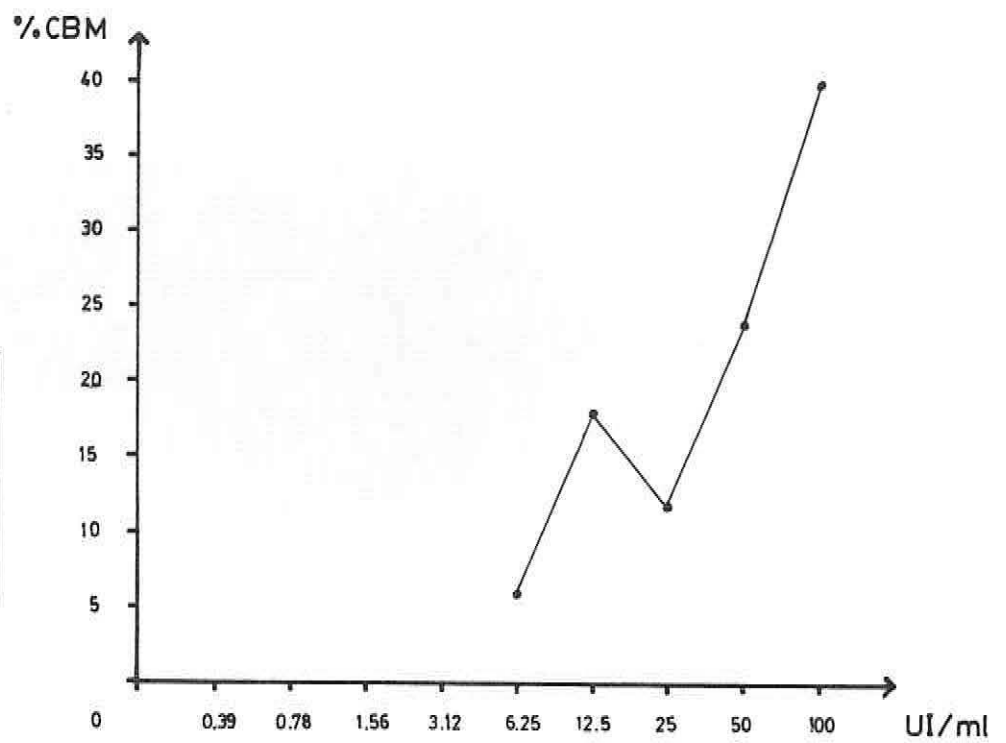


## 2.- TETRACICLINA.

CIM	N	%
3.125	2	6.7
6.25	3	10
12.5	5	17
25	5	17
50	6	20
100	9	30
	30	100

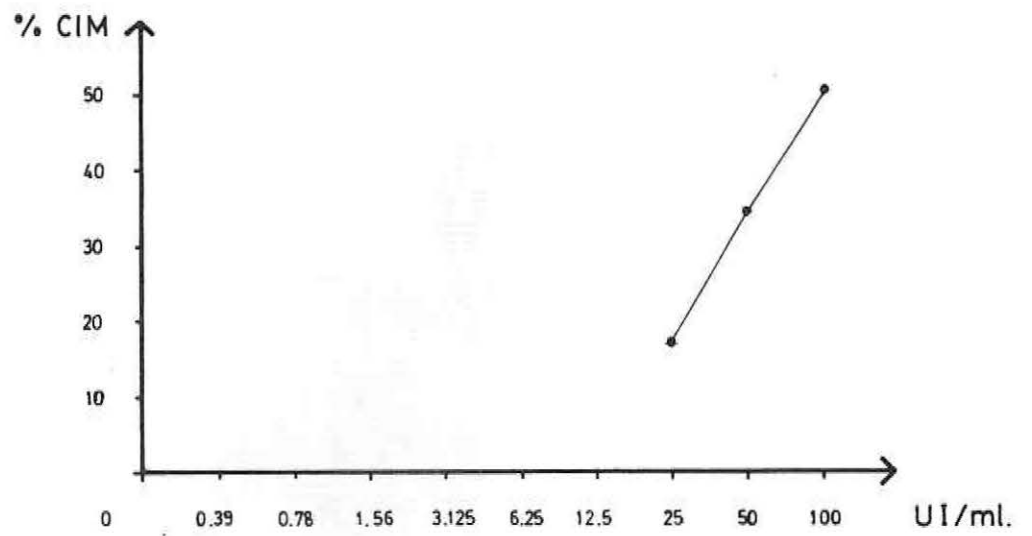


CBM	N	%
6.25	1	6.0
