

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA



ESTUDIO DE LA SUSCEPTIBILIDAD Y PRODUCCION DE  
GLECOCALIX DE STREPTOCOCCUS MUTANS

ANGUSTIAS DE LA FIGUERA ROMERO  
Granada, 1994

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

**ESTUDIO DE LA SUSCEPTIBILIDAD Y PRODUCCION DE GLICOCALIX  
DE *STREPTOCOCCUS MUTANS***

ANGUSTIAS DE LA HIGUERA ROMERO

GRANADA 1.994

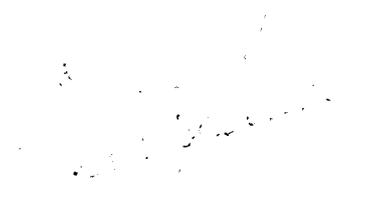
Editor: Universidad de Granada.Tesis Doctorales  
Autora: Angustias de la Higuera Romero  
ISBN: 978-84-9125-471-3  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/42057>

LOS PROFESORES D. JOSE LIEBANA UREÑA, CATEDRATICO DE MICROBIOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA, D<sup>a</sup> ANA MARIA CASTILLO PEREZ, PROFESORA TITULAR DE MICROBIOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA, Y D. JOSE GUTIERREZ FERNANDEZ, PROFESOR ASOCIADO DE MICROBIOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal que designe la Comisión del Doctorado, a propuesta del Consejo de Departamento, D<sup>a</sup> Angustias de la Higuera Romero, sobre el tema: **Estudio de la susceptibilidad y producción de glicocálix de *Streptococcus mutans***, ha sido realizada bajo nuestra dirección, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autora, en condiciones tan aventajadas, que la hacen acreedora del título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada a 1 de Septiembre de 1.994.

  
Fdo. José Liébana Ureña

  
Ana M<sup>a</sup> Castillo Pérez

José Gutiérrez Fernández

*A mis padres y hermanos*

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de esta tesis. en especial:

- A los Profs. JOSE LIEBANA UREÑA, ANA M<sup>a</sup> CASTILLO PEREZ y JOSE GUTIERREZ FERNANDEZ, directores de este trabajo, por sus inestimables consejos y por la ayuda que me han prestado en su realización.

- A los Profs. M<sup>a</sup> CARMEN MAROTO VELA y GONZALO PIEDROLA ANGULO, por su estímulo e inicio en la investigación y por el apoyo y la confianza que siempre me han demostrado.

- A todo el personal facultativo del Departamento, porque de todos ellos he aprendido Microbiología.

- A mis compañeros de Residencia, en especial a CAROLINA ROLDAN FONTANA y ANTONIO GARCIA MENDOZA, por su amistad y el interés que siempre han mostrado en mi trabajo.

- Al resto de personas que trabajan en el laboratorio, y con las que he podido contar en todo momento.

## INDICE

* INTRODUCCION Y OBJETIVOS .....	3
* CAPITULO PRIMERO. REVISION .....	6
1.1. Género <i>Streptococcus</i> . Estreptococos Grupo	
<i>mutans</i> .....	7
1.1.1. Caracteres generales .....	8
1.1.2. Clasificación e identificación .....	12
1.2. Endocarditis infecciosa. Endocarditis subaguda .....	48
1.2.1. Generalidades .....	49
1.2.2. Clasificación clínica .....	50
1.2.3. Endocarditis subaguda .....	52
1.3. Principales antibióticos en profilaxis y tratamiento de endocarditis	
subaguda .....	67
1.3.1. $\beta$ -lactámicos .....	68
1.3.2. Aminoglucósidos .....	75
1.3.3. Macrólidos y lincosamidas .....	77
1.3.4. Glicopéptidos .....	80
1.3.5. Estreptococos orales y antibióticos .....	82
* CAPITULO SEGUNDO. APORTACION PERSONAL .....	84
2.1. Material y métodos .....	85
2.1.1. Recogida de la muestra .....	86
2.1.2. Identificación de los microorganismos por métodos convencio- nales .....	88
2.1.3. Conservación de las cepas .....	93

2.1.4. Identificación de los microorganismos mediante un sistema automatizado .....	95
2.1.5. Diferenciación de biotipos mediante investigación de actividades enzimáticas .....	97
2.1.6. Detección de altos niveles de resistencia a aminoglucósidos .....	99
2.1.7. Estudio del fenómeno de tolerancia a penicilina .....	101
2.1.8. Determinación de la susceptibilidad a diversos antimicrobianos .....	104
2.1.9. Detección de la producción de glicocálix "in vitro" .....	106
2.1.10. Análisis estadístico .....	107
2.2. Resultados .....	108
2.2.1. Identificación mediante sistema AMS .....	109
2.2.2. Obtención de biotipos .....	117
2.2.3. Altos niveles de resistencia a aminoglucósidos .....	126
2.2.4. Tolerancia a penicilina .....	131
2.2.5. Susceptibilidad a antimicrobianos .....	140
2.2.6. Producción "in vitro" de glicocálix .....	151
2.2.7. Análisis estadístico .....	153
2.3. Discusion .....	154
* CAPITULO TERCERO.CONCLUSIONES .....	170
* CAPITULO CUARTO. BIBLIOGRAFIA .....	174

## INTRODUCCION Y OBJETIVOS

Dentro de la variada microbiota de la cavidad oral, *Streptococcus mutans* tiene una especial relevancia por su asociación con procesos tanto locales, tales como la caries dental, como sistémicos. Con relación a estos últimos, *S. mutans* es un importante patógeno productor de cuadros de endocarditis subaguda.

Su asentamiento a nivel valvular generalmente es consecuencia de la bacteriemia que acontece tras manipulaciones odontológicas. Esta bacteriemia en la mayoría de los casos es transitoria y no presenta repercusión clínica alguna, aunque en individuos con patología valvular de base, o intervenciones más cruentas, puede, en un alto porcentaje de casos, ser el origen de una endocarditis.

A este respecto, ante la necesidad de establecer pautas efectivas, tanto de profilaxis como de tratamiento de dicho proceso, se plantea la conveniencia de conocer el estado actual de *S. mutans* en relación con los antimicrobianos de uso común en la endocarditis bacteriana en cuya etiología esté implicado, así como el comportamiento del mismo frente a determinados fenómenos como la tolerancia a penicilina y la aparición de altos niveles de resistencia a aminoglucósidos.

Con relación a lo expuesto con anterioridad, en la realización del presente trabajo nos planteamos los siguientes **objetivos**:

- 1.- Evaluar la efectividad de un sistema automatizado en la identificación de *S. mutans*, así como establecer una clasificación en biotipos gracias a un estudio de actividades enzimáticas.

2.- Conocer el estado actual de la susceptibilidad de *S. mutans* a los antimicrobianos de uso habitual en profilaxis y tratamiento de endocarditis, y la posible aparición de cepas que presenten fenómeno de tolerancia a penicilina y/o altos niveles de resistencia a aminoglucósidos.

3.- Valorar la producción "in vitro" de glicocálix en *S. mutans* y su posible interferencia con los niveles de concentración mínima inhibitoria a los antimicrobianos ensayados.

Para ello hemos dividido nuestro trabajo en cuatro capítulos:

\* El **primer capítulo** consta de tres apartados, en el primero de los cuales se realiza una revisión del Género *Streptococcus*. El segundo apartado está dedicado a los aspectos generales de la endocarditis bacteriana, y el tercero recoge las principales características de los antimicrobianos empleados en nuestro estudio.

\* El **segundo capítulo** se ha reservado a la aportación personal y se divide, a su vez, en varios apartados. En el primero se recogen el material y métodos empleados en el trabajo, y el segundo se dedica a los resultados obtenidos del mismo. En el tercer apartado se realiza la discusión de dichos resultados.

\* En el **tercer capítulo** se reflejan las conclusiones obtenidas.

\* El **cuarto capítulo** lo constituye la bibliografía.

**CAPITULO PRIMERO: REVISION**

1.1. GENERO STREPTOCOCCUS. ESTREPTOCOCOS GRUPO *MUTANS*

### 1.1.1. CARACTERES GENERALES.

Los estreptococos son microorganismos inmóviles, grampositivos, de morfología esférica u ovoide de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de diámetro que se dividen en un solo plano observándose en parejas o formando cadenas, de longitud variable dependiendo del producto patológico y el medio de cultivo.

Crece de forma óptima a una temperatura cercana a los 37°C y su metabolismo es anaerobio facultativo. Cuando se desarrollan en presencia de aire su crecimiento se favorece por una atmósfera con un 5 a 10% de  $\text{CO}_2$ .

Son oxidasa negativos, carecen de catalasa y su tolerancia al oxígeno está determinada por poseer o no peroxidasa flavoproteínicas y pseudocatalasas.

Algunas especies son más exigentes en sus requerimientos nutricionales; son tiol-dependientes y necesitan la adición a los medios de cultivo de cisteína o piridoxal (Vitamina B<sub>6</sub>) como coenzima. Se denominan estreptococos nutricionalmente deficientes o B<sub>6</sub> dependientes<sup>1</sup>.

Estructuralmente, y dependiendo de las especies, pueden distinguirse además del núcleo, citoplasma y membrana citoplásmica, otros elementos de gran interés (Figura 1):



- Cápsula. Se comporta como un factor de virulencia en las cepas que la poseen, al dificultar la fagocitosis. Está constituida a expensas de ácido hialurónico o polisacáridos. Tiene carácter antigénico, como en el caso del *Streptococcus pneumoniae* cuya cápsula induce la formación de anticuerpos específicos que permiten el serotipado de esta especie.

- Fimbrias. Intervienen en la adhesión a tejidos del hospedador y en los fenómenos de coagregación y agregación bacteriana.

- Glicocálix. Puede estar constituido por glucanos y/o fructanos de gran importancia en la adhesión y formación de placas dentales.

- Pared celular. Es una cubierta rígida que confiere la forma peculiar a la bacteria, la protege de posibles cambios de presión osmótica, y es responsable de su coloración con la tinción de Gram.

Como en todas las bacterias grampositivas el principal componente es la mureína, mucopéptido o peptidoglicano. Además de éste, otros elementos pueden formar parte de la pared, entre ellos:

-- Ácidos teicoicos y lipoteicoicos, íntimamente ligados a la mureína. Los primeros constituyen la sustancia C presente en el *S. pneumoniae* y los ácidos lipoteicoicos intervienen principalmente en fenómenos de adherencia y colonización, dada su gran afinidad por las membranas biológicas, pudiendo además comportarse por sí mismos como antígenos grupo específicos (serogrupos D, H, N de Lancefield).

-- Carbohidratos parietales, como el **polisacárido C**, por cuyas diferencias de composición, junto a las de los ácidos lipoteicoicos, se ha podido realizar la clasificación de los estreptococos en diversos grupos (Grupos de Lancefield) que se denominan con letras latinas de la A a la W, exceptuando I, J, LL y Ñ. Su composición varía según los serogrupos; así por ejemplo, en el grupo A dicho carbohidrato está constituido por N-acetilglucosamina y ramnosa.

-- Proteínas parietales localizadas externamente a la cubierta anterior o bien intercaladas en ella o la mureína. Destacan la **proteína M** del estreptococo del grupo A, la proteína asociada a la M (PAM) y el factor de opacificación.

La proteína M constituye la base para la clasificación del estreptococo del grupo A en 80 serotipos, además de participar en la adhesividad a las células epiteliales, comportarse como superantígeno y determinar la resistencia a la fagocitosis<sup>2</sup>.

Otro complejo antigénico es el formado por las proteínas T y R, las cuales no intervienen en la patogenicidad del microorganismo.

- Complejo fibrilar superficial. En algunos casos los ácidos lipoteicoicos, proteína superficiales como la M y fimbrias, forman agrupaciones fibrilares que intervienen en procesos de adhesión a células del hospedador, al mismo tiempo que favorecen la antigenicidad de los elementos estructurales individuales.

### 1.1.2. CLASIFICACION E IDENTIFICACION.

Los estreptococos representan un amplio grupo de microorganismos algunos de los cuales forman parte de la microbiota normal no habiéndose demostrado su patogenicidad. Otros, sin embargo, se comportan como saprófitos, oportunistas e incluso como patógenos, produciendo diversas infecciones en el hombre y los animales.

La clasificación de los estreptococos se ha realizado en base a diversos criterios, lo que ha motivado que exista una importante confusión en cuanto a su taxonomía y nomenclatura, no siendo ningún sistema de diferenciación suficiente por sí solo para clasificar estas bacterias, por ello es necesario recurrir a la utilización combinada de varias propiedades y características.

1.- Tipo de hemólisis en agar sangre de carnero. Según sus propiedades hemolíticas se diferencian tres tipos de estreptococos,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  hemolíticos. La  $\alpha$  hemólisis es la lisis parcial de los hematíes alrededor de una colonia produciendo un halo verdoso en el medio de cultivo. La  $\beta$  hemólisis resulta de la lisis completa de los hematíes con decoloración total del medio. Se denomina hemólisis  $\gamma$  a la ausencia de ambos fenómenos.

La actividad hemolítica puede verse influida por distintos factores entre los que destacan el medio de cultivo empleado, el tipo de sangre, el procedimiento de siembra y lectura, y principalmente el tipo de incubación.

2.- Estructura antigénica (Tabla 1). La constitución antigénica del género es particularmente compleja. En función de la presencia o no de antígenos de grupo es posible dividirlos en estreptococos grupables y no grupables.

El polisacárido C confiere el carácter grupo específico a estos microorganismos y en función a él se obtienen la mayoría de los serogrupos de Lancefield. Dicho carbohidrato C es un compuesto ramificado formado por dos o varios monómeros cuya composición química, como se ha señalado, difiere según el grupo, pudiendo detectarse ramnosa, galactosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamida y galactosamida<sup>3</sup>. En otros casos el carácter de grupo va ligado a los ácidos lipoteicoicos (serogrupos D, H y N).

TABLA 1 : Esquema de la estructura antigénica del género *Streptococcus*.

ESTREPTOCOCOS SEROGRUPABLES (Serogrupos de Lancefield A-W menos I, J, LL, Ñ)	CARACTER DE GRUPO	CARACTER DE TIPO
ESTREPTOCOCOS NO SEROGRUPABLES	* <u>Polisacárido C</u> (Todas las letras menos las citadas y D, H y N) * <u>Ácidos lipoteicoicos</u> (D, H y N)	* Proteínas parietales. -Independientes. -Asociadas a ácidos teicoicos y fimbrias. * Polisacáridos capsulares. * Polisacáridos parietales superficiales + polisacáridos capsulares. * Polisacáridos capsulares. * Polisacáridos parietales superficiales.

Los serogrupos pueden a su vez dividirse en serotipos mediante antígenos proteicos parietales superficiales, y por antígenos capsulares polisacáridos.

Los estreptococos no grupables también pueden dividirse en serotipos gracias a polisacáridos capsulares (*S. pneumoniae*) o parietales (Grupo *mutans*).

3.- Características fisiológicas (Tabla 2). La diferenciación de los estreptococos por propiedades fisiológicas no es una tarea fácil. En algunos casos, con un número restringido de pruebas clásicas o convencionales, se pueden relacionar estas características con determinados serogrupos. En otros, por el contrario, es necesario utilizar una amplia gama de test que solo están al alcance de laboratorios muy especializados<sup>4,5</sup>.

El desarrollo de pruebas que detectan enzimas bacterianas preformadas que al hidrolizar un sustrato producen un cambio de color, están contenidas en algunos sistemas automatizados de identificación<sup>6,7</sup>. Desgraciadamente los continuos cambios en la nomenclatura de los estreptococos dejan con frecuencia anticuados en poco tiempo estos sistemas, con lo que nuevas especies no pueden ser identificadas. Otras pruebas para la identificación consisten en la detección de proteasa de IgA<sub>1</sub>, neuraminidasa e hialuronidasa<sup>8-12</sup>, aunque por su complejidad no puedan introducirse como técnicas rutinarias.

La diferenciación fenotípica tampoco es fácil ya que numeros especies no presentan pruebas uniformemente positivas o negativas, siendo el carácter variable una constante muy frecuente. Esta característica se utiliza para la obtención de biotipos.

TABLA 2: IDENTIFICACION DE ESTREPTOCOCOS POR  
SUS PROPIEDADES FISIOLÓGICAS.

OPT.	+ <i>S.pneumoniae</i>	+ <i>Enterococcus sp.</i>
	- BE + CINA	- <i>S.bovis</i>
	- BAC. + PYR	+ <i>S.pyogenes</i>
	- CAMP HH	+ <i>S.agalactiae</i>
		- β hemólisis + Otros estreptococos "no viridans"
		- <i>S.viridans</i>

BE: Crecimiento en bilis esculina    CINA: Crecimiento en CINA al 6.5%    HH: hidrólisis del hipurato  
PYR: hidrolasa-L-piroglutamil    CAMP: Producción del factor CAMP    Bac.: Bacitracina    Opt.: Optoquina

4.- Características nutricionales. Algunos estreptococos, aparentemente variantes de especies reconocidas, presentan, como se indicó previamente, un comportamiento nutricional especial al depender para su desarrollo de compuestos como el piridoxal (Vitamina B<sub>6</sub>) o la cisteína. De esta forma pueden distinguirse los SVN, *streptococci* variantes nutricionales, de los NSVN que carecen de tal dependencia.

5.- Características genéticas y químicas estructurales. Se basan en estudios sobre las proporciones de C+G en el ADN cromosómico, la homología ADN-ADN, ARN-ARN o ARN-ADN, o la secuenciación del ARN ribosomal (16S ARN<sub>r</sub>), así como en análisis de perfiles proteicos, estructura de la pared celular en cuanto a las secuencias de aminoácidos y formas de uniones de éstos en la mureína, o estudio de ácidos grasos

13-17

Estas investigaciones genéticas y taxonómicas han permitido separar especies, hasta hace poco consideradas idénticas, o aproximar otras que habían sido catalogadas como diferentes. Un ejemplo de esto lo tenemos en dos especies con una homología ADN-ADN del 30-38%, tales como *Streptococcus mitis* y *Streptococcus oralis*, que actualmente se consideran distintas aunque fenotípicamente sean casi idénticas (se consideran cifras de homología alta a partir del 70%)<sup>18,19</sup>.

Por desgracia estos estudios no siempre son definitivos, y el empleo de métodos no estandarizados o de cepas no características lleva a que en algunas ocasiones se planteen discrepancias entre distintos estudios. Tal es el caso de las especies *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus intermedius* y *Streptococcus*

*constellatus* en los que mientras unos autores proporcionan resultados de alta homología, otros señalan que ésta es baja o moderada<sup>20</sup>.

Cabe esperar que en el futuro, la combinación de pruebas bioquímicas, antigénicas, genéticas y químicas estructurales permitan clasificar los estreptococos.

6.- Criterios clínicos. La diferenciación entre estreptococos piógenos y no piógenos en la actualidad se ha quedado desfasada. A las especies consideradas clásicamente como productoras de procesos purulentos, como *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* y *S. pneumoniae*, habrá que ir incluyendo en el futuro otras muchas, conforme se vayan clasificando y profundizando en la significación patógena de los estreptococos denominados *viridans*.

A la vista de lo expuesto, resulta evidente que no es fácil realizar una clasificación racional de los estreptococos. Teniendo en cuenta una visión eminentemente práctica puede hacerse la siguiente división:

\* Estreptococos grupables (por los grupos de Lancefield). Las especies de principal importancia en patología humana son:

-Estreptococos del grupo A -- *Streptococcus pyogenes*

-Estreptococos del grupo B -- *Streptococcus agalactiae*

-Estreptococos del grupo D -- *Streptococcus bovis*

\* Estreptococos no grupables

- *Streptococcus pneumoniae*

- Estreptococos *viridans*

## # ESTREPTOCOCOS GRUPABLES

### - STREPTOCOCCUS PYOGENES

Esta especie puede encontrarse formando parte de la microbiota faríngea en un 5 a 10% de sujetos sanos, desconociéndose las implicaciones clínicas que puedan derivarse de esta situación.

Entre sus factores de virulencia, aparte de los elementos estructurales comunes a los restantes estreptococos y algunos de ellos con comunidad antigénica con estructuras del hospedador, produce una gran cantidad de enzimas (estreptoquinasa, hialuronidasa, nucleasas, proteasas, etc) y toxinas (estreptolisina O, estreptolisina S, y toxina eritrogénica) que libera al exterior y que tienen un importante papel en el desarrollo de los diversos cuadros clínicos producidos por este microorganismo, entre los que destacan: faringitis aguda, escarlatina, impétigo, erisipela, cuadros inmunológicos (fiebre reumática, glomerulonefritis aguda), endocarditis y septicemia <sup>21</sup>.

### - STREPTOCOCCUS AGALACTIAE

Puede encontrarse formando parte de la microbiota normal intestinal y del aparato genital femenino, y más excepcionalmente, de la faríngea. Habitualmente produce  $\beta$  hemólisis en el medio de cultivo, aunque a veces es posible detectar cepas  $\alpha$  o  $\gamma$  hemolíticas. El proceso más grave en el que se encuentra implicado es la sepsis neonatal precoz <sup>21</sup> (por infección del recién nacido a su paso por el canal del parto), o

tardía (a partir de otros neonatos o del personal sanitario), que suele afectar a niños prematuros y de bajo peso y cursa con manifestaciones generales muy graves, pudiendo llegar hasta exitus.

#### - OTROS ESTREPTOCOCOS GRUPABLES

Dentro de los estreptococos denominados como grupables, hay una gran cantidad de microorganismos que, aunque habitualmente se hallan entre la microbiota normal del ser humano, también han sido implicados, con mayor o menor frecuencia, en distintos procesos infecciosos; entre otros, están:

\* *Streptococcus bovis*.

Es huésped habitual del intestino de numerosos animales y del hombre y puede producir endocarditis y cuadros de bacteriemia en individuos afectados de neoplasias de colon.

\* Estreptococos del grupo G y M.

Son  $\beta$  hemolíticos, tienen como hábitat natural la rinofaringe además de piel y vagina en el caso del grupo G, y se relacionan con endocarditis, infecciones de heridas, etc.

## # ESTREPTOCOCOS NO GRUPABLES

### - STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

Aunque genéticamente está próximo a algunas especies de estreptococos *viridans*, fenotípicamente no debe considerarse como perteneciente a estos. Sus propiedades características, que permiten la diferenciación con el resto de los estreptococos, son la sensibilidad a la optoquina y la solubilidad en bilis. En la tinción de gram aparecen como cocos grampositivos lanceolados, asociados en parejas, y recubiertos de una cápsula polisacárida, responsable de la subdivisión en serotipos de ésta especie.

Cuando se incuban en atmósfera aerobia se comportan como  $\alpha$  hemolíticos, mientras que en anaerobiosis producen  $\beta$  hemólisis. No se desarrollan bien en medios sin sangre ya que necesitan la catalasa sanguínea para descomponer el agua oxigenada producida en su metabolismo y que llega a resultarles tóxica.

Con frecuencia se encuentra formando parte de la microbiota normal de la rinofaringe, pudiendo convertirse en patógeno ante situaciones predisponentes tales como la anestesia, esplenectomía, alcoholismo, infecciones víricas y otros procesos en los que exista una disminución de los mecanismos defensivos, tanto locales como generales, del hospedador. En estas circunstancias pueden originar cuadros de neumonía lobar, otitis, sinusitis, y pasar a la circulación general causando sepsis y posibles focos a distancia (artritis, meningitis, peritonitis, endocarditis, etc.).

- ESTREPTOCOCOS VIRIDANS

Estos estreptococos tienen su hábitat principal en la cavidad oral y en la faringe y su significación patogénica más importante va ligada a la formación de placas dentales, caries, periodontitis y otros procesos odontoestomatológicos desde donde puede pasar a sangre, tras manipulaciones a este nivel, causando cuadros de endocarditis subaguda, de especial significación en sujetos portadores de válvulas protésicas.

Bajo la denominación de "*viridans*" se incluyen un amplio número de estreptococos de difícil clasificación, lo que motiva una importante confusión taxonómica aún no resuelta. En el momento actual, fundamentalmente en base a criterios fisiológicos, quimiogénéticos y nutricionales, se admiten los siguientes grupos: *mutans*, *oralis*, *salivarius*, *milleri* y nutricionales deficientes.

Cada uno de estos grupos está constituido provisionalmente por las especies recogidas en la Tabla 3. Las actuales denominaciones no son aceptadas por todos los autores, de ahí la necesidad de conocer la clasificación anterior y su equivalencia con la presente (Tabla 4).

En cualquier caso, la diferenciación fenotípica de las distintas especies es una tarea complicada para la cual se requiere la introducción de pruebas bioquímicas hasta hace unos años no habituales, problema en parte solucionado por el empleo de sistemas automatizados de identificación.

Las principales características diferenciales de las distintas especies se reflejan en la Tabla 5.

TABLA 3: PRINCIPALES ESPECIES DE ESTREPTOCOCOS *VIRIDANS*<sup>22</sup>

ESPECIE	TIPO DE HEMOLISIS	HABITAT HUMANO	PODER PATOGENO HUMANO
<b>GRUPO MUTANS</b>	$\alpha, \gamma (\beta)$	Orofaringe, intestino	Caries, placa dental, endocarditis
	$\alpha, \gamma$	Orofaringe	Caries, placa dental
	$\alpha, \gamma$	-----	-----
	$\alpha$	Orofaringe, piel, intestino	Placa dental, endocarditis, heridas
	$\alpha$	Orofaringe, piel, intestino	Patología similar a <i>S. sanguis</i>
<b>GRUPO ORALIS</b>	$\beta$	Orofaringe, intestino, piel	Placa dental, endocarditis, abscesos diversos
	$\alpha, \gamma$	Orofaringe, intestino	Placa dental, endocarditis
	$\alpha$	Orofaringe	-----
<b>GRUPO MILLERI</b>	$\gamma$	Orofaringe, intestino	Placa dental, endocarditis
	$\alpha$	Orofaringe	-----
<b>SVN</b>	$\alpha$	Orofaringe, etc.	Endocarditis
	$\alpha$	Orofaringe, etc.	Endocarditis
	$\alpha$	Orofaringe, etc.	Endocarditis
	$\alpha$	Orofaringe, etc.	Endocarditis
	$\alpha$	Orofaringe, etc.	Endocarditis

\* NOMENCLATURA UTILIZADA POR ALGUNOS AUTORES PARA LOS SVN

**TABLA 4: CAMBIOS TAXONOMICOS DE LOS ESTREPTOCOS *VIRIDANS*<sup>22</sup>**

DENOMINACION ACTUAL	SINONIMOS
<i>S. downei</i>	Serotipo h
<i>S. sanguis</i>	Tipo I. Grupo I:B. <i>S. sanguis</i> subespecie <i>carlssonii</i> . Cepas de <i>S. sanguis</i> I. <i>S. sanguis</i> biotipo A serotipo I.
<i>S. parasanguis</i>	Cepas aisladas no bien clasificadas de estreptococos <i>viridans</i> .
<i>S. gordonii</i>	Tipo I-II. <i>S. sanguis</i> subespecie <i>sanguis</i> . Cepas de <i>S. sanguis</i> I. <i>S. sanguis</i> biotipo A serotipo III. Cepas de <i>S. mitis</i> .
<i>S. crista</i>	Cepas de <i>S. sanguis</i> I "CR". <i>S. sanguis</i> con mechón fibrilar.
<i>S. oralis</i>	Tipo II. Grupo I:A. Cepas de <i>S. mitior</i> y <i>S. sanguis</i> II.
<i>S. mitis</i>	V:A. V:B. Cepas de <i>S. mitior</i> .
<i>S. vestibularis</i>	Grupo IV. Cepas aisladas de la mucosa vestibular con caracteres atípicos.
Grupo <i>milleri</i>	Grupo <i>anginosus</i> . <i>S. anginosus-intermedius</i> . <i>S. milleri</i> . <i>Streptococcus</i> MG. <i>S. anginosus</i> . <i>S. constellatus</i> . <i>S. intermedius</i> . <i>S. anginosus-constellatus</i> . Cepas de <i>S. constellatus</i> .

TABLA 5: ALGUNAS CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE LOS ESTREPTOCOCOS<sup>22</sup>

	GLUCANOS SOLUBLES	GLUCANOS INSOLUBLES	FRUCTANOS	POLISACARIDOS INTRACELULARES	IgA <sub>1</sub> PROTEASA	NEURAMINI DASA	PRODUCCION H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<i>S. mutans</i>	+	+	+	+	-	-	-
<i>S. sobrinus</i>	+	+	-	-	-	-	+
<i>S. cricetus</i>	+	+	-	+	-	-	-
<i>S. rattus</i>	+	+	+	+	-	-	-
<i>S. ferus</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>S. downei</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>S. macacae</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>S. sanguis</i>	+	-	-	-	+	-	+
<i>S. parasanguis</i>	-	-	-	-	NC	-	+
<i>S. gordonii</i>	+	-	-	-	-	DC	+
<i>S. crista</i>	V	-	-	-	-	-	+
<i>S. oralis</i>	V	-	-	-	+	+	+
<i>S. mitis</i>	-*	-*	-	-*	V	V	+
<i>S. salivarius</i>	-*	-*	+	+	-	-	-
<i>S. vestibularis</i>	-	-	-	-	NC	NC	+
<i>S. intermedius</i>	-	-	-	-	-	+	-
<i>S. constellatus</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. anginosus</i>	-	-	-	-	-	-	V

\*: Excepciones positivas V: Variable DC: Datos contradictorios NC: No conocido

-- GRUPO *MUTANS*

Está constituido por las especies *Streptococcus mutans*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus ferus*, *Streptococcus downei* y *Streptococcus macacae*. Estructuralmente no difieren del modelo general de todos los estreptococos salvo en la ausencia de cápsula, polisacárido C, complejos proteínas-ácidos lipoteicoicos-fimbrias, y en que estas últimas, cuando existen, no son muy prominentes. Por el contrario, la pared es rica en proteínas y polisacáridos en cuya composición entran a formar parte glucosa, ramnosa, galactosa, etc. Estos polisacáridos muestran distintas especificidades antigénicas, lo que permite diferenciar los serotipos a, b, c, d, e, f, g y h<sup>22</sup> y, junto a las proteínas superficiales, participan en procesos de adhesión y agregación. Los principales caracteres diferenciales entre las especies del grupo se recogen en la Tabla 5.

## CULTIVO

Su metabolismo es anaerobio y aerobio facultativo y su temperatura óptima de crecimiento se sitúa alrededor de los 37°C. Es aconsejable incubar los cultivos en atmósfera anaerobia durante las primeras 24 horas y posteriormente otras 24 horas en aerobiosis ya que de esta forma se favorece la producción de agua oxigenada, que es un importante caracter diferencial, y también en parte la formación de polisacáridos extracelulares que en algunos casos pueden facilitar el reconocimiento de las colonias.

Cuando se siembran en un medio sólido como el agar sangre de carnero son  $\alpha$  o  $\gamma$  hemolíticos, a excepción de algunas cepas de *S. mutans* que producen  $\beta$  hemólisis. Para su aislamiento se pueden emplear medios algo más selectivos como es el caso del MSA (Mitis Salivarius Agar) en cuya composición hay sustancias inhibitoras tales como el telurito potásico, azul tripán y cristal violeta más un 5% de sacarosa. Otro medio aún más frecuentemente empleado y selectivo es el MSB (Mitis Salivarius Bacitracina) que es MSA adicionado de 0.2 U/ml de bacitracina y 15 gramos más de sacarosa. Este medio es considerado por algunos autores como inhibidor del serotipo c (*S. cricetus*)<sup>23</sup> y pese a que ésta especie es muy poco frecuente, se han desarrollado otros medios de cultivo que subsanan este inconveniente como es el caso del agar TYCSB (tripticosa, extracto de levadura, cisteína, sacarosa, bacitracina)<sup>24</sup>. Las colonias en MSA y MSB aparecen elevadas, convexas, onduladas, de color azul oscuro con márgenes irregulares, superficie granular, más o menos adheridas, y rodeadas por un halo brillante cuando producen polisacáridos extracelulares. Sin embargo, tanto en estos medios como en el agar TYCSB, el aspecto de las colonias puede variar mucho no sólo entre especies, sino entre cepas de la misma especie, lo cual a menudo dificulta su reconocimiento.

