

PRÁCTICA 1.1

Manejo del microscopio.

Eje temático 1:	Ecología microbiana de la cavidad oral.
Elemento de competencia del eje:	Reconocer los conceptos microbiológicos básicos que permitan diferenciar las características estructurales, morfológicas y funcionales de los microorganismos que conviven en la cavidad oral.
Propósito de la práctica:	Identificar los microscopios ópticos con los que cuenta el laboratorio de Ecología Oral y aplicar su manejo y uso correcto por medio de la observación de laminillas con microorganismos de la cavidad oral.

Elaboró: Dra. Adriana Patricia Rodríguez Hernández.
Material virtual: Dra. Lía Alioth Hoz Rodríguez

I. INSTRUCCIONES DE LA PRÁCTICA.

- **Previo a la realización de la práctica**
 - ◆ Ingresar en la liga: [LINEAMIENTOS INTERNOS DEL LABORATORIO DEL MÓDULO DE ECOLOGÍA ORAL.pdf](#), y leer el documento.
 - ◆ Lectura previa de la práctica
 - ◆ Contestar cuestionario
- **Durante la práctica**
 - ◆ Colocarse el equipo de protección personal (EPP), que consta de bata blanca (bien cerrada), gorro, y protectores oculares.
 - ◆ Colocar sus objetos personales en los estantes.
 - ◆ Limpiar, desinfectar la mesa de trabajo y lavarse las manos.
 - ◆ Solicitar y revisar el material al personal del laboratorio.
 - ◆ Realizar el método de la práctica siguiendo las indicaciones
- **Finalizar la práctica**
 - ◆ Realizar la observación de los resultados
 - ◆ Entregar el reporte de la práctica

II. INTRODUCCIÓN.

Un laboratorio con técnicas básicas de microbiología es un lugar habilitado para el manejo y estudio de microorganismos, por lo que es importante recordar que la finalidad de este es la de determinar las características fenotípicas (microscópicas y macroscópicas) para su identificación. El equipo indispensable para el crecimiento de microorganismos de la cavidad oral es muy variado incluyendo estufas de incubación, refrigeradores, autoclaves, jarras o cámaras de anaerobiosis, cuenta colonias, espectrofotómetro y microscopios ópticos, entre otros.

El desarrollo de la Microbiología como ciencia, tiene su apoyo en la microscopia para observar morfología celular y agrupación de muestras teñidas. El laboratorio de Ecología oral cuenta con microscopios ópticos Primostar Carl Zeiss (Figura 1), y un microscopio digital Primostar Carl Zeiss con cámara HD integrada (Figura 2). La finalidad de este último microscopio es la de poder observar una muestra y que la imagen de alta definición que nos proporciona la cámara digital pueda ser observada de diversos dispositivos con posibilidad de conectarse a múltiples como es el iPad. Para iniciar el uso de cualquier microscopio, es indispensable realizar el ajuste de iluminación de Köhler, con la finalidad de eliminar la iluminación dispereja en el campo de observación para que todas las partes de la fuente de luz contribuyan a la iluminación del espécimen. Revisa el siguiente video, que indica el uso del microscopio Primostar HD, con el ajuste de iluminación de Köhler <https://www.youtube.com/watch?v=pDEsjQ0qBIM>.

Con ayuda de la Figura 1, lee los pasos básicos sobre el ajuste del microscopio. Ajuste de iluminación de Köhler:

- a. Colocar el objetivo 10X para comenzar una laminilla teñida.
- b. Mover el condensador (A) a la posición más superior.
- c. Abrir el diafragma de campo (B) y enfocar una muestra con los tornillos micrométrico (C) y macrométrico (D).
- d. Cerrar el diafragma de campo (B).
- e. Mover el condensador (A) hacia abajo, hasta observar bien definido un polígono o una figura geométrica, con un color azulado hacia el exterior.
- f. Centrar la imagen geométrica con los tornillos de ajuste del condensador (E).
- g. Abrir el diafragma de campo (B) hasta que la imagen de los bordes del polígono o figura geométrica desaparezcan del campo visual.



Figura 1. Microscopio Promostar Carl Zeiss HD.

Otra indicación indispensable para el uso adecuado del microscopio es ajustar la distancia inter pupilar entre los dos oculares, esta usualmente se encuentra los 55 y 75 milímetros. Revisa el siguiente tutorial <https://www.olympus-lifescience.com/es/microscope-resource/primer/java/kohler/diopter/> donde podrás encontrar información adicional de ajuste inter pupilar y ajuste de dioptrías si es que lo requieres.

III. DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

Material y equipo

- Microscopio Primo Star HD y microscopio óptico Primostar Zeiss.
- Modem 5GB
- Ipad con aplicación Labscope
- Tres laminillas con microorganismos de la cavidad oral: Gram positivo (+), Gram negativo (-) y especie fúngica.

Procedimiento

A. Uso general de los microscopios.

1. El profesor a cargo mostrará el uso correcto de los microscopios ópticos Primostar que podrás localizar en cada mesa de trabajo.
2. Dentro de las indicaciones, recuerda que cada microscopio en banca ya cuenta con el ajuste de iluminación de Köhler, sólo es necesario ajustar la distancia interpupilar de cada alumno, con la finalidad de que puedan observar una imagen con los dos oculares.
3. Recuerda siempre transportar el microscopio con una mano en la base de este y la otra en el cuello superior sin tocar los objetivos.
4. Por último, asegúrate de que no utilices aceite de inmersión sin la supervisión del profesor, y únicamente con el objetivo 100X que indique el uso de aceite con la palabra "Oil".

B. Uso del microscopio Primo Star HD.

Se encontrará en las mesas de trabajo la conexión del microscopio Primostar con cámara HD para la demostración de este con ayuda del profesor. Se requieren de las siguientes indicaciones (Figura 2) junto con el video complementario: <https://www.youtube.com/watch?v=pDEsjQ0gBIM>), para su preparación:

- a. Conectar el cable ethernet al módem (puerto 1-4) de un extremo y a la conexión ethernet del microscopio en el otro extremo. No conectar en internet (puerto amarillo).
- b. Conectar el eliminador de la cámara del microscopio y del microscopio a la corriente eléctrica.
- c. Encender el ipad y abrir la aplicación Labscope (se puede conectarla al cañón). Nota importante: asegurarse que el ipad se encuentra conectada wi-fi a la red del microscopio y no a ninguna otra red (Clave: 00000000)

- d. Abrir la aplicación Labscope en el ipad y buscar el ícono del microscopio <Virtual 1> (en vivo).
- e. En <configure microscope>, asegurarse que esté seleccionado <Primo Star> en <Virtual 1>, y el objetivo a utilizar en ese momento (empezar con objetivo 10X).
- f. Es posible conectar hasta 10 ipad con el microscopio. Si se conectan más dispositivos es posible que se desconecte la aplicación. Para reiniciarla hay que cerrarla y abrirla nuevamente. **Nota importante:** no es posible conectar celulares con la aplicación Labscope, por falta de compatibilidad.

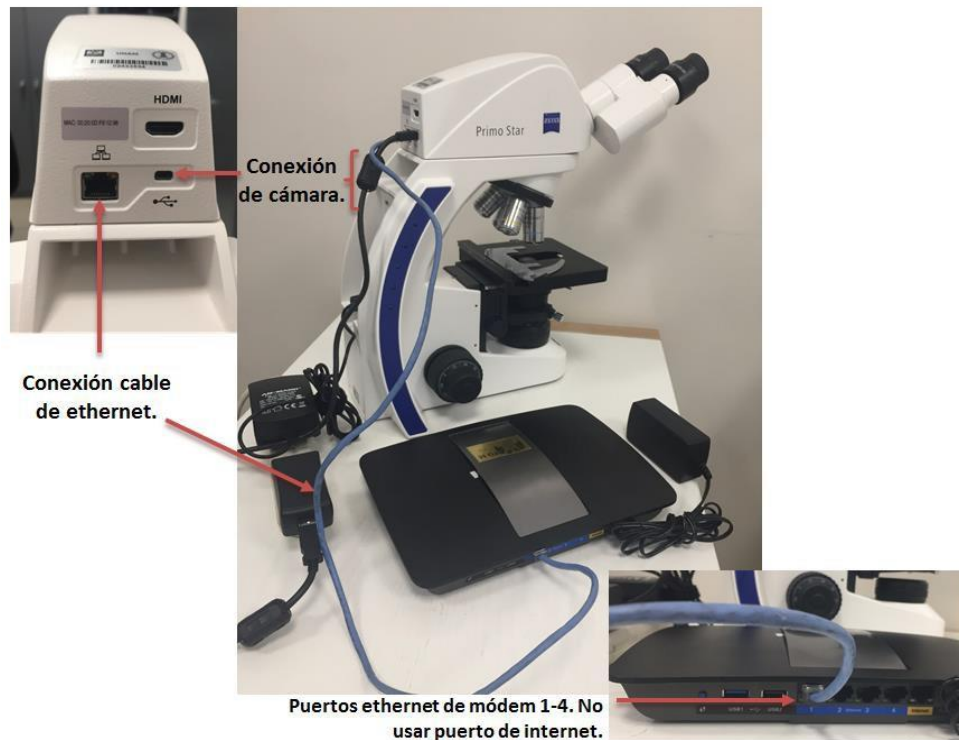


Figura 2. Conexiones del microscopio Primo Star HD.

C. Observación de laminillas en el microscopio:

- a. Cada mesa debe contar con un microscopio.
- b. Colocar la laminilla con la especie fúngica en la platina y colocar el sujetador. Recuerda que la laminilla se toma de los extremos para no ensuciarla.
- c. Observar a 10X y enfocar con tornillos macro y micrométrico (C y D Figura 1).
- d. Observar a 40X la laminilla y enfocar con tornillos macro y micrométrico (C y D Figura 1).
- e. Tomar una fotografía con ayuda de algún dispositivo electrónico (iPad o celular) para el llenado de la tabla 1 del apartado V. Reporte de la práctica.
- f. Continuar con la observación de las laminillas con bacterias G+ y G -, utilizando nuevamente objetivos 10X y 40X y tomar fotografías en 40X para el llenado de la tabla 1.
- g. Finalmente, cuando lo indique el profesor, observar una de las laminillas con especies bacterianas a 100X y tomar fotografía para el llenado de la tabla 1.

Nota: El objetivo 100X será utilizado con aceite de inmersión, únicamente por el profesor a cargo. Deben tener cuidado de no regresar a objetivos de 10X y 40X ya que no son compatibles con el aceite de inmersión y podrían dañarse.

IV. OBSERVACIONES AL FINALIZAR LA PRÁCTICA.

- Redacten sus observaciones del desarrollo de la práctica (Apartados A-C), e integre más información sobre el uso de microscopio óptico en la introducción de su reporte.
- Realice el llenado de la Tabla 1 Características microscópicas de microorganismos.

V. REPORTE DE LA PRÁCTICA.

El reporte de la práctica debe incluir los aspectos que se piden en la rúbrica de la práctica.

Tabla 1. Características microscópicas de microorganismos.

Objetivo:	Resultado:	Describe brevemente:
1. 40X Especie fúngica.	Anexar fotografía	Morfología celular: Color: Agrupación:
2. 40X Bacteria G +	Anexar fotografía	Morfología celular: Color: Agrupación:
3. 40X Bacteria G -	Anexar fotografía	Morfología celular: Color: Agrupación:
4. Anotar la bacteria elegida:	Anexar fotografía	Diferencias observadas entre las imágenes a 40X y 100X:

VER EVALUACIÓN MIXTA PARA EL DESEMPEÑO Y REPORTE DE RESULTADOS.

► Instrumento de evaluación mixto: Práctica 1.1. Manejo del microscopio.

PRODUCTO	DESCRIPCIÓN	PUNTAJE	Puntos obtenidos
1. Introducción y revisión previa de la práctica.	Revisa previamente la práctica y contesta las preguntas del profesor sobre la introducción de esta.	0.5	
2. Desempeño durante la práctica individual.	Asiste puntualmente a su práctica.		Obligatorio
	Se comporta de manera respetuosa durante la explicación del laboratorio con sus integrantes de equipo.		Obligatorio
	Trabaja en equipo durante el desarrollo de la práctica.	1	
	Participa activamente cuando el profesor pregunta sobre los temas de la introducción de la práctica.	1.5	
	Realizan el ajuste de dioptrías por alumno al observar al microscopio.	1	
3. Reporte de práctica en equipos.	Realiza introducción complementaria sobre el uso del microscopio.	2	
	Realiza el llenado de la Tabla 1 con sus 4 fotografías.	4	
Puntaje final obtenido:			

Nota: si sus productos no cumplen con los puntos obligatorios su trabajo no podrá ser evaluado, por favor revise que se cumplan ambos antes de enviar su actividad.

PRÁCTICA 1.2 Nutrición microbiana y cultivo de microorganismos de la cavidad oral.	
Eje temático 1	Ecología microbiana de la cavidad oral.
Elemento de competencia del eje	Reconocer las características ecológicas de la cavidad oral y los conceptos microbiológicos básicos que permitan diferenciar las características estructurales, morfológicas y funcionales de los microorganismos que conviven en este ecosistema.
Propósito de la práctica:	Aplicar la técnica aislamiento y siembra de estría simple de bacterias y levaduras en medios de cultivo simples, diferenciales y selectivos para identificar a los diferentes tipos de microorganismos.

Elaboró: CD. Víctor Manuel Mira Morales

I. INSTRUCCIONES DE LA PRÁCTICA.

- **Previo a la realización de la práctica**
 - ◆ Ingresar en la liga: [LINEAMIENTOS INTERNOS DEL LABORATORIO DEL MÓDULO DE ECOLOGÍA ORAL.pdf](#), y leer el documento.
 - ◆ Lectura previa de la práctica
 - ◆ Contestar cuestionario
- **Durante la práctica**
 - ◆ Colocarse el equipo de protección personal (EPP), que consta de bata blanca (bien cerrada), gorro, y protectores oculares.
 - ◆ Colocar sus objetos personales en los estantes.
 - ◆ Limpiar, desinfectar la mesa de trabajo y lavarse las manos.
 - ◆ Solicitar y revisar el material al personal del laboratorio.
 - ◆ Realizar el método de la práctica siguiendo las indicaciones
- **Finalizar la práctica**
 - ◆ Realizar la observación de los resultados
 - ◆ Entregar el reporte de la práctica

II. INTRODUCCIÓN

Técnicas de identificación fenotípica de bacterias y hongos

Existen dos métodos de identificación para microorganismos: los genotípicos y los fenotípicos, en la presente práctica, nos centraremos en estos últimos.

Cultivo

El cultivo de bacterias y hongos es el método diagnóstico más utilizado, pues permite el aislamiento del microorganismo y con ello su identificación y su sensibilidad ante agentes antimicrobianos. Al cultivar bacterias y hongos es esencial la correcta elección del medio de cultivo y de las condiciones de incubación. Desafortunadamente es necesario esperar de 18 a 24 horas como mínimo para visualizarlos. Estos microorganismos tienen requerimientos nutricionales imprescindibles y a veces únicos para su crecimiento. Entre ellos agua, carbono, nitrógeno, algunas sales y oligoelementos, por lo que los medios de cultivo han de cumplir como mínimo con estos componentes. Sin embargo, a veces necesitan de otras sustancias adicionales como vitaminas, factores o aminoácidos esenciales.

Medios de cultivo

Son una mezcla de nutrientes que, en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, permiten el crecimiento de los microorganismos. Pueden clasificarse con base en varios parámetros:

Según su consistencia

- **Líquidos:** Las sustancias nutritivas se encuentran disueltas. Estos medios facilitan el crecimiento de las bacterias, pero impiden la observación de la morfología de las colonias.
- **Sólidos:** Consisten en una base de agar, el cual es un polímero de origen vegetal que se mantiene en fase líquida a altas temperaturas pero que forma un gel al enfriarse. Estos medios mantienen una alta humedad y permiten la observación de la morfología de las colonias fácilmente.
- **Semisólidos:** Son medios líquidos adicionados con poca cantidad de agar y se usan para valorar la movilidad de los microorganismos.

Según su origen

- **Naturales:** Constituidos por sustancias naturales de composición compleja y en ocasiones variable (extracto de carne, extracto de levadura, etc.).
- **Sintéticos:** O químicamente definidos en los que se conoce la participación exacta de carbohidratos, aminoácidos, proteínas etc.
- **Semisintéticos:** Constituidos por sustancias naturales y químicas determinadas previamente.

Según su Uso

Los medios de cultivo se pueden clasificar con base en su capacidad para permitir el crecimiento. Así, existen medios básicos o generales, medios enriquecidos, medios selectivos, medios diferenciales y medios cromogénicos.