12.5	3	18
25	2	12.0
50	4	24
100	7	40
	17	100

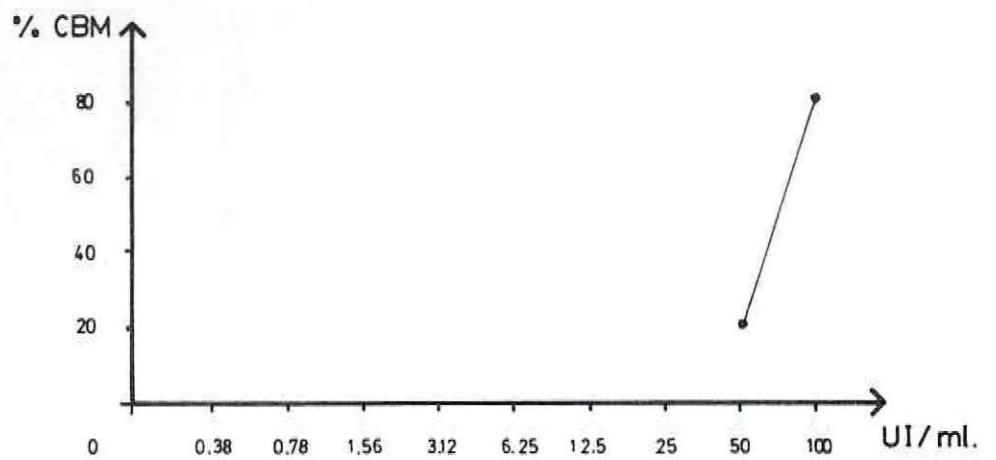


### 3- CEFALEXINA.

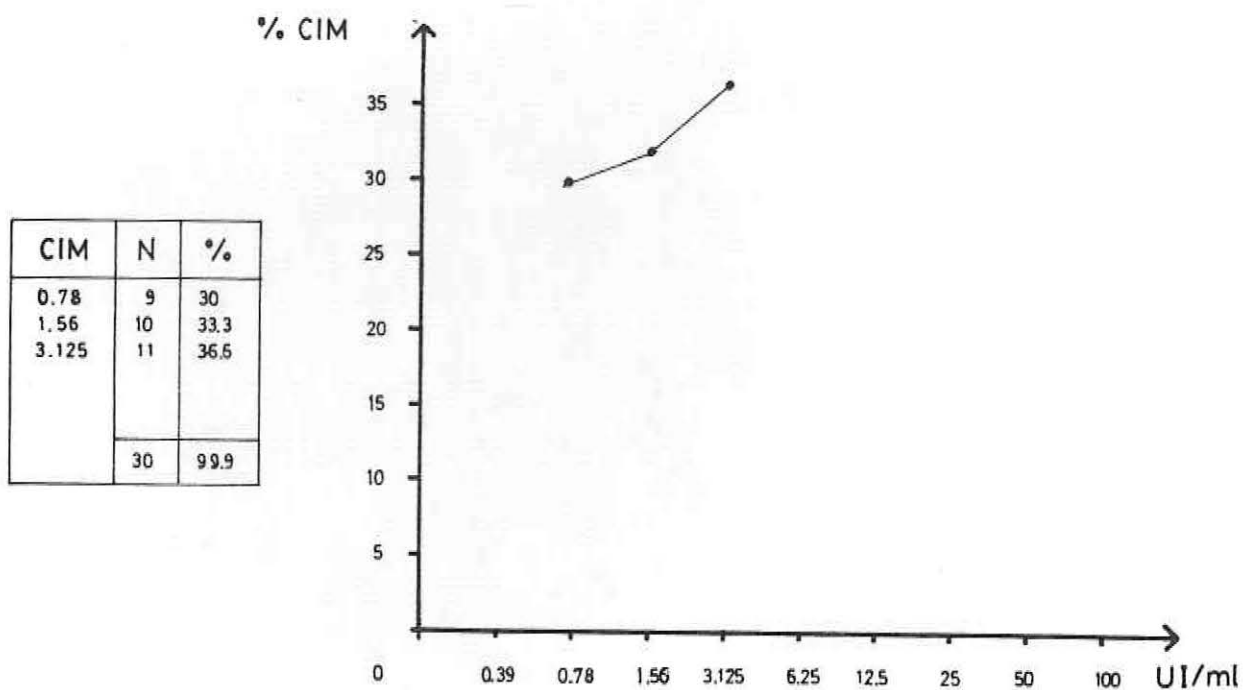
CIM	N	%
25	5	17
50	10	34
100	15	50
	30	100