## METABOLISMO DE LA SACAROSA

El sustrato más importante para estos microorganismos a nivel de la cavidad oral es la sacarosa. De su metabolización derivan la producción de ácidos y la síntesis de polisacáridos extra e intracelulares.

### 1.- Producción de ácidos (Figura 2) <sup>23</sup>.

Sólo una pequeña parte de la sacarosa es derivada para la formación de polisacáridos extra e intracelulares siendo la mayoría de ella empleada como fuente energética para el desarrollo de estos estreptococos. La sacarosa intracelularmente se encuentra bajo la forma de sacarosa y sacarosa-6-fosfato (sacarosa 6P). En el primer caso, por enzimas tipo invertasas, se originan glucosa y fructosa que fosforilándose dan lugar a glucosa 6P y fructosa 6P. En el segundo caso, por la acción de la sacarosa 6 dehidrolasa, surgen glucosa 6P y fructosa. En uno u otro caso ambos azúcares, glucosa y fructosa, seguirán la vía glucolítica de Embden-Meyerhof-Parnas para producir fundamentalmente lactato y también pequeñas cantidades de formato, acetato y etanol <sup>25</sup>. Desde el punto de vista práctico, la vía piruvato formato liasa tiene una cierta importancia ya que se inactiva en presencia de oxígeno <sup>25</sup>, por lo que la acidogenicidad de estas bacterias debe evaluarse en anaerobiosis.

Existen al menos dos mecanismos de transporte de sacarosa al interior de estas bacterias, conocidos como sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferasa y sistema ligado a permeasas.

Sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferasa (Figura 2). Para el mismo se requiere la participación del complejo fosfotransferasa, constituido por una proteína enzimática soluble (PES), otra ligada a la membrana bacteriana (PEM) y una proteína de bajo peso molecular (PBPM). La PES cataliza la transferencia del fosforil medio del fosfoenolpiruvato a la PBPM. La PEM transfiere el fosfato medio de la PBPM-P al azúcar, que fosforilado, pasa al interior celular.

La piruvatocinasa es el eslabón que regula la síntesis, de forma que a bajas concentraciones de sacarosa extracelular o de glucosa 6P y fructosa 1-6 2P intracelular, se inhibe la enzima y el fosfoenolpiruvato es utilizado fundamentalmente como elemento de transporte. Ante altas concentraciones extra e intracelulares de sacarosa los sistemas enzimáticos bacterianos no son capaces de "depurar" todos los productos intermediarios de la glucólisis, por lo que estos se acumularían y resultarían tóxicos. En estas condiciones, aparte de la síntesis de polisacáridos de reserva, se activaría la piruvatocinasa, lo que llevaría a aumentar los niveles de piruvato, activándose la lactato deshidrogenasa y eliminándose elevadas cantidades de lactato y menos de formato, acetato y etanol a través de la piruvato formato liasa. De esta forma se drenan de la célula aquellos productos que le son nocivos.

Sistema de transporte ligado a permeasas (Figura 3). Actuaría ante altas concentraciones de sacarosa extracelular. La metabolización de hidratos de carbono en general y de la sacarosa en particular, determina la liberación de hidrogeniones cuyos aceptores pueden ser oxígeno, nitratos, nitritos, fumaratos, etc. (Figura 2) y cuya finalidad es la génesis de energía mediante la síntesis de ATP a partir de ADP. Estos hidrogeniones pueden ser eliminados al exterior celular generando una fuerza motriz, bien a través

Sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferasa (Figura 2). Para el mismo se requiere la participación del complejo fosfotransferasa, constituido por una proteína enzimática soluble (PES), otra ligada a la membrana bacteriana (PEM) y una proteína de bajo peso molecular (PBPM). La PES cataliza la transferencia del fosforil medio del fosfoenolpiruvato a la PBPM. La PEM transfiere el fosfato medio de la PBPM-P al azúcar, que fosforilado, pasa al interior celular.

La piruvatocinasa es el eslabón que regula la síntesis, de forma que a bajas concentraciones de sacarosa extracelular o de glucosa 6P y fructosa 1-6 2P intracelular, se inhibe la enzima y el fosfoenolpiruvato es utilizado fundamentalmente como elemento de transporte. Ante altas concentraciones extra e intracelulares de sacarosa los sistemas enzimáticos bacterianos no son capaces de "depurar" todos los productos intermediarios de la glucólisis, por lo que estos se acumularían y resultarían tóxicos. En estas condiciones, aparte de la síntesis de polisacáridos de reserva, se activaría la piruvatocinasa, lo que llevaría a aumentar los niveles de piruvato, activándose la lactato deshidrogenasa y eliminándose elevadas cantidades de lactato y menos de formato, acetato y etanol a través de la piruvato formato liasa. De esta forma se drenan de la célula aquellos productos que le son nocivos.

Sistema de transporte ligado a permeasas (Figura 3). Actuaría ante altas concentraciones de sacarosa extracelular. La metabolización de hidratos de carbono en general y de la sacarosa en particular, determina la liberación de hidrogeniones cuyos aceptores pueden ser oxígeno, nitratos, nitritos, fumaratos, etc. (Figura 2) y cuya finalidad es la génesis de energía mediante la síntesis de ATP a partir de ADP. Estos hidrogeniones pueden ser eliminados al exterior celular generando una fuerza motriz, bien a través

de la cadena transportadora de electrones a nivel de membrana, con pérdida de energía (ATP-ADP), mediante ATPasas que requieren  $Mg^{++}$  y  $Ca^{++}$  o a través de la salida de productos metabólicos finales ácidos como el lactato (Figura 2). De esta forma se crea un gradiente de protones, por lo que por un lado el  $K^+$  penetra en el interior de la bacteria para compensar la pérdida de protones y por otro, estos últimos también pueden introducirse en la célula utilizando la fuerza motriz generada en la síntesis de ATP a partir de ADP. Finalmente otros protones ingresan acoplados a la entrada o salida de iones como  $Na^+$  y  $PO_4^{-3}$  pudiendo ocurrir lo mismo con la sacarosa, que penetraría en el citoplasma mediada por una molécula portadora.

Otros azúcares y polialcoholes como maltosa, galactosa, fructosa, lactosa, sorbitol, manitol, etc., pueden usar uno o ambos de estos sistemas de transporte e ingresar tras la formación de diversos productos intermediarios, mediante un número variable de enzimas, en la vía glucolítica.

FIGURA 2: PRODUCCION DE ACIDOS POR LOS ESTREPTOCOCOS GRUPO MUTANS Y SISTEMA FOSFOENOLPIRUVATO FOSFOTRANSFERASA <sup>22</sup>

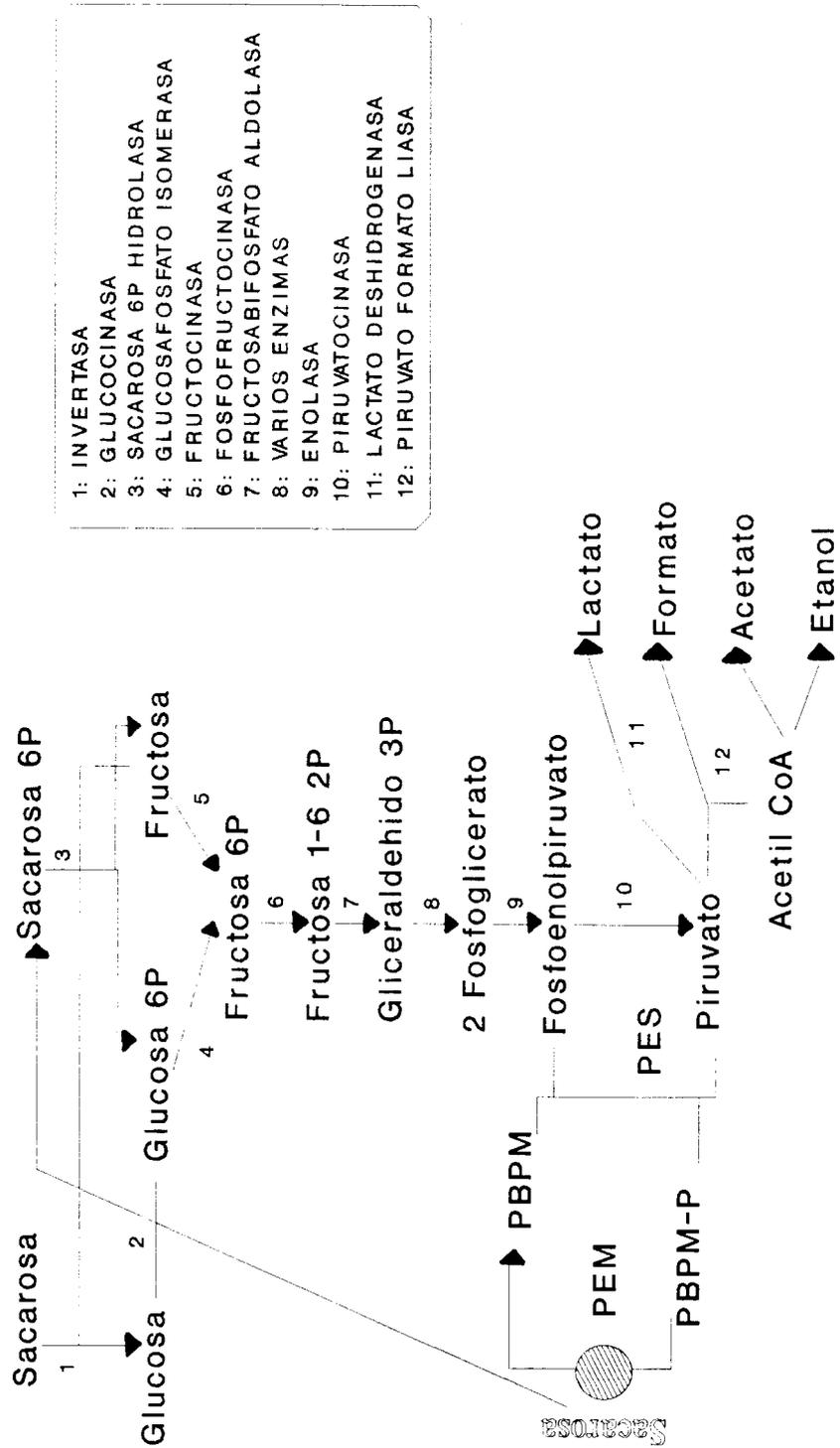
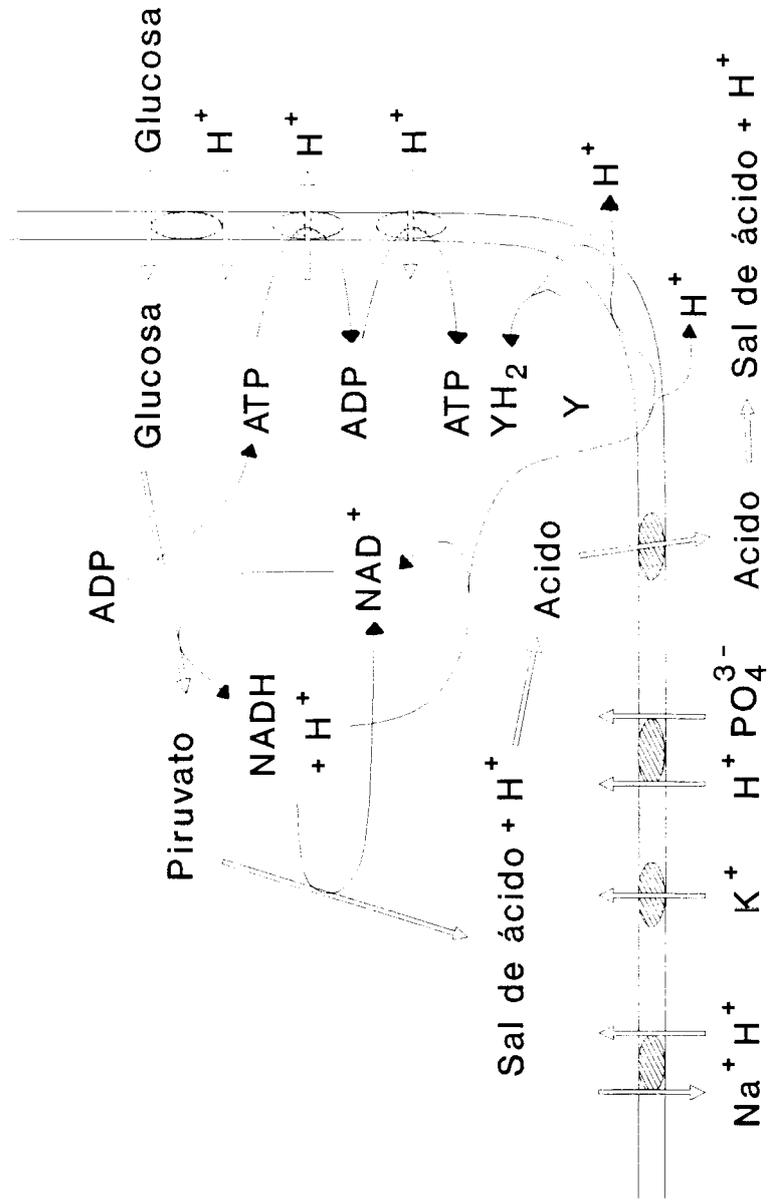


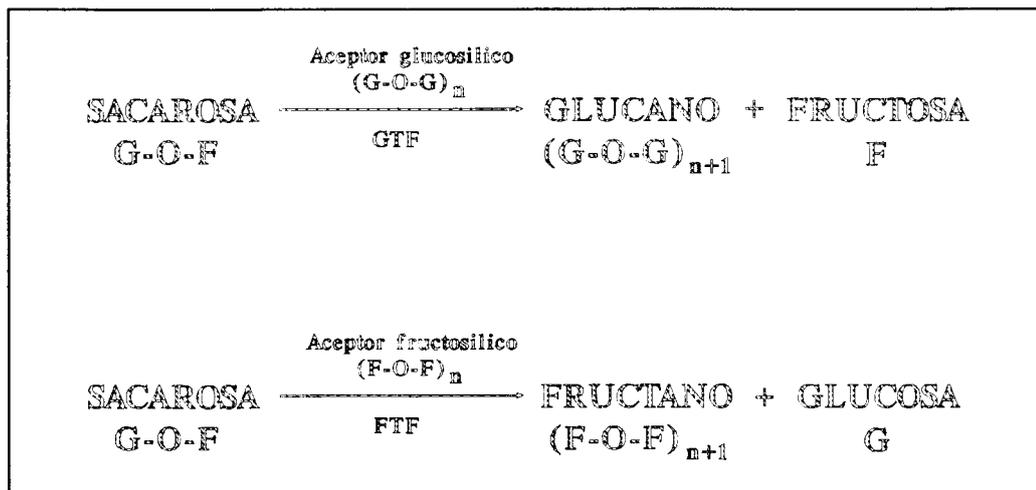
FIGURA 3: SISTEMA DE TRANSPORTE LIGADO A PERMEASAS<sup>22</sup>



## 2.-Formación de polisacáridos extracelulares<sup>22,23</sup>.

Los estreptococos del Grupo *mutans* son capaces de sintetizar homopolisacáridos extracelulares, especialmente a partir de la sacarosa, los cuales pueden ser de tres tipos: glucanos hidrosolubles (dextranos), glucanos no hidrosolubles o insolubles (mutanos) y fructanos hidrosolubles<sup>26,27</sup>. En los glucanos solubles predominan los enlaces  $\alpha(1,6)$  con ramificaciones  $\alpha(1,2)$ ,  $\alpha(1,3)$  y  $\alpha(1,4)$ , mientras que en los insolubles predominan los enlaces  $\alpha(1,3)$  con ramificaciones  $\alpha(1,6)$ <sup>27</sup>. En los fructanos, que son hidrosolubles, existen uniones  $\beta(2,6)$  o  $\beta(1,2)$ .

La formación de estos polímeros se debe a la acción de una o varias enzimas extracelulares denominadas glucosiltransferasas (GTF) o fructosiltransferasas (FTF), que escinden la molécula de sacarosa y polimerizan los monosacáridos transfiriendo grupos glucosílicos o fructosílicos, respectivamente, a aceptores de glucanos o fructanos preexistentes<sup>28,29</sup>.



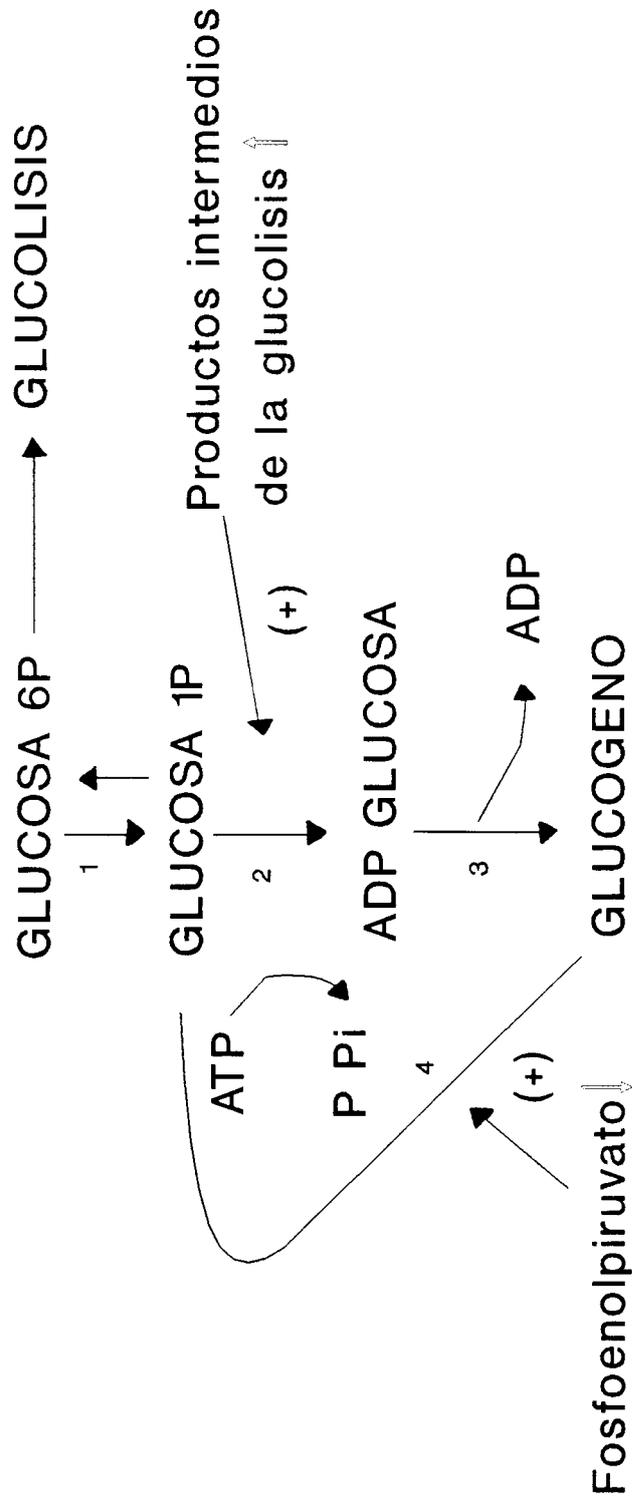
Las glucosiltransferasas que intervienen en la producción de glucanos insolubles son de peso molecular alto (GTF-I), mientras que las que lo hacen en la síntesis de glucanos solubles poseen un peso molecular bajo (GTF-S)<sup>27,30,31</sup>. Estas proteínas enzimáticas pueden aparecer localizadas en las superficies bacterianas, libres en el medio ambiente o adsorbidas a la película adquirida.

Se ha discutido mucho la significación de los polímeros extracelulares; en general, los glucanos solubles y los fructanos son más fácilmente degradados por enzimas tipo glucanasas y fructanasas hasta la formación de productos más sencillos. Por el contrario, los glucanos insolubles son degradados difícilmente por las bacterias, convirtiéndose en los principales responsables de la adherencia bacteriana, tanto a la matriz acelular de la placa dental, como a las válvulas cardíacas<sup>28,32</sup>.

### 3.- Síntesis de polisacáridos intracelulares (Figura 4)<sup>22,23</sup>.

Trás la hidrólisis de la sacarosa a partir de la sacarosa 6P, la glucosa 6P resultante es convertida en glucosa 1P por una fosfoglucomutanasa. Ante la presencia de altas concentraciones de glucosa 1-6 2P u otros productos intermediarios de la glucólisis, se activa una ADP-glucopirofosforilasa que conduce a la formación de ADP y glucosa, la cual mediante una glucógeno sintetasa es polimerizada a glucógeno con predominio de enlaces  $\alpha(1,4)$  y algunos  $\alpha(1,6)$ . De esta manera se evita la acción tóxica del exceso de aporte exógeno de sacarosa y por otra parte se fabrica un material de reserva de gran utilidad en ausencia de aporte exterior. Cuando falta este azúcar o los niveles de fosfoenolpiruvato están bajos, se activa una glucogenofosforilasa que agota las reservas de polisacáridos intracelulares.

FIGURA 4: SINTESIS DE POLISACARIDOS INTRACELULARES<sup>2,2</sup>



1: Fosfoglucomutanasa 2: ADP Pirofosforilasa 3: Glucógeno sintetasa 4: Glucógeno fosforilasa

— *Streptococcus mutans*

Esta especie posee los polisacáridos antigénicos c,d y f del grupo *mutans*. En agar sangre las colonias suelen comportarse como  $\alpha$  o  $\gamma$  hemolíticas y excepcionalmente pueden presentar  $\beta$  hemólisis. Tiene las enzimas GTF-I, GTF-S y FTS, sintetizando glucanos solubles, insolubles y fructanos además de polisacáridos intracelulares de reserva que pueden ser degradados por dextranasas, fructanasas y glucogenofosforilasas<sup>33</sup>. Aunque es especialmente acidógeno, no es tan acidúrico como *S. sobrinus*<sup>33</sup>. Presenta proteínas fijadoras de glucanos que intervienen en los fenómenos de adhesión y de agregación bacteriana<sup>23</sup>. También poseen proteínas parietales superficiales que pueden liberarse al medio en el curso del crecimiento bacteriano y que se comportan como adhesinas; son conocidas, según los autores, como antígenos B, I/II, IF, P1 y Pac. El papel de las fimbrias y de los ácidos lipoteicoicos en los procesos de adhesión a tejidos del hospedador y en los de agregación bacteriana es controvertido. Entre el 50 y 70% de las cepas son bacteriocinógenas<sup>35</sup>; estas bacteriocinas muestran un espectro que se extiende a otras bacterias grampositivas, tanto cocos como bacilos, e incluso a *Nocardia* y *Mycobacterium phlei*<sup>23</sup>.

El hospedador principal es el hombre, en el que ha mostrado su poder cariógeno colonizando especialmente las superficies duras de la cavidad oral (esmalte o cemento). A nivel extraoral *S. mutans* está relacionado con la aparición de cuadros de endocarditis subaguda y más raramente con otros procesos patológicos<sup>23,36,37</sup>.

Esta especie sigue siendo sensible a una amplia gama de antibióticos que incluye betalactámicos, macrólidos, lincosamidas, etc., si bien en los últimos años se ha observado una lenta y progresiva pérdida de sensibilidad, habiéndose descrito cepas con altos niveles de resistencia a los aminoglucósidos y tolerantes a la penicilina

29,38

### --- *Streptococcus sobrinus*

Contiene los polisacáridos del Grupo *mutans* d y g, aunque hay cepas sin estos antígenos. Habitualmente es  $\alpha$  hemolítico en agar sangre y en raras ocasiones no produce hemólisis; en cualquier medio las colonias son más lisas que las de *S. mutans*. Es la única especie del grupo que elabora peróxido de hidrógeno. Produce glucanos solubles e insolubles<sup>31,27</sup>, pero no fructanos, y posee una dextranasa para hidrolizarlos. No sintetiza polisacáridos intracelulares, siendo más acidúrico que *S. mutans*<sup>24</sup>. Al igual que esta última especie, posee proteínas superficiales fijadoras de glucanos y otras con carácter de adhesinas (Spa A y Pag), relacionadas serológicamente con las de *S. mutans*, que median procesos de adhesión y agregación bacteriana.

El porcentaje de cepas bacteriocinógenas es del 20 al 30%. Aunque también coloniza superficies duras, se encuentra en cantidades inferiores a *S. mutans* en las localizaciones supragingivales. Lo señalado para *S. mutans* respecto a la susceptibilidad a los antibióticos es válido para esta especie. Fuera del ámbito oral su significación

patógena es dudosa, salvo en la endocarditis subaguda, y aún en estos casos no existen estudios significativos.

--- *Streptococcus cricetus*

Posee el polisacárido del grupo a y sus colonias pueden ser  $\alpha$  o  $\gamma$  hemolíticas. Esta especie es mucho menos frecuente que las dos anteriores en placa dental humana y, aunque sintetiza los dos tipos de glucanos y polisacáridos intracelulares, su potencial de cariogenicidad humano es escaso.

--- *Streptococcus rattus*

Posee el antígeno b del grupo. Poco frecuente en la cavidad oral humana, sintetiza glucanos solubles e insolubles, fructanos, y grandes cantidades de polisacáridos intracelulares.

--- *Streptococcus ferus*, *Streptococcus downei* y *Streptococcus macacae*.

Estas especies se aíslan de forma excepcional en la cavidad oral humana.

-- GRUPO *ORALIS*

Incluye las especies *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus parasanguis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus crista*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus mitis*. Todas ellas han experimentado, a lo largo de los últimos años, importantes cambios taxonómicos, lo que aparte de los problemas de índole microbiológico, ha provocado una importante confusión a la hora de señalar su significación patógena actual. Así, cepas que un día fueron denominadas, por ejemplo, como *S. sanguis* hoy lo serían como *S. crista* o *S. gordonii*, o cepas designadas en otros tiempos como *S. mitior* actualmente son *S. mitis* o *S. oralis* (Tabla 4)<sup>39</sup>.

De esta forma es difícil relacionar los datos proporcionados por trabajos antiguos con la actual situación taxonómica por lo que, por ejemplo, muchas endocarditis subagudas que etiológicamente se relacionaron con una especie determinada hoy lo estarían con otras. Este problema tiene difícil solución, más aún cuando los actuales criterios taxonómicos distan mucho de ser estables y gozar de aceptación unánime por todas las escuelas.

--- *Streptococcus sanguis*

Puede poseer, aunque no siempre, los antígenos H y W de Lancefield. Las colonias son  $\alpha$  hemolíticas en agar sangre y en MSA aparecen elevadas, de superficies y bordes lisos, fuertemente adheridas al agar<sup>40</sup>. Se han descrito tres biotipos<sup>4</sup>:

BIOTIPOS	RAFINOSA	AMIGDALINA
1	+	-
2	+	+
3	-	-

Debido a los cambios taxonómicos habidos en los últimos años su capacidad bacteriocinógena es discutida, si bien algunos autores señalan que su espectro de acción se extiende incluso a las bacterias gramnegativas. Produce peróxido de hidrógeno<sup>41</sup> (el cual puede causar autólisis) y tiene actividad proteásica sobre la IgA,<sup>10,11</sup> lo que le confiere ventajas ecológicas, por su acción inhibitoria sobre otros microorganismos y por la posibilidad de evadir los mecanismos locales de defensa de las superficies epiteliales. No sintetiza polisacáridos intracelulares ni extracelulares, salvo glucanos<sup>42</sup>, si bien no posee dextranasas. Consta de proteínas parietales superficiales, SSP-S, relacionadas antigenicamente con las de *S. mutans* y *S. sobrinus* que permiten, como adhesinas, su unión a la película adquirida y superficies epiteliales. En estos procesos pueden estar implicados los ácidos lipoteicoicos individualmente o a través de sus uniones a proteínas superficiales y fimbrias que forman un entramado fibrilar. Estas fibrillas, o las fimbrias individualmente, serían las responsables de interacciones tipo lectina-carbohidratos o proteínas-proteínas con otras bacterias, determinando coagregaciones<sup>43,44</sup>. De igual forma, receptores polisacáridos superficiales de *S. sanguis* pueden interactuar con proteínas de fimbrias de otras bacterias y, mediante el ya señalado mecanismo tipo lectina-carbohidratos, determinar igualmente agregados bacterianos.

El hábitat primario de *S. sanguis*, además de la cavidad oral, es la faringe piel e intestino<sup>45</sup>. Aparte de su significación odontológica, está también implicado la aparición de endocarditis infecciosa subaguda, infecciones de heridas y diversos tipos de abscesos y procesos purulentos<sup>46,47,48</sup>.

--- *Streptococcus parasanguis*

Esta especie incluye cepas atípicas de estreptococos *viridans* procedentes de aislamientos de faringe, orina, sangre, etc.<sup>14</sup>. Es  $\alpha$  hemolítica, pudiendo dar reacciones cruzadas con los serogrupos de Lancefield B, G y F. No produce polisacáridos extra ni intracelulares, pero sí peróxido de hidrógeno.

--- *Streptococcus gordonii*

Coloniza la orofaringe y probablemente forma parte de la microbiota normal de intestino y piel. Produce  $\alpha$  hemólisis en agar sangre y carece de los polisacáridos de los grupos de Lancefield, aunque excepcionalmente algunas cepas pertenecen al serogrupo M. Elabora peróxido de hidrógeno y polisacáridos extracelulares solubles tipo glucanos, aunque no intracelulares ni proteasa IgA<sub>1</sub><sup>12</sup>. Su significación patógena, fuera del ámbito oral, quizás sea similar a la de *S. sanguis*.

**--- *Streptococcus crista***

Especie  $\alpha$  hemolítica, algunas cepas dan reacciones cruzadas con los serogrupos H y K de Lancefield. Se caracteriza por poseer un mechón fibrilar lateral intimamente ligado con procesos de adhesión y agregación bacteriana <sup>49</sup>. La producción de glucanos solubles es variable y, como otras especies del grupo, posee actividad peroxidogénica. Su hábitat primario, además de la cavidad oral, y su significación patógena fuera de la misma, parece similar a *S. sanguis*.

**--- *Streptococcus oralis***

Como las otras especies, es  $\alpha$  hemolítico y además, intensamente peroxidogénico <sup>40</sup>. Tiene igualmente actividad neuraminidásica y de proteasa IgA<sub>1</sub> <sup>8,10,11</sup>. La síntesis de polisacáridos extracelulares solubles tipo glucano es variable. Se ha señalado su potencial poder bacteriémico y productor de endocarditis <sup>50,51</sup>.

**--- *Streptococcus mitis***

Especie  $\alpha$  hemolítica que en MSA da colonias lisas, planas, de color azul luminoso, con una cúpula central y poco adheridas al agar. Se han descrito dos biotipos:

BIOTIPO	ARGININA	$\beta$ GLUCOSAMINIDASA
1	-	-
2	+	+

Sólo algunas cepas del biotipo 1 tienen actividad IgA<sub>1</sub> proteásica<sup>10,11,12</sup>. La producción de neuraminidasa es variable en ambos<sup>8,12</sup>, pero constante su capacidad peroxidogénica<sup>42,12</sup>. No sintetiza fructanos pero si, aunque excepcionalmente, glucanos solubles, insolubles, y polisacáridos intracelulares. Su poder cariígeno es dudoso, no así en las endocarditis subagudas, en las que claramente se ha mostrado como agente etiológico<sup>47,52,53</sup>.