- **Simple:** Tienen todos los elementos mínimos para el desarrollo de los microorganismos no exigentes.
- **Enriquecidos:** Están compuestos de un medio base al cual se le puede agregar diferentes suplementos nutritivos para permitir el crecimiento de microorganismos más exigentes. Como por ejemplo la sangre, el suero, líquido ascítico, etc. Ejemplos de estos medios son el agar sangre o el agar chocolate. Se utilizan para microorganismos que tienen grandes exigencias nutricionales.
- **Selectivos:** Son medios en los que la selectividad se consigue alterando las condiciones físicas del medio o añadiendo o suprimiendo componentes químicos específicos con el fin de inhibir el crecimiento de especies cuyo crecimiento no interesa. Este tipo de medio sólo permite el crecimiento de un grupo de microorganismos e inhibiendo el de otros. Se utiliza para seleccionar y aislar microorganismos a partir de poblaciones mixtas. Por ejemplo, Agar Manitol salado o Chapman (permite el crecimiento de ciertos estafilococos).
- **Medios diferenciales:** Se utilizan para poner de manifiesto características distintivas de las colonias. Son medios que distinguen entre distintos grupos bacterianos en función casi siempre del color de sus colonias. Por ejemplo, el agar MacConkey es un medio sólido que permite el crecimiento de bacilos gramnegativos fermentadores y no fermentadores de lactosa. Los primeros adoptan una coloración rosada que los diferencia de los segundos. Los medios diferenciales, además, pueden poner de manifiesto mezclas y contaminaciones en los cultivos.
- **Medios cromogénicos:** En éstos se incorporan sustancias cromogénicas para detectar distintas enzimas producidas por los microorganismos las cuales hidroliza el sustrato y se libera un compuesto cromogénico que adquiere un color intenso, dando color a la colonia.

Condiciones de incubación

Atmósfera. Las bacterias y los hongos se clasifican en función de sus requerimientos atmosféricos en:

- **Aerobios estrictos**, que crecen sólo en presencia de oxígeno.
- **Anaerobios estrictos**, que sólo crecen en ausencia de oxígeno.
- **Facultativos**, que crecen tanto en aerobiosis como en anaerobiosis.
- **Microaerofílicos**, que crecen mejor en una atmósfera con reducida concentración de oxígeno.
- **Capnofílicos**, que requieren CO₂ adicional para crecer.

Temperatura. Las bacterias y los hongos se clasifican también en función de la temperatura necesaria para su crecimiento en:

- **Psicrofílicos**, pueden crecer a bajas temperaturas entre 2-5°C (óptimo 10-30°C).
- **Mesofílicos**, crecen a temperaturas entre 10- 45°C (óptimo 30-40°C).
- **Termofílicos**, crecen muy poco a 37°C (óptimo 50-60°C).

Técnicas de siembra

El cultivo de microorganismos es una actividad que requiere del conocimiento de técnicas de siembra o inoculación y de aislamiento para transferirlos de un medio a otro, o mantener su crecimiento y actividad. Es indispensable para realizar diversos estudios morfológicos, de identificación, bioquímicos, de patogenicidad y ecológicos, entre otros.

Existen diferentes técnicas de siembra: por suspensión de la muestra en medios líquidos; extensión de diluciones de un cultivo en superficie de medios en la caja de Petri; por estría en caja de Petri y tubos con medios solidificados en forma inclinada; por piquete o picadura en tubos con medios sólidos o semisólidos. Con la aplicación de cada técnica se obtiene información de importancia para el estudio básico o aplicado de los microorganismos de interés.

Existen distintas técnicas para la siembra de microorganismos con base en estrías, el objetivo es obtener colonias aisladas, ya que, en la naturaleza, los microorganismos generalmente se encuentran en poblaciones, formando parte de comunidades de gran complejidad, por lo que uno de los objetivos de estudio más importantes en microbiología es aislarlos.

El aislamiento de bacterias a partir de muestras naturales se realiza, en la mayoría de los casos, mediante la técnica de estría cruzada para producir colonias aisladas en cultivos sólidos y así, obtener un cultivo puro, también conocido como cepa, que contiene un solo tipo de microorganismo con la misma composición genética.

- **Estría simple:** Depositar la muestra en un extremo de la caja. Esterilizar el asa bacteriológica, es decir calentar al rojo vivo, enfriar en una de las esquinas del agar, y realizar la estría en el medio sólido. Al momento de realizar la estría se debe tocar de extremo a extremo de la caja de Petri, a manera de zigzag en una sola intención y sin despegar el asa bacteriológica del medio de cultivo.
- **Estría cruzada:** El método de estría cruzada consiste en realizar varias estrías en la superficie de un medio sólido en la caja. Los microorganismos se van quedando al hacer las estrías en diferentes partes de la superficie de la caja. Así, quedarán microorganismos independientes, que, al multiplicarse, formarán una colonia. Esta técnica de siembra se usa para aislar cultivos puros en muestras que contienen diferentes microorganismos o para el estudio de la morfología de las colonias y de las propiedades hemolíticas de las bacterias. Dividir la caja en cuartos. Tomar la muestra con el asa bacteriológica estéril y hacer estrías paralelas en una cuarta parte de la superficie de la placa. Esterilizar nuevamente el asa, enfriar en una de las esquinas del agar, girar la caja 90° y estirar nuevamente tocando 3 o 4 veces el área sembrada inicialmente y cubriendo otro cuarto de la placa, sin rasgar el agar. Repetir este último paso en los dos cuadrantes restantes.

Características macroscópicas

Morfología

La morfología de las colonias es fundamental en la identificación preliminar de los microorganismos. Las colonias, cuando crecen en medios específicos y bajo condiciones ideales, se describen por sus características de tamaño, forma, consistencia, y color. El tamaño de las colonias bacterianas es generalmente uniforme entre una misma especie. La forma está determinada por los bordes y el grosor de la colonia. El borde puede ser liso o rugoso e irregular; la colonia, abultada o plana. La textura de la colonia puede variar de cremosa a viscosa, con superficie lisa o rugosa. Algunos microorganismos producen colonias pigmentadas.

Las colonias de *Candida* en medio de CHROMagar *Candida* presentan un color diferente para cada una de las especies. Las colonias de *C. albicans* presentan un color verde claro a mediano. *C. dubliniensis* produce un color verde oscuro. Las colonias de *C. tropicalis* presentan un color azul verdoso a azul metálico y las colonias de *C. krusei* presentan un color rosa claro con un borde blancuzco. Es posible que otras especies produzcan su color natural (crema) o presenten un color rosa o malva de claro a oscuro (por ejemplo, *Candida glabrata* y otras especies).

III. DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

Material y equipo

- Mechero de Bunsen
- Asa bacteriológica
- Piceta con agua destilada
- Toallas de papel
- Papel estraza (como campo)
- Encendedor
- Lápiz graso
- Bolígrafo
- Dos campos desechables
- Toallas de papel
- Desinfectante en aerosol (cada equipo deberá traerlo)
- Cepas
 - Cepa problema 1 (C1)
 - Cepa problema 2 (C2)
 - Cepa problema 3 (C3)
 - Cepa problema 4 (C4)
- Medios de cultivo en la caja de Petri con 4 divisiones:
 - 1 de ellas con Gelosa sangre (GS)
 - 1 de ellas con Manitol Salado (MS)
 - 1 de ellas con Agar Eosina Azul de Metileno (EMB)
 - 1 de ellas con agar dextrosa Sabouraud (S)

Procedimiento de la práctica

1. Desinfectar con desinfectante en aerosol todo el laboratorio dirigiendo la descarga al techo.
2. Colocarse las barreras de protección personal.
3. Higienizar y desinfectar el área de trabajo, antes del desarrollo de la práctica.
4. Colocar el material a emplear de acuerdo con la práctica (los medios de cultivo deben estar a temperatura ambiente, sin humedad y no contaminados).
5. Identificar y rotular con plumón indeleble o lápiz graso, por debajo de la caja las divisiones y de donde se tomó cada microorganismo, como se muestra en la figura 1.
6. Esterilizar y enfriar el asa bacteriológica en un extremo del medio de cultivo (evitar quemadura por contacto).
7. Tomar una colonia de la **C1** y sembrarla por la técnica de estría simple en la división marcada con **MS**. Sin rasgar los medios de cultivo
8. Esterilizar el asa bacteriológica para evitar contaminación cruzada (evitar quemadura por contacto).
9. Tomar una colonia de la **C2** y sembrarla por la técnica de estría simple en la división marcada con **EMB**. Sin rasgar los medios de cultivo
10. Esterilizar el asa bacteriológica para evitar contaminación cruzada (evitar quemadura por contacto).
11. Tomar una colonia de **C3** y sembrarla por la técnica de estría simple en la división marcada con **S**. Sin rasgar los medios de cultivo
12. Esterilizar el asa bacteriológica para evitar contaminación cruzada (evitar quemadura por contacto).
13. Tomar una colonia de **C4** y sembrarla por la técnica de estría simple en la división marcada con **GS**. Sin rasgar los medios de cultivo

14. Incubar la caja con la base hacia arriba en condiciones de aerobiosis a 37°C durante 24-48 horas

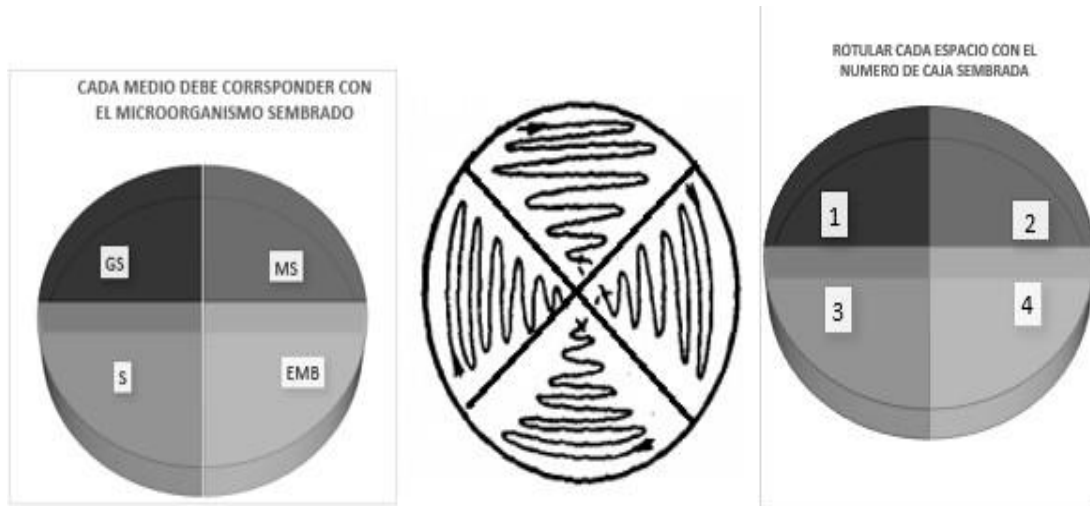


Figura 1. Rotulado de las cajas de cultivo y ejemplo de estría simple de purificación

Nota. Es importante mantener la caja con los medios de cultivo cerca del mechero encendido para evitar su contaminación.

15. Higienizar y desinfectar el área de trabajo, después del desarrollo de la práctica
16. Desinfectar el laboratorio con el desinfectante en aerosol dirigiendo la descarga al techo.
17. Revisar los cultivos y completar la tabla que aparece en la sección de resultados.

IV. OBSERVACIONES AL FINALIZAR LA PRÁCTICA.

1. Describir las observaciones y los resultados detalladamente según lo observado en las cajas.
2. Tiempo que se empleó para la incubación y el desarrollo de las colonias.
3. Condiciones de incubación: anaerobia o aerobia.
4. Características morfológicas de las colonias que se desarrollaron.
5. Crecimiento, si éste fue abundante, moderado o escaso por el número de colonias.
6. Metabolismo y reacción bioquímica en el medio de cultivo, el cual se identifica por los cambios de color de los medios de cultivo.
7. Incluir imágenes: fotografías con su respectivo pie de figura, que contenga la descripción de lo que se observa en ellas, identificadas con flechas o letras.
8. Enlistar de forma clara y concreta las conclusiones por orden de identificación.
9. Incorporar mínimo tres referencias bibliográficas que avalen su introducción.

IV. REPORTE DE LA PRÁCTICA

El reporte de práctica de laboratorio es un documento que describe de manera concisa el procedimiento que realizaron, el desarrollo y los resultados de esta.

Elaborar un documento que cuente con:

Título

Autores (nombre de estudiantes),

Antecedentes o marco teórico.

Texto Arial 12 con referencias en cada párrafo

Desarrollo de la práctica

Equipo, material, reactivos.

Procedimiento

Resultados

Elabore un video del ensayo del estriado y subir el link de dicho video en su reporte

Reportar sus resultados de siembra de las cepas en cada medio de cultivo.

Describir la morfología colonial representativa de cada cultivo microbiano de acuerdo con los criterios indicados en los cuadros, deben de incluir fotografías a color, que sean nítidas en tamaño de 7.0 x 5.0 cm y acordes a la práctica, que permitan comprender las observaciones realizadas.

Discusión

Conclusiones

Referencias

Formato Vancouver

Realizar el reporte en el formato de práctica que se incluye en los documentos de esta misma.

[https://docs.google.com/document/d/1RgKBckIJ4auuRBH4lgacXp8VUI8suiC/edit?usp=drive link&oid=104901572289815531153&rtpof=true&sd=true](https://docs.google.com/document/d/1RgKBckIJ4auuRBH4lgacXp8VUI8suiC/edit?usp=drive_link&oid=104901572289815531153&rtpof=true&sd=true)

PRÁCTICA 1.3 Técnicas de identificación fenotípica de bacterias y hongos.	
Eje temático 1:	Ecología microbiana de la cavidad oral.
Elemento de competencia del eje:	Reconocer los conceptos microbiológicos básicos que permitan diferenciar las características estructurales, morfológicas y funcionales de los microorganismos que conviven en la cavidad oral.
Propósito de la práctica:	Realizar la tinción de Gram, la tinción con azul de lactofenol, la prueba de práctica catalasa y la prueba de hemolisina para la identificación de microorganismos. Identificar los microorganismos con base en la descripción y análisis de las técnicas morfológicas y bioquímicas.

Elaboró: Dra. Eileen Uribe Querol

IV. INSTRUCCIONES DE LA PRÁCTICA.

- **Previo a la realización de la práctica**
 - ◆ Ingresar en la liga: [LINEAMIENTOS INTERNOS DEL LABORATORIO DEL MÓDULO DE ECOLOGÍA ORAL.pdf](#), y leer el documento.
 - ◆ Lectura previa de la práctica
 - ◆ Contestar cuestionario
- **Durante la práctica**
 - ◆ Colocarse el equipo de protección personal (EPP), que consta de bata blanca (bien cerrada), gorro, y protectores oculares.
 - ◆ Colocar sus objetos personales en los estantes.
 - ◆ Limpiar, desinfectar la mesa de trabajo y lavarse las manos.
 - ◆ Solicitar y revisar el material al personal del laboratorio.
 - ◆ Realizar el método de la práctica siguiendo las indicaciones
- **Finalizar la práctica**
 - ◆ Realizar la observación de los resultados
 - ◆ Entregar el reporte de la práctica

V. INTRODUCCIÓN

La presencia de microorganismos patógenos en la cavidad oral en gran medida promueve los procesos infecciosos. Así, la mejor manera de controlar dichos procesos infecciosos es mediante la identificación precisa, tratamiento y eliminación del o los microorganismos que los provocan.

A pesar de que cada vez más, la identificación de microorganismos se realiza con base en sus características genotípicas, las características fenotípicas siguen siendo utilizadas en gran medida. Las técnicas genotípicas son más rápidas y efectivas para la identificación de microorganismos. Sin embargo, su elevado costo, limita su uso. Las técnicas fenotípicas para la identificación de microorganismos incluyen la caracterización morfológica, el desarrollo de colonias, y la evaluación de las propiedades bioquímicas y metabólicas de los microorganismos.

Es importante realizar varias técnicas de identificación fenotípica dado que per se, éstas poseen limitaciones. Es decir, una sola técnica no es suficiente para poder identificar a los microorganismos. Por lo tanto, se deben realizar en forma secuencial para poder determinar el género y la especie de un microorganismo.

En el laboratorio del Módulo de Ecología Oral revisaremos algunas características fenotípicas mediante el uso de varias técnicas de identificación de microorganismos.

Tinción de Gram

La tinción de Gram fue desarrollada empíricamente por Christian Gram en 1884. La tinción permite diferenciar los componentes de la pared celular bacteriana y clasificarlos en dos grandes grupos de bacterias: Gram positivas y Gram negativas. Las bacterias Gram positivas se tiñen de color violeta o morado por el colorante cristal violeta. En cambio, las bacterias Gram negativas perderán la coloración violeta inicial y se teñirán de rojo o rosa por el colorante safranina.

Los colorantes son compuestos orgánicos que tienen alguna afinidad específica por los materiales celulares. Algunos colorantes son moléculas cargadas positivamente (cationes) que se combinan con los componentes celulares cargados negativamente, como los ácidos nucleicos y los polisacáridos. Los colorantes catiónicos de esta tinción son el cristal violeta y la safranina.

Los mordientes intensifican la tinción porque aumentan la afinidad del colorante a los componentes celulares.

Tinción con azul de lactofenol

La tinción de azul de lactofenol es utilizada para la identificación de levaduras y hongos. Es una tinción simple pues sólo se utiliza un colorante. La tinción de azul de lactofenol a pesar de no ser considerada una tinción diferencial, permite observar fácilmente las estructuras fúngicas para una adecuada identificación. Las elevadas concentraciones de fenol inactivan las enzimas hidrolíticas, evitando así la lisis celular. El ácido láctico preserva las estructuras fúngicas y el azul de metilo se une a la quitina de las paredes celulares, quedando las hifas fúngicas teñidas de azul.