CBM	N	%
50	1	20
100	4	80
	5	100

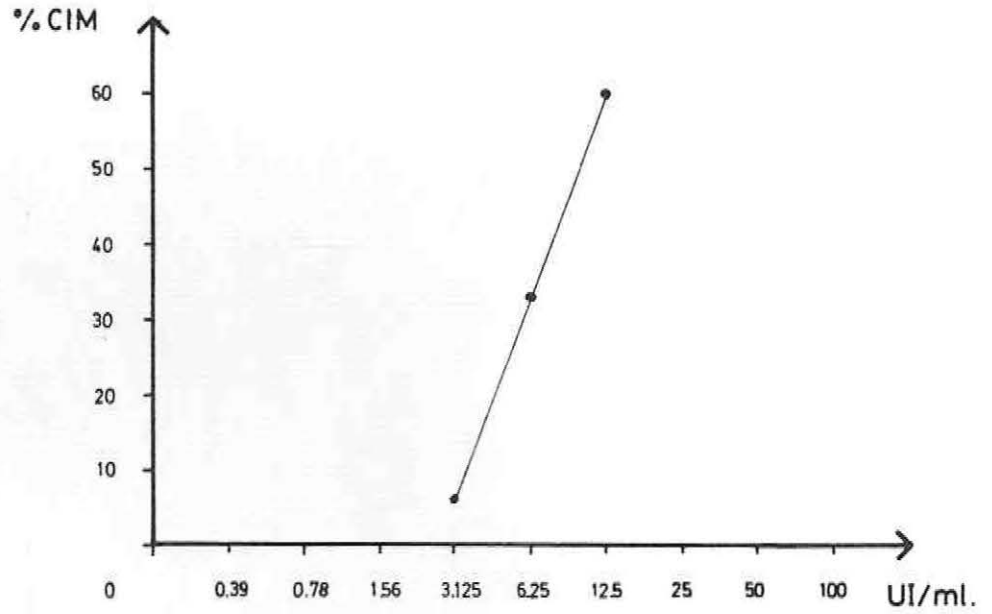


#### 4.- AMPICILINA.

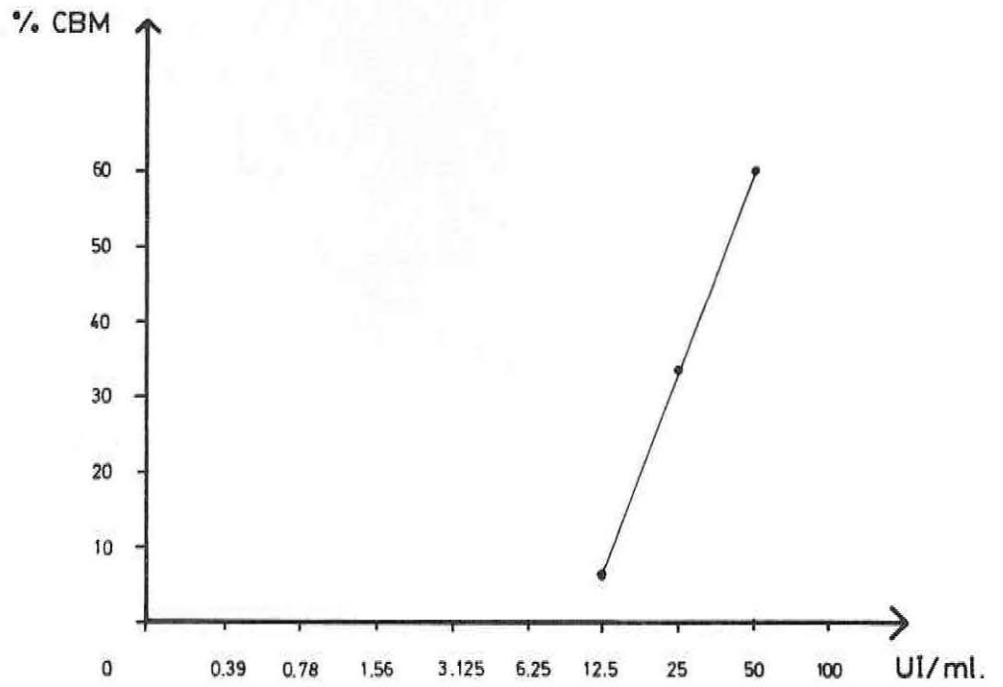


## 5.- CLORANFENICOL.

CIM	N	%
3.125	2	6.6
6.25	10	33.3
12.5	18	60
	30	99.9



CBM	N	%
12.5	2	6.6
25	10	33.3
50	18	60
	30	99.9



### 3.2.1 Análisis e interpretación de los gráficos

#### 3.2.1.1 Sensibilidad de los Enterococos a la Penicilina G

##### 3.2.1.1.1 Análisis de la CIM

En la Tabla, se pueden observar las concentraciones inhibitoria mínimas (CIM), el número de cepas sensibles a una determina CIM y su porcentaje correspondiente.

- En primera instancia, observamos sólo una cepa (con un 3.3%) sensible a una concentración de 0.78 UI/ml lo que evidencia la poca sensibilidad de los Enterococos a concentraciones menores de Penicilina.
- A medida que aumenta la concentración de Penicilina, aumenta el número (N) y porcentaje de cepas sensibles a ella.
- La pendiente sigue una ascensión normal, siendo el crecimiento de las CIM, proporcional al número de cepas sensibles.

##### 3.2.1.1.2 Análisis de la CBM

En la Tabla, valen las mismas observaciones que en la Tabla de la CIM.

- La pendiente es prácticamente paralela a la CIM en su progresión. Lo que varía es la concentración de antibiótico que lógicamente debe ser mayor, ya que la concentración bactericida mínima debe ser la suficiente como para causar la muerte de la bacteria y no su inhibición.
- Observamos que la menor CBM corresponde a las 3.125 UI/ml que correspondería aproximadamente a dos tubos a la derecha del tubo que no mostró desarrollo (CIM). En caso de dudas, remitirse a la Metodología y Resultados del antibiograma.

### 3.2.1.2 Sensibilidad de los Enterococs a la Tetraciclina

#### 3.2.1.2.1 Análisis de la CIM

- Los porcentajes de sensibilidad abarcan un amplio rango de concentración de antibiótico, a diferencia de la Penicilina en donde los mayores porcentajes de sensibilidad estaban entre una concentración de 1.56 a 6.25 UI/ml
- La pendiente es ascendente lo que enfatiza nuevamente la proporcionalidad entre concentración y porcentaje de sensibilidad.
- Es importante recalcar, que a diferencia de la Penicilina, la mayor concentración registrada corresponde a los 100 µgr/ml usando el método standard de 10 tubos para

el antibiograma siendo esta concentración la mayor que posee este método, lo que no excluye la posibilidad de que a una concentración mayor de 100  $\mu\text{gr/ml}$  hay un mayor porcentaje de sensibilidad.

#### 3.2.1.2.2 Análisis de la CBM

- Lo principal del gráfico es lo que respecta a la no proporcionalidad entre lo que es concentración y porcentaje de sensibilidad, la que podría atribuirse a una infnidad de factores, comenzando por las técnicas de laboratorio empleadas a factores inherentes de la bacteria o el fármaco.
- El gran porcentaje de muerte bacteriana se observa en concentraciones elevadas de antibiótico .