-- GRUPO *SALIVARIUS*

Incluye las especies *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus vestibularis*<sup>12</sup>, que muestran un grado de sensibilidad a los antibióticos similar a los señalados para otros estreptococos viridans y una especial predilección por colonizar superficies epiteliales en la cavidad oral.

--- *Streptococcus salivarius*

Algunos autores consideran la existencia de dos subespecies: *salivarius* y *thermophilus*; sin embargo, estudios de homología de ADN indican que por el momento deben considerarse como dos especies distintas.

*S. salivarius* es habitualmente  $\gamma$  hemolítico y excepcionalmente produce  $\alpha$  o  $\beta$  hemólisis. Se distinguen dos serotipos: el I, que da reacciones cruzadas con el serogrupo K de Lancefield, y el II, que no presenta esta reactividad. En MSA las colonias son mucoides, grandes, redondeadas, con una zona alrededor que recuerda una gota de agua. Sintetiza fundamentalmente fructanos y polisacáridos intracelulares degradados respectivamente por fructanasas y glucogenofosforilasa<sup>54</sup>, sin embargo, la producción de glucanos extracelulares es excepcional<sup>55</sup>. Coloniza fundamentalmente el dorso de la lengua<sup>40,45</sup>, siendo su capacidad cariógena dudosa y asociándose raramente a endocarditis subaguda<sup>56</sup>.

--- *Streptococcus vestibularis*

Esta especie es siempre  $\alpha$  hemolítica y peroxidogénica. No produce polisacáridos extracelulares ni intracelulares. Se aísla preferentemente en la región vestibular de la cavidad oral, no conociéndose su significación patógena, ni a este ni a otros niveles del organismo humano<sup>57</sup>.

## -- GRUPO MILLERI

Forman este grupo las especies *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus* y *Streptococcus anginosus*. La diferencia en los resultados de homología de ADN obtenidos por diversos autores hacen que deban ser consideradas como especies distintas<sup>58,20</sup>. Tienen una distribución humana muy amplia: placa dental, nasofaringe, intestino, piel, tracto respiratorio superior, etc.<sup>59</sup>. Esto supone una patología muy diversa, aislándose de numerosos procesos infecciosos: abscesos de sistema nervioso central, hígado y odontológicos, infecciones genitales, septicemias, endocarditis, etc.<sup>26,60-64</sup>.

La diferenciación fenotípica no es fácil<sup>65</sup>, lo que ha contribuido a errores taxonómicos. *S. anginosus* es  $\beta$  hemolítico y *S. constellatus* y *S. intermedius* son  $\alpha$  o  $\gamma$  hemolíticos. Todos ellos carecen de polisacáridos intra y extracelulares<sup>12</sup> y, mientras que *S. intermedius* no posee antígenos del grupo de Lancefield, *S. anginosus* pertenece a los grupos A, C, F y G y *S. constellatus* a veces al F<sup>26,66,67</sup>. En MSA las colonias son muy heterogéneas, propias de la diversidad de las especies: lisas, rugosas, concavas, convexas, etc., teniendo únicamente como carácter común su fácil desprendimiento del agar. Como el resto de los estreptococos *viridans*, muestran patrones de sensibilidad similares a los ya señalados.

## -- ESTREPTOCOCOS VARIANTES NUTRICIONALES (SVN)

Se caracterizan por ser piridoxal (Vitamina B<sub>6</sub>) o cisteína dependientes, por lo que presentan fenómenos de satelitismo con *Staphylococcus aureus*<sup>68</sup>. Suelen ser especies clásicas de estreptococos que tienen deficiencias metabólicas<sup>69</sup>. Algunos autores, sin embargo, proponen los nombres de *Streptococcus adjacens* y *Streptococcus defectivus* para denominar a estos microorganismos<sup>67,70</sup>.

Están especialmente implicados en la producción de endocarditis subagudas y bacteriemias<sup>68,69,71</sup> de peor pronóstico que el habitual, debido a la menor susceptibilidad que estos microorganismos presentan a los antibióticos<sup>1,72</sup>, y a la mayor dificultad para detectar su presencia en el laboratorio.

## 1.2. ENDOCARDITIS INFECCIOSA. ENDOCARDITIS SUBAGUDA

### 1.2.1 GENERALIDADES

La endocarditis infecciosa es una enfermedad causada por la colonización del endocardio por microorganismos que producen una lesión característica denominada vegetación. Aunque las estructuras afectadas con mayor frecuencia son las válvulas cardíacas, la infección también puede extenderse hacia el endocardio mural, shunt arteriovenosos, ductus arteriosos persistentes o defectos septales.

En la era preantibiótica esta enfermedad presentaba un curso invariablemente fatal con unos porcentajes de curación espontánea inferiores al 1%<sup>73</sup>. El descubrimiento de la penicilina abrió un futuro más alentador a los sujetos afectados por esta enfermedad<sup>74,75</sup>.

La edad media de los individuos con endocarditis ha variado en las últimas décadas, de forma que actualmente afecta a personas de más edad (mayores de 50 años)<sup>76</sup>, siendo rara en menores de 15 años<sup>77</sup>. Estas variaciones deben explicarse en base al descenso progresivo en la incidencia de fiebre reumática, la mayor expectativa de vida de los enfermos con valvulopatías, y a la mayor vida media de los individuos con defectos cardíacos congénitos, y de la población en general. Otro factor a tener en cuenta es el aumento de las endocarditis infecciosas adquiridas intrahospitalariamente y derivadas del uso cada vez más frecuente de la cirugía cardíaca correctiva (reposiciones valvulares, marcapasos, etc.)<sup>78</sup>.

Esta enfermedad afecta en mayor proporción a hombres que a mujeres<sup>79,80</sup>, asentando preferentemente a nivel de la válvula mitral seguida de la aórtica, y

presentándose en aproximadamente un caso de cada 1000 individuos que ingresan en un hospital <sup>81</sup>.

Los principales defectos cardíacos que se asocian con una mayor frecuencia de endocarditis infecciosa son la comunicación interventricular, coartación aórtica, tetralogía de Fallot y la persistencia del ductus arterioso <sup>77,82</sup>, siendo rara su presentación en los defectos del tabique interauricular.

#### 1.2.2. CLASIFICACION CLINICA

Las endocarditis, en relación al curso y la evolución clínica que presentan, se han dividido clásicamente en:

\* Endocarditis aguda: Se caracteriza por la aparición de un daño valvular rápido con un curso séptico que lleva a la muerte en pocos días o semanas. Suele asentar sobre válvulas previamente sanas, y los microorganismos que con mayor frecuencia está implicados son *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *Neisseria gonorrhoeae*.

\* Endocarditis subaguda (E.I.S): Evoluciona de forma más insidiosa, con deterioro valvular más progresivo, afectando generalmente a individuos con una alteración valvular previa. Su principal agente causal son los estreptococos *viridans*.

\* Endocarditis sobre prótesis valvulares: Las prótesis valvulares, u otros instrumentos intracirculatorios, suponen una alteración estructural que aumenta el riesgo de colonización endocárdica por microorganismos, y que modifica las características, tanto clínicas como terapéuticas, del proceso infeccioso, el cual se presenta como una complicación grave, aunque afortunadamente poco frecuente, del recambio valvular<sup>83,84</sup>. Dependiendo de que ésta colonización se produzca antes o después en el tiempo, se conocen dos tipos de endocarditis sobre válvulas protésicas (EVP):

- EVP precoz: La sintomatología aparece en el transcurso de los primeros dos meses tras la colocación de la prótesis. El principal agente causal de este cuadro es *Staphylococcus epidermidis*<sup>85,86</sup>, seguido por *S. aureus*. Probablemente el origen sea implantación de microorganismos durante la intervención quirúrgica, bien en la válvula protésica, o en los lugares de sutura.

- EVP tardía: Aparece transcurridos más de dos meses de la cirugía cardiaca. La puerta de entrada de la infección puede ser la implantación intraoperatoria de la bacteria, aunque generalmente el origen del proceso radica en bacteriemias transitorias posteriores a manipulaciones dentales, por lo que su etiología es similar a la de la endocarditis subaguda, y los estreptococos *viridans* los microorganismos más frecuentemente implicados.

### 1.2.3. ENDOCARDITIS SUBAGUDA

#### \* ETIOLOGIA

La mayoría de los cuadros de endocarditis infecciosa se presentan de una forma subaguda, siendo los estreptococos *viridans* los microorganismos más frecuentemente implicados en su aparición<sup>80,87-90</sup>. Esta forma de endocarditis suele incidir sobre válvulas cardíacas alteradas, bien por un proceso antiguo de fiebre reumática o por alguna cardiopatía congénita.

Dentro de los estreptococos *viridans* hay algunas especies que se aíslan con mayor frecuencia en estos pacientes, como son *S. sanguis*, *S. mutans*, *S. mitis* y estreptococos del grupo *milleri*<sup>91-93</sup> (Tabla 6). También es frecuente la infección por estreptococos variantes nutricionales, los cuales presentan una evolución más prolongada y más tasas de recaídas<sup>71</sup>.

La mayor incidencia de endocarditis infecciosa producida por estas especies parece estar ligada a la producción por parte de las mismas de polisacáridos extracelulares insolubles, tipo dextrano (glicocálix), que favorecen su adherencia a las válvulas cardíacas<sup>94-98</sup>. En este sentido, *S. mutans* es una de las especies más frecuentemente productoras de glicocálix, de ahí que alcance las mayores tasas de relación entre la aparición de bacteriemia por éste microorganismo y el posterior desarrollo de endocarditis<sup>99</sup> (Tabla 6).

TABLA 6: PRICIPALES ESTREPTOCOCOS VIRIDANS IMPLICADOS EN EIS\*

	FRECUENCIA %	ENDOCARDITIS/NO ENDOCARD.
<i>S. sanguis</i>	30-40	3,5/1
<i>S. mitis</i>	20-30	---
<i>S. mutans</i>	14-18	7/1
<i>S. milleri</i>	6-12	---
<i>S. salivarius</i>	0-1	---
SVN	2-3	---

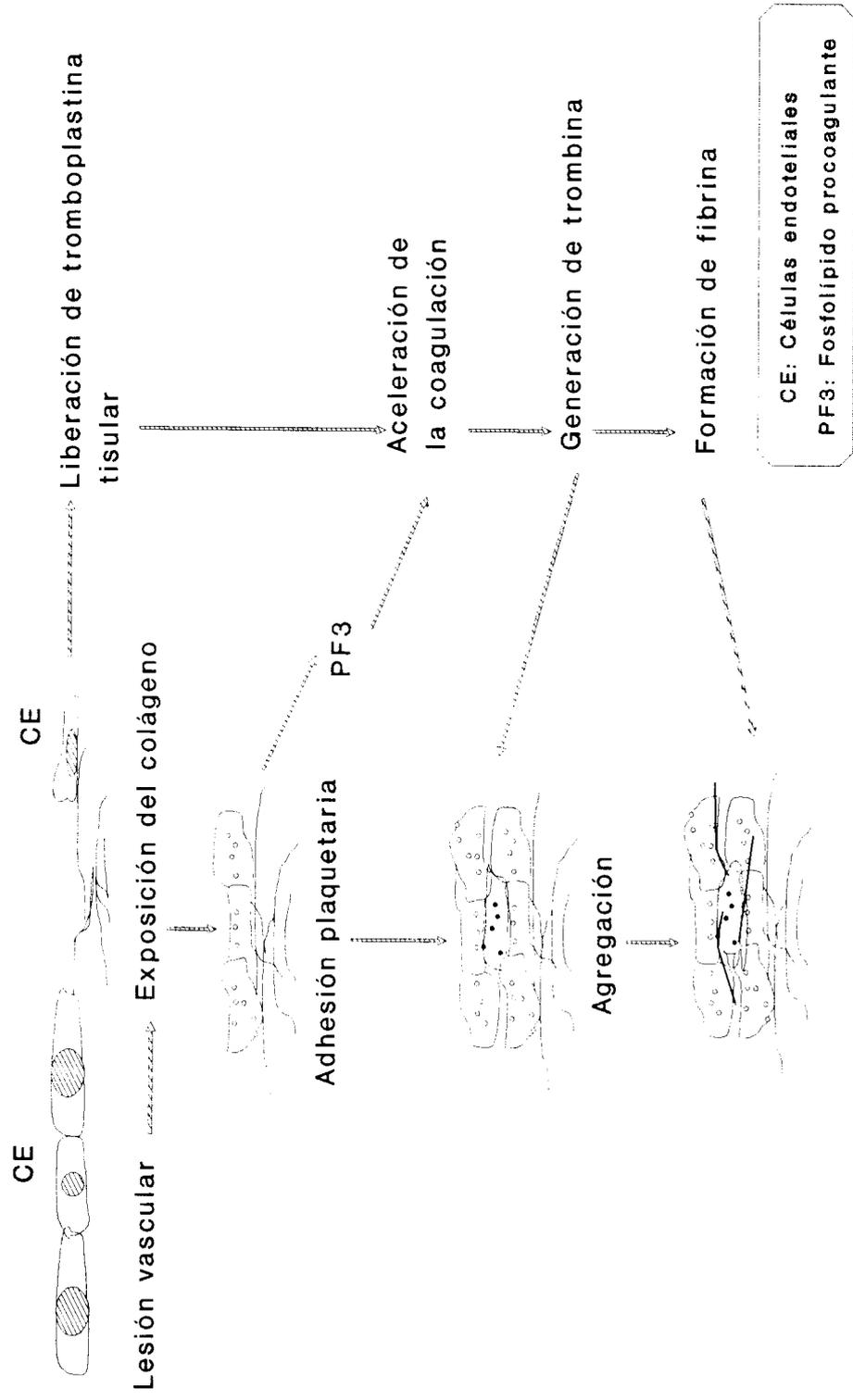
\* En base a la nomenclatura antigua

\*PATOGENIA

En condiciones normales el flujo sanguíneo discurre por el árbol vascular y el corazón de manera continua e uniforme, sin que exista ninguna alteración del endotelio vascular. Estas circunstancias cambian cuando se presentan anomalías estructurales en el corazón o los grandes vasos que determinan la formación de zonas de turbulencias con flujos de corriente rápida y remolinos, de forma que el choque continuo de la sangre sobre el endotelio valvular altera sus condiciones de nutrición y posibilita el que queden al descubierto el colágeno subendotelial y otros componentes de la matriz extracelular. Todos estos fenómenos se traducen en una pérdida de la habitual lisura del endotelio, propiciando el inicio de la serie de acontecimientos que pueden derivar en la aparición de una endocarditis subaguda.

Sobre esta zona del endotelio vascular, o del endocardio adyacente, alterada, se inicia un depósito de plaquetas circulantes que se adhieren al colágeno expuesto, formando un agregado al cual va a contribuir el posterior acúmulo de fibrina. En este agregado también se ven englobadas células endoteliales e inflamatorias del borde de la lesión, propiciando de esta forma el crecimiento de la vegetación formada y el establecimiento de la denominada Endocarditis Trombótica no Bacteriana (ETNB). Estas células inflamatorias contribuyen además al crecimiento de la lesión mediante la liberación de tromboplastina tisular, lo cual se traduce en una mayor formación de fibrina y un aumento del tamaño de la vegetación (Figura 5).

FIGURA 5: ACONTECIMIENTOS INICIALES EN LA ETNB



Bajo este contexto, la aparición de una bacteriemia transitoria favorecería la llegada al foco de ETNB de microorganismos y la colonización, iniciándose entonces el proceso de endocarditis bacteriana. Estas bacteriemias transitorias a menudo tienen su origen en manipulaciones producidas en la cavidad oral tales como la extracción dentaria o las originadas en el tratamiento de las periodontitis, amigdalectomía, etc., o las más simples tales como el cepillado dental o la masticación<sup>82,100</sup>. En individuos sin alteración cardíaca previa, este paso de microorganismos procedentes de la cavidad oral o faringe a sangre no tiene repercusión clínica alguna, a diferencia de lo que ocurre en individuos con válvulas alteradas en los que ya existe una ETNB subyacente.

Los microorganismos más frecuentemente implicados en este proceso son los estreptococos *viridans* y, si bien *S. sanguis* se asocia con mayores tasas de bacteriemia tras manipulación dental<sup>99</sup>, es *S. mutans* la especie que muestra una mayor capacidad para adherirse al foco trombótico, tanto con respecto al resto de estreptococos orales como a otras bacterias tipo estafilococos o bacilos gramnegativos<sup>56</sup>. Esta mayor capacidad de adherencia parece mostrar una íntima relación con la producción de polisacáridos extracelulares insolubles tipo dextranos, los cuales también dificultan la llegada al foco del antibiótico<sup>96,101,102</sup>.

Otro fenómeno descrito y que favorecería la formación de depósito bacteriano a nivel valvular es la capacidad que tienen los estreptococos *viridans* para producir agregación plaquetaria<sup>46,103</sup>, mediante la estimulación de la producción de tromboplastina tisular que activa el proceso de coagulación y la aposición de fibrina y plaquetas (Figura 5). Esta agregación puede verse inhibida parcialmente por la indometacina o

la ADP hidrolasa extracelular, y para que se produzca es necesaria la presencia de varios componentes séricos, entre ellos el fibrinógeno <sup>104</sup>.

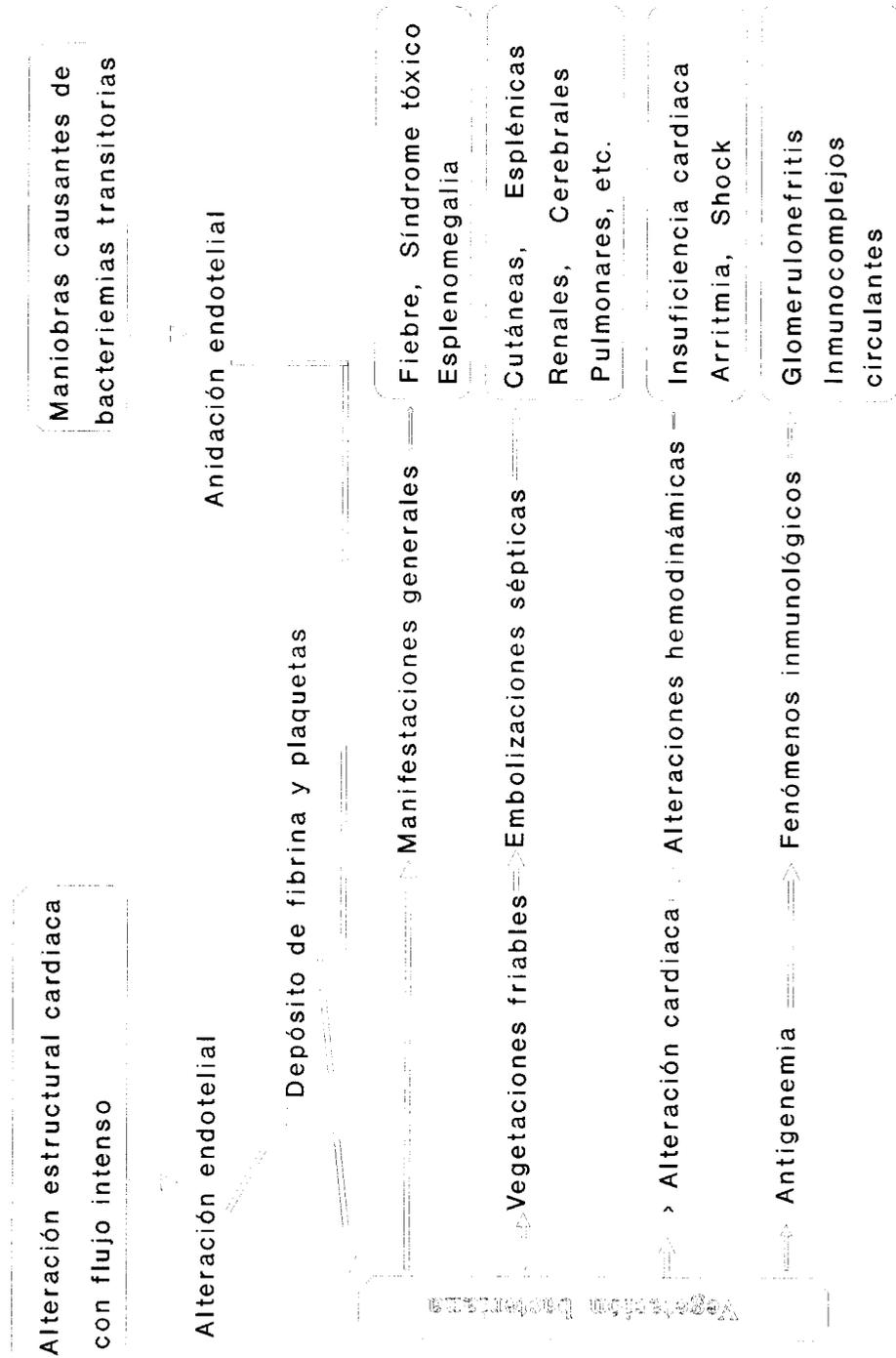
De esta forma se llega al establecimiento de una vegetación que va creciendo de forma escalonada adoptando una estructura laminar en la que los microorganismos se encuentran localizados entre capas de fibrina y plaquetas. Esta disposición probablemente se deba a la continua colonización de las vegetaciones por microorganismos circulantes y al crecimiento permanente de las mismas.

En estas lesiones se han podido demostrar dos tipos de poblaciones bacterianas <sup>103</sup>: una situada a nivel más superficial en la que los microorganismos están en fase de crecimiento exponencial, y otra más profunda en la que se encuentran en inactividad metabólica, sin replicación celular. Las bacterias de la capa más externa son las responsables de la "recolonización" permanente que se produce a nivel valvular y son a su vez las más susceptibles al tratamiento antimicrobiano.

El crecimiento de las vegetaciones origina ulceraciones y retracciones en el endocardio que contribuyen al agravamiento de las alteraciones hemodinámicas previas. Otro factor a tener en cuenta lo constituye el hecho de que dichas vegetaciones poseen una gran tendencia a la fragmentación, lo que origina embolias e infartos sépticos a distancia (Figura 6).

La curación final del proceso se produce por la formación de un tejido de granulación, que puede englobar incluso estructuras viables, y que termina sufriendo una transformación fibrótica <sup>82</sup>.

FIGURA 6: FISIOPATOLOGIA DE LA ENDOCARDITIS INFECCIOSA



\* ANATOMIA PATOLOGICA

- PATOLOGIA CARDIACA

La lesión principal de la endocarditis infecciosa subaguda es la vegetación, que puede ser única o múltiple y cuyo tamaño puede oscilar entre milímetros y centímetros. Están constituidas por plaquetas, fibrina, leucocitos y restos de hematíes sobre los que crecen las bacterias, y suelen localizarse en zonas de baja presión, normalmente a lo largo de la línea de cierre de los bordes valvulares, pudiendo extenderse en su evolución al resto del endocardio, llegando incluso a perforar válvulas, romper cuerdas tendinosas y provocar fibrosis.

La aparición de fenómenos de supuración o de ulceración valvular es rara en esta variedad, como también lo es la pericarditis supurada, más frecuente en la forma aguda. Algunas complicaciones secundarias pueden ser: hemorragias focales, infartos con disfunción del músculo papilar, etc..

- PATOLOGIA EXTRACARDIACA

Los hallazgos anatomopatológicos encontrados en localizaciones distantes al corazón, tienen su origen en la ya comentada tendencia de las vegetaciones a fragmentarse y originar focos sépticos a distancia, y en la reacción inmune que se desencadena ante este proceso. Estas lesiones pueden encontrarse prácticamente en cualquier zona del organismo, siendo más frecuente a nivel de:

\* Riñón: A este nivel pueden aparecer abscesos, infartos y glomerulonefritis. La formación de abscesos es poco frecuente, aunque no ocurre igual con los infartos por embolización <sup>105</sup>. La glomerulonefritis se produce por depósito de inmunocomplejos circulantes, detectados en la mayoría de los individuos con endocarditis infecciosa, y compuestos por antígenos bacterianos, anticuerpos y complemento.

\* Sistema Nervioso Central: El hallazgo más frecuente es la aparición de émbolos localizados en el territorio de la arteria cerebral media <sup>106</sup>. También se describen infartos, arteritis, hemorragias, etc..

\* Aneurismas micóticos: Localizados en zonas de bifurcación o cambios bruscos de dirección de arterias cerebrales, mesentéricas o periféricas. No suelen dar sintomatología, salvo si se produce su rotura.

\* Bazo: Casi todos los pacientes presentan hiperplasia de los folículos linfoides y sistema retículoendotelial, siendo también muy frecuente la aparición de zonas de infarto a nivel esplénico.

#### \* CLINICA

Esta enfermedad puede adoptar formas de presentación muy variables. Como antecedente suelen aparecer las manipulaciones dentales en individuos con una historia de enfermedad cardíaca previa.

Los síntomas suelen comenzar con la aparición de fiebre que a menudo aumenta al llegar la tarde, anorexia, debilidad, pérdida de peso, artralgias y mialgias. Estos

síntomas son totalmente inespecíficos, pudiendo confundirse por los originados por otros procesos como linfomas, neoplasias, etc..

A nivel cardíaco se detecta la aparición de un foco cambiante o un nuevo soplo de eyección que se superpone al ya existente por la cardiopatía de base y que a veces puede pasar desapercibido. En el curso de la enfermedad, además del aumento de la disfunción valvular, suelen desarrollarse signos de insuficiencia cardíaca.

La esplenomegalia es un hecho común en estos enfermos, así como las manifestaciones neurológicas, normalmente derivadas de fenómenos embólicos o de la hemorragia provocada por la rotura de un aneurisma micótico. La hematuria con proteinuria y cilindruria también es una manifestación muy frecuente en esta enfermedad y está relacionada con la existencia de una glomerulonefritis, focal o segmentaria, de base inmunológica. Puede aparecer dolor lumbar intenso, con irradiación ureteral y hematuria, en los casos en que se produce una embolización renal importante.

Muy típicas de este cuadro clínico son las lesiones mucocutáneas que aparecen como consecuencia del desarrollo de fenómenos de vasculitis con proliferación endotelial, necrosis y hemorragias subcutáneas. Las principales manifestaciones son:

- \* Nódulos de Osler: Son lesiones inflamatorias nodulares y dolorosas, de pequeño tamaño, que suelen aparecer en las yemas de los dedos de manos o piés.

- \* Manchas de Janeway: De tamaño similar a las anteriores, en palmas y plantas, no dolorosas, y con componente hemorrágico o petequeial.

\* Manchas de Roth: Hemorragias que pueden localizarse en retina o conjuntiva. Presentan una forma oval, con área central pálida y periferia hemorrágica.

#### \* DIAGNOSTICO

Al diagnóstico de E.I.S. se llega en base a la sospecha clínica y al aislamiento del microorganismo causal a partir de la sangre del paciente. Deben hacerse 3 tomas separadas por intervalos de 30 a 60 minutos en las primeras 24 horas para realización de hemocultivo, tanto aerobio como anaerobio. La bacteriemia que acontece en la endocarditis infecciosa es de carácter continuo, lo que lleva a que no exista una gran diferencia entre el rendimiento obtenido con un sólo hemocultivo y con varios. En realidad, lo que verdaderamente influye en el aislamiento del microorganismo, es la cantidad total de sangre cultivada<sup>82,107</sup>, la cual no debe obtenerse nunca a través de la luz de catéteres intravasculares, para evitar que posibles contaminaciones de los mismos falseen los resultados. Generalmente, el 95% de los microorganismos de importancia clínica crecen en el hemocultivo antes del séptimo día de incubación<sup>108</sup>.

Junto a la realización del hemocultivo hay otros datos que pueden orientar hacia el diagnóstico de endocarditis infecciosa, como son la anemia normocítica y normocrómica, un aumento en la velocidad de sedimentación globular (VSG) con cifras de leucocitos normales o ligeramente elevadas, la hipergammaglobulinemia, y la aparición de proteinuria con hematuria microscópica<sup>89</sup>.

Tanto el electrocardiograma como el ecocardiograma presentan alteraciones inespecíficas. La ecocardiografía permite la detección de vegetaciones de tamaño superior a 2 milímetros, sin distinguir lesiones activas de las ya curadas, por lo que su utilidad se reduce a los casos en los que, por aparecer unas vegetaciones muy aumentadas de tamaño o alteradas, se plantea la necesidad de tratamiento quirúrgico

89

#### \* PROFILAXIS Y TRATAMIENTO

Todos aquellos pacientes con sospecha de cardiopatía congénita o de valvulopatía adquirida, con prótesis valvular cardiaca, defectos de tabique interventricular, o antecedentes de endocarditis previa, deben recibir profilaxis antimicrobiana frente a estreptococos *viridans* antes de someterse a cualquier manipulación dentaria que origine sangrado, cirugía bucal, adenoidectomía o amigdalectomía<sup>108,109</sup>.

En la Tabla 7 se resumen algunos regímenes empleados para la profilaxis de la E.I.S.<sup>77,91,110-112</sup>. En todos ellos, salvo excepciones, se realizan dos tomas de antimicrobiano, una 60 minutos antes de la manipulación y otra a las 6 horas de la primera. Las dosis a las que se administran se recogen en el siguiente apartado de este capítulo.

El tratamiento de la endocarditis subaguda es generalmente médico<sup>113</sup>, y está basado en la adecuada administración de diversas pautas de antimicrobianos, la mayoría de las cuales se recogen en la Tabla 8<sup>114-116</sup>.

Hechos a tener en cuenta, para el adecuado tratamiento de esta enfermedad, son la necesidad de emplear antimicrobianos de acción bactericida, no bacteriostática, y la aparición cada vez más frecuente de cepas de estreptococos *viridans* que presentan altos niveles de resistencia a los aminoglucósidos (CMI  $\geq 1000 \mu\text{g/ml.}$ )<sup>117,118</sup> o tolerancia a la penicilina<sup>119,123</sup>.