Prueba de Catalasa

La enzima catalasa está presente en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. Las bacterias catalasa positivas son aquellas que sintetizan catalasa e hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. El resultado positivo de esta prueba es observar cómo se liberan burbujas de oxígeno.

Prueba de Oxidasa

Esta prueba es utilizada para determinar si un microorganismo produce la enzima citocromo oxidasa. La prueba se usa en la caracterización inicial de bacterias Gram negativas.

La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromo oxidasa sólo se encuentra en las bacterias aerobias, algunas anaerobias facultativas y, excepcionalmente, en alguna microaerófila (*Vibrio fetus*), pero las bacterias anaerobias estrictas carecen de actividad oxidasa.

El resultado positivo de esta prueba será determinado cuando la zona reactiva de la tira utilizada vire su color de azul a violeta. El resultado negativo de la prueba se determinará cuando la zona reactiva de la tira permanezca sin cambio de coloración.

Hemolisina

Algunas bacterias producen enzimas como las hemolisinas que causan la lisis de los hematíes en medios que contienen sangre. El microorganismo se denomina alfa hemolítico cuando genera un halo de color verdoso alrededor de la colonia o beta hemolítico cuando se genera una zona clara alrededor de la colonia.

VI. DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

Material y equipo

Cepas

- Cuatro cultivos de diferentes microorganismo (sembrados en práctica 1.2).

Tinción de Gram

- Agua corriente.
- Frascos goteros para tinción de Gram.
- Colorante de cristal violeta (un colorante básico que en contacto con las células cargadas negativamente, reacciona con ellas tiñendo su pared celular)
- Colorante de safranina (colorante de contraste, es un colorante básico)
- Mordiente Lugol (los mordientes fijan las tinciones, aumenta la afinidad entre el colorante y las células porque tienen sales metálicas, ácidos o bases)
- Alcohol-acetona (proporciones idénticas, agente decolorante como un disolvente orgánico)
- 2 Portaobjetos (para las cepas utilizadas en la práctica 1.2)
- 2 Cubreobjetos
- Mechero

Tinción con azul de lactofenol

- Azul de lactofenol
- 1 Portaobjetos (para la cepa utilizada en la práctica 1.2)
- 1 Cubreobjetos

Prueba de Catalasa

- Agua
- Disolución de peróxido de hidrógeno al 3%
- Palillos estériles
- 1 Portaobjetos

Prueba de Hemolisina

- Caja de Petri con medio gelosa sangre

Procedimiento.

Para cada tinción o prueba:

- Limpiar, desinfectar el área de trabajo, es decir, preparar el área de trabajo estéril.
- Prender los mecheros, ajustar la flama hasta presentar un cono azul bien marcado.
- Identificar y organizar el material dentro del área de trabajo.
- Durante todos los procedimientos se deben tomar fotografías y hacer anotaciones.

Preparación de portaobjetos

Rotular 3 portaobjetos

Portaobjetos 1

1. Colocar una gota de agua bidestilada sobre el portaobjetos.
2. Esterilizar el asa bacteriológica a la flama y enfriar el asa bacteriológica en un extremo del medio cultivo (evitar quemadura por contacto). (Figura 1a)
3. Tomar una colonia del medio MS y extender en un portaobjetos. (Figura 1b)
4. Realizar una extensión con el asa bacteriológica y secar inmediatamente al aire. (Figura 1c).
5. Pasar la preparación sobre la flama de un mechero sin quemar la muestra, quedando de esta forma fijada la muestra.

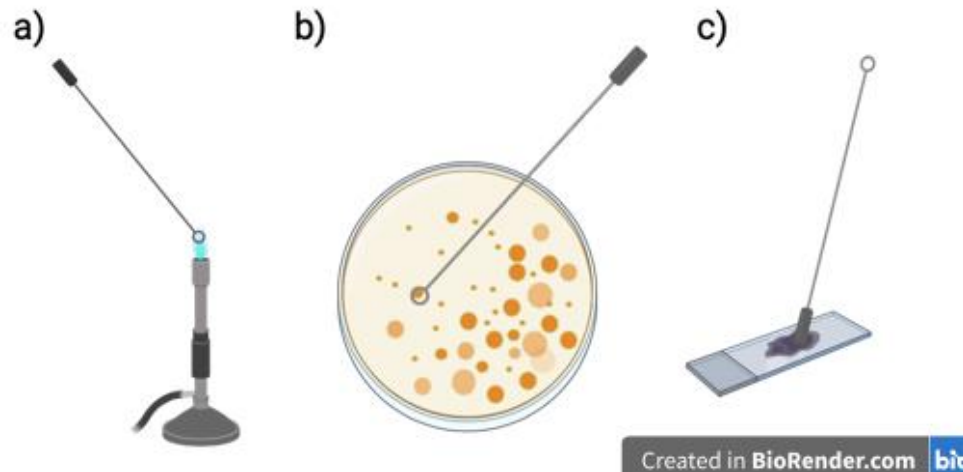


Figura 1. Preparación de portaobjetos para tinción de Gram y azul de lactofenol. a) Esterilización del asa de cultivo. b) Toma de sólo una colonia y c) Dispersar la colonia en el portaobjetos.

Portaobjetos 2

6. Realizar los mismos pasos anteriores (1-5) para los portaobjetos 2 donde se tomará una colonia del medio EMB

Portaobjetos 3

7. Realizar los mismos pasos anteriores (1-5) para los portaobjetos 3 donde se tomará una colonia del medio S

Tinción de Gram (Solo portaobjetos 1 y 2)

1. Una vez que prepararon las muestras en los dos portaobjetos.
2. Cubrir los portaobjetos con la disolución de cristal violeta.
3. Dejar reposar durante 1 minuto.
4. Lavar el portaobjetos suavemente con agua corriente a chorro fino.
5. Cubrir los portaobjetos con la disolución de lugol (mordiente).
6. Dejar reposar durante 1 minuto.
7. Lavar el portaobjetos suavemente con agua corriente a chorro fino.
8. Decolorar con la disolución de alcohol-acetona hasta que el color salga ligeramente claro).
9. Lavar el portaobjetos suavemente con agua corriente a chorro fino.
10. Cubrir los portaobjetos con la solución de safranina.
11. Dejar reposar durante 1-3 minutos.
12. Lavar el portaobjetos suavemente con agua corriente a chorro fino.
13. Dejar secar el frotis al aire.
14. Observar al microscopio.
15. Incluir la fotografía y la descripción de cada una de las observaciones en la Tabla 3 del reporte de práctica.

Tinción con azul de lactofenol (Portaobjetos 3)

1. Una vez que preparó la muestra en el portaobjetos
2. Cubrir el portaobjetos con una gota de azul de lactofenol
3. Eliminar el exceso de colorante con una piseta de agua
4. Colocar cubreobjetos
5. Observar a 10X y a 40X. Nota: los objetivos de 10X y 40X no son compatibles con el aceite y se dañan.
6. Usar el Microscopio PrimoStar según se requiera.
7. Tomar fotografías en el iPad o computadora de la laminilla observada.
8. Incluir la fotografía y la descripción de la observación en la Tabla 3 del reporte de práctica.

Prueba de Catalasa

1. Dividir con el plumón el portaobjetos en cuatro regiones.
2. Poner una gota de peróxido de hidrógeno sobre un primer cuarto del portaobjetos.
3. Tomar una colonia por cada cepa de la caja con cuatro divisiones de la práctica 1.2, con un palillo estéril.
4. Mezclar la colonia con la gota de peróxido de hidrógeno en el portaobjetos con movimientos en forma de círculos (en un área restringida, no en toda la laminilla).
5. Observar si se liberan burbujas.
6. Desechar el palillo y el portaobjetos en el contenedor para los residuos biológicos infecciosos.
7. Realizar este procedimiento para cada uno de los microorganismos.
8. Incluir la fotografía y la descripción de cada una de las observaciones en la Tabla 3 del reporte de práctica.

Hemolisis

1. Identificar el tipo de hemólisis en la cajas que se les entregan para este fin.
2. Revisar los cultivos.
3. Incluir la fotografía y la descripción de cada una de las observaciones en la Tabla 3 del reporte de práctica.

VII. OBSERVACIONES DE LA PRÁCTICA

Tinción de Gram: Describir la tinción que se observó, redactar los resultados obtenidos.

Tinción de azul de lactofenol. Describir la tinción que se observó, redactar los resultados obtenidos.

Prueba de catalasa: Describir la reacción química que se presentó, redactar los resultados obtenidos.

Prueba de hemolisina: Analiza y compara los cultivos sembrados en el medio gelosa sangre..

VIII. REPORTE DE LA PRÁCTICA

El reporte de práctica de laboratorio es un documento que describe de manera concisa el procedimiento que realizaron, el desarrollo y los resultados de esta.

Elaborar un documento que cuente con:

Título

Autores (nombre de estudiantes),

Antecedentes o marco teórico.

Texto Arial 12 con referencias en cada párrafo

Desarrollo de la práctica

Equipo, material, reactivos.

Procedimiento

Resultados

- Actividades virtuales, previas al desarrollo de la práctica de laboratorio.
- Fotografías y observaciones de cada una de las tinciones y pruebas realizadas para cada uno de los microorganismos

Descargue el archivo reporte de práctica donde se encuentran las tablas que deben llenar y siga las instrucciones de su profesor (a).

Discusión

Conclusiones

Referencias

Formato Vancouver

PRÁCTICA 2.1

Cultivo de microorganismos de distintos sitios de la cavidad oral..

Eje temático 1:	Ecología microbiana de la cavidad oral.
Elemento de competencia del eje:	Reconocer las características del medio oral que favorecen su colonización por bacterias, hongos y virus, así como las estructurales y factores de virulencia de los microorganismos que conviven en el ecosistema oral en salud y enfermedad.
Propósito de la práctica:	Identificar a los microorganismos que habitan los diversos sitios anatómicos de la cavidad oral en condiciones de salud acorde a las características nutricionales y metabólicas del microorganismo, a través de las técnicas de siembra en el primo aislamiento de las zonas de toma de muestra.

Elaboró: Dra. Santa Ponce Bravo

III. INSTRUCCIONES DE LA PRÁCTICA.

- **Previo a la realización de la práctica**
 - ◆ Ingresar en la liga: [LINEAMIENTOS INTERNOS DEL LABORATORIO DEL MÓDULO DE ECOLOGÍA ORAL.pdf](#), y leer el documento.
 - ◆ Lectura previa de la práctica
 - ◆ Contestar cuestionario
- **Durante la práctica**
 - ◆ Colocarse el equipo de protección personal (EPP), que consta de bata blanca (bien cerrada), gorro, y protectores oculares.
 - ◆ Colocar sus objetos personales en los estantes.
 - ◆ Limpiar, desinfectar la mesa de trabajo y lavarse las manos.
 - ◆ Solicitar y revisar el material al personal del laboratorio.
 - ◆ Realizar el método de la práctica siguiendo las indicaciones
- **Finalizar la práctica**
 - ◆ Realizar la observación de los resultados
 - ◆ Entregar el reporte de la práctica

III. INTRODUCCIÓN.

Como Cirujanos Dentistas, estamos en contacto con una gran diversidad de microorganismos en la cavidad oral que son residentes o transitorios. En la mayoría de los casos, el microbiota oral se encuentra en equilibrio sin producir enfermedad, pero cuando la eubiosis se altera, se presenta una disbiosis que bajo ciertas condiciones sistémicas del hospedero puede favorecer el desarrollo de procesos infecciosos o modifica el microbioma de la cavidad oral.

Para poder interpretar los resultados emitidos por un laboratorio de Microbiología, es primordial conocer el tipo de microorganismos presentes en cavidad oral en salud y diferenciarlos en el proceso de la enfermedad.

Los sitios de la cavidad oral presentan diversas características morfológicas, histológicas y fisiológicas, cada uno de ellos permiten el desarrollo de diferentes microorganismos que requieren condiciones ambientales, nutricionales y metabólicas muy específicas, para su desarrollo y simbiosis en condiciones de salud. Así como también, es importante identificarlos con base a su reacción a la tinción. Por lo que es importante considerar, que cuando se selecciona un sitio de la cavidad oral se debe tomar en consideración las características anatómicas e histológicas que favorecen el albergamiento de las distintos géneros y especies de microorganismos que son colonizadores como residentes o transitorios.

Cuando se realiza el aislamiento primario se emplea un medio de cultivo nutritivo, el cual permite mantener la viabilidad de los microorganismos, los medios de cultivo selectivos o específicos permiten identificar a géneros o especies bacterianas, así como aquellos enriquecidos que favorecen las reacciones bioquímicas para su identificación.

Para realizar la práctica deberá cumplir con lo siguiente:

- Documentarse con relación a medios de cultivo, su función y el microorganismo que tiene crecimiento en ellos.
- El comportamiento bioquímico de los microorganismos en los medios de cultivo (reacción bioquímica) que permite identificar y diferenciar al microorganismo aislado.
- Describir las características de los microorganismos que conforman al microbioma oral.

No olvide insertar las tres referencias bibliográficas consultadas como mínimo.

III. DESARROLLO DE LA PRÁCTICA.

Material y equipo

- Incubadora
- Microscopio óptico (fotónico).
- Mechero de Bunsen.
- Puente de tinción.
- Asa bacteriológica.

Medios de cultivo en placa con cuatro divisiones (caja de Petri) para el aislamiento del microorganismo.

- Agar dextrosa Sabouraud
- Agar gelosa sangre
- Agar manitol salado
- Agar MacConkey

Tinción de Gram

- Cristal violeta (colorante).
- Lugol (mordente).
- Alcohol-acetona (decolorante).
- Safranina (colorante de contraste).

Técnica de examen directo con KOH

- Un portaobjetos con pantalla esmerilada
- Un cubreobjetos rectangular (20 x 40 mm)
- Lápiz graso
- Bolígrafo
- Un hisopo de algodón estéril
- Toallas de papel.
- Desinfectante en aerosol y toallitas con desinfectante.

Procedimiento.

1. Colocar el material a emplear de acuerdo con la práctica (los medios de cultivo deben encontrarse a temperatura ambiente, sin humedad y no contaminados).
2. Identificar y rotular los medios de cultivo (con lápiz graso o masking tape) según el sitio de la toma de muestra.
3. Para la citología exfoliativa el portaobjetos debe estar limpios, libre de grasa y rotulados en un extremo por su parte inferior o en la pantalla con el nombre de la persona a quien se le tomará la muestra.

4. Toma de muestra

Elegir un sitio anatómico para toma de muestra: **paladar, carrillos o lengua**

Con el hisopo o abatelenguas estéril se frota de forma vigorosa la superficie seleccionada

5. Siembra en la caja de cultivo

La muestra obtenida con el hisopo o abatelenguas se depositará en un extremo de los medios de cultivo.

Posteriormente con el asa bacteriológica (esterilizar y enfriar), se realizan las siembras por estría simple en cada uno de los medios (cada cuadrante) a partir del inóculo y sin rasgar los medios de cultivo. Se incubará en condiciones de aerobiosis por 48 horas hasta 72 horas.

6. Citología exfoliativa

Nota. La mitad del grupo realizará tinción de Gram y la otra mitad KOH (en fresco)

- ♦ Con el mismo hisopo o abatelenguas se extenderá la muestra sobre la superficie del portaobjetos (previamente rotulado) con movimientos circulares para que el inóculo no quede concentrado en un solo sitio y se deja secar. Una vez preparada la muestra, teñir con la técnica de tinción de Gram.
- ♦ Para el examen directo, se colocará una gota de KOH y se depositará la muestra, se extenderá de forma homogénea y se observará en el microscopio.

III. OBSERVACIONES AL FINALIZAR LA PRÁCTICA.

- a. La observación del crecimiento bacteriano podrá realizarse a las 48 o 72 horas después de realizada la práctica.
- b. Describir las observaciones y los resultados detalladamente según el sitio de la toma de muestra:
 - Tiempo que se empleó para la incubación y el desarrollo de las colonias.
 - Condiciones de incubación: aerobia.
 - Características morfológicas de las colonias de bacterias que crecieron.
 - Crecimiento, si éste fue abundante, moderado o escaso por el número de colonias.
 - Metabolismo y reacción bioquímica en el medio de cultivo, el cual se identifica por los cambios de color de los medios de cultivo.
- c. Incluir imágenes: fotografías o dibujos con su respectivo pie de figura, que contenga la descripción de lo que se observa en ellas, identificadas con flechas o letras.

CUADRO DE LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

Medio de cultivo. Microorganismo	Condiciones aerobias.	Características de la colonia.	Reacción bioquímica en el medio	Características de tinción.
Agar dextrosa Sabouraud				
Agar gelosa sangre				
Agar manitol salado				
Agar MacConkey				

Nota 3. Al llenar el cuadro debe describir las imágenes que le permitan identificar y diferenciar las características de los distintos microorganismos presentes en cavidad oral. Colocar una imagen que describa las características de los microorganismos con base a la tinción que lo describan mejor desde el aspecto morfológico.



III. REPORTE DE LA PRÁCTICA.

El reporte de práctica de laboratorio es un documento que describe de manera concisa el procedimiento que realizaron, el desarrollo y los resultados de esta.