#### 3.2.1.3 Sensibilidad de los Enterococos a la Cefalexina

##### 3.2.1.3.1 Análisis de la CIM

- La Cefalexina mostró ser el antibiótico con mayor resistencia (100%). El gran porcentaje de sensibilidad se

---

NOTA: Para el caso de la Tetraciclina, Cefalexina, Ampicilina y Cloranfenicol; la concentración se debe expresar en  $\mu\text{gr/ml}$  y no en UI/ml como aparece en la abscisa de los gráficos.

agrupa en concentraciones muy altas de antibiótico (entre los 50 y 100  $\mu\text{gr/ml}$ ) graficadas en la Tabla, la pendiente es prácticamente recta.

#### 3.2.1.3.2 Análisis de la CBM

- Sólo existen dos concentraciones (empleando el método del antibiograma, antes mencionado) de antibiótico demostradas con este método. Si aumentamos la concentración, tal vez encontraríamos una mayor sensibilidad, pero, ese no es el objetivo de este método, ni de la terapia antibiótica.

#### 3.2.1.4 Sensibilidad de los Enterococos a la Ampicilina

##### 3.2.1.4.1 Análisis de la CIM

- Este antibiótico posee un amplio margen de sensibilidad a concentraciones pequeñas de antibiótico (entre 1.56 y 3.125  $\mu\text{gr/ml}$ ).

Demostró ser el antibiótico con mayor sensibilidad a los Enterococos.

#### 3.2.1.5 Sensibilidad de los Enterococos al Cloranfenicol

##### 3.2.1.5.1 Análisis de la CIM

- Existe una proporcionalidad marcada entre concentración y sensibilidad que se evidencia por la pendiente recta de los gráficos.

El mayor porcentaje de sensibilidad también se agrupa en concentraciones pequeñas de antibiótico, pero un poco mayor en relación a la Ampicilina, siendo este antibiótico, el segundo en sensibilidad.

#### 3.2.1.5.2 Análisis de la CBM

- Los resultados también son proporcionales a los obtenidos en la CIM y las observaciones son las mismas.

CAPITULO IV

DISCUSION Y CONCLUSIONES

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

### A. AISLAMIENTO, CULTIVO Y FRECUENCIA

Para identificar una determinada cepa de *Enterococos*, es imprescindible contar con los medios de cultivo más adecuados y completos posibles, con el fin de evitar resultados erróneos.

Es importante que el procedimiento de laboratorio sea efectuado en la forma más rigurosa posible, es decir, cumplir con los tiempos de incubación necesarios, temperaturas adecuadas, etc. Para ello, la ejecución de las técnicas de laboratorio, deben seguir una metódica de trabajo adecuada y standarizada y nosotros como operadores debemos poseer la destreza suficiente para tal propósito. Con el fin de mantener viables las cepas, es importante efectuar el traspaso periódico de ellas para continuar las sucesivas etapas de laboratorio. El procedimiento para el control bacteriano en los conductos radiculares infectados (conos de papel), es el más sencillo y al alcance de cualquier clínico y laboratorio ya que se emplean medios de cultivo de fácil preparación; sin embargo, posee un porcentaje de error que lo atribuimos a dos motivos principales: desarrollo en los cultivos de microorganismos ajenos al conducto radicular y no desarrollo

de microorganismos que se encuentran en el conducto. De ahí la importancia de realizar un procedimiento de laboratorio riguroso.

Con lo obtenido en los resultados, concluimos que la frecuencia de los Enterococos encontrada en nuestro medio, es realmente considerable, asemejándose mucho a investigaciones efectuadas en otros medios. Sin lugar a dudas el Streptococo faecalis arrojó el mayor porcentaje de prevalencia.

En las infecciones pulpares por caries dentinaria profunda (un alto porcentaje de gangrenas pulpares y Abscesos Dentoalveolares Agudos y Crónicos), los Enterococos y en especial el S. Faecalis, son los principales representantes de los Streptococos como habitantes de los conductos radiculares infectados.

Es importante señalar que la proporción de Enterococos encontrados en los conductos infectados, es la misma encontrada en la saliva; con ello, una vez más se demuestra que los microorganismos encontrados en todos los procesos piógenos de origen dentario, son los mismos comensales habituales de la cavidad oral.

Por último, recomendamos cultivar, siempre que sea posible, una muestra tomada del conducto radicular antes de iniciar el tratamiento, con el objeto de que el clínico tenga una idea de la flora existente y elegir así los agentes terapéuticos que actúen de mejor manera sobre los microorganismos presentes.

B. SENSIBILIDAD DE LOS ENTEROCOCOS A LOS DIFERENTES ANTIBIOTICOS

Existen muchas explicaciones y suposiciones acerca del por qué los Enterococos han variado su capacidad de resistencia a determinados antimicrobianos de uso frecuente en nuestro medio. Por este motivo, hemos confeccionado este resumen bibliográfico con las conclusiones de las publicaciones más recientes encontradas por nosotros, con el fin de compararlas con nuestras conclusiones:

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	AÑO	PENI. G	AMPI.	CEFALEX.	CAF	TC.
(18)	1973	R: -	-	100 (32->128)	X	40 (8->128)
		S: -	90 (0.25-2)	-	X	60 (0.25-1)
		I: 100 (1-4)	10 (2-4)	-		-
(12)	1975	R: 22	-	X	2	21
		S: 0	100	X	84	77
		I: 78	-	X	14	2
(15)	1986	R: -	-	X	-	X
		S: -	100	X	25	X
		I: 99	-	X	25	X

X: El antibiótico no fue empleado por la investigación.