TABLA 7: PROFILAXIS DE LA ENDOCARDITIS SUBAGUDA <sup>77,91,110-112</sup>

TIPO DE PACIENTE	ANTIMICROBIANO
PACIENTES DE RIESGO MODERADO	Penicilina o Amoxicilina
PACIENTES DE RIESGO MODERADO ALÉRGICOS A PENICILINA	Eritromicina o Clindamicina
PACIENTES DE ALTO RIESGO	Ampicilina más Gentamicina
PACIENTES DE ALTO RIESGO ALÉRGICOS A PENICILINA	Vancomicina

TABLA 8: TRATAMIENTO DE LA ENDOCARDITIS ESTREPTOCOCICA <sup>114-116</sup>

MICROORGANISMO	REGIMEN	DURACION
Estreptococos <i>viridans</i> sensibles a penicilina	1.- Penicilina	1.- 4 semanas
	2.- Penicilina + Gentamicina	2.- 4 semanas + 2 semanas
	3.- Cefazolina + Gentamicina	3.- 4 semanas + 2 semanas
	4.- Vancomicina (alérgicos)	4.- 4 semanas
Estreptococos <i>viridans</i> resistentes a penicilina	1.- Ampicilina+Gentamicina	1.- 4-6 semanas
	2.- Vancomicina+Gentamicina	2.- 4-6 semanas
Estreptococos variantes nutricionales	1.- Penicilina + Gentamicina	1.- 4 semanas

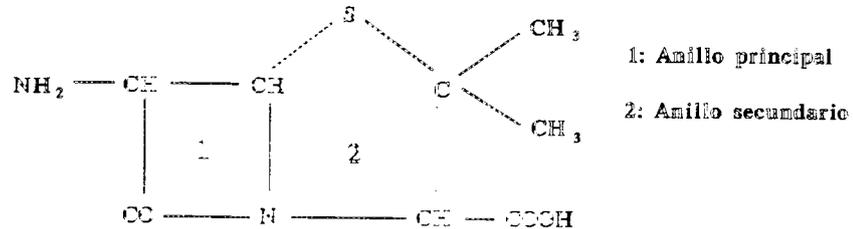
### 1.3. PRINCIPALES ANTIBIOTICOS EN PROFILAXIS Y TRATAMIENTO DE ENDOCARDITIS SUBAGUDA

En este apartado se pretende realizar una sucinta exposición de la estructura química y principales características de los distintos grupos de antimicrobianos de uso clásico en la profilaxis y tratamiento de la endocarditis producida por estreptococos orales, así como de aquellos otros antibióticos que se incluyen en nuestro trabajo, para valorar su posible utilidad en este proceso. Se reflejan asimismo, las dosis habituales a las que se administran, y se hace especial hincapié en algunos fenómenos, tales como los altos niveles de resistencia a aminoglucósidos, o la tolerancia a betalactámicos, que serán posteriormente objeto de nuestro estudio y que poseen una especial repercusión en el tratamiento de la EIS.

#### 1.3.1. $\beta$ LACTAMICOS.

##### \* PENICILINAS.

Las penicilinas son antibióticos naturales o semisintéticos de acción preferentemente bactericida, al interferir en el mecanismo responsable de la síntesis de la pared bacteriana. Desde su descubrimiento por Fleming en 1929<sup>124</sup>, a partir de un hongo denominado *Penicillium notatum*, hasta la fecha, se han obtenido un gran número de penicilinas semisintéticas las cuales presentan un elemento común en su estructura química, el ácido 6-amino-penicilánico (6-APA)<sup>125</sup>.



### ACIDO 6-AMINOPENICILANICO

Este compuesto está constituido por la unión de un anillo principal de  $\beta$  lactama y otro secundario de tiazolidina. Es el núcleo de los antibióticos  $\beta$  lactámicos, y del mantenimiento de su integridad depende la actividad bactericida del compuesto, ya que cuando se produce la ruptura del puente C=O mediante hidrólisis se obtiene el denominado ácido peniciloico, que es bacteriológicamente inactivo<sup>126</sup>.

Unido al 6-APA y en posición 6, todas las penicilinas llevan una cadena lateral constituida por un grupo amido ligado a un radical ácido. Esta cadena difiere de unas a otras, y en su estructura química radican algunas de las propiedades de los antimicrobianos de este grupo<sup>126</sup>, los cuales pueden dividirse en:

- Acil-amido penicilinas.
- Acil-ureido penicilinas.
- Amidino penicilinas.

El mecanismo de acción de estos antibióticos consiste en su unión a unas proteínas situadas en el espacio periplásmico o en la membrana citoplásmica, denominadas proteínas fijadoras de penicilina o PBPs (Penicillin Binding Proteins). Dichas enzimas se unen covalentemente al antibiótico por la analogía existente entre éste y el dipéptido D-ala-D-ala del peptidoglicano <sup>127</sup>. Estas PBPs son carboxipeptidasas y transpeptidasas cuya función consiste en la formación de enlaces cruzados en la mureina o glicopéptido de la pared bacteriana y eliminar el 5º aminoácido del peptidoglicano <sup>128</sup>.

Hasta el momento se han descrito 8 PBPs, denominadas 1a, 1b, 2, 3, 4, 4', 5 y 6 <sup>129</sup>. El complejo PBP1 es el principal y se encarga de la elongación de la bacteria. De su fijación a una penicilina se deriva la detención del crecimiento bacteriano y la formación de esferoplastos y protoplastos, que estallarán por la acción de enzimas endopeptidasas de efecto autolítico. La PBP2 se denomina factor de conformación y actúa añadiendo bloques curvos de peptidoglicano a las "esquinas" de los bacilos, y la PBP3 es el llamado factor de segmentación, al actuar formando septos o paredes transversales para dividir la bacteria en dos. Las restantes PBP no parecen ser esenciales para la formación de la pared celular.

Las penicilinas se unen, de forma no selectiva, a varias PBP simultáneamente.

Las resistencias a penicilinas pueden ser intrínsecas (por alteraciones en la permeabilidad de la membrana, mutaciones en las PBPs o síntesis de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas), o extrínsecas, por la actuación de plásmidos que codifican la síntesis de  $\beta$ -lactamasas <sup>130-133</sup>. Además de los fenómenos de resistencia se ha descrito también la existencia de cepas de microorganismos que presentan tolerancia a la penicilina, la

cual viene definida por un cociente  $\geq 32$  entre la CMB y la CMI para dicho antibiótico<sup>100,134</sup>. Este fenómeno está en relación con la supresión o déficit, debido a una mutación cromosómica, de mureinhidrolasa, un enzima autolítico que se activa al unirse el antibiótico a las PBPs, y que produce la lisis de la bacteria. De esta forma, las bacterias tolerantes eluden la lisis provocada por el antimicrobiano, sin modificaciones en su CMI.

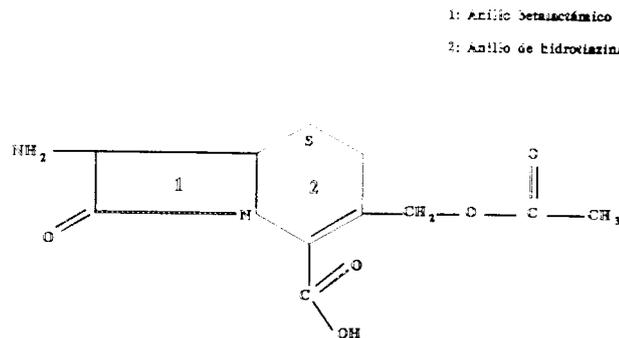
En el tratamiento y profilaxis de la endocarditis infecciosa subaguda se utilizan fundamentalmente tres antimicrobianos de esta familia: una acil-amido penicilina, la **penicilina G o bencilpenicilina**, y dos amidino penicilinas, la **amoxicilina** y la **ampicilina**, a las siguientes dosis<sup>114,116</sup>:

- \* Penicilina G: 16-24 millones de unidades internacionales (U.I) al día por vía intravenosa.
- \* Amoxicilina: 3 gramos vía oral 1 hora antes de la manipulación dentaria.
- \* Ampicilina: 8-12 g./día por vía intravenosa.

## \* CEFALOSPORINAS

Son antibióticos semisintéticos con actividad bactericida al actuar inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana cuando el microorganismo se encuentra en fase de crecimiento.

A partir de la cefalosporina C se obtienen el resto de cefalosporinas semisintéticas. Esta molécula está compuesta por un núcleo denominado ácido 7 aminocefalosporánico (7 ACA), y dos radicales o cadenas laterales: un grupo acetilo y un residuo de ácido aminoadípico <sup>135</sup>.



ACIDO 7 AMINOCEFALOSPORANICO

Las cefalosporinas son estructuralmente la condensación de un anillo principal de  $\beta$  lactama y otro secundario de dihidrotiazina. Todas ellas actúan uniéndose a más de una PBP, aunque preferentemente bloquean la PBP1a, teniendo escasa acción sobre la PBP1b y nula o insignificante sobre el resto <sup>125</sup>.

La resistencia a cefalosporinas y cefamicinas puede deberse a disminución en la permeabilidad bacteriana, alteraciones en las PBPs, o a elaboración de  $\beta$ -

lactamasas (cefalosporinasas), acilasas o esterases, cuya producción puede estar regida, tanto a nivel plasmídico como a nivel cromosómico. En relación con las cefalosporinasas, en concreto las de clase I de origen cromosómico, se ha descrito un fenómeno denominado "de atrapamiento", consistente en la unión covalente de las mismas a la cefalosporina, de forma que impiden su acción aunque no producen la ruptura del anillo  $\beta$ -lactámico.

La **cefazolina** es una cefalosporina de primera generación que se utiliza en el tratamiento de la EIS a dosis de 8 gramos/día vía intravenosa <sup>113</sup>.

## \* CARBAPENEMAS

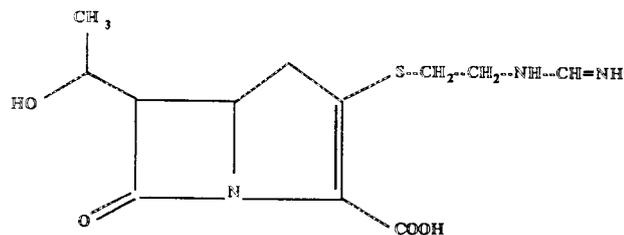
Los carbapenemas son antibióticos betalactámicos caracterizados por poseer un anillo principal  $\beta$ lactámico y otro secundario de 5 átomos, no saturado, y con un carbono en posición 1.

A este grupo pertenece el **imipenem**, antibiótico bactericida que actúa sobre microorganismos en fase de crecimiento inhibiendo la síntesis de la pared al tener una alta afinidad por las PBPs, en especial por la PBP2<sup>136</sup>.

La resistencia al imipenem es un fenómeno poco frecuente, y cuando aparece está motivado por alteraciones en la permeabilidad de la bacteria, debidas a modificaciones de las porinas, o por cambios en la PBP2, ya que este compuesto es muy estable frente a todo tipo de  $\beta$ -lactamasas, tanto plasmídicas como cromosómicas

137

Puede ser una alternativa en el tratamiento de la EIS a dosis de 500 mg. a 1 g. al día vía intravenosa.



IMIPENEM

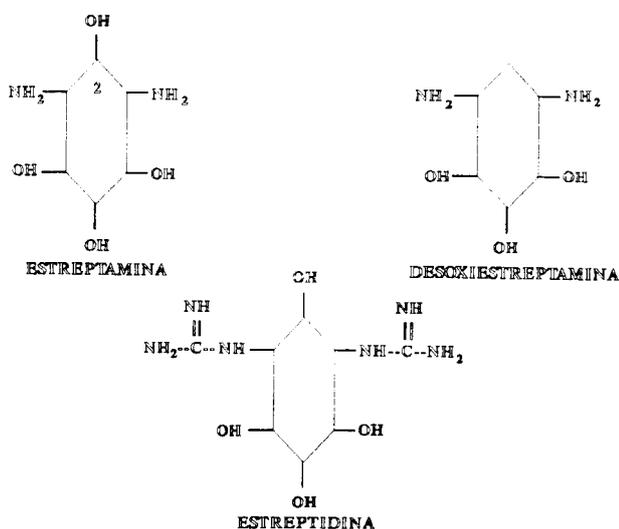
## 1.3.2. AMINOGLUCOSIDOS

Son antibióticos de estructura heterocíclica y acción bactericida mediante inhibición de la síntesis proteica de microorganismos en fase de crecimiento.

Los aminoglucósidos son poliheterósidos aminados cuyos principales glicoles proceden de la estreptamina, derivado diamínico del inositol.

Por reducción de la función alcohólica del carbono en posición 2 de la estreptamina se obtiene la desoxiestreptamina, base de los antibióticos del grupo de la **kanamicina, gentamicina y neomicina**.

La sustitución de dos hidrógenos, uno en cada grupo aminado de la estreptamina, por el radical guanido, da lugar a la estreptidina, base fundamental de las **estreptomicinas** <sup>123</sup>.



Actúan sobre el ribosoma de las bacterias sensibles a nivel de la subunidad 30S, sólo cuando éste se haya leyendo el ARNm (cualquiera de las fases de iniciación, elongación o terminación de la síntesis proteica). El sitio de unión a la fracción 30S es una de las 15 proteínas que la forman, en concreto la proteína 10, a la que se fijan, deteniendo la lectura del mensaje genético o bien induciendo falsas lecturas con la consiguiente síntesis de proteínas no funcionales <sup>138</sup>.

La aparición de resistencias a estos antibióticos puede ser de origen cromosómico o, más frecuentemente, estar mediadas por una serie de enzimas codificadas por plámidos de tipo acetiltransferasas, fosfotransferasas y nucleotidiltransferasas.

Para algunos microorganismos se ha descrito la existencia de altos niveles de resistencia a aminoglucósidos, definidos por la presencia de CMI  $\geq 1000$  ó  $2000 \mu\text{g/ml}$ . La aparición de este fenómeno está relacionada con la codificación a nivel cromosómico, de un enzima bifuncional, que inactiva el antibiótico y que actúa como 2'-fosfotransferasa y 6'-acetiltransferasa <sup>118,139</sup>.

En el tratamiento de la endocarditis infecciosa subaguda se utilizan dos antibióticos pertenecientes a este grupo, la gentamicina y la estreptomycin, asociadas a otros antimicrobianos. Las dosis empleadas son de  $1\text{mg/Kg}/12\text{h}$  y  $7,5\text{mg/k}/8\text{h}$  por vía intravenosa respectivamente <sup>114,116</sup>.

### 1.3.3. MACROLIDOS Y LINCOSAMIDAS

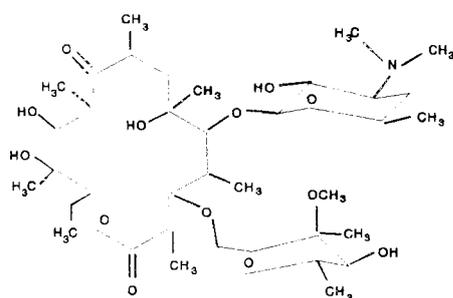
Los macrólidos y lincosamidas son antibióticos naturales y semisintéticos primariamente bacteriostáticos, aunque a elevadas concentraciones pueden ejercer un efecto bactericida. La estructura fundamental de los macrólidos consta de una macrolactona unida por un enlace glucosídico a un azúcar aminado <sup>125</sup>. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis de proteínas por bloqueo enzimático en la traslocación de la cadena proteica a nivel de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano <sup>140</sup>.

La resistencia a macrólidos y lincosamidas puede ser de dos tipos:

- Resistencia cruzada: esta forma es constitutiva y se debe a una alteración estructural de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, motivada por la existencia de un gen que codifica la síntesis de una metilasa que metila el ARNt, con lo que el antimicrobiano no puede actuar sobre su lugar "diana".

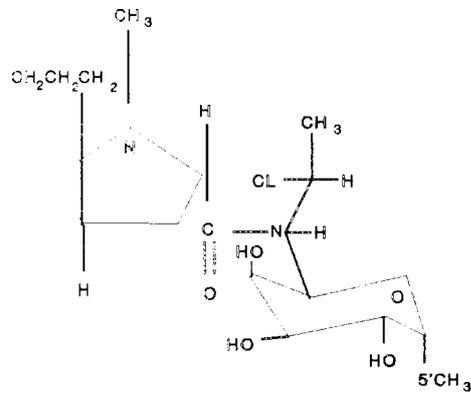
- Resistencia inducible o disociada: Este tipo de resistencia se pone de manifiesto unicamente cuando la bacteria se halla en presencia de concentraciones subinhibitorias de eritromicina, debido a que el ARNm para la síntesis de la metilasa permanece inactivo hasta ese momento.

La **eritromicina**, como la mayoría de los macrólidos, se obtiene de forma natural por la mezcla de varios compuestos. Este macrólido puede utilizarse en la profilaxis de la EIS a dosis de 1,5 g. una a dos horas antes y 0,5 g. a las 6 horas de la intervención <sup>108-110</sup>.



ERITROMICINA A

Las lincosamidas no contienen el núcleo macrolactónico de los macrólidos y están constituidas por un ácido aminado (metilprolina) y un azúcar (piranosa) unidos por una amida<sup>125</sup>. Actúan a nivel de la subunidad 50S impidiendo la elongación de la cadena proteica al bloquear la fijación de la parte terminal de los sustratos aminoacil-ARN-transportadores al sitio aceptor de la peptidil-transferasa integrada en dicha subunidad<sup>141</sup>.



CLINDAMICINA

La **clindamicina** es un derivado de la lincomicina, de la que se diferencia por sustituir, en el carbono 7, un grupo OH por un átomo de cloro. Se utiliza en la profilaxis de la endocarditis a dosis de 600 mg, una hora antes de la manipulación dental<sup>108-110</sup>.



En bacterias inicialmente sensibles, la aparición de resistencias a glicopéptidos es un fenómeno muy raro, provocado por un bloqueo del acceso al pentapéptido, codificado genéticamente <sup>143</sup>.

A este grupo pertenecen la **vancomicina** y la **teicoplanina**. La **vancomicina** es un compuesto anfotérico complejo, en cuya composición entran a formar parte un residuo de glucosa, de N-metil-leucina, de ácido 3-metil-4-cetahexanoico, dos de ortometil-hidroxibenceno y dos de para metil-hidroxibenceno.

Para el tratamiento de la EIS se emplea la vancomicina a dosis de 15mg/Kg cada 12 horas por vía intravenosa <sup>114,116</sup>.

### 1.3.5. ESTREPTOCOCOS ORALES Y ANTIBIOTICOS

Los estreptococos orales en general, y en particular *S. mutans*, clásicamente han mostrado una escasa resistencia frente a la mayoría de los antimicrobianos empleados en la profilaxis y el tratamiento de la endocarditis originada por estos microorganismos<sup>28</sup>. Esta buena sensibilidad a los antimicrobianos es común, tanto en los aislados obtenidos de placa dental, como en los procedentes de lesiones cardiacas, lo que indica que en estos casos, en contra de lo que cabría esperar dada la larga duración del tratamiento, la exposición al antibiótico no contribuye a aumentar las resistencias<sup>144,145</sup>.

Según un estudio de Little y cols<sup>146</sup>, los antibióticos a los que *S. mutans* muestra una mayor susceptibilidad son, en orden decreciente: penicilina, eritromicina, lincomicina, metilicina, vancomicina y tetraciclina.

A pesar de la adecuada sensibilidad y bajo número de resistencias, es necesario seguir investigando en el campo de la susceptibilidad de estos microorganismos a diversos antimicrobianos, ya que ésta vá cambiando con el tiempo, existiendo una lenta tendencia a aumentos en las CMI's a varios antibióticos tales como penicilina, amoxicilina, eritromicina, cefuroxima y clindamicina, entre otros<sup>29,147</sup>. Así, en un estudio sobre los cambios de susceptibilidad de *S. mutans* en un periodo de 5 años<sup>29</sup>, pudo verse como ésta vá disminuyendo de forma progresiva, de manera que mientras que en 1985 la CMI para penicilina oscilaba entre 0.003µg/ml y 0.12µg/ml, estos valores pasaron a 0.007 y 0.12µg/ml en 1989. De la misma forma, las CMI's para amoxicilina,

eritromicina y penicilina, todos ellos fármacos de uso común para la profilaxis de endocarditis en sujetos

sometidos a manipulaciones dentales de riesgo y con factores predisponentes, presentaron en 1985 rangos de CMI's de 0.015µg/ml-0.05µg/ml, 0.003µg/ml-0.25µg/ml y 0.015µg/ml-0.25µg/ml respectivamente, mientras que en 1989 fueron de 0.03µg/ml-1µg/ml, 0.007µg/ml-0.5µg/ml y 0.03µg/ml-0.25µg/ml.

En otro estudio, con cepas de *S. mutans* obtenidas de placa dental y/o saliva durante el año 1991<sup>147</sup>, las CMI's de eritromicina y clindamicina presentaron valores que oscilaron entre 0.03µg/ml y 16µg/ml para la primera, y 0.015µg/ml a 1µg/ml para la segunda.

También se ha visto incrementado en los últimos años, el número de aislados de *S. mutans* que muestran tolerancia a penicilina, o altos niveles de resistencia a amino glucósidos<sup>118,123</sup>. Aunque en la actualidad la magnitud de estos fenómenos es escasa, al aparecer en un porcentaje muy pequeño de los aislados orales o cardiacos, las repercusiones de estos hechos en el tratamiento médico de la endocarditis por estreptococos hace necesario prestar especial atención a su estudio, ya que pueden derivar en un fracaso terapéutico .

CAPITULO SEGUNDO: APORTACION  
PERSONAL

## 2.1. MATERIAL Y METODOS

## 2.1.1. RECOGIDA DE LA MUESTRA

Para la realización del presente trabajo se utilizaron 160 cepas de *S. mutans* procedentes de cavidad oral y/o saliva, recogidas mediante escobillón estéril (Eurotubo). Una vez realizada la toma, las muestras se sembraron en placas de agar MSB que se incubaron a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 48 horas, las 24 primeras horas en atmósfera de anaerobiosis y en condiciones aerobias las restantes. Este medio es selectivo, inhibiendo el crecimiento de la mayoría de microorganismos, salvo *S. mutans* y otras especies pertenecientes al mismo grupo. Las colonias obtenidas de dicha siembra se transfirieron a un medio líquido de enriquecimiento, TSB sin glucosa previamente regenerado, incubándose durante otras 24 horas a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ .

\* Composición de los medios empleados

- Agar MSB (Mitis Salivarius Bacitracina)

-- MSA (Mitis Salivarius Agar) Difco Ref. 0298-01-0

Tryptosa Bacto.....	10 g.
Proteasa peptona nº3 Difco.....	5 g.
Proteasa peptona Difco.....	5 g.
Glucosa Bacto.....	1 g.
Sacarosa Bacto.....	50 g.
Fosfato dipotásico.....	4 g.
Azul tripan.....	0.075 g.

- Cristal violeta Bacto.....0.0008 g.  
Agar Bacto.....15 g.  
-- 1 ml. de Telurito potásico al 1% (Merck Ref. 5164)  
-- 200U/ml. de Bacitracina (Sigma Ref. B0125)  
-- 150 g. de Sacarosa (Pronadisa Ref. 1906)

El medio se prepara resuspendiendo 90 g. de MSA y los 150 g de sacarosa, en 1 litro de agua destilada o desionizada, calentando hasta su completa disolución, para posteriormente proceder a su esterilización en autoclave a 121° C durante 15 minutos. El telurito potásico y la bacitracina se añadieron, una vez autoclavado el medio, en sobrefusión al baño maría a 45-50° C, y cuando ambos están disueltos, se reparte en placas de Petri de 9 cm. de diámetro. El pH final del medio es de  $7 \pm 0.2$ .

- Atmósfera anaerobia

Para la incubación en anaerobiosis de las cepas estudiadas se empleó una estufa de anaerobiosis (HERAEUS 433, P.A.262). En dicha estufa se introdujeron los microorganismos a estudiar, cerrándose a continuación herméticamente. Acto seguido se hace el vacío y se inyecta una mezcla de gases en las siguientes proporciones: N<sub>2</sub> 85%, H<sub>2</sub> 10%, CO<sub>2</sub> 5%. Además de los medios, en el interior de la estufa se coloca un catalizador de paladio y un indicador químico de anaerobiosis (azul de metileno).

- TSB (Trptycase Soy Broth) sin glucosa (Scott Ref. 4900-5207)

Peptona de caseína.....17 g.

Peptona de soja.....3 g.

Fosfato dipotásico.....2.5 g.

Cloruro sódico.....5 g.

Para su preparación se añaden 27.5 g. del medio a 1 litro de agua destilada, calentando hasta su disolución. Después se reparte en tubos de rosca con 5 ml. y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. El pH final del medio es de  $7.3 \pm 0.2$ . Antes de su uso hay que regenerarlo, para lo cual se sumerge en un baño maría a 100°C durante 15 minutos.

#### 2.1.2. IDENTIFICACION DE LOS MICROORGANISMOS POR METODOS CONVENCIONALES

A partir del microorganismo crecido en el medio líquido se realizó un subcultivo en una placa de agar Brucella, la cual se incubó durante 24 horas a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  en atmósfera anaerobia, con el fin de obtener suficiente masa microbiana para conseguir una suspensión en solución salina de 1 de McFarland, con la cual se procedió a la realización de una batería de pruebas bioquímicas para identificación de estreptococos orales, compuesta por las siguientes pruebas: tinción de Gram (para confirmar la existencia de cocos grampositivos en cadenas y en cultivo puro), hidrólisis de la arginina, hidrólisis de esculina, con y sin presencia de bilis, fermentación de diversos

azúcares y polialcoholes (manitol, rafinosa e inulina), y resistencia a 2U de bacitracina. Para la inoculación de las distintas pruebas se empleó una pipeta automática, (Gilson Ref.E10993N) con la que se dispensaron, en el fondo de los tubos, 100µl de la suspensión bacteriana.

La batería se leyó a las 24 y/o 48 horas, según pruebas, de su incubación en estufa a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ , considerándose válida la lectura realizada al segundo día.

La identificación de las distintas especies de estreptococos orales y un diagrama simplificado para la misma se recogen en las tablas 9 y 10.

\* Composición de los medios empleados

- Agar-Brucella (Difco 0964-01-3)

Peptamina Bacto.....	20 g.
Glucosa Bacto.....	1 g.
Extracto de levadura Bacto.....	2 g.
Cloruro sódico.....	5 g.
Bisulfito sódico.....	0.1 g.
Agar Bacto.....	15 g.

Se preparó disolviendo 43 g. del medio en 1000 ml. de agua destilada y autoclavando a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 minutos. Después se reparte en placas de Petri de 9cm. de diámetro, que se conservan a  $4^\circ\text{C}$  hasta su utilización. El pH final del medio es de  $7 \pm 0.2$ .

- Hidrólisis de la arginina

Trypticasa.....	10 g.
Extracto de levadura.....	5 g.
Fosfato dipotásico.....	2 g.
Glucosa.....	0.5 g.
Arginina.....	3 g.
Agua destilada.....	1000 ml.

Los componentes se disuelven en agua destilada y se calientan hasta ebullición, tras la cual se ajusta el pH del medio a 7.1. Se reparte en tubos con 3 ml. y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Trás la inoculación de la prueba de la forma antes descrita, se cubre el medio con parafina líquida esteril, para prevenir el escape de amoniaco durante la desaminación de la arginina, y se incuba a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo se procede a la lectura de la prueba, para lo cual se añaden 2-3 gotas de reactivo de Nessler (Merck Ref. 9011) a una cantidad igual del medio, obtenida mediante pipeta Pasteur estéril del fondo del tubo, junto con 2-3 gotas de hidróxido potásico a una concentración del 40%.

La prueba se consideró positiva cuando se produjo un cambio de color a rojo anaranjado, motivado por la formación de amonio al desaminarse la arginina. Si se mantiene el color original o vira hacia algún otro, la prueba se considera negativa.

- Hidrólisis de esculina sin bilis

Peptona.....	10 g.
Citrato férrico-amónico.....	1 g.

Esculina.....1 g.  
Agar.....2 g.  
Agua destilada.....1000 ml.

La preparación del medio se lleva a cabo disolviendo todos sus componentes, salvo el agar, en agua destilada y ajustando su pH a 7.3-7.4. Después se incorpora el agar, se reparte en tubos y se esteriliza en autoclave. La siembra debe realizarse a lo largo de todo el tubo. Trás la incubación, si se ha producido hidrólisis de la esculina, el medio adquiere un color negruzco, que indica que la prueba es positiva.

- Hidrolisis de la esculina con bilis (Bilis Esculina Agar o BEA) (Difco Ref. 0879-01-7)

Extracto de carne.....3 g.  
Peptona.....5 g.  
Esculina.....1 g.  
Bilis de Buey Bacto-Oxgal.....40 g.  
Citrato férrico.....5 g.  
Agar.....15 g.  
Agua destilada.....1000 ml.

Se preparó disolviendo 64 g. del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Se ajustó el pH a 6.6 y se repartió en tubos con 2.5 ml, que se esterilizaron en el autoclave y se dejaron solidificar inclinados, para que se formara una lengüeta.

La aparición de color negruzco del medio, tras 48 horas de incubación a  $36\pm 1^\circ\text{C}$ , indicó prueba positiva.

- Fermentación de diversos azúcares y polialcoholes

Peptona tripsica.....	15 g.
Extracto de Levadura.....	5 g.
Tween 80.....	1 ml.
Rojo de clorofenol.....	0.04 g.
Agar puro.....	1 g.
Agua destilada.....	1000 ml.

Los componentes del medio se disuelven en agua destilada, su pH se ajusta a 6.4 y se reparten en tubos con 2 ml., los cuales se esterilizan en autoclave.

Los carbohidratos y polialcoholes a estudiar (manitol, rafinosa e inulina), se prepararon en soluciones apropiadas, que se esterilizaron por filtración y se añadieron asépticamente al medio basal, hasta conseguir una concentración final del 1%.

La fermentación del hidrato de carbono, tras incubación a  $36\pm 1^\circ\text{C}$  durante 48 horas del medio previamente regenerado e inoculado, se traduce en un viraje del indicador de pH del rojo al amarillo, y en un descenso del mismo de más de 0.5 unidades, con respecto a un control sin sustrato fermentable. La ausencia de estos cambios es indicativa de prueba negativa.

- Resistencia a 2U de Bacitracina

Como medio base se empleó el mismo utilizado para la fermentación de azúcares, añadiéndole glucosa al 1% y 2U/ml. de Bacitracina (Sigma Ref. 1405-87-4). La lectura de la prueba es similar a la descrita en la fermentación de azúcares, considerando a la bacteria como resistente cuando se detecta color amarillo o cambio de pH.

### 2.1.3. CONSERVACION DE LAS CEPAS

Cuando por dichos resultados se llegó a la identificación de *S. mutans*, se procedió a su inoculación por duplicado, a partir del microorganismo crecido en agar Brucella, en TSB con glicerol (PANREAC Ref. 131339) al 50% y caldo leche, para su posterior conservación a -20°C.

- Caldo leche (Litmus Milk Difco Ref. 0107-01)

Se preparó añadiendo 105 g. del medio a un litro de agua destilada, repartiéndolo en tubos con 3 ml. y esterilizándolo en autoclave a 121°C durante 15 minutos. El pH final es de 6.8.



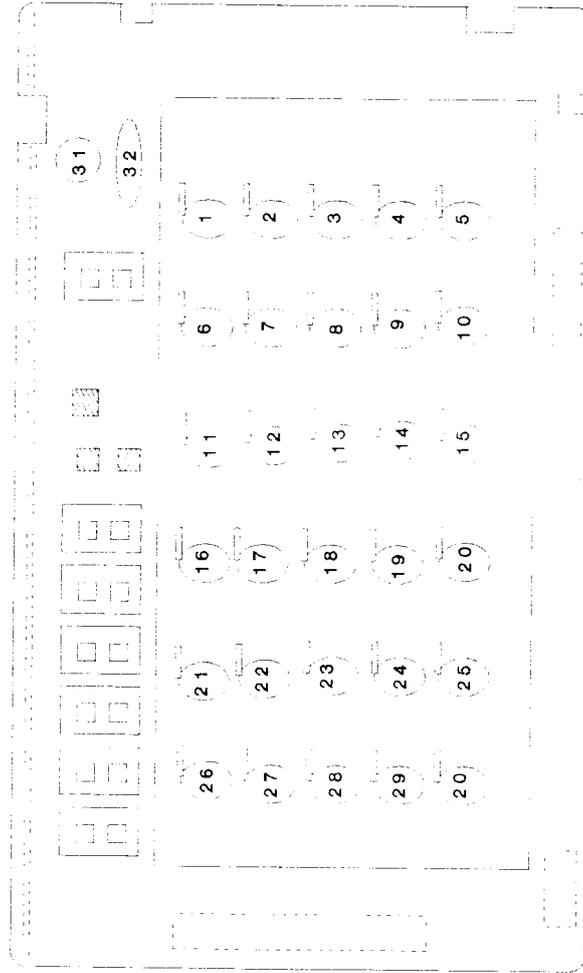
#### 2.1.4. IDENTIFICACION DE LOS MICROORGANISMOS MEDIANTE UN SISTEMA AUTOMATIZADO

Todas las cepas de *S. mutans* identificadas por métodos convencionales fueron estudiadas mediante un sistema de identificación automatizado, el Automicrobic System o Vitek (bioMérieux, Francia), con objeto de confirmar los resultados obtenidos y valorar la utilidad del mismo en la identificación de estreptococos orales.