Elaborar un documento que cuente con:

Título

Autores (nombre de estudiantes),

Antecedentes o marco teórico.

Texto Arial 12 con referencias en cada párrafo

Desarrollo de la práctica

Equipo, material, reactivos.

Procedimiento

Resultados

Incluye fotografías, imágenes y dibujos a color, nítidas acordes a la práctica, que permiten comprender las observaciones realizadas, con pie de figura, descripción de lo que se observa en ellas identificadas con flechas o letras.

Discusión

Conclusiones

Referencias

Formato Vancouver

PRÁCTICA 2.2**Acción de los antimicrobianos en el desarrollo de bacterias Gram positivas y Gram negativas.**

Eje temático 1:	Ecología microbiana de la cavidad oral.
Elemento de competencia del eje:	Reconocer las características del medio oral que favorecen su colonización por bacterias, hongos y virus, así como las estructurales y factores de virulencia de los microorganismos que conviven en el ecosistema oral en salud y enfermedad.
Propósito de la práctica:	Identificar la acción de los distintos antimicrobianos proporcionados en los sensidiscos sobre el desarrollo o inhibición de los microorganismos Gram positivos y Gram negativos. Comparar el halo de inhibición que se forma alrededor de los sensidiscos con los distintos fármacos.

Elaboró: Dra. Santa Ponce Bravo

I. INSTRUCCIONES DE LA ACTIVIDAD.**• Previo a la realización de la práctica**

- V. Ingresar en la liga: [LINEAMIENTOS INTERNOS DEL LABORATORIO DEL MÓDULO DE ECOLOGÍA ORAL.pdf](#), y leer el documento.
- V. Lectura previa de la práctica
- V. Contestar cuestionario

• Durante la práctica

- Colocarse el equipo de protección personal (EPP), que consta de bata blanca (bien cerrada), gorro, y protectores oculares.
- Colocar sus objetos personales en los estantes.
- Limpiar, desinfectar la mesa de trabajo y lavarse las manos.
- Solicitar y revisar el material al personal del laboratorio.
- Realizar el método de la práctica siguiendo las indicaciones

• Finalizar la práctica

- Realizar la observación de los resultados
- Entregar el reporte de la práctica

II. INTRODUCCIÓN.

El uso de fármacos para el control de infecciones orales y sistémicas ha provocado que en los últimos años surjan efectos adversos, propiciando la resistencia farmacológica en los microorganismos y en el hospedador reacciones de hipersensibilidad, en algunos casos hasta desencadenar enfermedades de tipo autoinmune como el Eritema multiforme en su forma leve, en el caso grave el Síndrome de Steven-Johnson. Cuando se tiene como elección administrar penicilina o derivados de la misma es fundamental preguntarle al paciente si es alérgico los mismos.

Por lo tanto, es necesario conocer y diferenciar los mecanismos, los sitios de acción de los antimicrobianos que se emplean en la terapia odontológica y médica; pero para ello, primero deberemos reconocer que no todos los antimicrobianos tienen el mismo efecto en todas las bacterias, por lo que se debe identificar si este quimioterápico empleado para el control de un proceso infeccioso es bactericida, bacteriostático, fungicida, viricida o si presenta resistencia farmacológica.

Hay que recordar que los microorganismos Gram positivos y Gram negativos tienen diferencias ultraestructurales que les confieren resistencia o susceptibilidad a los fármacos o que son antifagocíticas. Debemos ser conscientes de las implicaciones biológicas que tienen los fármacos al momento de prescribirlos. Los médicos y los cirujanos dentistas administramos antibióticos de amplio espectro. Por lo que el resultado deseado puede ser en la mayoría de los casos benéfico para el paciente o en el caso contrario dar resultado negativo y verse obligado el médico tratante a cambiar el tratamiento.

Para realizar la práctica deberá ampliar la información relacionada con los diferentes antibióticos o antimicrobianos de amplio espectro, definir si su acción es bacteriostática o bactericida, fungicida o viricida. Así como establecer el sitio de acción en la estructura bacteriana (llenar el cuadro) y si cumplen con el principio de Toxicidad Selectiva establecida por Paul Ehrlich.

Bibliografía.

Cavalieri SJ, Coyle MB. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. American Society for Microbiology 2005.
<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>

Previo al desarrollo de la práctica, deberás revisar los siguientes videos.

<https://www.youtube.com/watch?v=S0nAVS5gxyg>
<https://www.youtube.com/watch?v=8rRkpJjYkSo>

III. DESARROLLO DE LA PRÁCTICA.

Material y equipo

- Incubadora para cultivo en aerobiosis.
- Mechero de Bunsen.
- Asa bacteriológica.
- Pinzas estériles (para colocar los sensidiscos).
- Vernier para medir el halo alrededor del sensidisco.

Medios de cultivo en placa (caja de Petri).

- Agar de Müller-Hinton o agar nutritivo

Cepas.

- *Staphylococcus aureus*.
- *Escherichia coli*.

Antimicrobianos.

- Sensidiscos para bacterias Gram positivos y Gram negativos (identificar y diferenciar) Figura 1

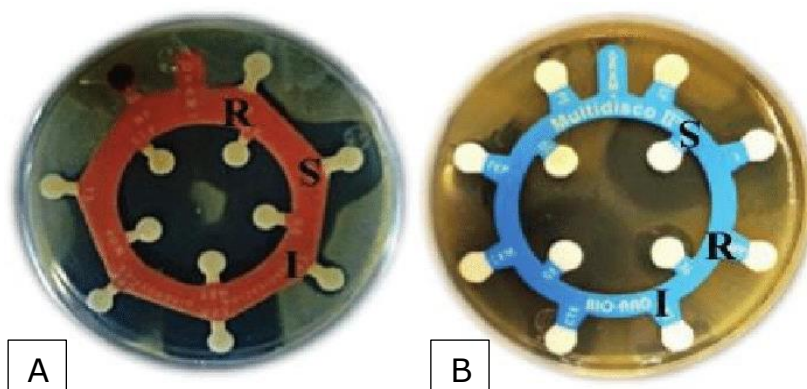


Figura 1 Ejemplo de multidiscos para la identificación de la acción de los antibióticos en bacterias Gram positivas (A) y Gram negativas (B).

Procedimiento.

1. Esterilizar el asa bacteriológica,
2. inocular una placa de agar Müller-Hinton con el microorganismo Gram positivo, distribuir de manera uniforme las bacterias sobre la superficie realizando siembra de estría cruzada (movimientos de zigzag). Esto se realiza rotando la placa aproximadamente 30 grados (1/3 de la caja) y repite 2 veces la inoculación en zigzag hasta crear un césped uniforme sobre el agar. Figura 2

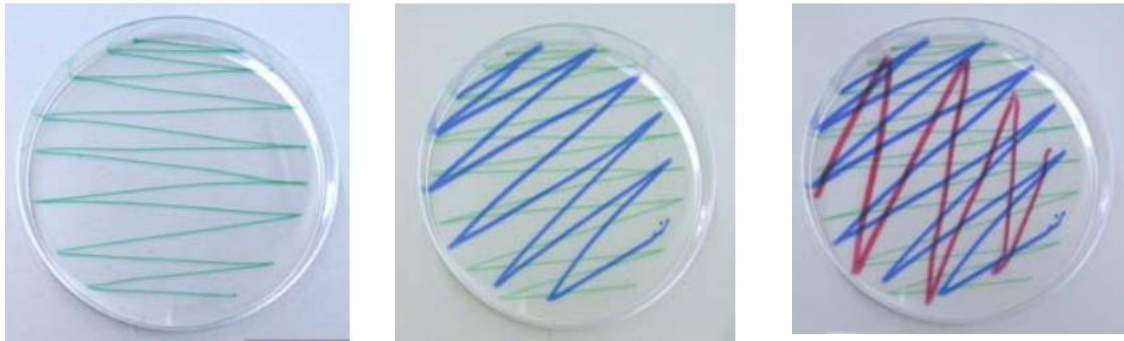


Figura 2. Ejemplo de siembra en zigzag sobre el agar

3. Dejar que la placa absorba el líquido durante 2 a 3 minutos, luego colocar los discos de antibióticos para Gram positivo sobre la superficie del agar haciendo una pequeña presión con las pinzas estériles. Desinfectar pinzas con alcohol y pasar con cuidado a la flama. **(NO quemar pinzas)**
4. Repetir los pasos 1 y 2 para el microorganismo Gram negativo.
5. Etiquetar las placas de agar e incubar por 24 o 48 horas a 37 °C.

Nota. No olvidar que durante la realización de esta práctica el mechero siempre debe de estar encendido, y que las muestras se toman cerca del mismo para evitar la contaminación de los medios de cultivo. Esto es fundamental para el éxito de la práctica y evitar falsos positivos o falsos negativos.

III. OBSERVACIONES AL FINALIZAR LA PRÁCTICA.

Revisar el siguiente sitio. <https://learn.chm.msu.edu/vibl/content/antimicrobial.html>

Elaborar el reporte de la práctica “Acción de los antimicrobianos sobre el desarrollo de las bacterias Gram positivas y Gram negativas”.

Describir los resultados detalladamente de acuerdo con las observaciones en las placas de agar y el efecto de los sensibilizadores, considerando lo siguiente:

- Crecimiento bacteriano, si éste fue abundante, moderado o fue inhibido por la acción de los fármacos.
Si el desarrollo (crecimiento bacteriano) fue abundante se interpreta como resistencia bacteriana (R), si es moderado se identifica como resistencia bacteriana intermedia (RI), y si no hay crecimiento será sensible (S) al fármaco y se observará un halo ausente de microorganismos alrededor del sensibilizador (inferir con relación al diámetro del halo). Observa el ejemplo de la figura 3

Incluir imágenes: fotografías o dibujos con su respectivo pie de figura, que contenga la descripción de lo que se observa en ellas, identificadas con flechas o letras.

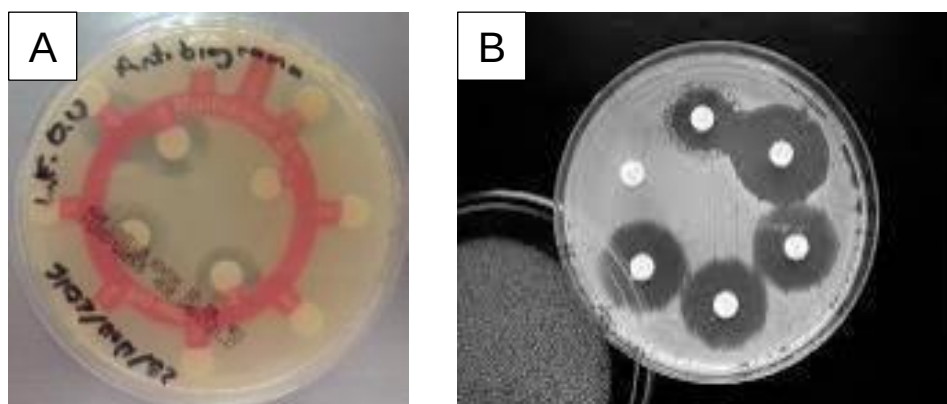
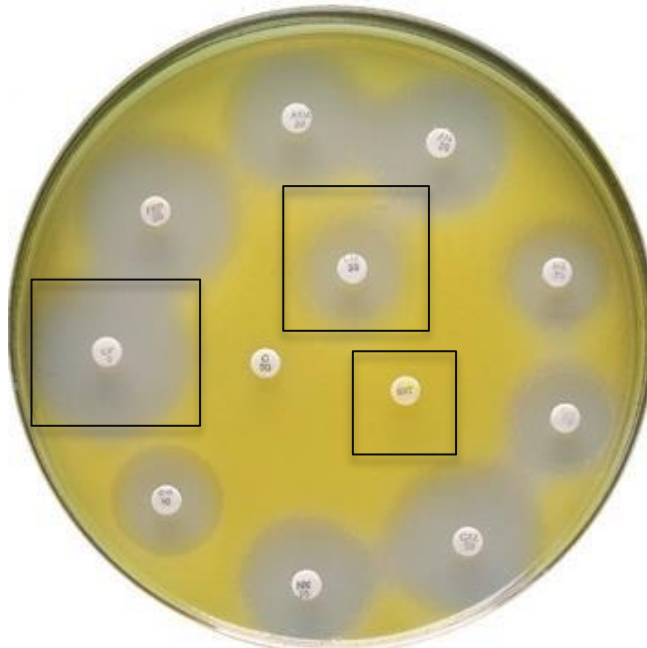


Figura 3 A) Imagen con los sensibilizadores sobre la placa de cultivo B) Se aprecian los halos de diferente diámetro que muestran la inhibición del desarrollo de bacterias a su alrededor, y también se observa el efecto inhibitorio en el desarrollo bacteriano lo que se traduce en resistencia farmacológica.

Contesta lo siguiente:

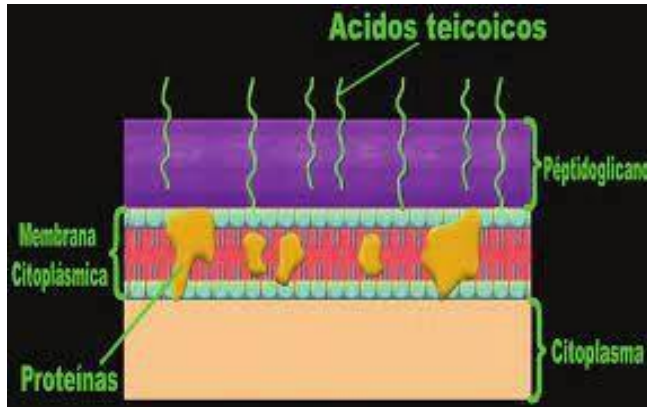
1. Reconocer los componentes estructurales de las bacterias Gram positiva y Gram negativa que son el blanco de la acción farmacológica de los diferentes antibióticos.
2. Definir bactericida, bacteriostático.
3. Describir el principio de toxicidad selectiva y en qué casos **NO** se cumple.
4. En la siguiente imagen, coloque en los recuadros una R si se observó resistencia farmacológica, RI si la resistencia fue intermedia y S si se observó inhibición del desarrollo.



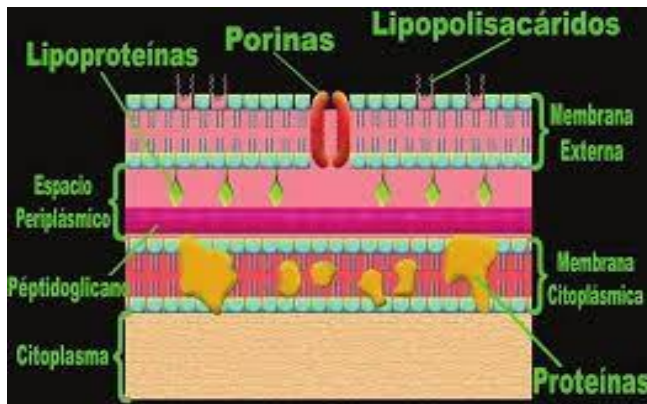
5. Contesta la Tabla con la información de los diferentes antimicrobianos, antimicóticos y antivirales solicitados.

Antimicrobiano	Acción contra Gram+ / Gram- / Hongo / Virus	Estructura de la bacteria, hongo o virus en donde actúa el fármaco	Tipo de fármaco (Bactericida / bacteriostático/ Fungicida/ Viricida)	Efectos adversos
Penicilina				
Ampicilina				
Tetraciclina				
Cefalosporina				
Vancomicina				
Eritromicina				
Clindamicina				
Trimetropin / sulfametoxazol				
Quinolonas				
Cloranfenicol				
Estreptomicina				
Gentamicina				
Kanamicina				

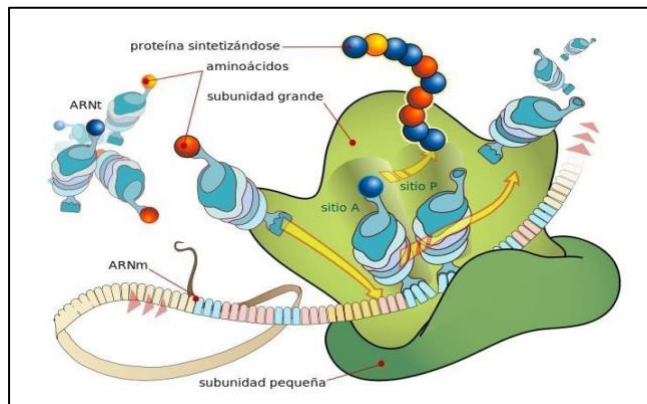
6. Analiza las imágenes y completa la información que se solicita



- A qué tipo de microorganismo corresponde
- De la tabla anterior, coloca una flecha señalando el sitio de acción y los fármacos que actúan sobre esta estructura celular



- A qué tipo de microorganismo corresponde
- De la tabla anterior, coloca una flecha señalando el sitio de acción y los fármacos que actúan sobre esta estructura celular



- A qué función bacteriana representa
- De la tabla anterior, coloca una flecha señalando el sitio de acción y los fármacos que actúan sobre esta estructura celular

IV. REPORTE DE LA PRÁCTICA.

El reporte de práctica de laboratorio es un documento que describe de manera concisa el procedimiento que realizaron, el desarrollo y los resultados.