Los datos se expresan en porcentaje de sensibilidad (cepas sensibles) y las cifras en los paréntesis corresponden a las CIM del antibiótico expresadas en  $\mu\text{gr/ml}$ .

En el caso de la Penicilina, las cifras se expresan en UI/ml.

- R : Resistente
- S : Sensible
- I : Intermedio

Para la determinación de la sensibilidad, se usó como referencia el Breviario de la Terapia Antimicrobiana del Dr. Montiel y Col (15).

Si comparamos nuestros resultados con lo obtenido del resumen bibliográfico:

	PEN. G	AMPI.	CEFALEX.	CAF	TC.
R:	-	-	100	-	83.3
S:	-	63.3	-	40	-
I:	100%	36.6	-	60	16.7

Muchos autores y trabajos de investigación concuerdan con la relativa resistencia de los Enterococos a la Penicilina, el resumen bibliográfico con las conclusiones de los trabajos sobre este tema evidencia este hecho. Nuestros resultados arrojaron gran porcentaje de sensibilidad en el rango intermedio (100%).

Sin embargo, la Ampicilina mostró ser el antibiótico con mayor porcentaje de sensibilidad, concordando

con las investigaciones anteriores. Este hecho se debe al amplio espectro de acción de este antibiótico.

Para el caso de la Cefalexina, la resistencia de los Enterococos fue considerable (100%). Este hecho se debe a que este antibiótico no es de elección frente a infecciones causadas por Enterococos.

El CAF fue otro de los antibióticos con un considerable porcentaje de sensibilidad (40%), pero al igual que la Cefalexina, se prefiere su uso en infecciones causadas por otros Gram (+).

Por último, la Tetraciclina fue el segundo antibiótico en mostrar un alto porcentaje de resistencia (83.3%). Existen muchas explicaciones del por qué de esta resistencia (Control extracromosomal, mecanismos de transferencia y conjugación, cambios en la susceptibilidad en los sitios blancos, etc)., pero lo importante es que su espectro de acción no es específico para Enterococos sino que para otras especies bacterianas, de ahí que no sea droga de elección en infecciones Enterocóccicas.

Consideramos importante señalar, además, que el antimicrobiano de primera elección sigue siendo la Penicilina G, más la Ampicilina. Como antimicrobiano de alternativa se prefiere la Estreptomicina o Gentamicina en el caso de Endocarditis Infecciosa.

Otro dato importante de señalar, es el por qué de la persistencia de los Enterococos después de un tratamiento endodóntico convencional con Paramonoclorofenol Alcanforado, si bien es cierto, no estaba dentro de nuestros objetivos el estudiar su acción bactericida y bacteriostática, su poca eficacia y su mínima actividad, son la causa de la persistencia de estos microorganismos en los conductos tratados con este antiséptico.

ANEXO

TABLA (7): ENDOCARDITIS INFECCIOSA, ANTECEDENTES EPIDEMIOLOGICOS Y CARDIOPATIA DE BASE (1) (11)  
(20)

---

En los estudios realizados, se sospechó de una probable puerta de entrada (47%) destacando:

- Infecciones del tracto respiratorio.
- Cirugía intracardiaca.
- Maniobra gineco obstétrica (parto, aborto con endometritis, colocación de D.I.U., etc.).

En un 64% existía compromiso válvula aortica y valvulopatía mitral asociada:

- 41% Insuficiencia aortica.
  - 17% Compromiso válvula mitral aislada.
  - 11% Prótesis intracardiaca.
-

TABLA (8): ENDOCARDITIS INFECCIOSA. CUADRO CLINICO (FRECUENCIA DE SINTOMAS Y SIGNOS) (1) (11) (20)

	%
- Soplo valvular o de defecto congénito	100.0
- Fiebre	91.1
- Debilidad, anorexia	58.8
- Esplenomegalia	58.8
- Baja de peso	54.5
- Artralgia	41.0
- Cefalea	41.0
- Petequias cutáneas y/o conjuntivales	41.0
- Náuseas, vómitos	35.2
- Signos insuficiencia cardíaca congestiva	26.1
- Manifestaciones neurológicas	17.6
- Ictericia	17.6
- Alteraciones del fondo de ojo	11.6

TABLA (9): ENDOCARDITIS INFECCIOSA. EXAMEN DE LABORATO-  
RIO (1) (11)

EXAMENES	%
- Hematocritos < 39%	91.1
< 30%	41.0
- Velocidad de sedimentación	
<100 mm/h	24.2
50-99	54.5
50	21.3
- Leucocitos > 10.000 mm <sup>3</sup>	41.0
8.000-10.000	11.6
6.000- 7.900	30.3
< 6.000	17.1
- Factor reumatoideo	40.0
1/80 - 1/320 - 1/640 o más	20.0
- Creatinina mayor 1 mg/dl	56.7
- Hematuria microscópica	35.2
- Células endoteliales > 5%	16.0

TABLA (10): ENDOCARDITIS INFECCIOSA. CAUSAS DE MUERTE.