El sistema Vitek consta de distintas tarjetas de plástico para investigar la susceptibilidad y realizar la identificación de cocos grampositivos, de un módulo preparador de las mismas, otro de sellado, y un lector-incubador que transfiere los datos obtenidos a un sistema informático.

La tarjeta Vitek GPI permite la identificación de estreptococos, estafilococos y algunos bacilos grampositivos de importancia clínica. Dicha tarjeta posee 30 pocillos, 29 de los cuales contienen caldos bioquímicos, siendo el restante un control negativo (Figura 7). En su interior se ha creado una atmósfera microaerófila para favorecer el crecimiento de estreptococos. El sistema automatizado determina si la reacción en cada pocillo es positiva o negativa midiendo la atenuación de luz, debida a la turbidez del pocillo o los cambios de longitud de onda por variaciones en el color, que se produce en cada uno de ellos, tras un tiempo de incubación que puede oscilar de 4 a 15 horas dependiendo del microorganismo.

FIGURA 7: TARJETA VITEK DE IDENTIFICACION  
PARA GRAMPOSITIVOS



- |                 |                          |                |                |               |
|-----------------|--------------------------|----------------|----------------|---------------|
| 1: PEPTONA BASE | 8: ESCULINA              | 15: LACTOSA    | 22: ARABINOSA  | 29: RIBOSA    |
| 2: BACITRACINA  | 9: CONTROL - DE ARGININA | 16: MANITOL    | 23: PIRUVATO   | 30: XILOSA    |
| 3: OPTOQUINA    | 10: ARGININA             | 17: RAFINOSA   | 24: PULULAN    | 31: CATALASA  |
| 4: HEMICELULASA | 11: UREA                 | 18: SALICILINA | 25: INULINA    | 32: HEMOLISIS |
| 5: CLNA 6%      | 12: ROJO DE TETRAZOLIO   | 19: SORBITOL   | 26: MELOBIOSA  |               |
| 6: BILIS 10%    | 13: NOVOBIOCINA          | 20: SACAROSA   | 27: MELECITOSA |               |
| 7: BILIS 40%    | 14: GLUCOSA              | 21: TREALOSA   | 28: CELOBIOSA  |               |

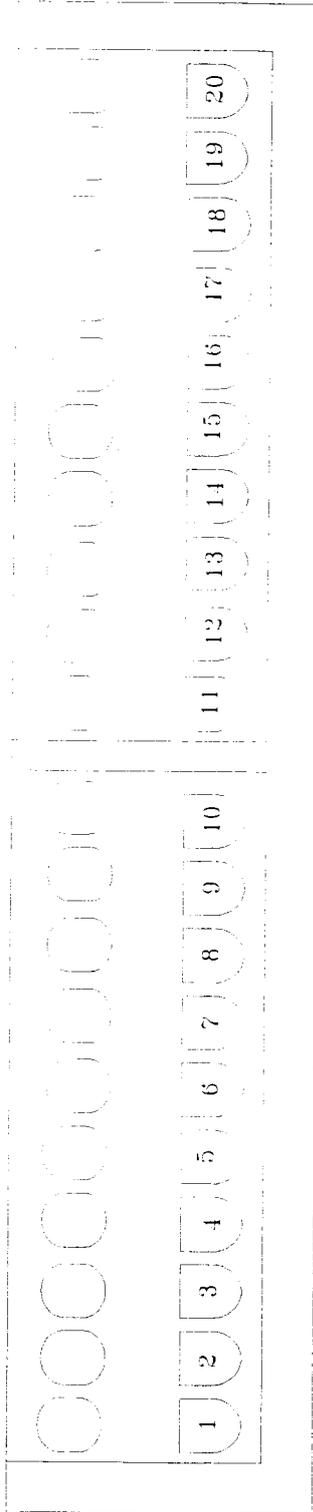
Para la inoculación de la tarjeta se partió de un cultivo bacteriano puro en medio sólido (agar Brucella), de no más de 48 horas de incubación. Debe obtenerse una suspensión uniforme en 1.8 ml de solución salina al 0.45% en tubos de 12x75 mm hasta alcanzar una turbidez equivalente a un patrón de 0.5 de McFarland, no superando en ningún caso el 1 de McFarland. Esta suspensión se pone en contacto con la tarjeta gracias a un tubo de transferencia a través del cual se inoculará el microorganismo en los pocillos mediante un sistema de vacío realizado en el módulo preparador. Después se procede a sellar la tarjeta en el otro dispuesto para dicho fin y se coloca dentro del lector-incubador que, transcurrido el tiempo de incubación necesario, transferirá los resultados obtenidos a un sistema informatizado conectado a una impresora la cual emitirá un informe de los mismos.

Como control de la prueba empleamos las cepas de referencia de *S. mutans* NCTC-10832, NCTC-10449 y ATCC-25175.

#### 2.1.5. DIFERENCIACION DE BIOTIPOS MEDIANTE INVESTIGACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

Para tal fin se ha empleado el sistema API ZYM (bioMérieux, Francia), un micrométodo cualitativo o semicuantitativo que permite la investigación de 19 actividades enzimáticas. Consiste en una galería plástica con 20 cúpulas conteniendo un sistema enzimático con un tampón (Figura 8).

**FIGURA 8: TARJETA API ZYM PARA DETERMINACIONES ENZIMATICAS**



- |                         |                                   |
|-------------------------|-----------------------------------|
| 1: CONTROL              | 11: FOSFATASA ACIDA               |
| 2: FOSFATASA ALCALINA   | 12: NAFTOL-A-S-BI-FOSFOHIDROLASA  |
| 3: ESTERASA             | 13: ALPHA GALACTODISADA           |
| 4: ESTERASA LIPASA      | 14: BETA GALACTOSIDASA            |
| 5: LIPASA               | 15: BETA GLUCURONIDASA            |
| 6: LEUCINA ARILAMIDAS   | 16: ALPHA GLUCOSIDASA             |
| 7: VALINA ARILAMIDAS    | 17: BETA GLUCOSIDASA              |
| 8: CISTINA ARIL AMIDASA | 18: N-ACETIL-BETA GLUCOSAMINIDASA |
| 9: TRIPSINA             | 19: ALPHA MANOSIDASA              |
| 10: ALPHA QUIMOTRIPSINA | 20: ALPHA FUCOSIDASA              |

Para su realización se prepara una suspensión bacteriana en 2 ml de agua destilada o suero fisiológico hasta alcanzar una turbidez equivalente a un patrón 5-6 de la escala de McFarland. y se dispensan 65µl de la misma en cada cúpula de la galería. Después se incuba a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 4 horas, transcurridas las cuales se añade una gota de reactivo ZYM A y otra de ZYM B y se esperan 5 minutos antes de proceder a la lectura de los resultados. Para ello, el sistema adjunta una tabla en la que se reflejan los cambios de color que se deben producir en cada cúpula si el microorganismo posee esa actividad enzimática, y las distintas intensidades de la misma, valoradas de 0 a 5.

#### 2.1.6. DETECCIÓN DE ALTOS NIVELES DE RESISTENCIA A AMINOGLUCOSIDOS

La posible aparición de cepas de *S. mutans* con altos niveles de resistencia a aminoglucósidos se determinó por el método de difusión en agar, para lo cual se empleó como medio de cultivo agar Wilkins-Chalgren (Difco Ref. 1805-17-6), cuya composición es la siguiente:

Triptona Bacto.....	10 g.
Peptona Bacto.....	10 g.
Extracto de levadura Bacto.....	5 g.
Glucosa Bacto.....	1 g.
Cloruro sódico.....	5 g.
L-Arginina.....	1 g.
Piruvato sódico.....	1 g.

Hemina.....	5 mg.
Vitamina K <sub>1</sub> .....	0.5 mg.
Agar Bacto.....	15 g.

Se preparó añadiendo 48 g. del medio a un litro de agua destilada, repartiéndolo en tubos con 25 ml. y esterilizándolo en autoclave a 121°C durante 15 minutos. El pH final es de  $7.1 \pm 0.1$ .

Los antibióticos testados fueron gentamicina (Sigma Ref. 1405-41-0), estreptomina (Sigma Ref. 3810-74-0), tobramicina (Sigma Ref. 79645-27-5), kanamicina (Sigma Ref. 25389-94-0), y amikacina (Sigma Ref. 149022-22-0), los cuales fueron diluidos en agua estéril previa realización de los cálculos necesarios para corregir su potencia.

Se utilizaron placas de Petri de 15 cm. de diámetro en las que se depositaron 25 ml. de agar Wilkins-Chalgren previamente fundido y conservado a una temperatura de 45°C en baño maría, al que se añadieron las cantidades necesarias de cada antibiótico para obtener concentraciones finales del mismo de 500, 1000, y 2000  $\mu\text{g/ml}$  para cada uno de ellos.

Una vez solidificado el medio, los microorganismos se inocularon en superficie en número de 16 por cada placa, previamente rotulada para su perfecta identificación. Para ello se partió de cepas en fase de crecimiento en caldo TSB sin glucosa, de cada una de las cuales se depositó 0.001 ml. con asa calibrada, en la superficie del agar. Todas las placas se incubaron a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  en aerobiosis durante 24 horas.

Para el control de crecimiento del microorganismo se inocularon en el mismo medio, pero sin antibiótico, las diversas cepas ensayadas, incubándose en las mismas condiciones.

La lectura de los resultados se realizó a las 24 horas, definiéndose la concentración mínima inhibitoria o CMI, como la menor concentración de antibiótico que impide un desarrollo bacteriano objetivable a simple vista.

#### 2.1.7. ESTUDIO DEL FENOMENO DE TOLERANCIA A PENICILINA

La detección de cepas de *S. mutans* tolerantes a penicilina se realizó mediante el medio de macrodilución en medio líquido, utilizando para ello caldo Todd-Hewitt (Oxoid Ref. CM189), cuya composición es la siguiente:

- Infusión de 450g. de extracto de carne..... 10 g.
- Triptona..... 20 g.
- Glucosa..... 2 g.
- Bicarbonato sódico..... 2 g.
- Cloruro sódico..... 2 g.
- Fosfato disódico..... 0.4 g.

Se preparó añadiendo 36.4 g. del medio a un litro de agua destilada y esterilizándolo en autoclave a 115°C durante 10 minutos. El pH final es de  $7.8 \pm 0.2$ .

\* Preparación del antibiótico.

La penicilina (Sigma Ref. 69-57-8) fué disuelta, previa corrección de su potencia, en caldo Todd-Hewitt. realizándose diluciones dobles progresivas a partir de la solución madre hasta alcanzar el rango de concentraciones deseado. Dichas diluciones se conservaron a 4° C hasta la realización de la prueba, no más allá de 24 horas después.

\* Preparación del inóculo

La cepas de *S. mutans* procedentes de colección se incubaron en caldo Todd-Hewitt a  $36 \pm 1^\circ \text{C}$  durante 24 horas, transcurridas las cuales se procedió, a partir del microorganismo crecido, a la realización de un inóculo en el mismo caldo, de aproximadamente  $5 \times 10^5$  ufc. (equivalente a un patrón 0.5 de la escala de McFarland), siguiendo la recomendaciones del NCCLS<sup>148</sup>.

\* Realización de la prueba

Cada uno de los microorganismos ensayados se testó para 10 concentraciones de antibiótico cuyo rango estuvo comprendido entre 2 y  $0.003 \mu\text{g/ml}$ . Para ello se utilizaron tubos con 1 ml de penicilina a las distintas diluciones preparadas previamente, en los que se inoculó, mediante pipeta automática (Nichiryo Ref. K 572704), 1 ml de suspensión bacteriana, incubándose después a  $36 \pm 1^\circ \text{C}$  durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se procedió a la lectura para determinar en que dilución se hallaba la CMI, definida como la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir

el crecimiento bacteriano visible, el cual se pone de manifiesto por la opacificación del medio.

\* Detección de la tolerancia

Con el fin de determinar si una cepa era tolerante a penicilina (relación CMB/CMI  $\geq 32$ ), se procedió a investigar en que dilución de antibiótico se encontraba la concentración mínima bactericida o CMB, definida como la mínima concentración de antibiótico capaz de producir la muerte del 99.9% del inóculo inicial.

Para ello se procedió según el método descrito por James LA<sup>149</sup>, transfiriendo a placas de agar con un 1% de sangre de caballo lisada y 0.5U/ml de  $\beta$ -lactamasa (Sigma Ref. 9001-74-5), 10 $\mu$ l de cada uno de los tubos en los que no existía crecimiento visible, mediante pipeta automática. Dichas placas se incubaron a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24 horas. La aparición de menos de 10 colonias representa menos del 0.1% de supervivientes, para el inóculo empleado, y la primera dilución en la que se encuentren determina la CMB.

\* Control de crecimiento

Junto con las distintas concentraciones de penicilina, cada microorganismo fué inoculado en un tubo con 1 ml. de caldo Todd-Hewitt sin antibiótico, que se incubó en las mismas condiciones que los restantes y que sirvió como control de crecimiento de la cepa ensayada.

### 2.1.8. DETERMINACION DE LA SUSCEPTIBILIDAD A DIVERSOS ANTIMICROBIANOS

Todas las cepas de *S. mutans* fueron testadas para conocer su susceptibilidad frente a diversos antimicrobianos de uso frecuente en el tratamiento y profilaxis de la endocarditis producida por dichos microorganismos, para lo cual se empleó el método de difusión en agar, utilizando agar Wilkins-Chalgren como medio de cultivo.

#### \* Preparación del antibiótico

Los antibióticos empleados en este estudio fueron: amoxicilina (Sigma, Ref. 26787-78-0), cefazolina (Sigma Ref. 27164-46-1), eritromicina (Sigma Ref. 643-22-1), clindamicina (Sigma Ref. 24729-96-2), vancomicina (Sigma Ref. 123409-00-7), teicoplanina (Merrell Dow), e imipenem (Merck).

Todos ellos fueron disueltos, una vez realizada la corrección de su potencia, en el medio adecuado para cada uno, con el fin de conseguir una solución madre a partir de la cual realizar diluciones dobles seriadas en el rango de concentraciones deseado.

La mayoría de ellos se disolvieron en agua destilada estéril, salvo amoxicilina y cefazolina, que necesitan como diluyente una solución tamponada de pH 6, el imipenem, que necesita una solución tamponada de pH 7.2, y la eritromicina, que se disuelve en una solución de etanol al 10% en agua estéril.

Los rangos de concentraciones ensayados oscilaron entre 0.5 y 0.003 $\mu$ g/ml para amoxicilina, cefazolina, clindamicina, eritromicina, e imipenem, y entre 1 y 0.007 $\mu$ g/ml para vancomicina y teicoplanina.

\* Preparación del inóculo

Se partió de cepas en fase de crecimiento en caldo TSB sin glucosa, de las que se depositó 0.001 ml. con asa calibrada en la superficie del medio de cultivo.

\* Realización de la prueba

Se depositaron 25 ml. de agar Wilkins-Chalgren, previamente fundido y mantenido a una temperatura de 45°C en baño maría, en placas de Petri de 15 cm. de diámetro rotuladas para su perfecta identificación. Previamente a su reparto en placas, se le añadió la dilución del antibiótico en estudio, en la cantidad adecuada para alcanzar en las mismas la concentración final deseada del mismo.

Una vez inoculados los microorganismos, en número de 16 por placa, se incubaron a 36 $\pm$ 1°C durante 24 horas, transcurridas las cuales se determinó la CMI de cada uno de ellos.

\* Control de crecimiento

Para el control de crecimiento del microorganismo se inocularon en el mismo medio, pero sin antibiótico, las diversas cepas ensayadas, incubándose en las mismas condiciones.

\* Puntos de corte

Los estreptococos se consideran sensibles (S) a penicilina y amoxicilina cuando la CMI es  $\leq 0.12 \mu\text{g/ml}$ , de sensibilidad moderada o intermedia (I) entre  $0.25-2 \mu\text{g/ml}$  y resistentes (R) cuando la CMI es  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ . En el resto de los antimicrobianos ensayados estos valores son:

Cefazolina : S  $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ , I=  $16 \mu\text{g/ml}$ , R  $\geq 32 \mu\text{g/ml}$

Clindamicina: S  $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$ , I=  $1-2 \mu\text{g/ml}$ , R  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$

Eritromicina: S  $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$ , I=  $1-4 \mu\text{g/ml}$ , R  $\geq 8 \mu\text{g/ml}$

Imipenem: S  $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ , I=  $8 \mu\text{g/ml}$ , R  $\geq 16 \mu\text{g/ml}$

Vancomicina y Teicoplanina: S  $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ , I=  $8-16 \mu\text{g/ml}$ , R  $\geq 32 \mu\text{g/ml}$

#### 2.1.9. DETECCIÓN DE LA PRODUCCION DE GLICOCALIX "IN VITRO"

Las 80 cepas de *S. mutans* incluidas en el estudio fueron sometidas a un ensayo cualitativo para detectar la posible producción "in vitro" de polisacárido extracelular o glicocálix, componente relacionado con la adherencia de estos microorganismos a las válvulas cardiacas en el curso de la endocarditis producida por los mismos, para lo cual se empleó el método descrito por Molisch<sup>150,151</sup>.

A partir de un cultivo en medio sólido, cada una de la cepas se inoculó en un tubo conteniendo 4 ml. de suero fetal bovino (Bio-Whittaker Ref. 14-501A) como fuente de hidratos de carbono, incubándose durante 48 horas a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ . Transcurrido este tiempo el tubo se sometió a centrifugación a  $950 g$  durante 10 minutos. El sobrenadan-

te fué resuspendido en 4ml de solución salina al 0.9% y sonicado durante 30 segundos al 30% de potencia. Después se extrajeron 0.5ml del sobrenadante y se les adicionaron 2 gotas de  $\alpha$ -naftol (Merck, Ref. 3817976) diluido al 10% en alcohol absoluto. Esta solución fué mezclada con 0.5ml de ácido sulfúrico (Panreac, Ref. 131058). Los carbohidratos, en contacto con el ácido, se degradan a un derivado de furaldehido el cual es condensado por el  $\alpha$ -naftol, observándose una coloración rojo-violácea en la zona de contacto de ambos líquidos, la cual es indicativa de una reacción positiva, y por tanto, de la producción de polisacárido.

Paralelamente a la realización de esta prueba utilizando como nutriente suero fetal bovino, se inocularon todas las cepas en 4ml de agar Wilkins-Chalgren, siguiéndo todos los pasos descritos anteriormente, con el fin de comprobar si las posibles cepas productoras de glicocálix eran también capaces de elaborarlo cuando crecían en un medio de cultivo convencional, y en nuestro caso, que coincidía con el utilizado en las pruebas de susceptibilidad a diversos antimicrobianos.

Como control negativo de la prueba empleamos una cepa de *Proteus mirabilis*, no productora de glicocálix.

#### 2.1.10. ANALISIS ESTADISTICO

Para la realización del estudio estadístico de los resultados se empleó el programa de estadística RSIGMA, aplicándose el test de  $\chi^2$ .

## 2.2. RESULTADOS

### 2.2.1. IDENTIFICACION MEDIANTE SISTEMA AMS

De las 160 cepas de *S. mutans* sometidas a identificación por el sistema Vitek, 116 fueron confirmadas como *S. mutans* (72.5%), mientras que en un 27.5% de los casos (44 cepas), dicho sistema realizó una identificación diferente. En las figuras 9 y 10 se reflejan los resultados obtenidos.

Junto con las cepas de nuestro estudio se emplearon tres de *S. mutans* de referencia (NCTC-10832, ATCC-25175 y NCTC-10449), siendo las dos primeras identificadas como *S. mutans* y la última como *S. bovis*.

Las tablas 11 y 12 recogen las pruebas bioquímicas empleadas por el sistema AMS o Vitek que coinciden con las empleadas de forma convencional, y los resultados obtenidos en ellas, tanto para las cepas identificadas como *S. mutans* como para aquellas en que dicha identificación fue distinta.

FIGURA 9: RESULTADOS DE LA IDENTIFICACION DE LAS CEPAS POR EL SISTEMA VITEK

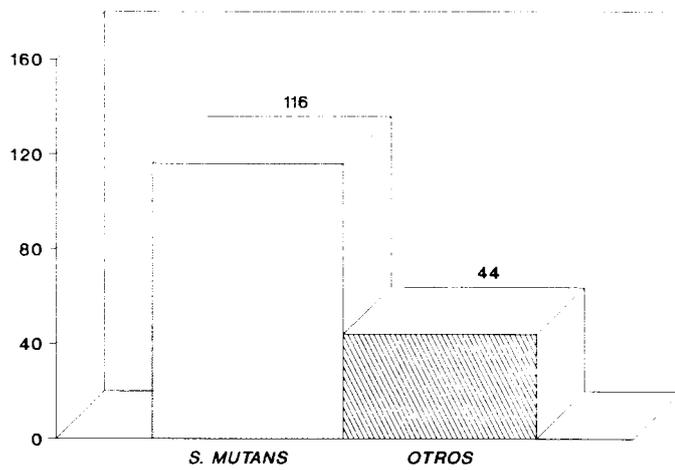
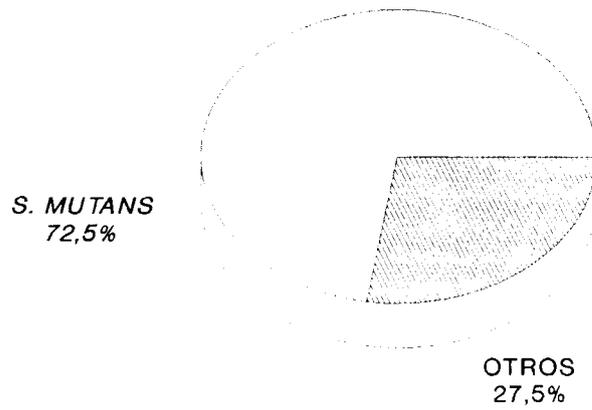


FIGURA 10: CEPAS NO IDENTIFICADAS COMO *S. MUTANS* POR EL SISTEMA VITEK

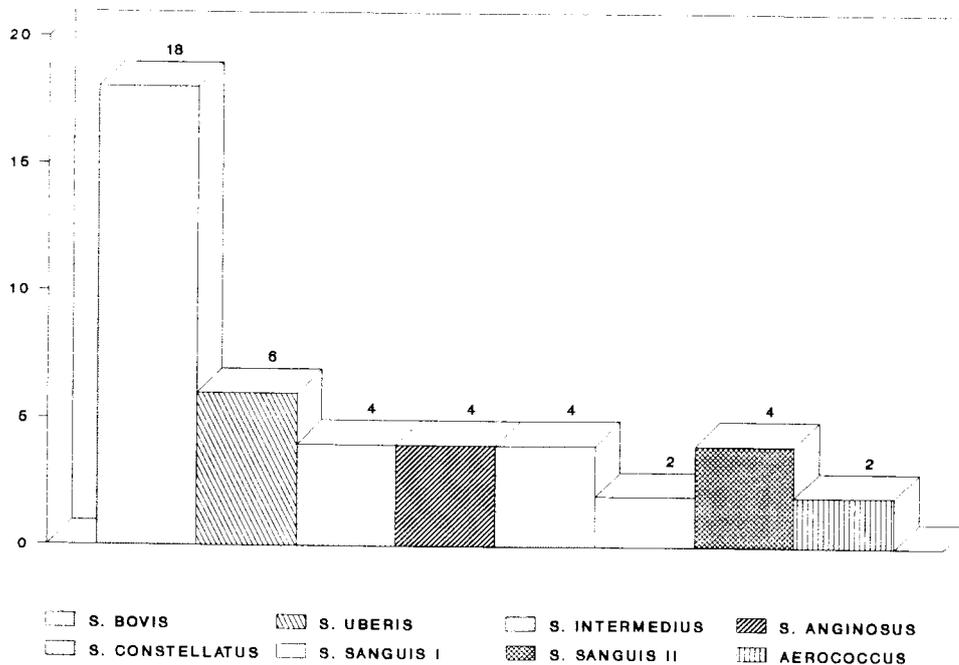
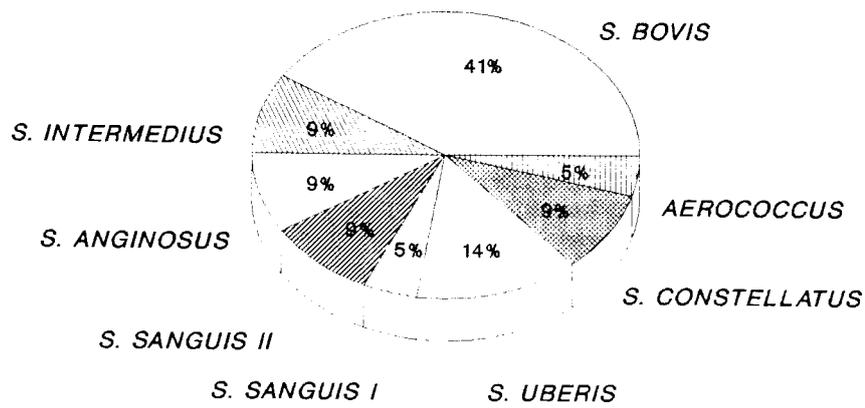


TABLA 11: RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS COINCIDENTES CON CON LAS CONVENCIONALES DEL SISTEMA VITEK PARA *S.MUTANS*

Nº CEPAS	BAC	ESC	ARG	MAN	RAF	INU
6	+	-	-	+	+	-
2	+	-	-	+	+	+
2	+	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	-	+
28	+	+	-	+	+	+
76	+	+	-	+	+	-

BAC: Bacitracina

ESC: Esculina

ARG: Arginina

MAN: Manitol

RAF: Rafinosa

INU: Inulina

TABLA 12: RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS COINCIDENTES CON LAS CONVENCIONALES DEL SISTEMA VITEK PARA LAS CEPAS NO IDENTIFICADAS COMO *S. MUTANS*

***S. BOVIS***

Nº CEPAS	BAC	ESC	ARG	MAN	RAF	INU
18	+	+	-	+	+	-

***S. INTERMEDIUS***

Nº CEPAS	BAC	ESC	ARG	MAN	RAF	INU
2	-	-	-	-	+	-
2	+	+	+	+	-	-

TABLA 12 (continuación): RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS COINCIDENTES CON LAS CONVENCIONALES DEL SISTEMA VITEK PARA LAS CEPAS NO IDENTIFICADAS COMO *S. MUTANS*

**S. ANGINOSUS**

Nº CEPAS	BAC	ESC	ARG	MAN	RAF	INU
2	+	+	-	+	+	-
2	+	+	+	+	+	-

**S. SANGUIS II**

Nº CEPAS	BAC	ESC	ARG	MAN	RAF	INU
4	-	-	-	-	+	-

TABLA 12 (continuación): RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS COINCIDENTES CON LAS CONVENCIONALES DEL SISTEMA VITEK PARA LAS CEPAS NO IDENTIFICADAS COMO *S. MUTANS*

***S. SANGUISI***

Nº CEPAS	BAC	ESC	ARG	MAN	RAF	INU
2	+	+	-	-	-	-

***S. UBERIS***

Nº CEPAS	BAC	ESC	ARG	MAN	RAF	INU
6	+	+	-	+	-	-

TABLA 12 (continuación): RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS COINCIDENTES CON LAS CONVENCIONALES DEL SISTEMA VITEK PARA LAS CEPAS NO IDENTIFICADAS COMO *S. MUTANS*

***S. CONSTELLATUS***

Nº CEPAS	BAC	ESC	ARG	MAN	RAF	INU
4	+	+	-	-	-	-

***AEROCOCCUS***

Nº CEPAS	BAC	ESC	ARG	MAN	RAF	INU
2	-	+	-	+	-	-

BAC: Bacitracina

ESC: Esculina

ARG: Arginina

MAN: Manitol

RAF: Rafinosa

INU: Inulina

### 2.2.2. OBTENCION DE BIOTIPOS

A partir de los resultados obtenidos con la utilización del sistema API ZYM, se realizó una clasificación en biotipos de las cepas de nuestro estudio. Para ello se eligieron las tres enzimas (valina arilamidasa, fosfatasa ácida y  $\alpha$ -galactosidasa) que presentaban mayor variabilidad para la totalidad de cepas.

Gracias a la presencia o no de dichas enzimas se establecieron ocho biotipos clasificados del I al VIII.

Los resultados para la totalidad de las enzimas y cepas ensayadas se reflejan en la tabla 13. La tabla 14 recoge la clasificación en biotipos, así como el número de cepas y porcentaje de las mismas incluido en cada uno de ellos.

TABLA 13: RESULTADOS DE LA UTILIZACION DEL SISTEMA ENZIMATICO

API ZYM PARA LA TOTALIDAD DE CEPAS

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	BIOTP
1	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	VII
2	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	VII
3	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	VIII
4	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	VII
5	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	VII
6	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	IV
7	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	IV
8	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	VII
9	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	IV
10	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	VII
11	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	IV
12	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	IV
13	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	I
14	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	II
15	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	VI
16	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
17	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	VI
18	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	II
19	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	I
20	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V

21	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	VIII
22	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
23	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
24	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
25	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	VII
26	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
27	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
28	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	VIII
29	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	I
30	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	VI
31	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	VI
32	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	VII
33	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III
34	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
35	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
36	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	VI
37	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	V
38	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	III
39	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
40	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
41	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	I
42	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	I
43	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	IV
44	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	I
45	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	VI

46	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	IV
47	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	II
48	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	IV
49	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	I
50	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	II
51	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	VII
52	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
53	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	IV
54	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	I
55	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	IV
56	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	I
57	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
58	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	VII
59	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
60	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	V
61	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
62	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	VIII
63	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	VIII
64	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
65	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
66	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
67	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
68	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
69	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	VII
70	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V

71	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	VII
72	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	I
73	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	I
74	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	I
75	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	II
76	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
77	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	I
78	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	I
79	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	IV
80	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
81	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	VII
82	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	VII
83	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	VIII
84	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	VII
85	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	VII
86	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	IV
87	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	IV
88	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	VII
89	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	IV
90	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	VII
91	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	IV
92	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	IV
93	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	I
94	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	II
95	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	VI

96	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
97	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	VI
98	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	II
99	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	I
100	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
101	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	VIII
102	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
103	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
104	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
105	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	VII
106	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
107	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
108	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	VIII
109	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	I
110	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	VI
111	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	VI
112	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	VII
113	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III
114	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
115	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
116	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	VI
117	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	V
118	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	III
119	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
120	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V

121	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	I
122	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	I
123	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	IV
124	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	I
125	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	VI
126	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	IV
127	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	II
128	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	IV
129	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	I
130	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	II
131	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	VII
132	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
133	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	IV
134	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	I
135	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	IV
136	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	I
137	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
138	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	VII
139	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
140	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	V
141	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
142	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	VIII
143	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	VIII
144	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
145	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V

146	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
147	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
148	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
149	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	VII
150	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
151	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	VII	
152	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	I
153	-	-	+	+	-		-+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	I
154	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	I
155	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	II
156	-	-	+	+	-	+	-		+-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V
157	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	I
158	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	I
159	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	IV
160	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	V

- 1: CONTROL NEGATIVO      2: FOSFATASA ALCALINA      3: ESTERASA  
4: ESTERASA LIPASA      5: LIPASA      6: LEUCINA ARILAMIDASA  
7: VALINA ARILAMIDASA      8: CISTINA ARILAMIDASA      9: TRIPSINA  
10:  $\alpha$ -QUIMOTRIPSINA      11: FOSFATASA ACIDA      12: NAFTOL-FOSFOHIDROLASA  
13:  $\alpha$ -GALACTOSIDASA      14:  $\beta$ -GALACTOSIDASA      15:  $\beta$ -GLUCURONIDASA  
16:  $\alpha$ -GLUCOSIDASA      17:  $\beta$ -GLUCOSIDASA      18: N-ACETIL  $\beta$ -GLUCOSAMINIDASA  
19:  $\alpha$ -MANOSIDASA      20:  $\alpha$ -FUCOSIDASA      BIOTP: BIOTIPOS

TABLA 14: CLASIFICACION EN BIOTIPOS DE LAS 160 CEPAS DE  
*S. MUTANS*

	VALINA ARIL AMIDASA	FOSFATASA ACIDA	$\alpha$ -GALACTO- SIDASA	Nº	%
BIOTIPO I	+	+	+	28	17.5
BIOTIPO II	+	+	-	10	6.25
BIOTIPO III	+	-	-	4	2.5
BIOTIPO IV	+	-	+	22	13.75
BIOTIPO V	-	+	+	50	31.25
BIOTIPO VI	-	+	-	12	7.5
BIOTIPO VII	-	-	+	24	15
BIOTIPO VIII	-	-	-	10	6.25

### 2.2.3. ALTOS NIVELES DE RESISTENCIA A AMINOGLUCOSIDOS

En el estudio de altos niveles de resistencia a aminoglucósidos se obtuvo un resultado negativo para todas las cepas cuando fueron testadas a gentamicina, tobramicina, kanamicina y amikacina, a las distintas concentraciones empleadas.