Elaborar un documento que cuente con:

Título

Autores (nombre de estudiantes),

Antecedentes o marco teórico.

Texto Arial 12 con referencias en cada párrafo

Desarrollo de la práctica

Equipo, material, reactivos.

Procedimiento

Resultados

Incluye fotografías, imágenes y dibujos a color, nítidas acordes a la práctica, que permiten comprender las observaciones realizadas, con pie de figura, descripción de lo que se observa en ellas identificadas con flechas o letras.

Discusión

Conclusiones

Referencias

Formato Vancouver

PRÁCTICA 3.1

Eficacia de los barnices dentales fluorados en la prevención de la desmineralización dental y la formación de biopelícula dental.

Eje temático 3	Interacciones biológicas en el desarrollo de la caries dental.
Elemento de competencia del eje:	Identificar aspectos microbiológicos, bioquímicos, inmunológicos y nutricionales que influyen en la formación y composición de la biopelícula dental como factores etiológicos y progresión de la caries dental.
Propósito de la práctica:	Determinar el efecto de barnices fluorados en la prevención de la desmineralización y en la formación de exopolisacáridos producidos por <i>Streptococcus mutans</i> sobre esmalte dental.

Elaboró: Dr. Mikado Alejandro Nidome Campos
Dr. Gonzalo Montoya Ayala

I. INSTRUCCIONES DE LA PRÁCTICA.

● Previo a la realización de la práctica

- ◆ Ingresar en la liga: [LINEAMIENTOS INTERNOS DEL LABORATORIO DEL MÓDULO DE ECOLOGÍA ORAL.pdf](#), y leer el documento.
- ◆ Lectura previa de la práctica
- ◆ Contestar cuestionario

● Durante la práctica

- ◆ Colocarse el equipo de protección personal (EPP), que consta de bata blanca (bien cerrada), gorro, y protectores oculares.
- ◆ Colocar sus objetos personales en los estantes.
- ◆ Limpiar, desinfectar la mesa de trabajo y lavarse las manos.
- ◆ Solicitar y revisar el material al personal del laboratorio.
- ◆ Realizar el método de la práctica siguiendo las indicaciones

● Finalizar la práctica

- ◆ Realizar la observación de los resultados
- ◆ Entregar el reporte de la práctica

II. INTRODUCCIÓN

El esmalte dental es un tejido mineralizado que recubre la corona del diente y cuya composición química está representada por un alto contenido mineral en forma de cristales de hidroxiapatita (HAP). En condiciones de salud, el esmalte dental se encuentra en contacto directo con el medio bucal, donde se lleva cabo un proceso dinámico de desmineralización-remineralización determinado por la solubilidad de la hidroxiapatita que a su vez depende directamente del pH. Desafortunadamente, el esmalte maduro no puede regenerarse a sí mismo después de una pérdida mineral sustancial, que a menudo ocurre como consecuencia de la erosión o la caries dental.

La erosión dental, está definida según la Asociación Dental Americana (ADA), como la pérdida irreversible de la estructura del diente debido a la desmineralización química del esmalte por ácidos ajenos a los que se obtiene como producto del metabolismo de las bacterias. La erosión dental endógena está asociada a la exposición crónica de la estructura dental a un ambiente ácido como el ocasionado por el jugo gástrico (en condiciones como el reflujo gastroesofágico, anorexia o bulimia) y cuyo principal componente es el ácido clorhídrico (pH1-1.5); mientras que la erosión exógena tiene su etiología en hábitos alimenticios acidogénicos (bebidas carbonatadas entre otros).^{1,2}

Por otro lado, la Organización Mundial de la Salud (OMS) define esta entidad patológica como “un proceso localizado de origen multifactorial que se inicia después de la erupción dentaria, determinando el reblandecimiento del tejido del diente debido a la acción de microorganismos sobre los carbohidratos fermentables provenientes de la dieta, que puede evolucionar hasta la formación de una cavidad.” (3)

Aun cuando se han empleado diversos enfoques para tratar de reducir la incidencia de la caries dental, esta enfermedad todavía se considera una de las enfermedades bucales dependientes de biopelículas más ubicuas y costosas en todo el mundo. Uno de los principales responsables de la formación de biopelículas cariogénicas (colonizador inicial) tanto en esmalte como de la dentina es el *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) que está asociado a la etiología de la caries dental debido a que posee enzimas extracelulares (glucosiltransferasa), proteínas de unión a glucanos y fructosiltransferasas, que le permiten sintetizar una matriz rica en exopolisacáridos a partir del metabolismo de la sacarosa. (2,4)

En la actualidad, el uso de fluoruros dentales es considerado como el estándar de oro para la prevención y control ante la desmineralización, ya que el fluoruro puede combinarse con iones de fosfato de calcio para formar nuevos cristales de Fluorapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$) mediante un fenómeno denominado diadoquismo, dando como resultado un mineral más resistente al ataque ácido; además, tiene un efecto antimicrobiano al inhibir la actividad de la enolasa (enzima importante durante los procesos metabólicos de *S. mutans*). (4-6)

Los barnices de fluoruro se desarrollaron por primera vez a finales de la década de 1960, con la finalidad de prolongar el contacto del fluoruro con la superficie dental y promover su actividad benéfica. La OMS señala que los barnices con fluoruro tienen gran potencial en la reducción de riesgo a caries dental ya que suministran los iones fluoruro de manera más eficiente en comparación con otros agentes tópicos. Según las recomendaciones de la Asociación Dental Americana, la aplicación de barnices de fluoruro es particularmente benéfica en sujetos con riesgo moderado o alto de caries; para niños menores de 6 años, el barniz de fluoruro es el único producto de fluoración recomendado debido al bajo riesgo de ingestión e intoxicación por fluoruro. (6-11)

III. DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

Material y equipo.

- Muestra de esmalte dental (4 x 6 mm) aprobadas por comité de ética (CIE/0101/10/2023).
- Microscopio Monozoom EDF2.0
- Micropipetas y puntas para micropipeta (1000 y 200 µl)
- Mechero y encendedor
- Portaobjetos
- Pinza de curación estéril
- Microbrush
- Barniz dental fluorado comercial (marca a seleccionar)
- 2 microplacas de 12 pocillos (dos microplacas por grupo, característica del pocillo: diámetro de 2,26 cm)
- Bacteria: *S. mutans* (ATCC 25175)
- Ácido Clorhídrico al 0.06 Molar (HCl 0.06M) con el objetivo de simular la erosión endógena ocasionada después de 4 meses de exposición al jugo gástrico.¹²
- Tinción para exopolisacárido de *S. mutans* (Medio de cultivo Infusión Cerebro Corazón con sacarosa al 10% y Rojo Congo al 1%)

Procedimiento.

Se emplearán muestras de esmalte dental humano obtenidos a partir de dientes extraídos por indicaciones profilácticas (muestras obtenidas a través del proyecto: CIE/0101/10/2023), cumpliendo con todos los lineamientos y aprobación del Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Odontología-UNAM.

1. Las muestras se lavarán con agua y se analizarán con microscopio estereoscópico para excluir aquellas muestras con defectos en el esmalte, fracturas, tinciones o caries.
2. Se seccionará la corona del órgano dentario 1 mm por debajo de la unión cemento-esmalte y posteriormente se obtendrán muestras de esmalte de aproximadamente 4X6 mm, con ayuda de un disco de diamante y abundante irrigación. De las muestras obtenidas se dividirán para las dos pruebas: Prevención de la desmineralización e Inhibición de la formación de exopolisacárido de *S. mutans*.

Imagen que ejemplifica la forma de las muestras de esmalte para ambas pruebas.



Prevención de la demineralización

1. Con ayuda de un microbrush, se colocará una capa homogénea del barniz sobre una mitad de la superficie de esmalte y se dejará desecar por 5 min a temperatura ambiente (la otra mitad se tomará como superficie control sin tratamiento).
2. Tomar con las pinzas cada una de las muestras y colocarla en cada uno de los pozos de la caja de cultivo. Agregar 2 mL de HCl al 0.06M en cada pocillo de la microplaca (la solución deberá cubrir en su totalidad la muestra de esmalte) y dejar incubar por 24 hrs a temperatura ambiente.

Inhibición de la formación de exopolisacárido de *S. mutans*

1. Generar una zona estéril mediante un mechero.
2. Con ayuda de un microbrush, se colocará una capa homogénea del barniz sobre una mitad de la superficie de esmalte y se dejará desecar por 5 min a temperatura ambiente (la otra mitad se tomará como superficies control sin tratamiento).
3. Tomar con pinzas cada una de las muestras y colocarla en cada uno de los pozos de la caja de cultivo.
4. Agregar 2 mL del medio de tinción para exopolisacárido de *S. mutans* (medio de cultivo infusión Cerebro Corazón con sacarosa al 10% y Rojo Congo al 1%) en cada pocillo de la microplaca (la muestra de esmalte deberá quedar completamente sumergida en el medio).
5. Agregar 20 μ L del vial *S. mutans* (1×10^8) en cada uno de los pocillos con el medio de cultivo y muestra de esmalte dental. Agitar lentamente y dejar incubar durante 24 horas a 37 °C.

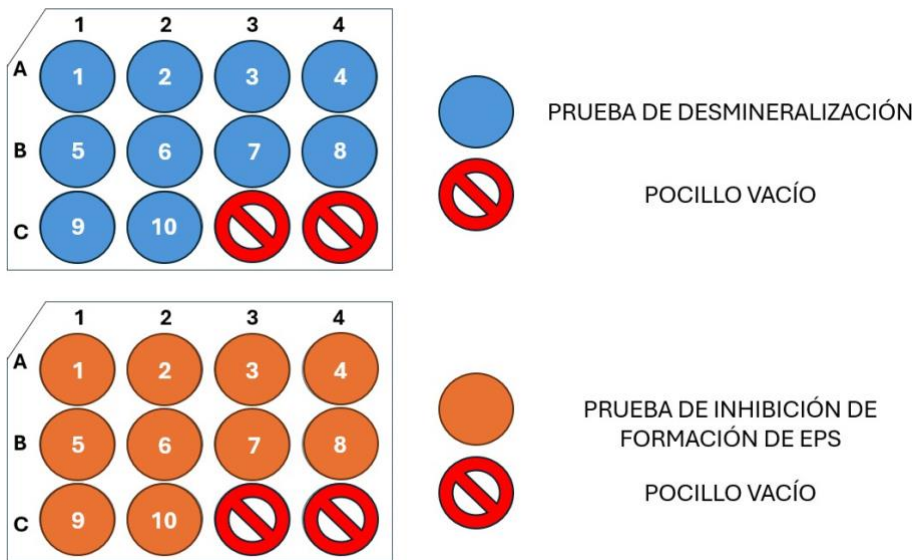


Imagen que ejemplifica la distribución de las muestras para ambas pruebas.

IV. OBSERVACIONES DE LA PRÁCTICA

Prevención de la demineralización

Transcurridas las 24 horas, se retirará el contenido de la solución de HCl (embace marcado para su correcto deshecho) y las muestras se desecarán durante 1 minuto a temperatura ambiente. Con ayuda del microscopio se observará toda la muestra (ambas mitades) para analizar las diferencias entre la superficie tratada con barniz y sin tratamiento.

Inhibición de la formación de exopolisacárido de *S. mutans*

Transcurridas las 24 horas, se retirará todo el contenido del medio de cultivo (embace marcado para su correcto deshecho) y las muestras se desecarán durante 1 minuto a temperatura ambiente. Con ayuda del microscopio se observará toda la muestra (ambas mitades) para analizar las diferencias entre la superficie tratada con barniz y sin tratamiento.

V. REPORTE DE LA PRÁCTICA

El reporte de práctica de laboratorio es un documento que describe de manera concisa el procedimiento que realizaron, el desarrollo y los resultados de esta.

Título

Autores (nombre de estudiantes),

Antecedentes o marco teórico.

Texto Arial 12 con referencias en cada párrafo

Desarrollo de la práctica

Equipo, material, reactivos.

Procedimiento

Resultados

Describir el efecto de la solución de HCl sobre la superficie sin tratamiento y sobre aquellas superficies tratadas con el barniz fluorado.

Describir la presencia de exopolisacáridos identificados mediante la tinción rojo Congo en las muestras sin tratamiento y en aquellas superficies tratadas con el barniz fluorado.

Discusión

Conclusiones

Referencias

Formato Vancouver

REFERENCIAS

1. Milani, D. C., Borba, M., Farré, R., Grando, L. G. R., Bertol, C., & Fornari, F. (2022). Gastroesophageal reflux disease and dental erosion: The role of bile acids. *Archives of Oral Biology*, 139, 105429.
2. Roesch-Ramos, L., Roesch-Dietlen, F., Remes-Troche, J. M., Romero-Sierra, G., Mata-Tovar, C. de J., Ali Azamar-Jácome, A., & Barranca-Enríquez, A. (2014). Dental erosion, an extraesophageal manifestation of gastroesophageal reflux disease: the experience of a center for digestive physiology in Southeastern Mexico. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 106(2), 92–97.
3. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>
4. Wolfson G, Sionov RV, Smoum R, Korem M, Polacheck I, Steinberg D. (2023) Anti-Bacterial and Anti-Biofilm Activities of Anandamide against the Cariogenic *Streptococcus mutans*. *Int J Mol Sci*, 24;24(7):6177. doi: 10.3390/ijms24076177.
5. Santos, V. C. E. dos ., Maquera-Huacho, P. M., Imbriani, M. J. M., Minhaco, V. M. T. R., & Spolidorio, D. M. P. (2023). Effects of BlueM[®] against *Streptococcus mutans* biofilm and its virulence gene expression. *Brazilian Dental Journal*, 34(1), 19–28. <https://doi.org/10.1590/0103-6440202305133>
6. Krzyściak W., Jurczak A., Kościelniak D., Bystrowska B., Skalniak A. (2014) The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*, 33:499–515. doi: 10.1007/s10096-013-1993-7.
7. Xie, Z., Yu, L., Li, S. et al. (2023) Comparison of therapies of white spot lesions: a systematic review and network meta-analysis. *BMC Oral Health* 23, 346. <https://doi.org/10.1186/s12903-023-03076-x>
8. Keyes, P. H. (1969). *Present and future measures for dental caries control. The Journal of the American Dental Association*, 79(6), 13951404.
9. Hausen H. (2004) How to improve the effectiveness of caries–preventive programs based on fluoride. *Caries Res*, 38:263-67.
10. Pandya, M., & Diekwisch, T. G. H. (2019). Enamel biomimetics—fiction or future of dentistry. *International Journal of Oral Science*, 11(1), 8.
11. Marinho VCC, Higgins JPT, Logan S, Sheiham A. (2004) Fluoride varnishes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database of Systematic Reviews*; Issue 1
12. Oliveira, J., Menezes, M., Dovigo, N., & García, R. (2022). Long-term effects of simulated gastric juice alternated with brushing on hardness, substance loss, flexural strength, and reliability of CAD-CAM monolithic materials. *Journal of Applied Oral Science* vol. 30. Published by Faculdade De Odontologia De Bauru, USP

PRÁCTICA 3.2 Prueba de susceptibilidad a caries dental en medios de cultivo para <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Lactobacillus</i> sp. y medición del pH salival.	
Eje temático 3	Interacciones biológicas en el desarrollo de la caries dental.
Elemento de competencia del eje:	Identificar aspectos microbiológicos, bioquímicos, inmunológicos y nutricionales que influyen en la formación y composición de la biopelícula dental como factores etiológicos y progresión de la caries dental.
Propósito de la práctica:	Observará en medios de cultivo selectivos, el crecimiento bacteriano y la cuantificación de especies cariogénicas y pH salival de muestras de saliva de un sujeto de estudio.

Elaboró: C.D. Martha Concepción Chimal Sánchez.

I. INSTRUCCIONES DE LA PRÁCTICA.

- **Previo a la realización de la práctica**

- ◆ Ingresar en la liga: [LINEAMIENTOS INTERNOS DEL LABORATORIO DEL MÓDULO DE ECOLOGÍA ORAL.pdf](#), y leer el documento.
- ◆ Lectura previa de la práctica
- ◆ Contestar cuestionario

- **Durante la práctica**

- ◆ Colocarse el equipo de protección personal (EPP), que consta de bata blanca (bien cerrada), gorro, y protectores oculares.
- ◆ Colocar sus objetos personales en los estantes.
- ◆ Limpiar, desinfectar la mesa de trabajo y lavarse las manos.
- ◆ Solicitar y revisar el material al personal del laboratorio.
- ◆ Realizar el método de la práctica siguiendo las indicaciones

- **Finalizar la práctica**

- ◆ Realizar la observación de los resultados
- ◆ Entregar el reporte de la práctica

II. INTRODUCCIÓN.

La caries dental es un proceso patológico de destrucción de los tejidos duros del diente, de origen multifactorial y que uno de los factores que desencadenan la infección es producida por microorganismos. Las pruebas de actividad cariogénica se han empleado durante muchos años en la investigación dental y algunas de estas se han adaptado para el uso en el consultorio dental. Se han descrito un gran número de pruebas de actividad a caries dental lo que demuestra que es importante realizar de forma individual si existe susceptibilidad a presentarla.