(1)

- 
- *Insuficiencia cardíaca*
  - *Insuficiencia cardíaca + I. renal*
  - *Insuficiencia cardíaca + accidente vascular encefálico*
  - *Infarto miocardio post operatorio*
  - *Shock séptico*
  - *Insuficiencia hepática*
  - *Insuficiencia renal*
  - *Desconocida en domicilio*
-

TABLA (11): FICHA DE SEMINARIO TESIS


---

FECHA: ..... N° FICHA: .....

(1)

- Nombre paciente: .....

- Edad: .....

- Sexo: .....

- Domicilio: .....

(2)

- Diagnóstico específico: .....

.....

- Diagnóstico integral: .....

.....

.....

(3)

- Higiene oral: .....

- Antecedentes paradenciales: .....

- Salivación: Calidad: ..... Cantidad: .....

(4)

- Otros: .....

.....

.....

.....

TABLA (12): COLORACION GRAM CLASICA

- 
- Cubrir el frotis ya fijado con solución de Violeta Gen-  
ciana por dos minutos.
  - Eliminar el exceso de violeta y cubrir con Lugol duran-  
te un minuto.
  - Lavar suavemente con agua.
  - Decolorar con acetona - éter.
  - Eliminar excesos y cubrir con solución de fucsina bási-  
ca por un minuto.
  - Lavar con agua.
  - Secar con papel absorbente y observar con inmersión.
-

TABLA (13): PROCEDIMIENTO MATEMATICO PARA EL CALCULO DE LA SOLUCION STOCK

(1) Penicilina G Sódica:

$$\begin{array}{l}
 1.000.000 \text{ UI} + 4 \text{ ml caldo} \rightarrow 250.000 \text{ UI/ml} \\
 250.000 \text{ UI} + 4 \text{ ml caldo} \rightarrow 50.000 \text{ UI/ml} \\
 50.000 \text{ UI} + 9 \text{ ml caldo} \rightarrow \underline{5.000 \text{ UI/ml}} \\
 5.000 \text{ UI} + 4 \text{ ml caldo} \rightarrow \underline{1.000 \text{ UI/ml}}
 \end{array}$$

(2) Tetraciclina:

$$\begin{array}{l}
 250 \text{ } \mu\text{gr} = 250.000 \text{ } \mu\text{gr} \\
 1.000 \text{ } \mu\text{gr} = \rightarrow 1 \text{ ml} \\
 250.000 \text{ } \mu\text{gr} = \rightarrow X \text{ ml} \\
 X = 250 \text{ ml}
 \end{array}$$

Entonces, se necesitan 250 ml de caldo para diluir 250 mgr de Ab. y obtener 1.000  $\mu\text{gr/ml}$

(3) Cefalexina:

$$\begin{array}{l}
 500 \text{ mgr} = 500.000 \text{ } \mu\text{gr} \\
 1.000 \text{ } \mu\text{gr} = \rightarrow 1 \text{ ml} \\
 500.000 \text{ } \mu\text{gr} = \rightarrow X \text{ ml} \\
 X = 500 \text{ ml}
 \end{array}$$

Se necesitan 500 ml de caldo para diluir 500 mgr de Ab y obtener 1.000  $\mu\text{gr/ml}$ .

(4) Ampicilina:

500 mgr.

Igual procedimiento a Cefalexina.

(5) Cloranfenicol Succinato:1 gr + 5 ml caldo  $\rightarrow$  200 mgr/ml200 mgr + 3 ml caldo  $\rightarrow$  50 mgr/ml50 mgr = 50.000  $\mu$ gr.1.000  $\mu$ gr  $\rightarrow$  1 ml50.000  $\mu$ gr  $\rightarrow$  X ml

X = 50 ml

Se necesitan 50 ml de caldo para diluir el Ab y obtener 1.000  $\mu$ gr/ml.

Para Ampicilina y Cefalexina, con el propósito de ahorrar caldo Soya-Trypticase, se pueden diluir de la siguiente manera:

500 mgr + 5 ml caldo  $\rightarrow$  100  $\mu$ gr/ml100 mgr + 1 ml caldo  $\rightarrow$  50  $\mu$ gr/ml

Si seguimos procedimiento anterior, con 50 ml diluimos el Ab para lograr 1.000  $\mu$ gr/ml.

Para el caso de la Tetraciclina:

$$250 \text{ mgr} + 5 \text{ ml caldo} \rightarrow 50 \text{ mgr/ml}$$

$$X = 50 \text{ ml}$$

Se necesitan 50 ml de caldo para lograr 1.000  
 $\mu\text{gr/ml}$ .

---

TABLA (14): ESPECTROS DE ACCION DE VARIOS ANTIBIOTICOS Y SUS DOSIS EN ADULTOS

- 
- 1) Penicilina G: Gram (+) (no productores de beta-lactamasa)
- Anaerobios (no *B. fragiles*)  
*Erisipelothrix rhusiopathiae*
- 0.3-4 millones
- U/6 horas Gram (-) (meningococo, gonococo, *H. influenzae* no productores de beta-lactamasa)
- Treponema pallidum*
- 2) Ampicilina: Igual a Penicilina en Gram (+), Gram (-)
- 30 mg/kg/ incluye a *E. coli*, *proteus mirabilis*, *H. influenzae* no productor de beta-lactamasa
- 6 horas
- 3) Cefalexina: Gram (+) (no Enterococo, *Stafilococo metilicina resistente*), Gram (-) especialmente *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *klebsiella*, *H. influenzae* (no *proteus indol +*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Acinetobacter*).