Para estreptomina se encontraron 26 cepas (16.25%) resistentes a 500 $\mu$ g/ml, 16 (10%) resistentes a 1000 $\mu$ g/ml y 8 (5%) a 2000 $\mu$ g/ml.

Estos resultados se reflejan en las figuras 11 a 14.

FIGURA 11: ALTOS NIVELES DE RESISTENCIA A AMINOGLUCOSIDOS

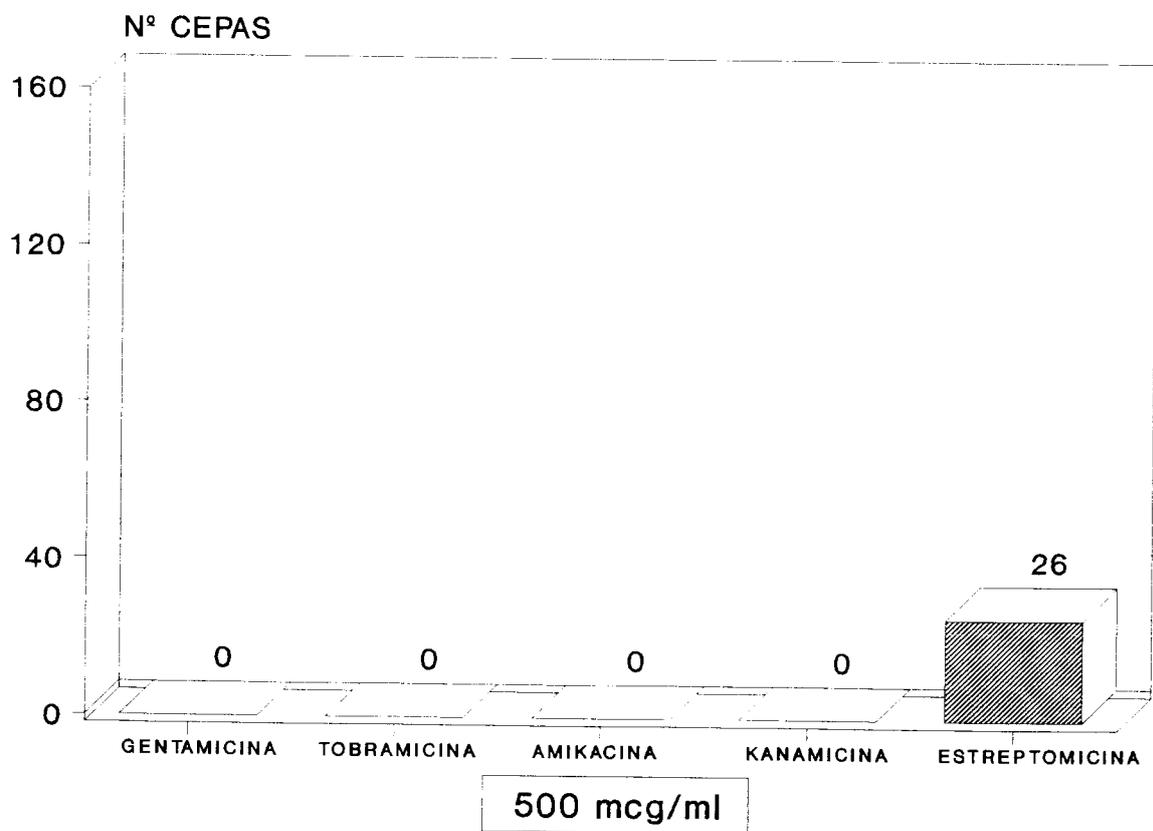


FIGURA 12: ALTOS NIVELES DE RESISTENCIA A AMINOGLUCOSIDOS

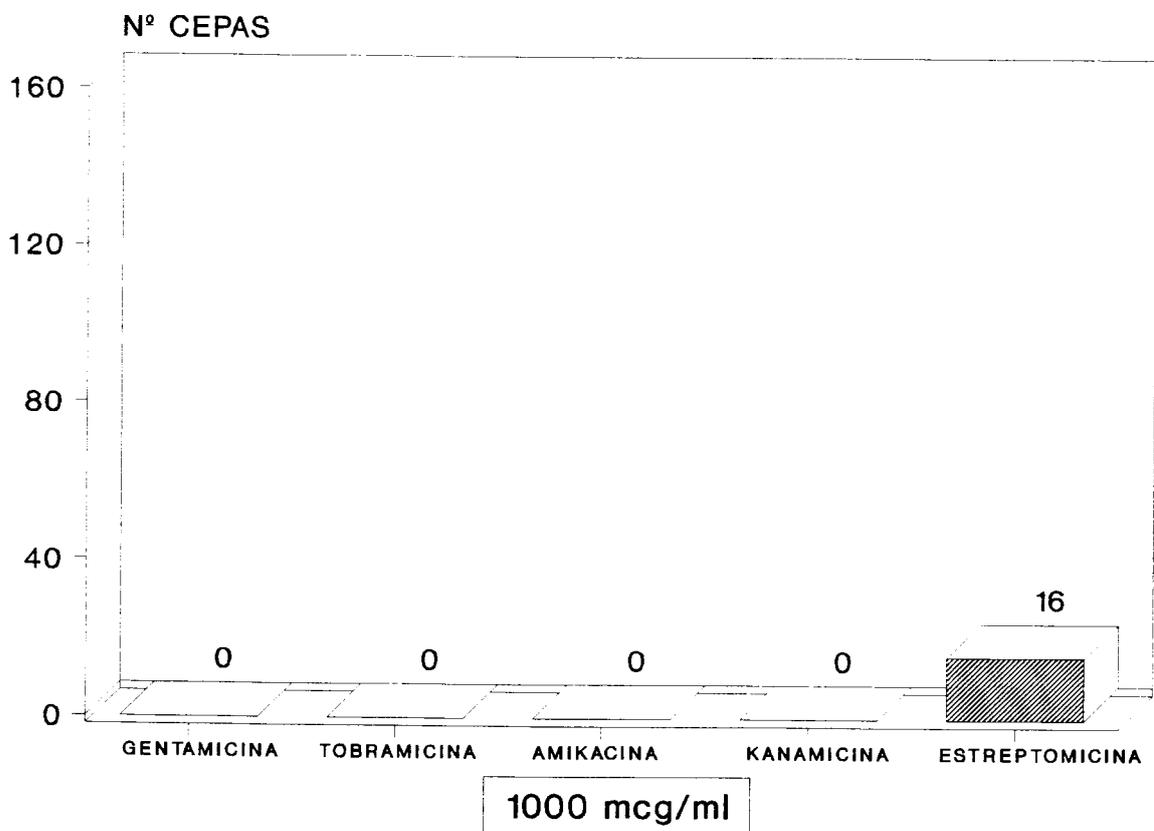


FIGURA 13: ALTOS NIVELES DE RESISTENCIA A AMINOGLUCOSIDOS

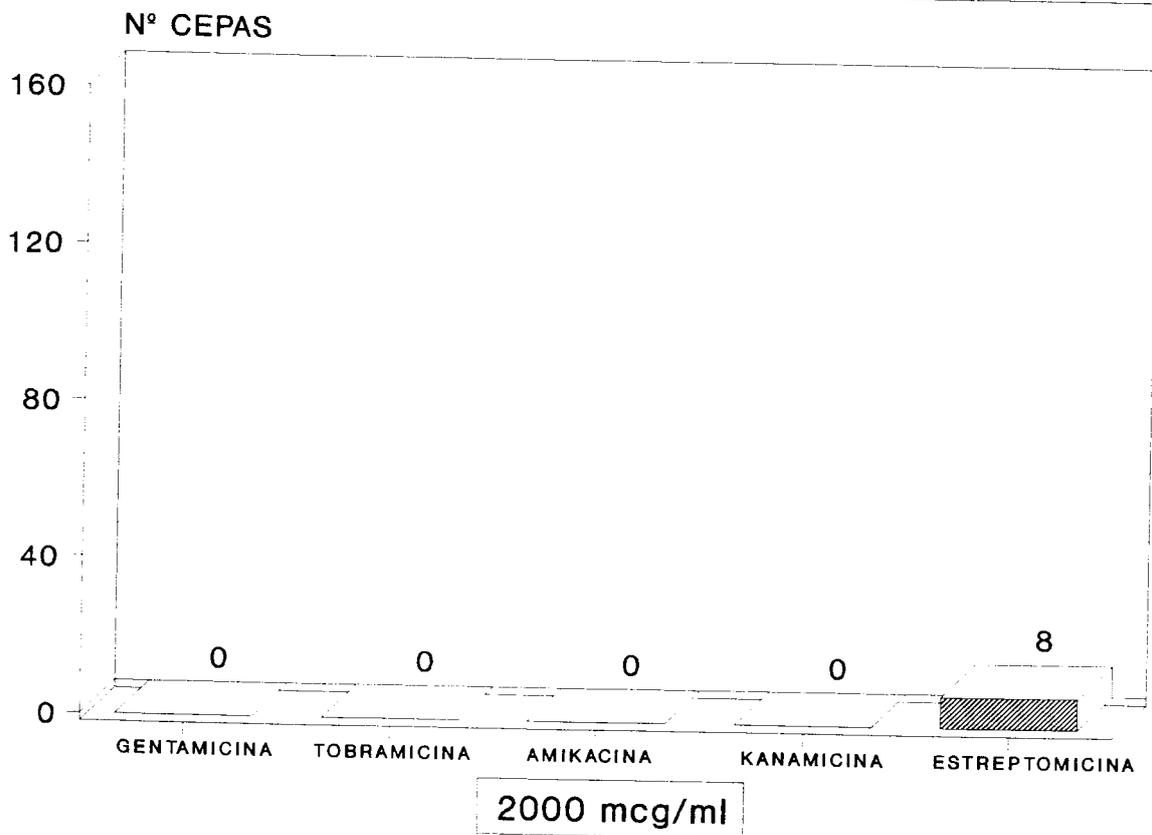
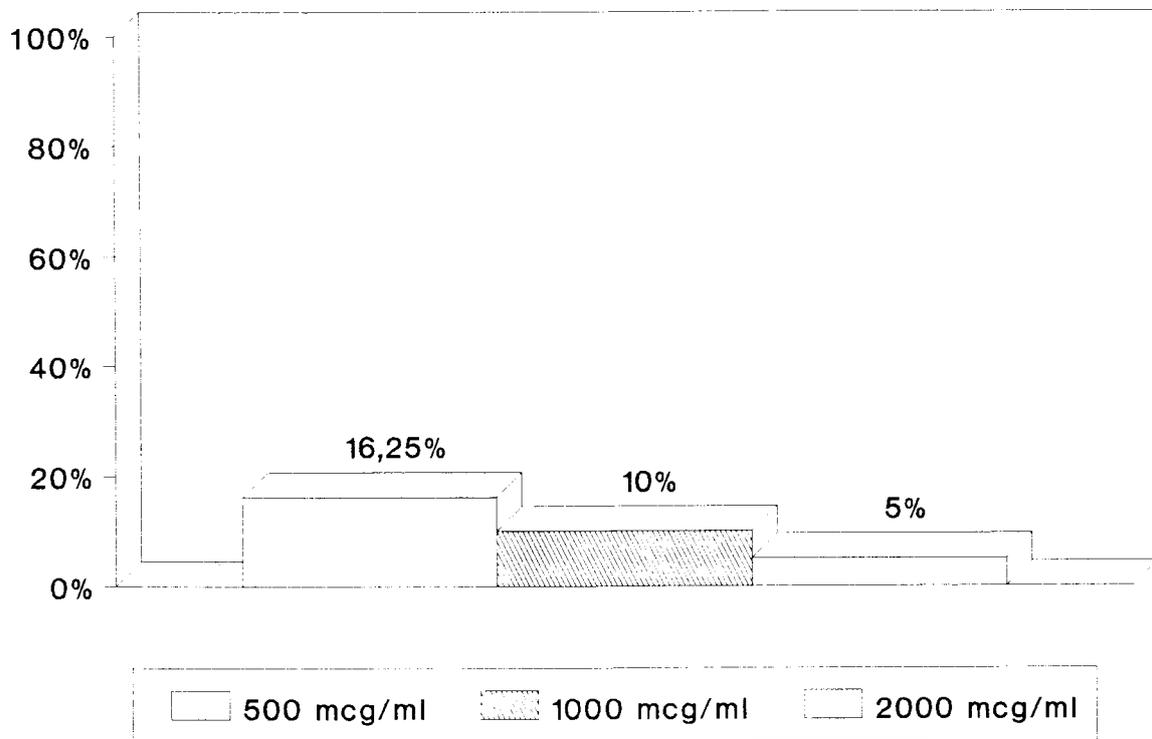


FIGURA 14: PORCENTAJE DE CEPAS CON ALTOS NIVELES DE RESISTENCIA A ESTREPTOMICINA



#### 2.2.4. TOLERANCIA A PENICILINA

En nuestro estudio obtuvimos 4 cepas de *S. mutans* tolerantes a penicilina, dos de las cuales presentaron una CMI de 0.03 $\mu$ g/ml y CMB  $\geq$  1 $\mu$ g/ml. Las dos restantes tuvieron una CMI de 0.25 $\mu$ g/ml y una CMB  $\geq$  8 $\mu$ g/ml.

Los resultados de CMI y la concordancia entre CMI/CMB de las distintas cepas, y el porcentaje de microorganismos tolerantes se refleja en las figuras 15 a 22.

FIGURA 15: CMI A PENICILINA DE LAS CEPAS ESTUDIADAS

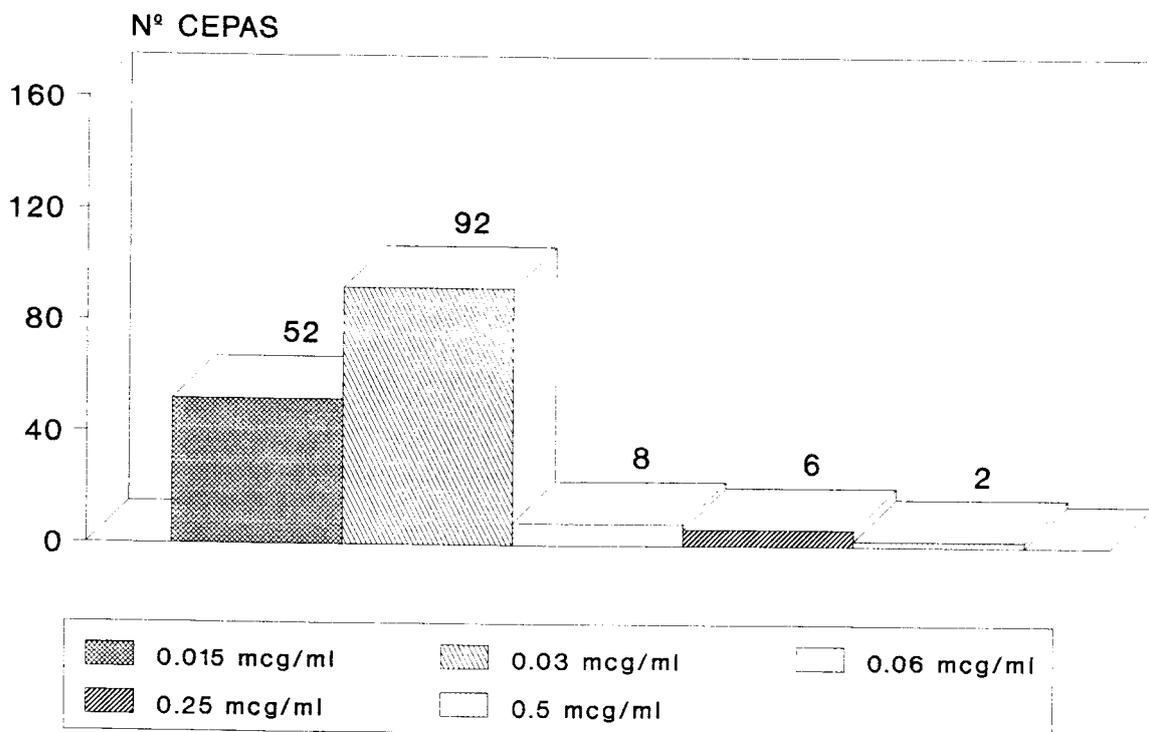
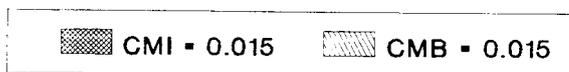
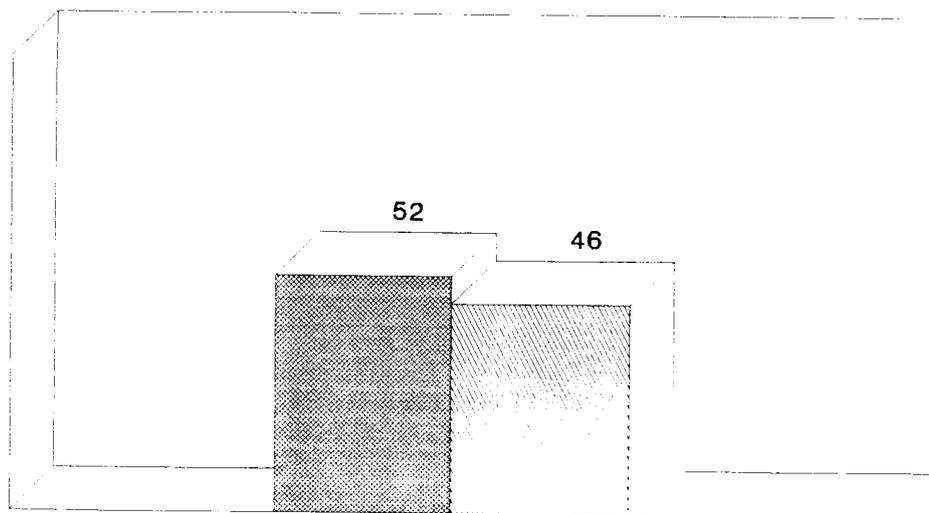
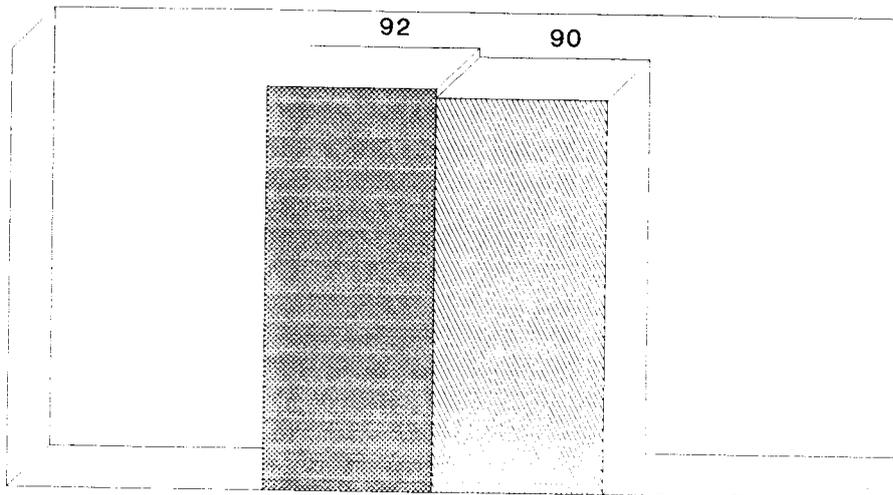


FIGURA 16: CONCORDANCIA CMI/CMB DE LAS CEPAS CON CMI DE 0.015 mcg/ml



Nº CEPAS	CMI	CMB
46	0.015	0.015
6	0.015	(2) 0.06 (4) 0.03

FIGURA 17: CONCORDANCIA CMI/CMB DE LAS CEPAS CON CMI DE 0.03 mcg/ml



CMI = 0.03
  CMB = 0.03

N° CEPAS	CMI	CMB
90	0.03	0.03
2	0.03	>1

FIGURA 18: CONCORDANCIA CMI/CMB DE LAS CEPAS CON CMI DE 0.06 mcg/ml

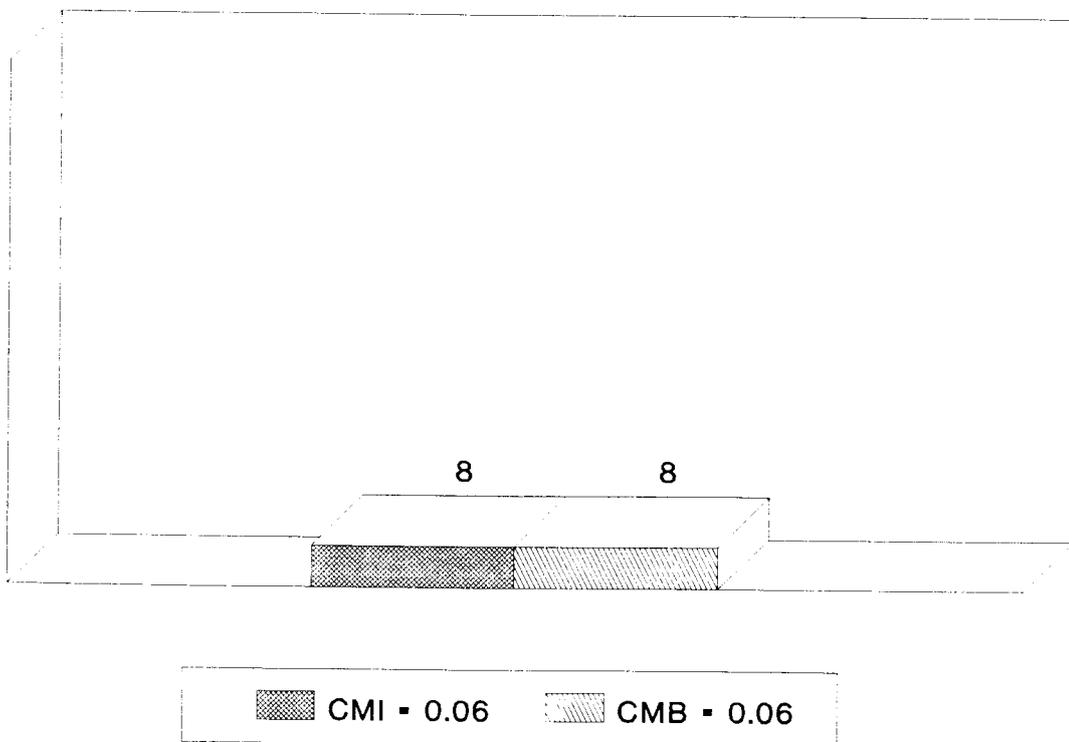
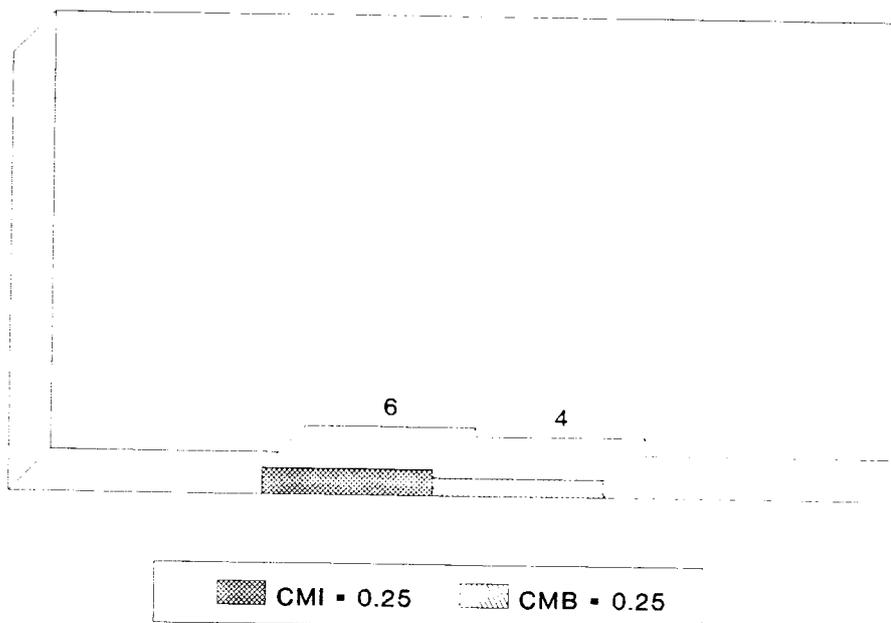
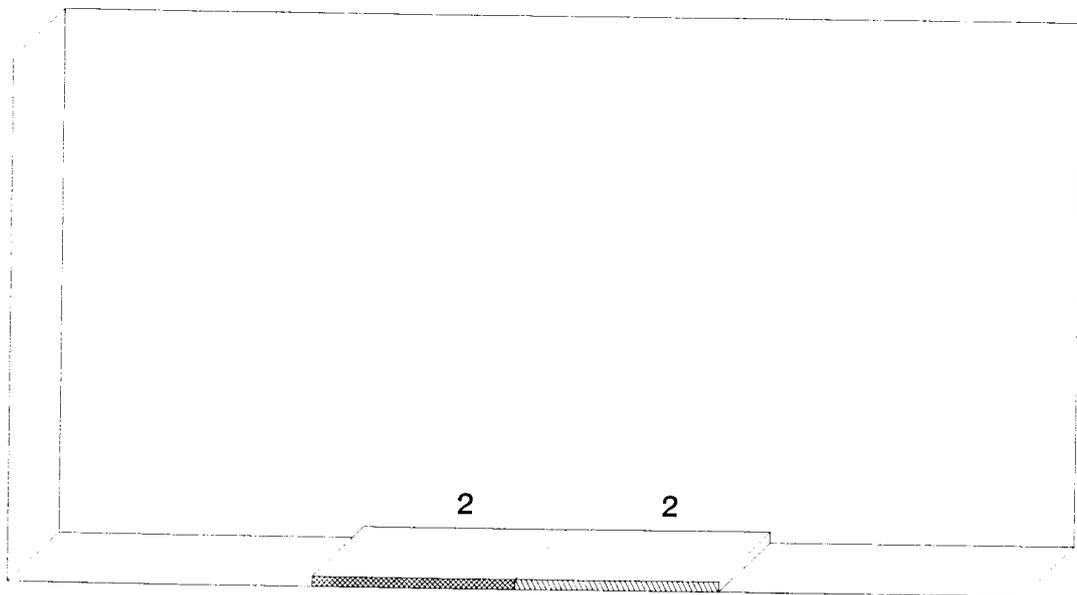


FIGURA 19: CONCORDANCIA CMI/CMB DE LAS CEPAS CON CMI DE 0.25 mcg/ml



Nº CEPAS	CMI	CMB
4	0.25	0.25
2	0.25	>8

FIGURA 20: CONCORDANCIA CMI/CMB DE LAS CEPAS CON CMI DE 0.5 mcg/ml



 CMI = 0.5       CMB = 0.5

FIGURA 21: PORCENTAJE DE CEPAS TOLERANTES A PENICILINA

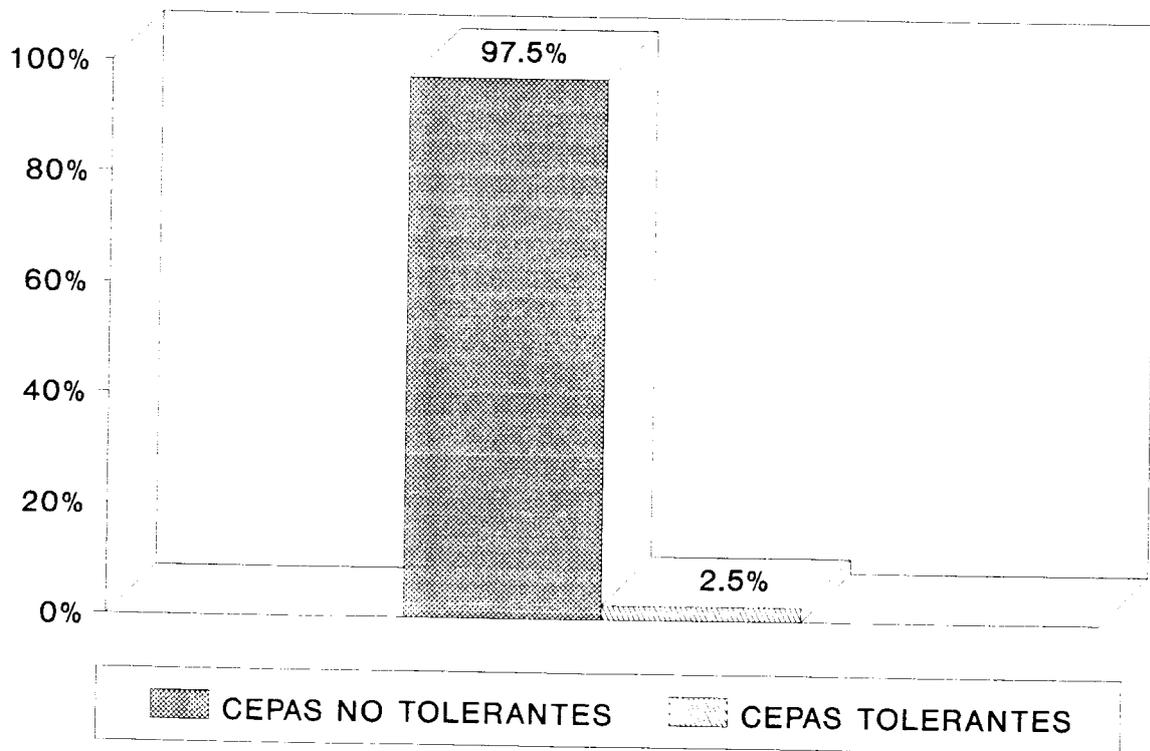
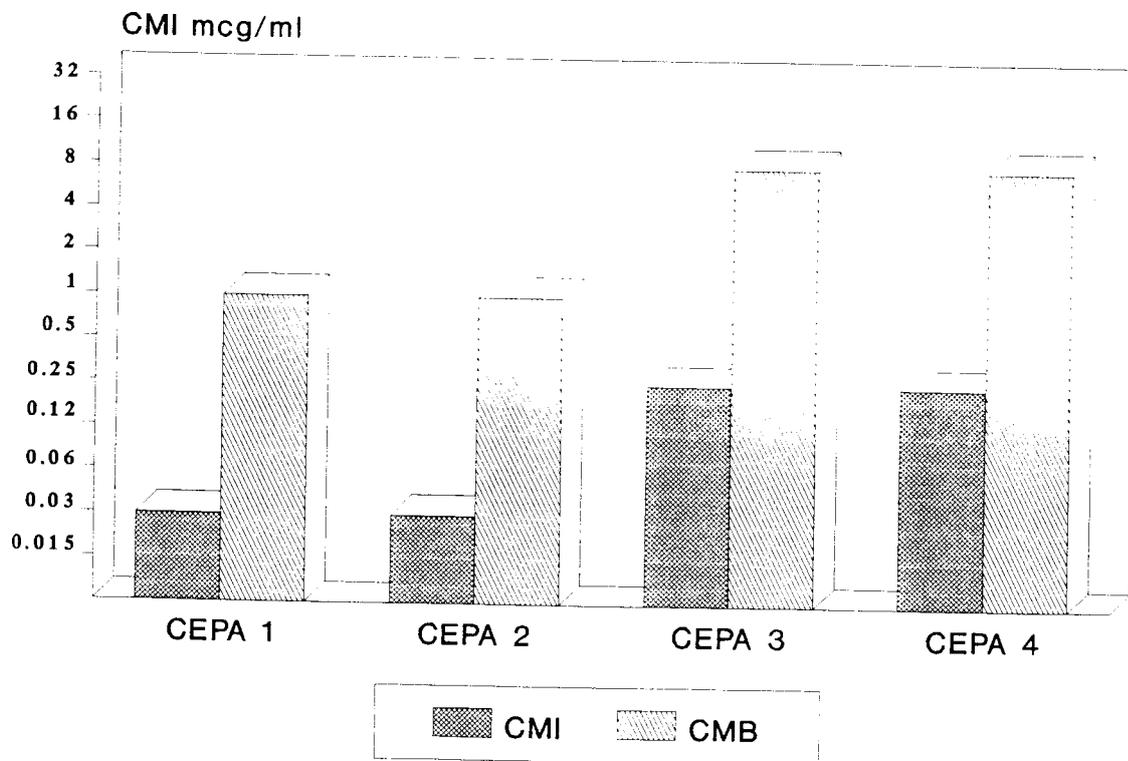


FIGURA 22: RELACION CMI/CMB DE LAS CEPAS TOLERANTES A PENICILINA



### 2.2.5. SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

Los valores de CMI de las 160 cepas estudiadas, así como la  $CMI_{50}$ ,  $CMI_{90}$  y media ( $\bar{X}$ ), para los antimicrobianos ensayados se reflejan en las tablas 15 a 21 y las figuras 23 a 25.