Las pruebas microbiológicas aportan información sobre los niveles en la saliva de las bacterias cariogénicas: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* sp. y *Actinomyces* sp. Actualmente, existen pruebas para determinar la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias UFC, de los microorganismos cariogénicos, que permiten al clínico evaluar el nivel cuantitativo de estas bacterias en sus pacientes. Para ello se utiliza dos medios de cultivo diferentes que son: Agar *mitis salivarius* bacitracina y Agar Rogosa para realizar estas determinaciones, y los cultivos son inoculados a partir de muestras de saliva completa estimulada realizando comparaciones como: la densidad de crecimiento de colonias en el medio de cultivo realizado y expresado con los resultados, se interpretan como unidades formadoras de colonias por mililitro de saliva (UFC/ml).

Se considera como paciente de alto riesgo a caries dental, aquellos que presentan valores iguales o superiores a 10^5 UFC/ml para *Lactobacillus* sp. y más de 10^6 para *Streptococcus mutans*. La lectura de las colonias en los medios de cultivo será de bajo riesgo cuando presenten cifras inferiores a 10^3 UFC/ml para *Lactobacillus* sp. e inferiores a 10^5 para *Streptococcus mutans*.

Los diversos habitantes bacterianos de la cavidad oral tienen un amplio espectro de necesidades físicas y químicas. Para cultivar con éxito bacterias en el laboratorio, las condiciones de cultivo deben ajustarse para satisfacer estos variados requerimientos. El proceso general para el cultivo de bacterias orales es recolectar una muestra de saliva estimulada y sembrar en el Agar selectivo para *Streptococcus mutans* y el de *Lactobacillus* sp., después de realizar la colocación de la saliva en los medios de cultivo en la caja de Petri deberá cerrar y rotular con los datos del paciente* y entregar para su colocación en la incubadora.

Existen más bacterias en una muestra oral de saliva de las que pueden cultivarse, las cuales no crecerán debido a que utilizaremos los medios selectivos para las bacterias relacionadas con la caries dental.

El hábitat natural de las especies orales es de alrededor de 37°C , por lo que las bacterias orales y nuestros medios de cultivo deberán cultivarse en incubadoras a esa temperatura.

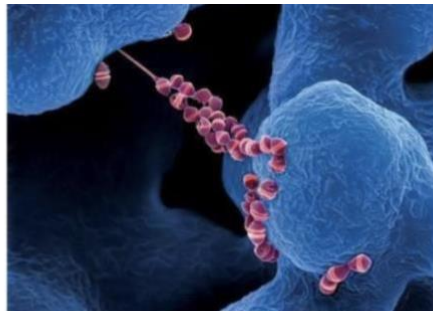
Muchas bacterias facultativas importantes para la caries dental, como *Streptococcus* sp. y *Lactobacillus* sp., pueden desarrollarse en condiciones atmosféricas normales.

La evaluación microbiológica del riesgo o susceptibilidad a caries dental es diferente a otras enfermedades infecciosas. Al ser un proceso multifactorial, la presencia de un gran número de bacterias cariogénicas no implica necesariamente el desarrollo de lesiones, debido a que otros factores pueden compensar el ataque bacteriano como el uso de fluoruros o la correcta higiene oral.

Cuantificación de *Streptococcus mutans* de la saliva en un medio de cultivo.

Las evaluaciones cuantitativas de *Streptococcus mutans* en la saliva y en la placa dentobacteriana se realizan en el laboratorio sobre placas de Agar con un medio selectivo. Se utilizará muestra de saliva y una parte de la saliva recolectada se colocará en la superficie del Agar *mitis salivarius* bacitracina para *Streptococcus mutans* y otra de Agar Rogosa para *Lactobacillus* sp. Después de 24 horas de incubación anaerobia, se comparan con una muestra ilustrada para distinguir aproximadamente la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

Las bacterias tienen una apariencia morfológica distintiva y es posible diferenciarlas de diversas cepas. Se han sugerido variaciones para su adaptación y fácil empleo en el consultorio dental. Si bien estos valores no son absolutos, brindan una guía para el tratamiento de una infección producida por *Streptococcus mutans*. Existen procedimientos que puede realizar el odontólogo para detectar y modificar la magnitud de una infección por estos microorganismos.



1. Imagen microscópica de *Streptococcus mutans* (color rosa)*.

Cuantificación de *Lactobacillus* sp. de la saliva en un medio de cultivo.

Una prueba, introducida por Hadley por primera vez en 1933, calcula el número de bacterias acidogénicas y acidúricas que se encuentran en la saliva de un paciente al encontrar el número de colonias que aparecen en las placas de Agar de peptona de tomate (pH 5.0) después de una inoculación con una muestra de saliva. El agar LB y Agar Rogosa son los medios selectivos para observar y cuantificar *Lactobacillus* sp. en saliva.

La cuenta de *Lactobacillus* sp. en la placa es una de las pruebas de actividad de la caries dental más antiguas. Su correlación con la actividad clínica de la caries dental se ha demostrado a través de numerosas investigaciones, sobre todo en los estudios comparativos entre pacientes con actividad cariogénica y pacientes sin actividad cariogénica.



2. Imagen microscópica de *Lactobacillus* sp (color morado)*.

pH Salival

Ver Video relacionado

https://phet.colorado.edu/sims/html/acid-base-solutions/latest/acid-base-solutions_es.html

https://phet.colorado.edu/sims/html/ph-scale/latest/ph-scale_es.html

III. DESARROLLO DE LA PRÁCTICA.

Material y equipo

- Un equipo para toma de fotografías (cámara fotográfica o celular)
- Mechero de Bunsen
- Dos Cajas de Petri conteniendo los Medios de Cultivo uno con Agar *mitis salivarius bacitracina* y otra con Agar Rogosa
- Tubo o vaso chico desechable
- Micropipetas desechables
- Cubo de parafina para masticar
- Tiras reactivas para medición de pH marca comercial
- Bolígrafo indeleble

Procedimiento

Nota: Indicación para el paciente.

*Se nombrará a un estudiante como PACIENTE; previo a la práctica (**por lo menos 1 hora antes**) no debe haber realizado cepillado dental, ni enjuagues o colutorios, no haber ingerido alimentos, ni dulces, chicles etc., sólo si es necesario podrá tomar agua natural.

1. Estimular el flujo salival del paciente masticando por 3 minutos la pastilla o cubo de parafina o cera.
2. Recolectar del paciente 2 mL de saliva estimulada en un recipiente desechable.
3. Encender el mechero de Bunsen.
4. Con la micropipeta tomará 1ml de saliva estimulada cuidando no tomar la espuma de la misma y lo colocará en la caja de Petri que contenga el medio de cultivo selectivos en el Agar para *Streptococcus mutans* y tapar y colocar 1mL de saliva en el Agar selectivo de *Lactobacillus* sp., tapar las dos cajas
5. Etiquetar el medio de cultivo utilizando un bolígrafo indeleble para anotar la fecha, grupo y nombre del paciente en la caja de Petri y colocar el medio en la jarra Gaspak para ser llevada a una atmósfera anaerobia a la incubadora.
6. Los cultivos serán llevados a incubación anaerobia a 37 °C por 24 horas.

7. Tomar una tira reactiva del extremo donde no se encuentre el reactivo para medición del pH con saliva estimulada, y coloque con un gotero estéril una gota de saliva que abarque la zona del reactivo del pH, espere 3 minutos y observe el cambio de color, ahora comparará el color que adquirió, con el colorímetro que se encuentra en la caja de las tiras y escriba en la tabla de resultados el número de pH que presentó.
8. Realizar la revisión de los medios a las 24 horas.

IV. OBSERVACIONES AL FINALIZAR LA PRÁCTICA

Realizar el recuento de UFC

Recuento de *Streptococcus mutans* _____UFC.

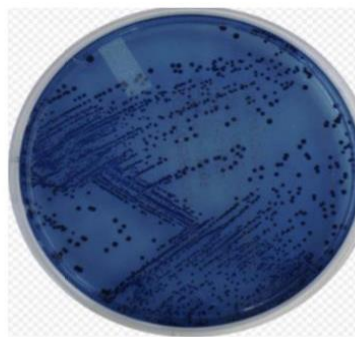
Recuento de *Lactobacillus* sp. _____UFC.

Tomar una fotografía de la muestra de los cultivos, observar y comparar las muestras del paciente, con las imágenes de referencia observando las Unidades formadoras de colonias (UFC) de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus* sp., y si presentan una cuantificación superior a 10^5 UFC/mL de saliva.

Imágenes para comparar con los medios de cultivo a las 24 horas



Alta actividad cariogénica *Lactobacillus* sp**
> 10^5 .



Alta actividad cariogénica *Streptococcus* del grupo
*mutans***
> 10^6

Deberán indicar:

¿Cuál es el riesgo de caries dental?. Recordando que la caries dental es un proceso multifactorial y que este resultado sólo nos determina un factor.

Los resultado de la medición del pH salival será con referencia al colorímetro que se tiene en el frasco de tiras reactivas.

Completar la tabla con la información solicitada

Característica Macroscópicas	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Lactobacillus</i> sp.
Forma		
Tamaño (mm)		
Elevación		
Aspecto: (Opaco o Brillante)		
Nombre del medio de cultivo		



VI. REPORTE DE LA PRÁCTICA

El reporte de práctica de laboratorio es un documento que describe de manera concisa el procedimiento que realizaron, el desarrollo y los resultados de esta.

Título

Autores (nombre de estudiantes),

Antecedentes o marco teórico.

Texto Arial 12 con referencias en cada párrafo

Desarrollo de la práctica

Equipo, material, reactivos.

Procedimiento

Resultados

Reportar sus resultados de siembra de las cepas en cada medio de cultivo. Describir la morfología de cada medio de cultivo.

Verificar el tipo de microorganismos que corresponden a la muestra problema.

Discusión

Conclusiones

Referencias

Formato Vancouver

Referencias

Mateos Moreno MV. Protocolo-SESPO. Actuacion-en-niños-de-alto-riesgo-de- caries.pdf. Disponible en: <http://sespo.es/wp-content/uploads/2013/03/Protocolo- SESPO.- Actuacion-e n-nin%CC%83os-de-alto-riesgo-de-caries.pdf>

Linossier Alfredo C, Valenzuela Carlos Y, Soler Eduardo R, Contreras Estela M. Colonización de la cavidad oral por *Streptococcus* grupo *mutans*, según edad, evaluado en saliva por un método semi-cuantitativo. Rev. chil. infectol. 2011 Jun [citado 2016 Ago 17] ; 28(3): 230-237. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S071610182011000300006>.

Caridad C., El pH, Flujo Salival y Capacidad Buffer en Relación a la Formación de la Placa Dental.ODOUS CIENTIFICA , [artículo en Internet] Vol. IX No.1, Enero- Junio 2008; Disponible en: <http://servicio.bc.uc.edu.ve/odontologia/revista/v9n1/art3.pdf>

Chamorro-Jiménez A L, Ospina-Cataño A, Arango-Rincón J C, Martínez-Delgado C M; Effect of secretory IgA on the adherence of *Streptococcus mutans* on human teeth, CES odontol. vol.26 no.2 Medellín July/Dec. 2013; Disponible en: <http://revistas.ces.edu.co/index.php/odontologia/article/view/2807>

[Video] PhETInteractive Simulations, University of Colorado Boulder. pH. https://phet.colorado.edu/sims/html/acid-base-solutions/latest/acid-base-solutions_es.html
https://phet.colorado.edu/sims/html/ph-scale/latest/ph-scale_es.html

Referencias en línea de las imágenes

https://www.google.com.mx/search?q=imagenes+de+medios+de+cultivo+de+Streptococcus+mutans&rlz=1C9BKJA_enMX623MX623&hl=esMX&prmd=ivn&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjvpN2mtdjVAhUHySYKHZJFBHIQ_AUICSgB&biw=1024&bih=653#imgsrc=JYEE3azQmZgVFM

http://milkgenomics.org/wp-content/uploads/2015/08/bigstock.Lactobacillus.bacteria.931299_65.000-300x192.jpg

PRÁCTICA 4.1

Cultivo de microorganismos de la biopelícula supra y subgingival.

Eje temático 4	Interacciones biológicas en el desarrollo de las enfermedades periodontales.
Elemento de competencia del eje:	Reconocer las características ecológicas de los tejidos periodontales y las características estructurales, morfológicas y funcionales de las bacterias que interactúan con estos tejidos
Propósito de la práctica:	Obtener muestras de biopelícula dental supra y subgingival identificando claramente la ubicación anatómica de cada sitio muestreado. Realizar cultivos microbiológicos en condiciones de incubación aerobias y anaerobias de las muestras obtenidas. Reconocer las diferencias morfológicas y cuantitativas de los microorganismos recuperados en cada uno de los sitios muestreados dependiendo de las condiciones de incubación.

Elaboró: Dra. Argelia Almaguer Flores
Dr. Victor Irahuen García Pérez

I. INSTRUCCIONES DE LA PRÁCTICA.

- **Previo a la realización de la práctica**

- ◆ Ingresar en la liga: [LINEAMIENTOS INTERNOS DEL LABORATORIO DEL MÓDULO DE ECOLOGÍA ORAL.pdf](#), y leer el documento.
- ◆ Lectura previa de la práctica
- ◆ Contestar cuestionario

- **Durante la práctica**

- ◆ Colocarse el equipo de protección personal (EPP), que consta de bata blanca (bien cerrada), gorro, y protectores oculares.
- ◆ Colocar sus objetos personales en los estantes.
- ◆ Limpiar, desinfectar la mesa de trabajo y lavarse las manos.
- ◆ Solicitar y revisar el material al personal del laboratorio.
- ◆ Realizar el método de la práctica siguiendo las indicaciones

- **Finalizar la práctica**

- ◆ Realizar la observación de los resultados
- ◆ Entregar el reporte de la práctica

II. INTRODUCCIÓN.

La complejidad de la composición de las biopelículas que pueden formarse en la cavidad oral, es debida en parte a la gran diversidad de microorganismos capaces de colonizarla. Hoy en día sabemos que el microbioma oral humano, comprende un poco más de 700 especies bacterianas, de las cuales 200 de ellas representan la población dominante.

La base de datos expandida del Microbioma Oral Humano, llamada eHOMD (por sus siglas en inglés; expanded Human Oral Microbiome Database), fue abierta al público en el 2010. El objetivo de esta base de datos es proveer toda la información, fenotípica, filogenética, clínica y bibliográfica disponible de las más de 700 especies procaróticas que se han identificado colonizando la cavidad oral. Hasta inicios del año 2023, se han descrito 774 especies bacterianas orales, de las cuales el 58% tiene asignado un nombre oficial y son cultivables, el 16% de ellas no tiene nombre oficial aún, pero ya han podido ser cultivadas y el 26% son conocidas sólo como filotipos no-cultivables (www.homd.org).

La importancia de la presencia de las biopelículas en el ecosistema oral reside su papel para mantener el equilibrio de la salud oral (homeostásis). Ya que la presencia de enfermedades como la gingivitis y la periodontitis, son la manifestación patológica de la respuesta del hospedero en contra del reto microbiano de las biopelículas que colonizan la superficie dental y el espacio subgingival (o disbiosis).

Una de las biopelículas más importantes y complejas presentes en la cavidad oral es la placa dentobacteriana. La formación y la composición de esta biopelícula es altamente orquestada, y es bien sabido que las asociaciones de las bacterias que componen esta biopelícula dental no son hechas al azar.

La superficie dental provee un sustrato estable para la colonización bacteriana en la cavidad bucal. En contraste, las agregaciones bacterianas presentes en la mucosa masticatoria, mucosa de carrillos, piso de la boca y paladar duro son en general limitadas, debido al recambio y descamación de las células epiteliales que los conforman.

A la fecha, se reconoce que las infecciones periodontales son de origen endógeno y que ciertas especies bacterianas consideradas patógenos periodontales se encuentran también colonizando la biopelícula dental de sujetos sanos. Sin embargo, el grado de patogenicidad de la placa dentobacteriana se ve influenciado por el medio ambiente local, factores de virulencia de ciertos microorganismos y la cantidad e identidad de las bacterias presentes; se estima que en un surco subgingival sano las cuentas bacterianas son de 10^3 mientras que un surco enfermo puede tener cuentas mayores o iguales a 10^8 .

La secuencia de colonización y formación de una biopelícula dental es un proceso orquestado y altamente ordenado. El primer evento para que comience la formación de una biopelícula es la adhesión bacteriana. Las bacterias poseen mecanismos específicos para adherirse a los tejidos o superficies. Muchas bacterias poseen componentes proteínicos en su superficie llamados “adhesinas”, los cuales se unen de manera específica a moléculas complementarias o “receptores” que se encuentran en la superficie de los tejidos.