- 4) Tetraciclina: Gram (+), Gram (-), anaerobios (no bacteroides), Chlamydia, Mycoplasma, Rickettsia.  
7 mg/kg/ 6 horas
- 5) Cloranfenicol: Gram (+) (no enterococo), Gram(-) (buena acción sobre anaerobios y chlamydia, Rickettsia).  
7-5 mg/kg/ 6 horas
- 

1. MEDIOS DE CULTIVO: BASE DE AGAR CON SANGRE Y AZIDA

- a) Este medio es selectivo para el aislamiento de Streptococos. Se puede usar solo o con sangre.
- b) Composición: Poly-peptona, extracto de carne, cloruro de sodio, azida de sodio y agar; con un pH final de 7.2 ±.
- c) Usos: Se emplea en preparación de placas primarias de cultivos en la investigación y aislamiento de Streptococos y Stafilococos provenientes de las aguas de abastecimiento, agua de piscinas, alimentos y otras fuentes con flora mixta. Los G(-) se inhiben con la azida de sodio.

2. MEDIOS DE CULTIVO: CALDO GLUCOSADO CON AZIDA

- a) Este medio es de elección para la determinación cuantitativa del *Streptococo* en el agua de albañal, etc.
- b) Composición: Polypeptona, extracto de carne, glucosa, cloruro de sodio y azida de sodio; pH final de 7.2 <sup>±</sup>.
- c) Usos: se usa para medir los índices de contaminación de las aguas.

3. MEDIOS DE CULTIVO: CALDO BAGG (CALDO AMORTI - GUADOR CON AZIDA, GLUCOSA Y GLICERINA)

- a) Es un medio de cultivo fluido para la investigación del *Streptococo* fecal.
- b) Composición: Polypeptona, glucosa, fosfato dipotásico, fosfato monopotásico, cloruro de sodio, azida de sodio, púrpura de bromocresol; pH de 6.9 <sup>±</sup>.
- c) Usos: Para la investigación del *Streptococo* fecal en aguas, alimentos y otros alimentos de importancia sanitaria. También para diagnóstico de laboratorio, en exámenes de orina, heces fecales, etc. La presencia del *Streptococo* se demuestra por la producción de ácido (cambio de color al amarillo).

Para distinguir diferentes tipos de Streptococos se puede incubar a diferentes temperaturas, así tenemos que para el S. Zymogenes, S. Durans y S. Liquefaciens, la temperatura de incubación puede ser de 37°C ó 45 °C.

4. MEDIOS DE CULTIVO: CALDO CEREBRO CORAZON

- a) Es un medio líquido para el cultivo de bacterias.
- b) Composición: Infusión de cerebro de ternera, infusión de corazón de res, peptona, cloruro de sodio, fosfato disódico y glucosa; pH de 7.4 <sup>±</sup>.
- c) Usos: En cultivos de sangre, para el cultivo de micrococos patógenos y otros microorganismos.

5. MEDIOS DE CULTIVO: CALDO PRESUNTIVO PARA ENTEROCOCOS

- a) Se emplea para la investigación en el agua y otros materiales de importancia sanitaria. La azida de sodio y la alcalinidad del caldo inhiben el desarrollo de otros microorganismos.
- b) Composición: Triptona (5.0), extracto de levadura (5.0), glucosa (5.0), azida de sodio (0.4) y azul de bromotimol (0.032); pH final de 8.4 <sup>±</sup>.

- c) Usos: Se usa para la investigación de *Enterococos* en agua dulce o salina y alimentos naturales como cangrejos, ostras y otros. Los *Enterococos* son catalasa (-) que crecen en 10 y 45 °C con 6.5% de NaCl, este crecimiento no se inhibe con 0.04% de azida de sodio ni con 650 unidades de Penicilina / lt del medio.

La prueba de presunción consiste en la producción de ácido y turbiedad en el medio con azida. Los tubos de ensayo se observan periódicamente después de 8 horas, buscando aparición de turbiedad y producción de ácido. Tan pronto la reacción sea positiva, se re siembra en un medio de confirmación con caldo superficie inclinada.

6. MEDIOS DE CULTIVO: CALDO CONFIRMATIVO PARA ENTEROCOCOS

- a) Para confirmar presencia de *Enterococos* en el agua y otros materiales de importancia sanitaria.
- b) Composición: Triptona, extracto de levadura, glucosa, azida de sodio, cloruro de sodio, azul de metileno, pH final de 8.0  $\pm$ . A esto se le agrega 65 unidades de Penicilina para cada 100 ml de caldo .
- c) Usos: Se emplean con agar para confirmar *Enterococos*.

7. MEDIOS DE CULTIVO: CALDO CON MANITOL Y ROJO FENOL, CALDO CON SORBITOL Y ROJO FENOL Y CALDO ARABINOSA CON ROJO FENOL

- a) Para la determinación de reacciones de fermentación está disponible esta serie de azúcares.
- b) Composición: Trypticase, hidrato de carbono, cloruro de sodio, rojo de fenol; pH final de 7.3  $\pm$ .
- c) Usos: Para los estudios de fermentación en la identificación de diferentes microorganismos.

8. MEDIOS DE CULTIVO: AGAR MITIS-SALIVARIUM

- a) Medio selectivo para aislar Streptococos a partir de cultivos mixtos.
- b) Composición: Trypticase, thiotone, glucosa, sacarosa, fosfato dipotásico, azul tripan, violeta cristal y agar; pH final de 7.0  $\pm$ .
- c) Usos: Para aislamiento e identificación de Streptococos faecalis. Las colonias de los Enterococos son de color azul oscuro brillante, un poco elevadas y con un diámetro de 1 a 2 mm.