TABLA 15: EVALUACION DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE 160 CEPAS DE *S. MUTANS* A AMOXICILINA

	0,003	0,007	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5
Nº SIMPLE	12	10	32	60	30	6	4	6
Nº ACUMULATIVO	12	22	54	114	144	150	154	160
% ACUMULATIVO	7,5	13,75	33,75	71,25	90	93,75	96,25	100

CMI<sub>50</sub>: 0,0215

CMI<sub>90</sub>: 0,06

$\bar{X}$ : 0,0596

TABLA 16: EVALUACION DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE 160 CEPAS DE *S. MUTANS* A CEFAZOLINA

	0,007	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1
Nº SIMPLE	18	14	66	44	6	6	2	4
Nº ACUMULATIVO	18	32	98	142	148	154	156	160
% ACUMULATIVO	11,25	20	61,25	88,75	92,5	96,25	97,5	100

CMI<sub>50</sub>: 0,0259

CMI<sub>90</sub>: 0,07

$\bar{X}$ : 0,0761

TABLA 17: EVALUACION DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE 160 CEPAS DE *S. MUTANS* A ERITROMICINA

	0,007	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1
Nº SIMPLE	6	24	52	34	30	10	2	2
Nº ACUMULATIVO	6	30	82	116	146	156	158	160
% ACUMULATIVO	3,7	18,75	51,25	72,5	91,25	97,5	98,75	100

CMI<sub>50</sub>: 0,0294

CMI<sub>90</sub>: 0,116

$\bar{X}$ : 0,0818

TABLA 18: EVALUACION DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE 160 CEPAS DE *S. MUTANS* A CLINDAMICINA

	0,007	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1
Nº SIMPLE	8	46	34	58	4	4	2	4
Nº ACUMULATIVO	8	54	88	146	150	154	156	160
% ACUMULATIVO	5	33,75	55	91,25	93,75	96,25	97,5	100

CMI 50 : 0,0264

CMI 90 : 0,0589

$\bar{X}$ : 0,0732

TABLA 19: EVALUACION DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE 160 CEPAS DE *S. MUTANS* A IMIPENEM

	0,003	0,007	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1
Nº SIMPLE	12	22	50	34	6	2	22	10	2
Nº ACUMULATIVO	12	34	84	118	124	126	148	158	160
% ACUMULATIVO	7,5	21,25	52,5	73,75	77,5	78,75	92,5	98,75	100

CMI 50 : 0,0144

CMI 90 : 0,1690

$\bar{X}$ : 0,0941

TABLA 20: EVALUACION DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE 160 CEPAS DE *S. MUTANS* A VANCOMICINA

	0,007	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1
Nº SIMPLE	0	0	24	14	0	16	76	30
Nº ACUMULATIVO	0	0	24	38	38	54	130	160
% ACUMULATIVO	0	0	15	23,75	23,75	33,75	81,25	100

CMI 50 : 0,3355

CMI 90 : 0,7333

$\bar{X}$ : 0,4597

TABLA 21: EVALUACION DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE 160 CEPAS DE *S. MUTANS* A TEICOPLANINA

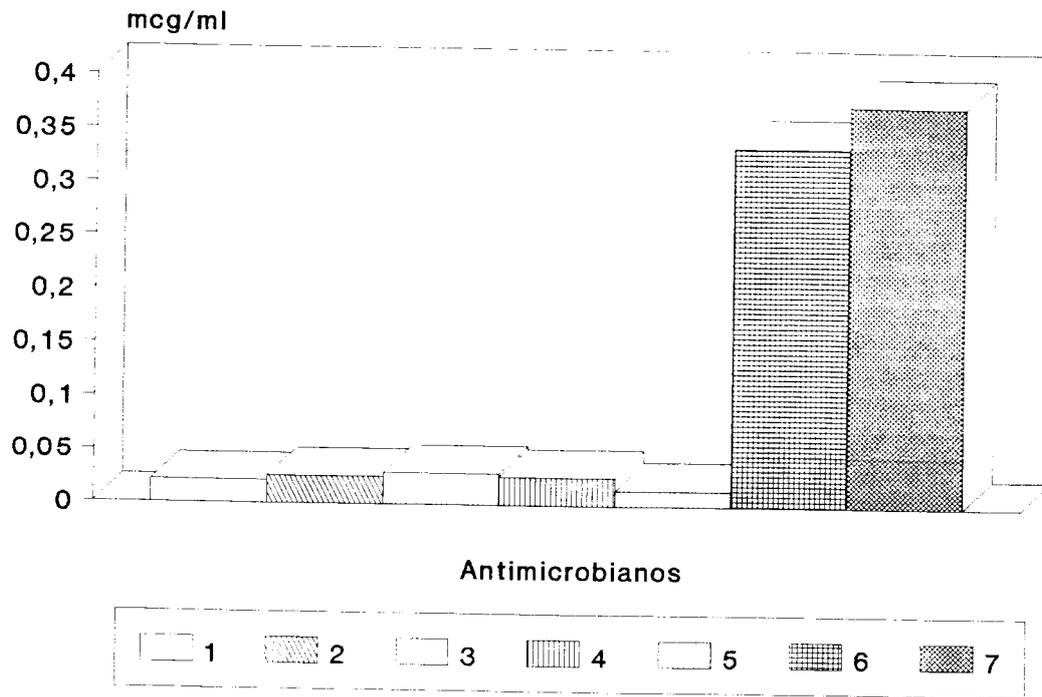
	0,007	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1
Nº SIMPLE	0	0	0	4	24	24	56	52
Nº ACUMULATIVO	0	0	0	4	28	52	108	160
% ACUMULATIVO	0	0	0	2,5	17,5	32,5	67,5	100

CMI<sub>50</sub> : 0,375

CMI<sub>90</sub> : 0,8461

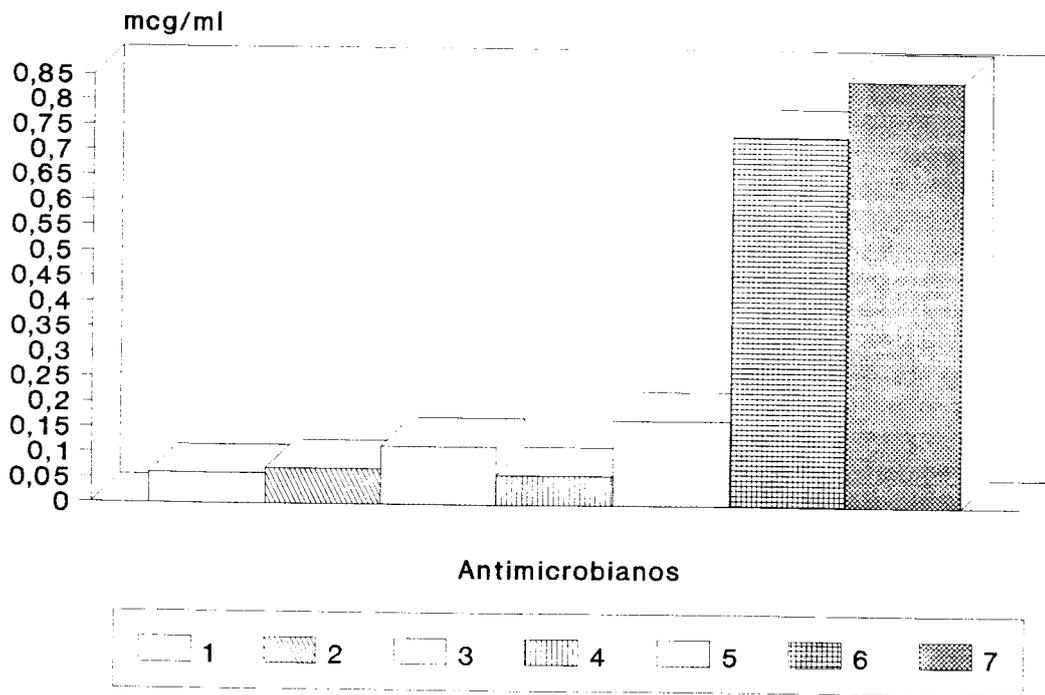
$\bar{X}$ : 0,557

FIGURA 23: CMI50 DE LAS CEPAS ESTUDIADAS A LOS ANTIMICROBIANOS ENSAYADOS



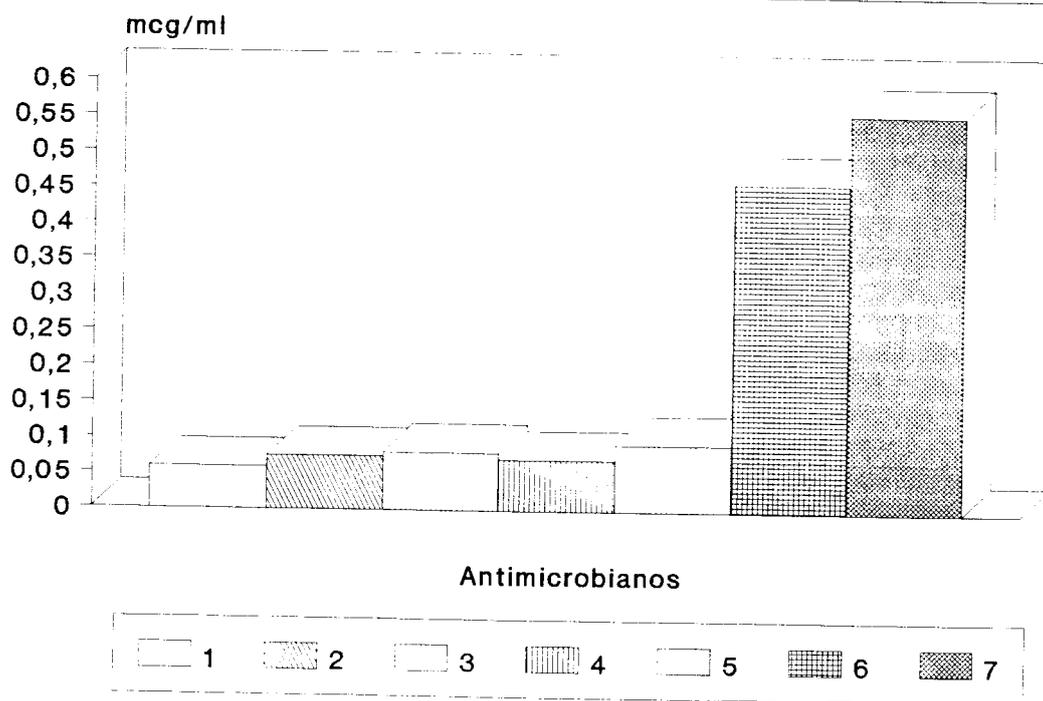
- 1: AMOXICILINA
- 2: CEFAZOLINA
- 3: ERITROMICINA
- 4: CLINDAMICINA
- 5: IMIPENEM
- 6: VANCOMICINA
- 7: TEICOPLANINA

**FIGURA 24: CMI90 DE LAS CEPAS ESTUDIADAS A LOS ANTIMICROBIANOS ENSAYADOS**



- 1: AMOXICILINA
- 2: CEFAZOLINA
- 3: ERITROMICINA
- 4: CLINDAMICINA
- 5: IMIPENEM
- 6: VANCOMICINA
- 7: TEICOPLANINA

FIGURA 25: MEDIA DE LAS CEPAS ESTUDIADAS  
A LOS ANTIMICROBIANOS ENSAYADOS



- 1: AMOXICILINA  
2: CEFAZOLINA  
3: ERITROMICINA  
4: CLINDAMICINA  
5: IMPENEM  
6: VANCOMICINA  
7: TEICOPLANINA

#### 2.2.6. PRODUCCION "IN VITRO" DE GLICOCALIX

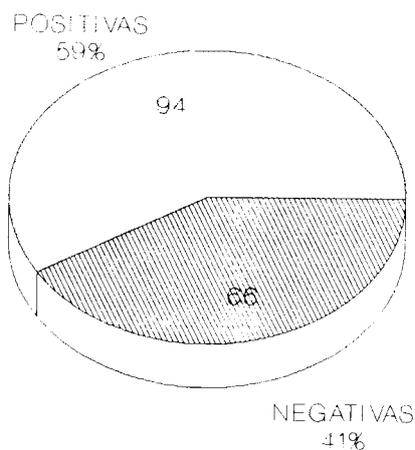
De las 160 cepas de *S. mutans* incluidas en nuestro estudio, un total de 94 produjeron glicocálix después de incubarse con suero fetal bovino o caldo Wilkins-Chalgren. En las restantes 66 cepas no se detectó la presencia de glicocálix tras su incubación en ninguno de los dos medios mencionados.

Estos resultados, así como el porcentaje obtenido de cepas productoras de glicocálix, se reflejan en la tabla 22 y figura 26.

TABLA 22: *S. MUTANS* Y PRODUCCION DE GLICOCALIX

GLICOCALIX	SUERO	CALDO	%
POSITIVO	94	94	58.75
NEGATIVO	66	66	41.25

FIGURA 26: PORCENTAJE DE CEPAS PRODUCTORAS DE GLICOCALIX



### 2.2.7. ANALISIS ESTADISTICO

Cuando aplicamos el test de  $\chi^2$  para comparar las variables biotipo y tolerancia, obtuvimos una relación estadísticamente significativa con  $p < 0.05$  para el biotipo II y la aparición de tolerancia a penicilina, aunque la muestra puede no ser representativa, por falta de tamaño suficiente.

Al analizar la posible relación entre los biotipos y la susceptibilidad a los antimicrobianos ensayados, encontramos asociación estadística significativa entre el biotipo IV y amoxicilina, cefazolina y eritromicina ( $p < 0.001$ ,  $0.001$  y  $0.01$ , respectivamente), en el sentido de una mayor susceptibilidad de las cepas de dichos biotipos. También encontramos asociación entre el biotipo V y vancomicina ( $p < 0.05$ ) y el biotipo I y teicoplanina ( $p < 0.05$ ), en ambos casos con una menor susceptibilidad a dichos antimicrobianos.

Al relacionar la producción de glicocálix y la susceptibilidad antimicrobiana hubo una asociación estadísticamente significativa entre las cepas con glicocálix y una mayor susceptibilidad a clindamicina y vancomicina ( $p < 0.001$  en ambos casos).

### 2.3. DISCUSSION

La aparición de cuadros de endocarditis bacteriana subaguda es un fenómeno que acontece con cierta frecuencia tras manipulaciones odontológicas, y que tiene como origen la bacteriemia que se produce como consecuencia de las mismas. En este proceso se hallan generalmente implicadas distintas cepas de especies de estreptococos orales, entre las que destacan *S. sanguis*, *S. mitis* y *S. mutans*<sup>152-155</sup>. Estos microorganismos, a través del torrente circulatorio, pueden alcanzar las válvulas cardíacas, asentándose generalmente sobre aquellas en las que existe una lesión previa (bien un proceso anterior de fiebre reumática, o una cardiopatía congénita), y en las que, a consecuencia de la misma, se han producido cambios en el endotelio vascular que han derivado en la denominada endocarditis trombótica no bacteriana (ETNB).

La colonización y persistencia de los estreptococos a nivel de la lesión es consecuencia de la interacción, tanto de factores del hospedador, como de los microorganismos implicados. Con relación a estos últimos, varios influyen en la evolución y pronóstico de la endocarditis bacteriana subaguda, así como en la profilaxis y el tratamiento de la misma. Se incluyen, la capacidad de las distintas cepas de estreptococos orales para elaborar productos extracelulares (glicocálix), así como la aparición de tolerancia a  $\beta$ -lactámicos, o altos niveles de resistencia a aminoglucósidos.

Todos estos fenómenos afectan al desarrollo de la endocarditis, por lo que es necesario conocer su presencia en aquellos estreptococos generalmente implicados en la misma, tal es el caso de *S. mutans*, especie a la que se circunscribe nuestro estudio. Este microorganismo es el principal patógeno relacionado con la caries dental,

y está presente en la cavidad oral de la mayoría de la población <sup>156</sup>. Este hecho implica que el riesgo de bacteriemias post manipulaciones dentales originadas por *S. mutans* sea muy elevado, lo cual unido a las especiales características de la endocarditis originada por el mismo, ha motivado su elección para la realización de este trabajo.

El primer problema que plantea el estudio de los estreptococos *viridans* es el de conseguir una adecuada identificación de los mismos. Como se comentó en el primer capítulo, dedicado a la revisión, estos microorganismos se han visto sometidos a un número muy importante de cambios taxonómicos, de forma que especies consideradas distintas han terminado siendo afines o viceversa, mientras que otras han desaparecido o se han integrado dentro de otros grupos <sup>154</sup>.

Todos estos cambios en la taxonomía han sido motivados por la aparición de nuevas técnicas de identificación en las que se incluyen, entre otros, estudios de homología de ácidos nucleicos y secuenciación de ARN, <sup>157,158</sup>, los cuales, con ayuda de otros parámetros, como la estructura antigénica o las propiedades fisiológicas, han contribuido a esclarecer, en parte y de forma todavía provisional, la clasificación de los estreptococos *viridans*.

En lo que se refiere a *S. mutans*, en la actualidad se halla integrado dentro de un grupo denominado *mutans* y que está constituido por siete especies (*S. mutans*, *S. rattus*, *S. cricetus*, *S. sobrinus*, *S. ferus*, *S. downei* y *S. macacae*), de las que únicamente las cuatro primeras, tienen importancia como patógenos humanos <sup>39,154</sup>.

Para llegar a la identificación de *S. mutans* nos basamos en una batería de pruebas convencionales que incluyó crecimiento en bilis esculina agar, hidrólisis de la esculina, hidrólisis de la arginina, fermentación de manitol, rafinosa e inulina y

resistencia a 2U de bacitracina. Estas pruebas permitieron diferenciar dicho estreptococo, tanto del resto de los incluidos en su grupo, como de todos aquellos que entran a formar parte de la microbiota normal de la cavidad oral.

Junto a estas pruebas convencionales, y basándonos en ellas como referencia, incluimos en nuestro estudio un sistema automatizado (Automicrobic System, Vitek, bioMérieux), que permite la identificación de las principales cepas de estreptococos implicadas en patología humana, además de otras bacterias grampositivas. Entre los estreptococos que son reconocidos por este sistema se encuentran *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *S. equisimilis*, *S. equi*, *S. zooepidemicus*, *S. anginosus*, *S. anginosus (S. milleri)*, *S. bovis*, *S. equinus*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. uberis*, *S. sanguis* I y II, *S. salivarius*, *S. constellatus*, *S. intermedius*, *S. acidominimus* y estreptococos del grupo G.

Entre las 32 pruebas que este sistema emplea para la identificación, se hallan la mayoría de las utilizadas de modo convencional, de forma que nos permite comparar los resultados obtenidos en las mismas con los de la batería clásica.

A este respecto, el Antimicrobic System (AMS), llegó a la identificación de *S. mutans* en un 72.5% de las cepas estudiadas, porcentaje bastante elevado en comparación con los resultados obtenidos por otros autores con este sistema de identificación<sup>159</sup>, aunque hay que tener en cuenta que su empleo nos permite llegar únicamente a la identificación de grupo, el cual incluye a las siete especies que lo forman, y no en particular a *S. mutans*. Del total de 114 cepas identificadas como tal por Vitek, tan solo un 24.14% (28) de las mismas se pudieron encuadrar, dentro de la

identificación convencional, como tales, mientras que las restantes, valorando solamente las pruebas del sistema automatizado que semejan las empleadas de forma convencional, no presentarían un patrón que permitiera identificarlas como pertenecientes al resto de las especies que constituyen el grupo *mutans*, aunque fueron identificadas como tales.

Al comparar los resultados de las pruebas empleadas en la batería manual con los ofrecidos para las mismas por el sistema automatizado, encontramos discrepancias ya que, aunque el 100% de las 114 cepas presentaron, según dicho sistema, resistencia a bacitracina y fermentación del manitol, otras pruebas tuvieron porcentajes menores de concordancia, siendo en la fermentación de la inulina, que resultó positiva en un 27.58% de las cepas, en la que se obtuvo la mayor discordancia.

El 27.5% (44) de las restantes cepas no fueron identificadas por Vitek como *S. mutans*. De ellas, la mayoría (40.9%) lo fueron como *S. bovis*, seguido de *S. uberis* (13.6%), *S. intermedius*, *S. anginosus*, *S. sanguis II*, *S. constellatus* (9.09%), *S. sanguis I* y *Aerococcus* (4,5%).

La posibilidad de que estas cepas pertenezcan a dichas especies queda descartada gracias a los resultados obtenidos en las pruebas convencionales. Así, en el caso de los estreptococos identificados como *S. bovis*, el crecimiento en bilis esculina agar, que fue negativo en las totalidad de las cepas, hace incorrecta esta identificación.

Con respecto a las dos cepas identificadas como *Aerococcus*, esta posibilidad queda anulada al ser ambas catalasa negativas, mientras que esta especie es, en la mayoría de los casos, catalasa positiva. Las restantes especies obtenidas son todas

ellas incapaces de fermentar el manitol, por lo que su identificación automatizada se consideró errónea.

En general, la identificación por Vitek no resultó plenamente satisfactoria, ya que los resultados de las pruebas a las que se someten las cepas no presentan correlación con los obtenidos en las realizadas de forma manual. Estas discrepancias, a nuestro entender, podrían estar motivadas por el tiempo de incubación que presentan en este sistema los microorganismos, el cual oscila entre 5 y 15 horas, y que en otras especies es suficiente para una correcta identificación, pero que en el caso de los estreptococos orales, y en particular de *S. mutans*, dadas sus características de crecimiento lento, puede no bastar para una lectura apropiada de las pruebas.

Con el fin de poder obtener una clasificación en biotipos de *S. mutans*, nos planteamos el empleo de una galería de pruebas enzimáticas (API ZYM, bioMérieux), que nos permitiera, dependiendo de la posesión o no de los diversos enzimas testados, distinguir distintos fenotipos en las cepas de nuestro estudio. De esta forma, y eligiendo aquellas enzimas en las que las discrepancias entre cepas eran mayores, se llegó a una clasificación en ocho biotipos. Las enzimas empleadas fueron valina arilamidasa, fosfatasa ácida y  $\alpha$ -galactosidasa. El biotipo aislado con mayor frecuencia fue el V (-,+,+), en el que se incluyen un 31.5% de las cepas, seguido del I (+,+,+) con un 17.5% del total de *S. mutans* estudiados. El biotipo que se encontró en menor proporción fue el III (+,-,-), del que sólo se aislaron 4 cepas, lo que corresponde a un 2.5%.

La clasificación en biotipos se planteó, tanto por su utilidad epidemiológica para el estudio de transmisibilidad de caries y relación manipulación estomatodontológica-bacteriemia-endocarditis, como por la posibilidad de que existieran distintos comportamientos de las cepas, en relación con los fenómenos que se iban a estudiar, y de que estas diferencias pudieran estar relacionadas con algún patrón común de comportamiento frente a diversos sustratos enzimáticos, es decir, con similares expresiones fenotípicas. El estudio estadístico posteriormente realizado confirmó nuestra hipótesis, encontrándose una asociación entre el biotipo y la susceptibilidad a antimicrobianos, según la cual las cepas pertenecientes al biotipo IV muestran mayor sensibilidad a amoxicilina, cefazolina y eritromicina, mientras que las pertenecientes a los biotipos V y I son más resistentes a vancomicina y teicoplanina, respectivamente.

Los aminoglucósidos, en concreto estreptomina y gentamicina, se emplean con frecuencia en la endocarditis originada por estreptococos *viridans*, asociados generalmente a penicilina sobre todos en los casos en que los microorganismos son moderadamente resistentes a esta última, dado el sinergismo que acontece, tanto "in vitro" como "in vivo" al utilizar esta combinación<sup>117</sup>. El empleo de otros aminoglucósidos, en el tratamiento de la endocarditis, como tobramicina o kanamicina no es habitual, ya que estos no presentan ninguna ventaja terapéutica con respecto a los mencionados en lo que respecta a su sinergismo con penicilina<sup>160</sup>.

La aparición de cepas de estreptococos *viridans* que poseen resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos es un fenómeno, que aunque no aparece de forma tan

frecuente como en otras especies, por ejemplo *Enterococcus spp.*<sup>117,161</sup>, es necesario estudiar, ya que de él puede depender el fracaso de la terapia antimicrobiana en la endocarditis.

Los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) que definen el punto de corte en el que establecer si una cepa presenta o no altos niveles de resistencia (ANR), varían dependiendo de la bibliografía revisada. Así, mientras que para unos autores valores de CMI  $\geq 500\mu\text{g/ml}$  serían indicativos de resistencia de alto nivel<sup>38</sup>, para otros dichos valores deberían ser  $\geq 1000\mu\text{g/ml}$  e incluso  $\geq 2000\mu\text{g/ml}$ <sup>117,161</sup>. Aunque el establecimiento de una concentración de antibiótico que sirva de frontera para determinar la existencia o no de ANR es difícil, parece que lo ideal sería considerar como punto de corte aquella CMI a partir de la cual desaparezca el fenómeno de sinergismo entre penicilina y aminoglucósidos, derivando por tanto en un fracaso terapéutico<sup>117</sup>.

La aparición de ANR a aminoglucósidos generalmente está mediada por enzimas que modifican los mismos y cuya síntesis está codificada genéticamente. Estas enzimas realizan una conjugación del aminoglucósido con un grupo acetilo, adenilo o fosforilo, por lo que se denominan acetiltransferasas, adeniltransferasas y fosfotransferasas. Existe una gran variedad de dichas enzimas, y dependiendo de sus características, su efecto puede afectar a uno o varios aminoglucósidos<sup>161,162</sup>.

Aunque este mecanismo de resistencia es el más frecuente, también se ha descrito un tipo de resistencia ribosomal a la estreptomina dependiente de una proteína específica aberrante (S12) de la subunidad ribosomal menor<sup>163,164</sup>.

En nuestro estudio, las 160 cepas de *S. mutans* fueron testadas para concentraciones de 500, 1000 y 2000  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomicina, gentamicina, tobramicina, kanamicina y amikacina. Nuestro propósito fue evaluar la posible aparición de resistencia a las diversas concentraciones ensayadas, ver si existían diferencias entre ellas y valorar la presencia de resistencias cruzadas entre los diversos aminoglucósidos probados.

Tan solo se obtuvieron cepas con ANR para estreptomicina. A concentraciones de 500  $\mu\text{g/ml}$  un total de 26 cepas (16.25%) fueron resistentes, descendiendo dicho número a 16 cepas (10%) para 1000  $\mu\text{g/ml}$  y 8 (5%) cuando empleamos 2000  $\mu\text{g/ml}$ .

Estos resultados no difieren significativamente de los obtenidos por otros autores para estreptococos *viridans*, y que oscilan entre un 2 y un 7,9%<sup>117,165</sup>.

El hecho de que ninguna cepa presentara resistencia cruzada con otros aminoglucósidos, apoya la posibilidad de que en nuestro caso el mecanismo de resistencia pueda ser, bien una adeniltransferasa que inactive únicamente la estreptomicina, ya descrita para *Enterococcus spp.*<sup>161</sup>, o una alteración ribosomal del tipo anteriormente mencionado.

El término de tolerancia se aplica en aquellos casos en los que un microorganismo presenta niveles de CMB significativamente mayores que los de su CMI (relación  $\text{CMB/CMI} \geq 32$ )<sup>100,122</sup>, lo que determina que las bacterias tolerantes mueran mucho más lentamente que las no tolerantes. Los valores de CMI de dichas bacterias, a diferencia de lo que ocurre con la aparición de resistencia, no se ven alterados en

este fenómeno<sup>100</sup>. Este concepto no puede aplicarse para fármacos cuya acción sea bacteriostática.

Los microorganismos que poseen esta característica presentan una alteración en la actividad de enzimas autolíticas, en concreto, el fenómeno de tolerancia a  $\beta$ -lactámicos se relaciona con el déficit de mureín-hidrolasa, enzima que interviene en los fenómenos de lisis bacteriana que acontecen una vez que el  $\beta$ -lactámico se une a las proteínas fijadoras de penicilina de la pared bacteriana<sup>100,123,134,166</sup>.

Este fenómeno puede ser estudiado en el laboratorio, aunque la estandarización del método a emplear para ello es de gran importancia, ya que de ella dependen la reproductibilidad de los resultados y la posibilidad de estudios comparativos entre distintos autores<sup>134,149</sup>.

Desde el aislamiento de las primeras cepas tolerantes a la actualidad, cada vez son más las especies en la que se ha demostrado la presencia de este fenómeno, siendo común entre los estreptococos obtenidos de surco gingival y de hemocultivos post extracción dental<sup>167</sup>. Su aparición en cepas productoras de endocarditis también se detecta en nuestro país<sup>100</sup>.