Pocos minutos después de realizar una limpieza dental profesional, los primeros colonizadores, cocos y bacilos Gram positivos principalmente de los géneros *Streptococcus* y *Actinomyces*, se adhieren a la superficie dental por medio de moléculas específicas de adhesión bacteriana, las cuales interactúan con moléculas adheridas a la superficie dental derivadas de componentes salivales y del fluido crevicular. Estos primeros colonizadores juegan un papel muy importante en la formación de la biopelícula dental, ya que tienen receptores específicos para las diferentes especies bacterianas que posteriormente se coagregarán a la estructura inicialmente formada. Los segundos colonizadores, también llamados colonizadores puente o secundarios, poseen mecanismos de adhesión tanto con los primeros colonizadores como con las especies que se coagregarán de forma tardía a la biopelícula dental. Este grupo de microorganismos está formado principalmente por especies pertenecientes a los géneros *Campylobacter*, *Capnocytophaga*, *Veillonella*, *Fusobacterium* y *Prevotella* entre otros. Finalmente, si la secuencia de colonización de la biopelícula dental no se ve interrumpida, un tercer grupo de microorganismos principalmente especies anaeróbicas Gram negativas como especies de los géneros *Treponema* y *Porphyromonas*, se unen a la biopelícula dental.

La representación de las asociaciones entre especies bacterianas que forman la biopelícula dental subgingival fue descrita por Socransky y cols. Los complejos amarillo, morado, verde y azul son especies consideradas primordialmente como “colonizadoras primarias”. El complejo naranja está compuesto principalmente por “colonizadores puente” y el complejo rojo por “colonizadores tardíos”.

Las bacterias que conforman cada complejo se encuentran fuertemente asociadas entre sí. Como se puede observar en la figura de los complejos bacterianos, los complejos amarillo, verde y morado se encuentran más fuertemente asociados entre sí y éstos a su vez asociados al complejo naranja pero no con los miembros del complejo rojo. A su vez, los complejos también ejemplifican la secuencia de colonización, de tal manera que los miembros de los complejos amarillo y morado forman parte de los colonizadores primarios, los miembros del complejo naranja, junto con los miembros del complejo verde son colonizadores puente y finalmente los miembros del complejo rojo son colonizadores tardíos.

Bibliografía.

1. Gibbons RJ. Role of adhesion in microbial colonization of host tissues: a contribution of oral microbiology. *J Dent Res.* 1996;75(3):866-70.
2. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 2010;192(19):5002-17.
3. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Jr., Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol 2000.* 2006;42:47-79.
4. Listgarten M. Formation of dental plaque and other oral biofilms. In: Newman HN & Wilson M, ed Dental Plaque Revisited: Oral Biofilms in Health and Disease Eastman Dental Institute, University College London. 1999:187-210.
5. Socransky, S. S., A. D. Haffajee, M. A. Cugini, C. Smith and R. L. Kent, Jr. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25(2): 134-144.
6. Socransky, S. S. and A. D. Haffajee (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000* 38: 135-187.
7. Xie H, Cook GS, Costerton JW, Bruce G, Rose TM, Lamont RJ. Intergeneric communication in dental plaque biofilms. *J Bacteriol.* 2000;182(24):7067-9.

III. DESARROLLO DE LA PRÁCTICA.

Material y equipo .

Clínico

- Dos curetas Gracey 11/12 estériles (ver **figuras 1 y 2**).
- Dos campos desechables.
- Rollos de algodón.
- Abatelenguas
- Gasas.
- Guantes y cubrebocas para el encargado de tomar las muestras.

Laboratorio

- Dos juegos con dos tubos para microcentrífuga de 1.8 mL con 1 mL c/u de medio TSB (Caldo con soya tripticasa). Un juego de tubos será para biopelícula dental supragingival y otro juego de tubos para la subgingival. El juego de tubos para las muestras supragingivales estará marcado con A y A-1. El juego de tubos para las muestras subgingivales estará marcado con B y B-1.
- Dos cajas de Petri con cuatro divisiones con medio de cultivo TSA enriquecido (Agar con soya tripticasa, enriquecido con sangre, Vitamina K y Hemina), en cada división. Marcar cada caja como se muestra en la **figura 3**. Una caja será incubada bajo condiciones aeróbicas y otra caja bajo condiciones anaeróbicas.
- Mechero de bunsen.
- Asa bacteriológica.
- Jarra de anaerobiosis.
- Incubadora para bacterias aerobias.
- Micropipetas y puntas para micropipeta estériles.

Procedimiento.

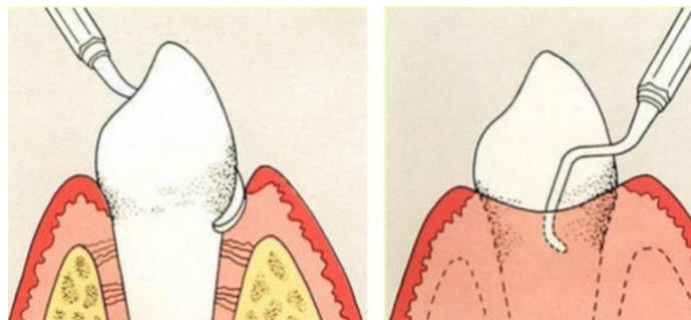
1. Elegir un alumno por equipo al cual se le tomarán las muestras (sujeto de estudio). El sujeto de estudio deberá contar con los siguientes criterios de selección:
 - No haber tomado antibiótico en los últimos 3 meses.
 - No haber recibido tratamiento periodontal.
 - No tener cálculo dental en la zona de muestreo.
2. Tener la mesa del laboratorio limpia y con todo el material que se va a utilizar preparado, acomodado y con el instrumental estéril.
3. Sentar al sujeto de estudio cerca del campo de trabajo.
4. Para la toma y procesamiento de las muestras de biopelícula dental supra y subgingival (ver **figura 2**):
 - i. Hacer aislamiento relativo (con rollos de algodón) de la zona de los primeros o segundos molares inferiores. Seleccionar el molar que será muestreado y tomar con una de las puntas de la cureta una muestra de biopelícula dental supragingival de la zona mesiovestibular (MV) del molar seleccionado. La toma de muestra deberá realizarse raspando suavemente la superficie del esmalte, teniendo cuidado de no introducir la punta de la cureta dentro del margen gingival.

- ii. Colocar la punta de la cureta con la muestra tomada al tubo con TSB marcado con A (muestra de biopelícula dental supragingival). La cureta debe de tocar perfectamente el medio de cultivo y la muestra debe de ser depositada en el medio del tubo, golpeando ligeramente las paredes del tubo con la cureta.
- iii. A continuación, se deberá tomar la segunda cureta estéril y de la misma zona donde se tomó la muestra de biopelícula dental supragingival, se deberá tomar una muestra de biopelícula dental subgingival. La muestra se tomará raspando suavemente la superficie del diente en la zona del surco subgingival, y teniendo cuidado de no volver al tocar la corona del diente muestreado. NOTA: este procedimiento no debe causar sangrado ni dolor al paciente.
- iv. Colocar la muestra tomada al tubo con TSB para la muestra de biopelícula dental subgingival marcado con B (muestra de biopelícula dental subgingival). La cureta debe de tocar perfectamente el medio de cultivo y la muestra debe de ser depositada en el medio del tubo, golpeando ligeramente las paredes del tubo con la cureta.
- v. Una vez colocadas las muestra en los tubos A y B, éstos deberán ser dispersados por medio de vórtex o agitación manual vigorosa.
- vi. Posteriormente se realizará una dilución serial del tubo A de la siguiente manera (ver **figura 3**):
 - Tomar 100 μ L del tubo A (muestra supragingival) y transferirlo al tubo marcado con A-1.
 - Dispersar la muestra del tubo A-1 por medio de vórtex o agitación manual vigorosa.
- vii. Ya que los dos tubos (A y A-1) tengan la muestra dispersada, se deberán tomar 100 μ L del tubo A-1 y colocarlos en la caja de Petri marcada como “Aerobia” en la división marcada como A-1 y luego tomar otros 100 μ L de ese mismo tubo y colocarlos en la caja de Petri marcada como “Anaerobia” en la división marcada como A-1. Posteriormente tomar 100 μ L del tubo A y colocarlos en la caja de Petri marcada como “Aerobia” en la división marcada como A y luego tomar otros 100 μ L de ese mismo tubo y colocarlos en la caja de Petri marcada como “Anaerobia” en la división marcada como A.
- viii. Hacer el mismo procedimiento con las muestras de los tubos B y B-1 (muestra subgingival) (ver numerales 4.6 y 4.7). Es decir, al final se tendrán dos cajas de Petri de cuatro divisiones con medio TSA, una caja para incubación aerobia y una caja para incubación anaerobia con las muestras A y B y su respectiva dilución A-1 y B-1.

- ix. Una vez colocadas las diluciones de las muestras en cada una de las cajas de Petri, se deberá dispersar cada muestra de forma manual, cuidando de que todo el líquido de la muestra quede bien disperso en todo el agar de la caja de cultivo y no se salga de las divisiones.
5. Incubación de las placas de petri: Incubar las placas anaerobias en las jarras de anaerobiosis a 37°C durante 7 días y las aerobias en la incubadora a 37°C durante 5 días



Figura 1. Imagen de la cureta Gracey 11/12 que será utilizada para las muestras de biopelícula dental supra y subgingival.



Supragingival

Subgingival

Figura 2. Imagen representativa de la colocación de la cureta Gracey 11/12 para la toma de muestras de biopelícula dental supra y subgingival.

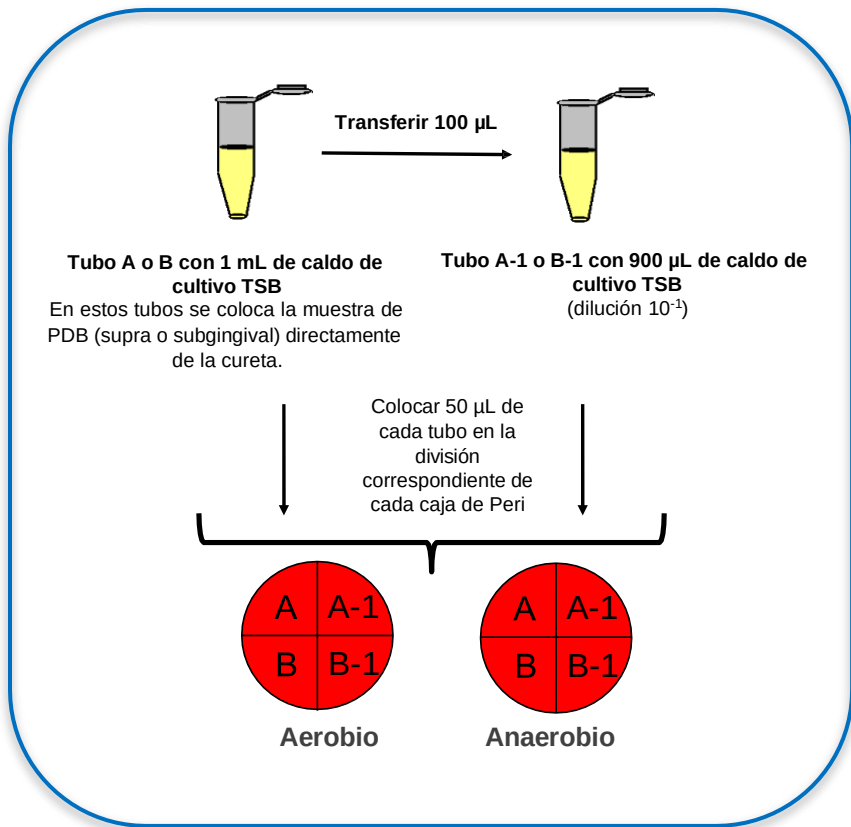


Figura 3. Secuencia para diluir y sembrar las muestras de biopelícula dental supra y subgingival.

IV. OBSERVACIONES AL FINALIZAR LA PRÁCTICA

Realizar la observación de las características macroscópicas de las colonias formadas en las cajas de cultivo, tomar fotografías



V. REPORTE DE LA PRÁCTICA

El reporte de práctica de laboratorio es un documento que describe de manera concisa el procedimiento que realizaron, el desarrollo y los resultados de esta.

Título

Autores (nombre de estudiantes),

Antecedentes o marco teórico.

Texto Arial 12 con referencias en cada párrafo

Desarrollo de la práctica

Equipo, material, reactivos.

Procedimiento

Resultados

Reportar sus resultados de siembra de las cepas en cada medio de cultivo. Describir la morfología de cada medio de cultivo.

Verificar el tipo de microorganismos que corresponden a la muestra problema.

Discusión

Conclusiones

Referencias

Formato Vancouver

PRÁCTICA 4.2 Acción de compuestos químicos con actividad antimicrobiana usados en Odontología	
Eje temático 4	Interacciones biológicas en el desarrollo de las enfermedades periodontales.
Elemento de competencia del eje:	Reconocer las características ecológicas de los tejidos periodontales y las características estructurales, morfológicas y funcionales de las bacterias que interactúan con estos tejidos
Propósito de la práctica:	Identificar el efecto antimicrobiano, mediante el uso de un antibiograma, de diversos compuestos químicos presentes en colutorios comerciales sobre el crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> .

Elaboró: Dra Miryam Martínez Hernández.
Dr. Miguel Pérez Garzón

I. INSTRUCCIONES DE LA PRÁCTICA.

- **Previo a la realización de la práctica**

- ◆ Ingresar en la liga: [LINEAMIENTOS INTERNOS DEL LABORATORIO DEL MÓDULO DE ECOLOGÍA ORAL.pdf](#), y leer el documento.
- ◆ Lectura previa de la práctica
- ◆ Contestar cuestionario

- **Durante la práctica**

- ◆ Colocarse el equipo de protección personal (EPP), que consta de bata blanca (bien cerrada), gorro, y protectores oculares.
- ◆ Colocar sus objetos personales en los estantes.
- ◆ Limpiar, desinfectar la mesa de trabajo y lavarse las manos.
- ◆ Solicitar y revisar el material al personal del laboratorio.
- ◆ Realizar el método de la práctica siguiendo las indicaciones

- **Finalizar la práctica**

- ◆ Realizar la observación de los resultados
- ◆ Entregar el reporte de la práctica

II. INTRODUCCIÓN

Durante décadas el control de la acumulación de la biopelícula sobre las superficies dentales ha sido la piedra angular de la prevención de enfermedades orales como la caries y la periodontitis. La limpieza mecánica dental a través del cepillado con pasta dental sigue siendo considerada la estrategia de higiene oral más común y potencialmente más efectiva practicada por personas para el control de dichas patologías orales. Sin embargo, a pesar de las innovaciones tecnológicas, el nivel de práctica de higiene oral mecánica sigue siendo inadecuada, los esfuerzos de los pacientes, frecuentemente se ven comprometidos por la presencia, en la cavidad oral, de áreas de difícil alcance al control mecánico, así como de falta de destreza, pobre motivación y falta de compromiso por parte de los pacientes. Por lo tanto, el uso de enjuagues orales antimicrobianos, adjunto a los regímenes de higiene oral mecánica, puede ser considerado un auxiliar importante en la prevención de la acumulación de la biopelícula dental y la gingivitis (1-3).

El control químico de la biopelícula dental supragingival está dado por diversos productos que principalmente son usados como colutorios. Dentro de estas sustancias podemos encontrar compuestos de amonio cuaternario, fenoles y aceites esenciales, productos naturales (sanguinaria) y biguanidas (4). A continuación, se describen algunos de estos compuestos.

- La **clorhexidina** es una biguanida catiónica que posee una alta sustantividad y actividad antibacteriana. La sustantividad se define como la habilidad de un agente de unirse a las superficies bucales y de liberarse a través del tiempo, en dosis adecuadas. La clorhexidina actúa gracias a su carga positiva, que le facilita la adherencia a estructuras que tienen carga negativa. Los tejidos de la boca y bacterias tienen carga negativa, por lo que la clorhexidina se une a ellos con facilidad. El mecanismo de acción de la clorhexidina es la reducción de la formación de la película, alteración de la adhesión de bacterias y de la pared celular bacteriana causando lisis. Se recomienda realizar 2 enjuagues diarios con 10 mL de una solución acuosa de digluconato de clorhexidina al 0.2% para lograr una reducción en el índice de placa del 45% al 61%. El uso de la clorhexidina produce efectos secundarios locales, reversibles, tales como manchas pardas en los dientes, la lengua y restauraciones con resinas, así como alteraciones pasajeras de la percepción gustativa, por lo cual se recomienda no ingerir alimentos ricos en cromógenos (café, té o vino que tienen carga negativa) para evitar las pigmentaciones (5).

- Los **aceites esenciales** pueden reducir la biopelícula dental en un 27%. El producto comercial característico de este grupo es Listerine®. Este colutorio tiene una fórmula fija de timol al 0.064% y eucaliptol al 0.092%, mezclados con mentol al 0.042% y salicilato de metilo al 0.060%, en un vehículo de alcohol al 22%. Su mecanismo de acción se relaciona con la ruptura de la pared celular e inhibición de algunas enzimas bacterianas. Los principales efectos adversos asociados a su uso son la sensación de quemadura y gusto amargo. Se recomienda su utilización dos veces al día posterior al cepillado en una medida de 10 mL (6).
- Los **fluoruros** son principalmente utilizados para reducir la prevalencia de caries y para aumentar la remineralización del esmalte, su efecto antibacteriano y cariostático ha sido comprobado previamente. Los fluoruros actúan principalmente a través de la formación de cristales de fluorapatita, los cuales tienen una mayor resistencia a los ácidos orgánicos que la hidroxiapatita del esmalte dental. A lo largo de los años se han utilizado diversos compuestos de fluoruro en odontología, como el fluoruro estañoso (SnF_2), fluoruro de sodio (NaF), monofluorofosfato de sodio (SMFP) y el fluoruro de amina (AmF), principalmente.