9. MEDIOS DE CULTIVO: CALDO CON SOYA Y TRYPTICASE

- a) Medio estable para usos generales, de altas cualidades nutritivas y fácilmente adaptables a una gran variedad de procedimientos de laboratorio, en el aislamiento y pruebas de sensibilidad y en la preparación de inoculos y antígenos.
- b) Composición: Trypticase, phytone, cloruro de sodio, fosfato dipotásico y glucosa; pH final de 7.3<sup>±</sup>.
- c) Usos: general, cultivos de sangre, prueba de sensibilidad, diferenciación de cocos G (+), preparación de antígenos.

Los Streptococos y otros patógenos ácido -sensibles, pueden morir si se resiembran repetidamente en él.

BIBLIOGRAFIAA) BIBLIOGRAFIA DE CONSULTA:

1. AGUERO M.E., ESCOBAR E.      *Endocarditis infecciosa: Estudio de 32 casos. Rev. Méd. Chile, 110:133 - 138, 1982.*  
y AGUAYO J.
2. ARANEDA T., CALVO A.M.,      *Contribución al estudio de los Streptococos en los diferentes nichos ecológicos de la cavidad bucal. Seminario de Tesis. Escuela de Odontología. Universidad de Valparaíso, 1984.*  
OROZCO I.M.
3. BURNETT G.W., SCHUSTER      *Microbiología oral y enfermedad infecciosa. 1982.*  
G.S.
4. CLEWELL D.B., GAWRON-      *Conjugative Transposons and the dissemination of antibiotic resistance in streptococci. Ann Rev. Microbiol 40: 635 - 659, 1986.*  
BURKE C.

5. DEIBEL R.M. *The group D Streptococci. Bacteriological. Reviews Vol. 28, N° 3, 330 - 366. Sept. 1964.*
6. ELLERBRUCH and MURPHY R.A. *Antimicrobial activity of root canal medicament vapors. J. of Endodontics. Vol. 3, N° 5, 189 - 193, May 1977.*
7. FORTEZA G., y MARTINEZ R. *Terapéutica antimicrobiana en las infecciones inespecíficas oro-faciales. Rev. Iberoamericana Cirugía oral y Máxilo facial, 6, 16 (123-140), 1984.*
8. GARCIA J. *Procedimientos y Técnicas de Laboratorio. Instituto de Salud Pública de Chile, Vol. I, 59 - 65, 1983.*
9. GOLDSTEIN J. *Antibiotics as related to Endodontic therapy. J. of Endodontics. Vol. 4, N° 5, 135 - 139. May 1978.*

10. GOLDSTEIN J. and MACRINA F.L. Extrachromosomal control of antibiotic resistance in bacteria. *J. of Endodontics*. Vol. 3, N° 7, 269 - 273. July 1977.
11. HARRISON *Medicina Interna*. La Prensa Médica Mexicana. Cap. 137, 854 - 859; cap. 141, 885. 1973.
12. HEINTZ C.E., DEBLINGER R. and OLIET S. Antibiotic Sensitivities of Enterococci isolated from treated root canals. *J. de Endodontics* Vol. 1, N° 11, 373 - 376, Nov. 1975.
13. HUERTA J.M., HERNANDEZ A.M. y MARTINEZ DE P.M.V. *Principios de Microbiología Bucal*. Universidad de Chile, 1975.
14. MC CRACKEN A.W., COWSON R.A. *Clinical and oral microbiology*, 1983.
15. MONTIEL F., LOBOS T., ACUNA G. y LAM M. *Brevario de la Terapia Antimicrobiana*. Pontificia U. Católica de Chile, Facultad de Medicina, Escuela Medicina, 1986.

16. NOLTE W.A. *Oral Microbiology with basic microbiology an inmunology, 1982.*
17. NORD C.E and WODSTRÖM  
*Characterization of hemolytic enterococci isolated from oral infections. Acta Odont. Scand. 31, 387 - 393, 1973.*
18. NORD C.E. and WODSTRÖM  
*Susceptibility of hemolytic oral enterococci to eight antibiotics in vitro. Acta Odont. Scand. 31, 395 - 399, 1973.*
19. THE S.D.  
*Long distance bactericidal and fungicidal effectiveness of parachlorophenol and Formalin on S. faecalis. J. of Endodontics, Vol. 1, N° 9, 300 - 302. Sept. 1975.*
20. TORRES H., DIAZ R., ANIMAT M. y CHARID P.  
*Endocarditis infecciosa, experiencia en los últimos 6 años. Boletín Hospital de Viña del Mar, Vol. 42 (2), 84 - 88. 1986.*

B) BIBLIOGRAFIA AUXILIAR:

1. Apuntes de la Cátedra de Endodoncia, Esc. de Odontología de la Universidad de Valparaíso, 1986.
2. Apuntes de la Cátedra de Microbiología. Facultad de Odontología, Universidad de de Concepción, 1981.
3. Apuntes de la Cátedra de Microbiología, Escuela de Odontología, Universidad de Valparaíso, 1983.
4. B.B.L. Productos. Medios de cultivo, Materiales e instrumentos para laboratorios de Microbiología. Baltimore Biological Laboratory, Inc. 1959.