Existen diversas formas disponibles para la aplicación tópica de fluoruros, como pastas dentales, geles, barnices y enjuagues orales. Los fluoruros presentes en pastas dentales están formulados para mantener una concentración constante de fluoruro en la cavidad oral de $\sim 0.02\text{ppm}$. Las concentraciones de fluoruro generalmente aceptadas en pasta dentales son de 1000-1500ppm, mientras que, en enjuagues orales, la concentración aceptada es de 100-500 ppm. El uso de enjuagues bucales con flúor es aconsejable en individuos con alto riesgo de caries, tales como pacientes con hiposalivación y pacientes con tratamiento de ortodoncia. Finalmente, es importante considerar que el uso de enjuagues bucales con altas concentraciones de flúor puede producir fluorosis dental, por lo que su uso en niños menores de 6-7 años y en mujeres embarazadas o lactando debe ser evitado.

- El **triclosán** es un compuesto aromático clorado no iónico que tiene grupos funcionales representativos de éteres y fenoles. Este compuesto tiene un amplio espectro de eficacia contra bacterias Gram positivas y negativas. Su mecanismo de acción es a nivel de la membrana citoplasmática microbiana, induciendo un aumento en la permeabilidad celular. Es bactericida en concentraciones tan bajas como 0.3 mg/mL (7, 8). El triclosán tiene efectos antiinflamatorios que son independientes de sus propiedades antibacterianas.

El uso de triclosán está regulado por la FDA (Food and Drug Administration). Es importante considerar que, aunque la presencia de triclosán sigue siendo común en antisépticos orales, se ha encontrado que la exposición a dicho compuesto puede estar asociada con niveles de hormona tiroidea alterados en los seres humanos (NHANES 2007- 2008). Por lo que, aunque no hay suficiente evidencia para confirmar y determinar la potencial importancia para la salud pública y clínica de estos hallazgos, la FDA en 2016 prohibió la utilización del triclosán para la fabricación de jabones antibacteriales líquidos y en barra.

- Los **compuestos de amonio cuaternario** son agentes tensoactivos y detergentes catiónicos, derivados del ion amonio tetravalente NH_4 . Son muy activos como bactericidas ante bacterias Gram positivas y negativas. Es importante considerar que el material orgánico neutraliza su acción. Entre ellos se encuentran el cloruro de benzalconio y el cloruro de cetilpiridinio (6).
- El **peróxido de hidrógeno** (H_2O_2) es un antiséptico cuyo mecanismo de acción se debe a sus efectos oxidantes generando OH y radicales libres que atacan una amplia variedad de compuestos orgánicos, entre ellos lípidos y proteínas que componen las membranas celulares de los microorganismos. La enzima catalasa presente en los tejidos degrada rápidamente el peróxido de hidrógeno, produciendo oxígeno y agua lo que dificulta el crecimiento microbiológico. El peróxido de hidrógeno libera oxígeno. El oxígeno al ser un elemento químico de la familia 6 tiene una valencia 6 en su último orbital, así para estar estable tiende a ir hacia la regla del octeto, busca otros dos electrones. Por lo general el oxígeno reacciona robando electrones de otros átomos (agente oxidante) así el oxígeno se reduce y el otro átomo se oxida. Al ganar y perder electrones los átomos cambian su carga eléctrica alterando el comportamiento y función de la molécula, destruyendo las funciones metabólicas de las bacterias. El peróxido de hidrógeno se utiliza también como agente blanqueador. El cambio de color en los dientes se da al acumularse moléculas grandes de diversos orígenes desde hemoglobina, comida etc. Estas moléculas grandes cambian la interacción de luz en el diente, usualmente haciéndolo más opaco y oscuro. El oxígeno rompe las moléculas grandes en estructuras más pequeñas así disminuyendo la absorción de luz y aclarando al diente.
- La **arginina** es un aminoácido que ha sido identificado como un ingrediente que brinda un alivio contra la hipersensibilidad dentinaria. Ha sido demostrado que en concentraciones de 8% y en conjunto con el carbonato de calcio, crean un conglomerado de carga positiva, favoreciendo su unión a la dentina (carga negativa), sellando, penetrando y bloqueando físicamente los túbulos dentinarios abiertos disminuyendo la hipersensibilidad dentinaria.

Antes de que los profesionales de la salud prescriban o recomienden un agente químico para el control de la biopelícula dental, deberán tomar en cuenta la efectividad clínica comprobada del producto seleccionado, con base en resultados de meta-análisis publicados en términos de la magnitud del efecto, número y heterogeneidad de los estudios disponibles y consistencia de los resultados. Sólo los productos que han demostrado actividad clínica usando criterios de seguridad y eficacia aceptados deben ser recomendados a los pacientes de acuerdo con las necesidades clínicas específicas (9). Además, es importante tener en cuenta que el uso de enjuagues bucales con agentes antimicrobianos y antibiopelícula tienen sólo efecto limitado en individuos con enfermedad periodontal existente, debido a que dichos agentes no tienen efecto en la flora microbiana subgingival (10, 11). Por otro lado, los pacientes quienes mantienen un buen control mecánico de la biopelícula dental se beneficiarán más del uso de agentes químicos adicionales en oposición a los pacientes con pobre control mecánico, por lo tanto, la importancia de la instrucción y reforzamiento constante por parte del clínico en las técnicas de control mecánico es primordial para obtener el mayor beneficio derivado del uso de un colutorio antimicrobiano.

Para esta práctica, la evaluación del efecto antimicrobiano de los distintos compuestos presentes en colutorio comerciales se llevará a cabo mediante el método de antibiograma. El antibiograma es la prueba microbiológica que se realiza para determinar la susceptibilidad (sensibilidad o resistencia) de una bacteria a un grupo de antibióticos o antisépticos.

III. DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

Material y equipo.

- Cubrebocas y guantes.
- Jarra de anaerobiosis.
- 10 discos de papel filtro.
- Pinza de curación estéril.
- Cuatro productos comerciales para el control químico de la biopelícula por mesa (tres proporcionados por el laboratorio y uno traído por cada equipo).
- Plumón indeleble o un lápiz de cera.
- Cinta adhesiva.
- Encendedor.
- Asa bacteriológica.
- Mechero.
- Micropipeta de laboratorio.

Reactivos

- Una caja Petri con agar TSA suplementado con sangre.
- Suspensión bacteriana de *Streptococcus mutans* ajustada a concentración de 1×10^6 UFC/mL.
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL etiquetados con cada producto comercial.

Procedimiento.

1. Limpie correctamente la mesa de trabajo.
2. Organice sobre la mesa de trabajo los materiales y reactivos necesarios para la realización de la práctica.
3. Encienda los mecheros con precaución.
4. Sin abrir la caja de Petri, divida la base de la caja en 4 secciones simétricas con líneas trazadas con el plumón indeleble o con el lápiz de cera. Enumere cada sección del 0 al 4, como se observa en la siguiente imagen (**Figura 1**):

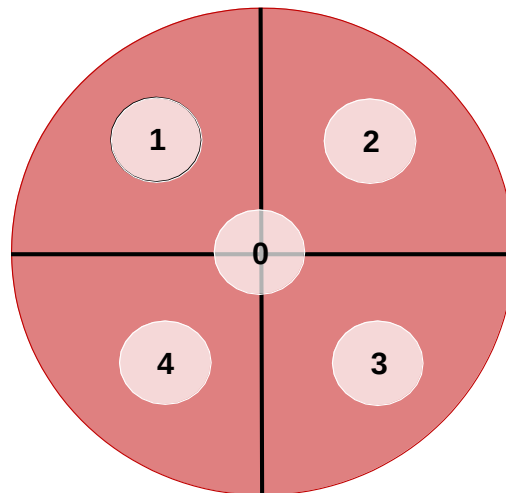


Figura 1. Plantilla para colocación de los discos de papel filtro sobre el agar.

5. Esterilice el asa bacteriológica en el mechero. Con cuidado, cerca del mechero, abra la caja Petri y enfríe el asa en el agar.
6. El profesor dispensará 100 μL del pre-inoculado de *S. mutans* 1×10^6 , a continuación, realiza el sembrado de la bacteria mediante estría masiva sobre el agar siguiendo las indicaciones de la imagen (**Figura 2**):

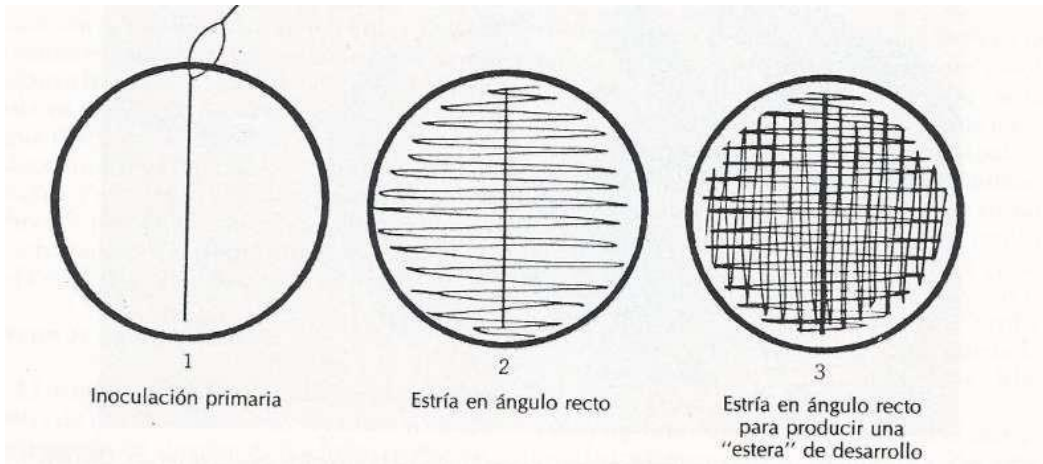


Figura 2. Sembrado en estría masiva.

7. Con cuidado abra el tubo Eppendorf de 1.5 mL marcado con número correspondiente a cada compuesto y con una pinza estéril, tome un disco de papel filtro, sumerja el papel filtro en compuesto a evaluar. Antes de sacar el disco de papel filtro, impregnado del compuesto a evaluar, presione el disco contra el lateral del tubo Eppendorf mientras aplica presión para eliminar el exceso de líquido antes de colocar sobre el agar.
8. Levantar la tapa de la placa y coloque el disco sobre una de las marcas de posicionamiento (**Figura 3**).

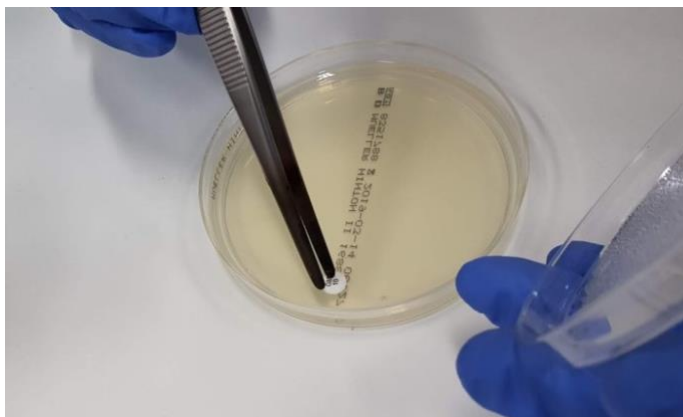


Figura 3. Sembrado en estría

9. Presionar el disco con las pinzas para asegurar un contacto completo con la superficie de agar.
10. Vuelva a colocar la tapa de la placa entre disco y disco para minimizar la exposición a contaminantes transportados por el aire.
11. Repetir los pasos 7-9 con el resto de los discos.
NOTA: Tener la precaución de cerrar la caja Petri cada vez que coloques cada disco.
12. Utilice como control negativo un disco sin producto.
13. Rotule la caja Petri (cinta adhesiva, plumón y letra legible) con los datos: equipo, grupo y fecha.
14. Coloque el cultivo en jarra de anaerobiosis por 48 horas.
15. Desinfecte la mesa y material de trabajo una vez terminada la práctica.

IV. OBSERVACIONES DE LA PRÁCTICA

- a. Tras las 48 horas de incubación, tome fotografías de la placa petri, y acontinuació, mida el tamaño de los halos de inhibición con una regla milimétrica; incluya el diámetro del disco en la medición (**Figura 4**).

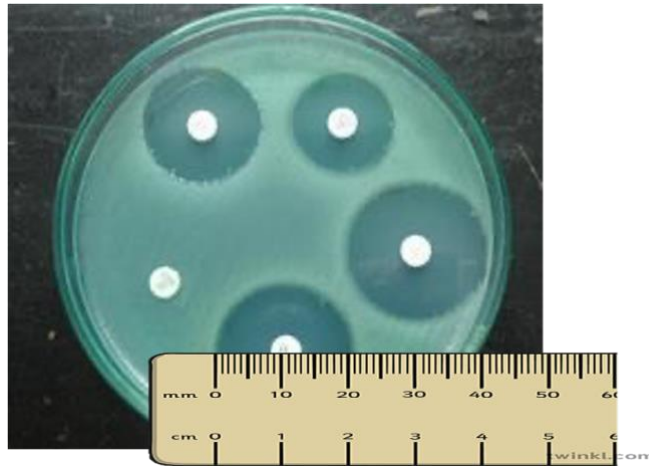


Figura 4. Medición de los halos de inhibición (*en este ejemplo, el halo de inhibición mide 20mm*).

- b. Al medir los diámetros de los halos de inhibición, redondear siempre al milímetro superior.
- c. Todas las mediciones se realizan mediante observación directa.
- d. Anote el tamaño del halo de inhibición en la columna G de la hoja de registro (**Tabla 1**).

Tabla 1. Hoja de registro.

Compuesto químico para el control de la biopelícula dental	Agente activo principal	Mecanismo de acción	Sustantividad	Indicaciones y frecuencia de uso	Efectos secundarios	Diámetro del halo de inhibición.
Control negativo (disco sin compuesto químico)						
Oral B gingivitis						
LISTERINE®						
Enjuague Bucal Oral-B Complete						
Producto traído por el equipo:						

- d. En la **Tabla 1** encontrarás 5 filas donde se han colocado varios productos comerciales, numerados del 0 al 4. el número cero será para el uso de control negativo (disco sin ningún producto). las filas 1 al 5 corresponden a diferentes productos comerciales para el control del crecimiento de la biopelícula dental. el número 5 será para el compuesto químico que haya traído cada mesa de trabajo para el control del crecimiento de la biopelícula dental.



V. REPORTE DE LA PRÁCTICA

El reporte de práctica de laboratorio es un documento que describe de manera concisa el procedimiento que realizaron, el desarrollo y los resultados de esta.

Título

Autores (nombre de estudiantes),

Antecedentes o marco teórico.

Texto Arial 12 con referencias en cada párrafo

Desarrollo de la práctica

Equipo, material, reactivos.

Procedimiento

Resultados

En el apartado de resultados del documento, complete y presente la **Tabla 1**; además, haga una lista ordenando los productos de mayor a menor de acuerdo con el grado de inhibición.

Discusión

En el apartado de discusión, reflexioné sobre las siguientes preguntas:

¿Qué producto antiséptico usaría preferentemente en sus pacientes?, y ¿por qué?

Conclusiones

Referencias

Formato Vancouver

REFERENCIAS

1. Zimmermann H, Zimmermann N, Hagenfeld D, Veile A, Kim TS, Becher H. Is frequency of tooth brushing a risk factor for periodontitis? A systematic review and meta-analysis. *Community dentistry and oral epidemiology*. 2014;43(2):116-27.
2. Gunsolley JC. A meta-analysis of six-month studies of antiplaque and antigingivitis agents. *J Am Dent Assoc*. 2006;137(12):1649-57.
3. Van Leeuwen MP, Slot DE, Van der Weijden GA. Essential oils compared to chlorhexidine with respect to plaque and parameters of gingival inflammation: a systematic review. *J Periodontol*. 2011;82(2):174-94.
4. Flores AA, Olea JGV. *Ecología oral: Manual Moderno*; 2017.
5. Hope CK, Wilson M. Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(5):1461-8.
6. Leszczynska A, Buczek P, Buczek W, Pietruska M. Periodontal pharmacotherapy - an updated review. *Adv Med Sci*. 2011;56(2):123-31.
7. Owens J, Addy M, Faulkner J. An 18-week home-use study comparing the oral hygiene and gingival health benefits of triclosan and fluoride toothpastes. *J Clin Periodontol*. 1997;24(9 Pt 1):626-31.
8. Binney A, Addy M, Owens J, Faulkner J. A comparison of triclosan and stannous fluoride toothpastes for inhibition of plaque regrowth. A crossover study designed to assess carry over. *J Clin Periodontol*. 1997;24(3):166-70.
9. Barnett ML. The role of therapeutic antimicrobial mouthrinses in clinical practice: control of supragingival plaque and gingivitis. *J Am Dent Assoc*. 2003;134(6):699-704.
10. Moran JM. Chemical plaque control--prevention for the masses. *Periodontol* 2000. 1997;15:109-17.
11. Moran JM. Home-use oral hygiene products: mouthrinses. *Periodontol* 2000. 2008;48:42- 53.