El mayor porcentaje de cepas tolerantes se ha encontrado en *S. sanguis*, sobretodo en el tipo I<sup>168</sup>, *S. mitior* (actualmente *S. mitis*) y *S. mutans*, las especies con una mayor implicación en el desarrollo de endocarditis<sup>123</sup>.

Aunque inicialmente se pensó que la aparición de tolerancia no tenía repercusión clínica alguna<sup>169</sup>, en la actualidad se cree, dada la asociación existente entre especies tolerantes y endocarditis, que este fenómeno puede estar implicado en la evolución del proceso<sup>123,166</sup>.

La tolerancia puede asociarse a fallo en la terapia con penicilina en circunstancias como la endocarditis, en la que la actividad bactericida es un requisito para el éxito del tratamiento<sup>149,166</sup>. Se ha demostrado que las cepas tolerantes presentan una menor respuesta a la penicilina con respecto a las que no lo son, incluso cuando ésta se administra asociada a estreptomina<sup>121,170</sup>.

También existen diversos estudios en los que se pone de manifiesto que la tolerancia a penicilina es un factor que determina el fallo de la profilaxis con una sola dosis de amoxicilina en pacientes con riesgo de desarrollar endocarditis<sup>100,121,123</sup>. Utilizando un modelo experimental, Pujadas y col.<sup>100</sup> han confirmado este hecho, demostrando que, cuando la bacteriemia post manipulación dental es muy intensa, una única dosis con amoxicilina no es útil ante microorganismos tolerantes, por lo que en estos casos es aconsejable emplear otra segunda dosis o realizar la profilaxis con amoxicilina más estreptomina por vía parenteral.

Dada la importancia y trascendencia en la profilaxis y tratamiento de la endocarditis estreptocócica que posee el fenómeno de tolerancia a  $\beta$ -lactámicos, nos planteamos su determinación en nuestras cepas, para lo cual utilizamos el método de macrodilución en medio líquido, que parece ser el que ofrece mayor reproductibilidad de los empleados hasta el momento<sup>149</sup>.

Del total de cepas estudiadas, tan solo cuatro (2.5%) presentaron una relación  $CMB/CMI \geq 32$ , es decir, fueron tolerantes a penicilina. De ellas, dos tenían su CMI en  $0.03 \mu\text{g/ml}$ , mientras que en las dos restantes estaba en  $0.25 \mu\text{g/ml}$ , presentando por tanto una sensibilidad moderada al antibiótico.

Estos valores son sensiblemente inferiores a los obtenidos por otros autores. Al revisar la bibliografía se señalan porcentajes de tolerancia que oscilan desde un 11%<sup>171</sup> a un 50%<sup>123</sup>, pasando por valores intermedios como 27%<sup>167</sup>.

Entre los factores que pueden explicar estas discrepancias se hallan la ya referida dificultad en la reproductibilidad de los datos, sobretodo cuando se emplean distintos métodos de detección y el hecho de que en la mayoría de los estudios el mayor porcentaje de cepas estudiadas pertenezca a la especie *S. sanguis*. Aún en los casos en que se refleja la tolerancia de *S. mutans*, no está claro si esa denominación recoge a la totalidad del grupo o sólo a esta especie<sup>167</sup>. Por último, existe la posibilidad de que en nuestra área geográfica el fenómeno estudiado presente una menor incidencia.

La mayoría de los estreptococos implicados en el desarrollo de endocarditis subaguda presentan buenos patrones de sensibilidad a los antimicrobianos de uso común, tanto en profilaxis como en tratamiento de la misma<sup>29,147,172</sup>. Los  $\beta$ -lactámicos han constituido clásicamente la base de la terapéutica en dicho proceso, ya que los microorganismos implicados en el mismo mantienen excelentes niveles de susceptibilidad a este grupo de antibióticos<sup>165,172</sup>. Junto a estos fármacos, se utilizan otros que, asociados a ellos o sustituyéndolos, también han demostrado su eficacia.

Entre estos antimicrobianos hay que destacar el uso de agentes bacteriostáticos, como la eritromicina o clindamicina, en la profilaxis de la bacteriemia post extracción dental<sup>173,174</sup>. Su empleo está basado en experiencias que ponen de manifiesto que su administración es capaz de prevenir dicha bacteriemia, mediante un

mecanismo distinto al de la lisis bacteriana, y que podría basarse en una inhibición de la adherencia de los estreptococos a las válvulas cardíacas<sup>102,174</sup>.

Las cefalosporinas, en particular la cefazolina, pueden ser una alternativa en el tratamiento de la endocarditis, al comportarse los estreptococos *viridans*, en general, como sensibles a las mismas<sup>175</sup>.

La vancomicina y teicoplanina también se emplean en sujetos con alergia a penicilina, mostrándose útiles tanto en profilaxis como en tratamiento<sup>176,177</sup>.

El imipenem y otros carbapenemas se han demostrado activos, solos o en combinación con aminoglucósidos, en el tratamiento de la endocarditis estreptocócica, por lo que podrían constituir una alternativa en pacientes que presenten alergia a la penicilina<sup>114,178,179</sup>, y en el tratamiento hospitalario de la misma.

De todos los estreptococos orales, *S. mutans* se ha comportado clásicamente como uno de los más susceptibles a los antimicrobianos, tanto los aislados de placa dental, como de pacientes con endocarditis infecciosa<sup>144,145,172</sup>.

En nuestro trabajo estudiamos la susceptibilidad de esta especie a diversos antimicrobianos de uso frecuente o posible en profilaxis y tratamiento de la endocarditis subaguda, tales como: amoxicilina, cefazolina, eritromicina, clindamicina, imipenem, vancomicina y teicoplanina.

La totalidad de las cepas presentaron valores de CMI inferiores a los puntos de corte para los antibióticos ensayados. Únicamente diez cepas mostraron sensibilidad intermedia a la amoxicilina (cuatro con CMI en 0.25µg/ml y seis en 0.5µg/ml). Dos cepas mostraron sensibilidad intermedia a eritromicina y cuatro a clindamicina (CMI en 1µg/ml).

Comparando las  $CMI_{50}$  de los distintos antimicrobianos ensayados, los que presentan niveles menores son imipenem, amoxicilina y clindamicina. Los valores más bajos de  $CMI_{90}$  los ofrecen clindamicina, amoxicilina y cefazolina.

Estos resultados son similares a los reflejados por otros autores en relación con la susceptibilidad de estreptococos orales, confirmando la baja tasa de aparición de resistencias en estos microorganismos. También coinciden con estudios previamente realizados en nuestro medio <sup>29,147</sup>, en el mejor comportamiento de clindamicina con respecto a eritromicina, y por tanto, apoyan su elección para profilaxis de endocarditis estreptocócica.

En la patogenia de la endocarditis originada por estreptococos *viridans*, la interacción entre estos microorganismos y la válvula cardíaca dañada es un punto crucial en el desarrollo del proceso. La capacidad de determinados estreptococos de este grupo, en concreto *S. mutans*, *S. sanguis* y *S. mitis*, para adherirse a la matrix extracelular del endotelio cardíaco, explica en parte la alta incidencia de endocarditis producida por los mismos <sup>94,95</sup>. Esta capacidad está en relación con la elevada producción de exopolisacárido (glicocáliz) que presentan estas especies <sup>95</sup>.

Los estreptococos que elaboran abundante glicocáliz forman mayores vegetaciones que los no productores <sup>101</sup>. Este hecho puede ser consecuencia directa de la existencia de un mayor número de microorganismos adherido a la superficie valvular, o deberse a un mayor depósito de plaquetas y fibrina <sup>180</sup>. A nivel de la vegetación cardíaca hay dos tipos de poblaciones microbianas, una profunda que se halla en fase de reposo, y otra más superficial en la que los microorganismos están en

fase de crecimiento. Sólo esta última es susceptible de ser erradicada durante el tratamiento con  $\beta$ -lactámicos y aminoglucósidos, por lo que todo factor que contribuya a un aumento del grosor de la vegetación dificulta la esterilización de la misma <sup>101</sup>.

A este respecto, se ha demostrado que la formación de vegetaciones cardíacas de gran tamaño dificulta, no sólo la llegada del antibiótico a las mismas, sino también la actuación de los mecanismos de defensa del hospedador (complemento, anticuerpos, células fagocíticas), contribuyendo a la persistencia en el tiempo de la lesión y a una mayor dificultad en la curación del proceso <sup>96,101,151,181</sup>.

La producción "in vitro" de glicocálix refleja de la capacidad de los estreptococos para generarlo a nivel cardíaco, por lo que su detección presenta un valor potencial como predictor de la patogenicidad de las cepas en las que la prueba sea positiva <sup>95</sup>. No se han demostrado únicamente variaciones en la cantidad de exopolisacárido producido por las cepas causantes de endocarditis <sup>101</sup>, sino que hay estudios que reflejan la existencia de diferencias, tanto cuantitativas como cualitativas, entre el glicocálix de los estreptococos productores de endocarditis y el de los que no suelen asociarse con este cuadro <sup>182</sup>.

Todos estas circunstancias nos llevaron a plantearnos la necesidad de conocer el número de microorganismos capaces de producir glicocálix, y por tanto cuadros más rebeldes de endocarditis <sup>183</sup>, entre las 160 cepas de *S. mutans* de nuestro estudio, así como la posible influencia "in vitro" de su producción en los valores de CMI a los antimicrobianos ensayados.

Para ello empleamos el test descrito por Molisch para la detección de glicocálix, y de forma paralela, lo aplicamos sustituyendo el suero fetal bovino por caldo Wilkins-

Chalgren, el mismo medio de cultivo empleado para la investigación de la susceptibilidad a antimicrobianos. Nuestro propósito era comprobar si las cepas productoras de glicocálix eran capaces de poner de manifiesto dicha característica cuando se inoculaban en el medio de cultivo mencionado, ya que de esa forma podríamos correlacionar la presencia de exopolisacárido con posibles cambios en los valores de CMI.

En un 58.75% de las cepas se detectó producción de glicocálix, mientras que las restantes (41.25%) dieron un resultado negativo. En todas ellas existió concordancia entre los dos medios de cultivo empleados.

Cuando se aplicó el test de  $\chi^2$  para ver la posible relación de las CMI a antimicrobianos y la producción de glicocálix, no encontramos significación estadística para la mayoría de los antibióticos, salvo para clindamicina y vancomicina, en el sentido de una mayor susceptibilidad a éstas entre las cepas productora de glicocálix. Estos datos confirman, salvo para los dos antibióticos mencionados, lo referido por otros autores en relación a que la susceptibilidad "in vitro" de las cepas que elaboran exopolisacárido no es distinta de la de aquellas que no lo producen, ya que el fallo en el tratamiento no se relaciona con cambios en sus CMI, sino con una menor accesibilidad del antibiótico a nivel del foco cardíaco<sup>101</sup>. La asociación de la producción de glicocálix con la mayor susceptibilidad a clindamicina y vancomicina es un fenómeno de difícil explicación, aunque es posible que pueda deberse al azar.

**CAPITULO TERCERO:  
CONCLUSIONES**

1<sup>a</sup>.- El método clásico convencional, con los test de crecimiento en bilis esculina agar, hidrolisis de la esculina, fermentación de manitol, rafinosa e inulina y resistencia a 2U de bacitracina, proporciona mejores resultados que el sistema automatizado Antimicrobic System<sup>®</sup> en la identificación de *Streptococcus mutans*.

2<sup>a</sup>.- Con el sistema AMS<sup>®</sup> se obtiene un buen porcentaje de identificaciones de *Streptococcus mutans*, pero no permite detectar la totalidad de las cepas, ni llegar a la clasificación de especies del Grupo *mutans*, no existiendo, por otra parte, correlación absoluta entre las pruebas comunes del sistema y del método convencional.

3<sup>a</sup>.- Cepas de *Streptococcus mutans* identificadas como tales por el método clásico, lo fueron por el sistema automatizado AMS<sup>®</sup> como *Streptococcus bovis*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus sanguis* I y II, *Streptococcus constellatus* y *Aerococcus*.

4<sup>a</sup>.- Utilizando la galería de pruebas enzimáticas API ZYM<sup>®</sup>, y en función de la elección de las enzimas valina arilamidasa, fosfatasa ácida y  $\alpha$  galactosidasa, se propone un esquema de clasificación para *Streptococcus mutans* en ocho biotipos, codificados con números romanos. Esta tipificación puede aportar importantes datos epidemiológicos de transmisibilidad de caries y de la relación manipulación odontoestomatológica-bacteriemia-endocarditis. En el estudio efectuado, el biotipo más frecuente fué el V, habiendo mostrado además, alguno de los biotipos, una relación estadísticamente significativa con una mayor sensibilidad a los antibióticos.

5ª.- Sólo algunas cepas de *Streptococcus mutans* presentan altos niveles de resistencia a estreptomina a concentraciones de 500 µg/ml, descendiendo su número con 1000 y 2000 µg/ml. No apareció resistencia cruzada con los restantes aminoglucósidos ensayados: gentamicina, tobramicina, amikacina y kanamicina.

6ª.- Por el método de macrodilución en medio líquido se ha detectado un número muy reducido de cepas de *Streptococcus mutans* tolerantes a penicilina. Esta discrepancia con los datos de otros autores, probablemente esté motivada por problemas en la reproductibilidad de los resultados entre los diversos laboratorios, el carácter geográfico del estudio, y la falta de criterios objetivos a la hora de separar la especie *Streptococcus mutans* del Grupo *mutans*.

7ª.- En el estudio de la susceptibilidad "in vitro" de *Streptococcus mutans* a los antibióticos amoxicilina, cefazolina, eritromicina, clindamicina, vancomicina y teicoplanina, no se han detectado cambios significativos con respecto a trabajos anteriores realizados en nuestro medio. Todos los microorganismos estudiados han mostrado una excelente sensibilidad, siendo las CMI<sub>50</sub> más bajas para imipenem, amoxicilina y clindamicina. Los valores inferiores de CMI<sub>90</sub> los presentaron clindamicina, amoxicilina y cefazolina.

8ª.- La producción "in vitro" de glicocálix por *Streptococcus mutans*, proporcionó resultados concordantes al realizarse tanto por el test de Molisch, como en caldo Wilkins-Chalgren, siendo esta última una técnica menos costosa. Por ambas

metodologías, más de la mitad de las cepas produjeron glicocálix, aunque estas cifras, en función de la pérdida del mismo en los subcultivos, debe ser superior "in vivo".

9ª.- Según el análisis estadístico, las cepas con glicocálix no son "in vitro" menos sensibles a los antibióticos, siendo, al contrario, más susceptibles a vancomicina y clindamicina. Aunque estos hechos parecerían indicar que el fracaso terapéutico en la endocarditis subaguda no está en relación con la producción de homopolisacárido, la dificultad en la accesibilidad del antibiótico al foco cardiaco que determina la presencia del mismo, es causante "in vivo" de fallo en la terapia antimicrobiana.

**CAPITULO CUARTO: BIBLIOGRAFIA**

- 1.- Cooksey RC, Thompson RS, Facklam RR. Physiological Characterization of Nutritionally Variant Streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 1979; 10:326-30.
- 2.- Caparon MG, Stephens DS, Olsen A, Scott JR. Role of M protein in adherence of group A streptococci. *Infect. Immunity.* 1991; 59:1811-17.
- 3.- Abeygunawardana C, Bush CA, Cisar JO. Complete structure of the cell surface polysaccharide of *Streptococcus oralis* ATCC 10557: a receptor for lecitin mediated interbacterial adherence. *Biochemistry.* 1991; 30:6528-40.
- 4.- Beighton D, Hardie JM, Whiley RA. A scheme for the identification of viridans streptococci. *J. Med. Microbiol.* 1991; 35:367-72.
- 5.- Ezaki T, Hashimoto Y, Takeuchi N, Yamamoto H, Liu SL, Miura H et al. Simple genetic method to identify viridans group streptococci by colorimetric dot hybridization and fluorometric hybridization in microdilution wells. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26:1708-13.
- 6.- French GL, Talsania h, Charlton JR, Phillips I. A physiological classification of viridans streptococci by use of the API 20STREP System. *J. Med. Microbiol.* 1989; 28:275-86.

- 7.- Peterson EM, Shigei JT, Woolard A, de la Maza LM. Identification of viridans streptococci by three commercial systems. *Am. J. Clin. Pathol.* 1988; 90:87-91.
- 8.- Beighton D, Whiley RA. Sialidase activity of the "*Streptococcus milleri* group" and other viridans group streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28:1431-33.
- 9.- Kilian M, Nyvad B. Ability to bind salivary alpha-amylase discriminates certain viridans group streptococcal species. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28:2576-77.
- 10.- Kilian M, Reinholdt J, Nyvad B, Frandsen EV, Mikkelsen L. IgA<sub>1</sub> proteases of oral streptococci: ecological aspects. *Immunol. Inves.* 1989; 18:161-70.
- 11.- Reinholdt J, Tomana M, Mortensen SB, Kilian M. Molecular aspects of immunoglobulin A<sub>1</sub> degradation by oral streptococci. *Infect. Immun.* 1990; 58:1186-94.
- 12.- Kilian M, Mikkelsen L, Henrichsen J. Taxonomic study of viridans streptococci: description of *Streptococcus gordoni* sp. nov. and emended descriptions of *Streptococcus sanguis* (White and Nive 1946), *Streptococcus oralis* (Bridge and Sneath 1982), and *Streptococcus mitis* (Andrewes and Horder 1906). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1989; 39:471-84.

- 13.- Collins MD, Wallbanks S. comparative sequence analyses of the 16S rRNA genes of *Lactobacillus minutus*, *Lactobacillus rimae* and *Streptococcus parvulus*: proposal for the creation of a new genus *Atopobium*. FEMS Microbiol. Let. 1992; 74:235-40.
- 14.- Whiley Ra, Fraser HY, Douglas CW, Hardie JM. *Streptococcus parasanguis* sp. nov.. An atypical viridans streptococcus from human clinical specimens. FEMS. Microbiol. Let. 1990; 56:115-21.
- 15.- Rudney JD, Neuvar EK, Soberay AH. Restriction endonuclease-fragment polymorphisms of oral viridans streptococci compared by conventional and field-inversion gel electrophoresis. J. Dent. Res. 1992; 71:1182-88.
- 16.- Bentley RW, Leigh JA, Collins MD. Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit ribosomal RNA sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 1988; 41:487-94.
- 17.- De Soet J, van Dalen PJ, Appelmelk BJ, de Graaff J. Identification of *Streptococcus sobrinus* with monoclonal antibodies. J. Clin. Microbiol. 1987; 25:2285-88.
- 18.- Schmidhuber S, Kilpper-Bälz R, Schleifer KH. A taxonomic study of *Streptococcus mitis*, *S. oralis* and *S. sanguis*. System. Appl. Microbiol. 1987; 10:74-77.

- 19.- Kilpper-Bälz R, Wenzig P, Schleifer KH. Molecular relationships classification of some viridans streptococci as *Streptococcus oralis* and emended description of *Streptococcus oralis* (Bridge and Sneath 1982). Int. J. Syst. Bacteriol. 1985; 35:482-88.
- 20.- Fujii Y. Taxonomic studies of the *Streptococcus intermedius* strains isolated from human oral cavities. Aichi-Gakuin J. Dent. Science. 1989; 27:137-51.
- 21.- Koehler V. Epidemiologie und Pathogenese von Streptokokkeninfektion. Immun. Infek. 1992; 20:92-98.
- 22.- Liébana J, Castillo A, Gutiérrez J. Género *Streptococcus*. En Microbiología Oral. Liebana J, Prats G, Prieto J. Madrid: Ed. Interamericana. En prensa.
- 23.- Hamada S, Slade HD. Biology, Immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol. Rev. 1980; 44:331-84.
- 24.- De Soet J, Van Dalen PJ, Pavicic MP, de Graaff J. Enumeration of Mutans Streptococci in clinical samples by using monoclonal antibodies. J. Clin. Microbiol. 1990; 28:2467-72.
- 25.- Abbe K, Carlsson J, Takahashi-Abbe S, Yamada T. Oxygen and the sugar metabolism in oral streptococci. Proc. Fin. Dent. Soc. 1988; 87:477-88.

- 26.- Piscitelli SC, Shwed J, Schreckemberger P, Danziger LH. *Streptococcus milleri* group: renewed interest in an elusive pathogen. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1992; 11:491-98.
- 27.- Abo H, Matsumura T, Kodama T, Ohta H, Fukui K, Kato K, Kagawa H. Peptide sequences for sucrose splitting and glucan binding within *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase (water insoluble glucan synthetase). J. Bacteriol. 1991; 173:989-96.
- 28.- Hamada S, Slade HD. Synthesis and binding of glucosyltransferase an in vitro adherence of *Streptococcus mutans* grown in a sintetic medium. Arch. Oral. Biol. 1979; 24:399-402.
- 29.- Liébana J, Castillo A, Peis J, Baca P, Piédrola G. Antimicrobial susceptibility of 1042 strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*: comparison from 1985 to 1989. Oral. Microbiol. Immunol. 1991; 6:146-50.
- 30.- Hanada N, Takehara T, Saeki E. Purification and characterization of a third glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* serotype g. J. Gen. Microbiol. 1987; 133:1351-58.
- 31.- Yamashita Y, Hanada N, Takehara T. Purification of fourth glucosyltransferase form *Streptococcus sobrinus*. J. Bacteriol. 1989; 171:6265-77.

- 32.- Hamada S, Slade HD. Binding of glucosyltransferase and glucan synthesis by *Streptococcus mutans* and other bacteria. *Infect. Immun.* 1978; 21:213-220.
- 33.- Hamada S, Koga T, Ooshima T. Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. *J. Dent. Res.* 1984; 63:407-11.
- 34.- De Soet JJ, Toors FA, de Graaff J. Acidogenesis by oral streptococci at different pH values. *Caries. Res.* 1989; 23:14-17.
- 35.- Bondi M, Neglia RG, Messi P, Manicardi G, Fabio U. *Streptococcus mutans* : classification in bacteriocin types. *Microbiologica.* 1991; 14:223-8.
- 36.- Ullman RF, Strampfer MJ, Cunha BA. *Streptococcus mutans* vertebral osteomyelitis. *Heart Lung.* 1988; 17:319-21.
- 37.- Ullman RF, Miller SJ, Strampfer MJ, Cunha BA. *Streptococcus mutans* endocarditis: report of three cases and review of the literature. *Heart Lung.* 1988; 17:209-12.
- 38.- Potgieter E, Carmichael M, Koornhof HJ, Chalkley LJ. In vitro antimicrobial susceptibility of viridans streptococci isolated from blood cultures. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1992; 11:543-46.

- 39.- Coykendall AL. Classification and identification of the viridans streptococci. Clin. Microbiol. Rev. 1989; 2:315-18.
- 40.- Carlsson J. A numerical taxonomic study of human oral streptococci. Odontol. Rev. 1968; 19:137-60.
- 41.- Willcox MD, Drucker DB. Partial characterisation of the inhibitory substances produced by *Streptococcus oralis* and related species. Microbios. 1988; 55:135-45.
- 42.- Facklam RR. Physiological differentiation of viridans streptococci. J. Clin. Microbiol. 1977; 5:184-201.
- 43.- Willcox MD, Drucker DB. Surface structures co-aggregation and adherence phenomena of *Streptococcus oralis* and related species. Microbios. 1989; 59:19-29.
- 44.- Handley PS, Carter PL, Wyatt JE, Hesketh LM. Surface structures (Peritrichous fibrils and tufts of fibrils) found on *Streptococcus sanguis* strains may be related to their ability to coaggregate with other oral genera. Infect. Immun. 1985; 47:217-27.
- 45.- Frandsen EV, Pedrazzoli V, Kilian M. Ecology of viridans streptococci in the oral cavity and pharynx. Oral Microbiol. Immunol. 1991; 6:129-33.

- 46.- Douglas CW, Brown PR, Preston FE. Platelet aggregation by oral streptococci. FEMS. Microbiol. Let. 1990; 6:63-67.
- 47.- Etienne J, Reverdi ME, Mouren C, Fleurette J. Etud bacteriologique de cent vingt cinq endocardites infectieuses a streptocoque. Sem. Hoxp. Paris. 1983; 59:240-43.
- 48.- Muñoz P, Berenguer J, Gutierrez J, Villacorta J. Absceso hepático por *Streptococcus sanguis* como causa de fiebre prolongada. Enf. Infec. Microbiol. Clin. 1988; 6:219-20.
- 49.- Handley P, Coykendall A, Brighton D, Hardie JM, Whiley RA. *Streptococcus crista* sp. nov., a viridans streptococcus with tufted fibrils, isolates from the human oral cavity and throat. Int. J. Syst. Bacteriol. 1991; 41:543-47.
- 50.- Ronda C, García JL, López R. Characterization of genetic transformation in *Streptococcus oralis* NCTC 11427: expression of the pneumococcal amidase in *S. oralis* using a new shuttle vector. Mol. Gen. Genet. 1988; 215:53-57.
- 51.- Ronda C, García JL, López R. Teichoic acid choline esterase, a novel hydrolytic activity in *Streptococcus oralis*. FEMS. Microbiol. Let. 1991; 80:289-94.

- 52.- Voiriot P, Weber M, Gerard A, Danchin N, Mathieu P, Dureux JB. Persistence of *Streptococcus mitis* in a aortic vegetation after 25 days of penicillin-netilmicin combination therapy. N. Engl. J. Med. 1988; 318:1067-68.
- 53.- Las Heras G, Llibre JM, Tor J, Carbonell C, Larrousse E. Endocarditis infecciosa aórtica por *Streptococcus viridans mitis y acidominimus* en un adicto a drogas por vía parenteral. Enf. Infec. Microbiol. Clin. 1990; 8:188.
- 54.- Hojo S, Mitsutomi M, Yamada T. Metabolism of glycosylsucrose by oral microorganisms and its hydrolysis by *Streptococcus salivarius* fructosyltransferase. Infect. Immun. 1987; 55:698-703.
- 55.- Sato S, Yoshimitsu-Narita A, Eifuku H, Inoue M. Isolation and some properties of extracellular glucan producing strains of human oral *Streptococcus salivarius*. Microbios. 1990; 62:101-12.
- 56.- Crawford I, Russell C. Comparative adhesion of seven species of streptococci isolated from the blood of patients with subacute bacterial endocarditis to fibrin platelet clots in vitro. J. Appl. Bacteriol. 1986; 60:127-33.
- 57.- Whiley RA, Hardey JM. *Streptococcus vestibularis* sp. nov. from the human oral cavity. Int. J. Syst. Bacteriol. 1988; 38:335-339.

- 58.- Osano E, Fujii Y, Hibi E. Genetic and physiological characteristics of oral *Streptococcus intermedius*. Aichi-Gakuin Dent. Science. 1990; 3:1-5.
- 59.- Gossling J. Occurrence and pathogenicity of the *Streptococcus milleri* group. Rev. Infect. Dis. 1988; 10:257-85.
- 60.- Tecson- Tumang F, Sen P, Kapila R. Fatal streptococcus MG-intermedius (*Streptococcus milleri*) meningitis in an adult. Am. J. Clin. Pathol. 1982; 77:480-84.
- 61.- Rabe LK, Winterscheid KK, Hillier SL. Association of viridans group streptococci from pregnant women with bacterial vaginosis and upper genital tract infection. J. Clin. Microbiol. 1988; 26:1156-60.
- 62.- Ferber T, Mueller F, von Graevenitz A. Pleural empyema due to *Streptococcus milleri*. J. Suis. Med. 1987; 117:916-19.
- 63.- Whiley RA, Beighton D, Winstanley TG, Fraser HY, Hardie JM. *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus* and *Streptococcus anginosus* (the *Streptococcus milleri* group): Association with different body sites and clinical infection. J. Clin. Microbiol. 1992; 30:243-44.

- 64.- Esteban A, Villuendas MC, López C, Marco ML, Moles B, Aldea MJ, Aísa ML. Infecciones producidas por *Streptococcus milleri*. Rev. Esp. Microbiol. Clin. 1991; 6:387-92.
- 65.- Whiley Ra, Fraser H, Hardie Jm, Beighton D. Phenotypic differentiation of *Streptococcus intermedius*, and *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus anginosus* strains within the "*Streptococcus milleri* group". J. Clin. Microbiol. 1990; 28:1497-1501.
- 66.- Kitada K, Nagata K, Yakushiji T, Eifuku H, Inoue M. Serological and biological characteristics of *Streptococcus milleri* isolates from systemic purulent infections. J. Med. Microbiol. 1992; 36:143-48.
- 67.- Whitworth JM, Ross PW, Poxton IR. Use of rapid carbohydrate utilisation test for identifying *Streptococcus milleri* group. J. Clin. Pathol. 1991; 44:329-33.
- 68.- Stein DS, Libertin CR. Genetic heterogeneity among nutritionally deficient streptococci. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 1992; 15:281-85.
- 69.- Bouvet A, Villeroy F, Cheng F, Lamesch C, Williamson R, Gutmann L. Characterization of nutritionally variant streptococci by biochemical test and penicillin-binding proteins. J. Clin. Microbiol. 1985; 22:1030-34.

- 70.- Bouvet A, Grimonod F, Grimond PAD. *Streptococcus defectivities* sp. nov. and *Streptococcus adjacens* sp. nov., nutritionally variant streptococci from human clinical specimens. Int. J. Syst. Bacteriol. 1989; 39:290-94.
- 71.- Stein DS, Libertin CR. Molecular analysis of viridans and nutritionally deficient (variant) streptococci causing sequential episodes of endocarditis in a patient. Am. J. Clin. Pathol. 1989; 91:620-24.
- 72.- Gephart JF, Washington II JA. Antimicrobial susceptibilities of nutritionally variant streptococci. J. Infect. Dis. 1982; 146:536-39.
- 73.- Lichtman SS, Treatment of subacute bacterial endocarditis: current results. Ann. Int. Med. 1943; 19:787-94.
- 74.- Meads M, Harris HW, Finland M. The treatment of bacterial endocarditis with penicillin. Experiences at the Boston City Hospital during 1944. N. Eng. J. Med. 1945; 232:464-69.
- 75.- Cates JE, Christie RV. Subacute bacterial endocarditis. Quart. J. Med. 1951; 20:93-130.
- 76.- Garvey GJ, Neu Hc. Infective endocarditis an evolving disease. Medicine. 1978; 5:105-12.

- 77.- Parras F, Torroba L. Endocarditis infecciosa en la edad pediátrica. *Enf. Infec. Microbiol. Clin.* 1988; 6:260-71.
- 78.- Friedland, von Reyn CF, Levy B, et al. Nosocomial endocarditis. *Infect. Control.* 1984; 5:284-89.
- 79.- Kramer NH, Burgeois M, Liersch R, Nebler L, Meyer H, Sievers G. Current clinical aspects of bacterial endocarditis in infancy, Childhood and adolescence. *Eur. J. Pediatrics.* 1983; 140:253-59.
- 80.- Colmenero JD, Hernandez S, Gomez F, Gonzalez JL, Miranda MT. Endocarditis infecciosa. *Enf. Infec. Microbiol. Clin.* 1987; 6:81-87.
- 81.- Von Reyn CF, Levy BS, Arbeit RD et al. Infective endocarditis: an analysis based on strict case definitions. *Ann. Intern. Med.* 1981; 94:505-18.
- 82.- Verger G. Infecciones del aparato circulatorio: endocarditis infecciosa, pericarditis y miocarditis. Infecciones del árbol vascular. En *Enfermedades Infecciosas*. Barcelona: Ed. Doyma. 1988:502-20.
- 83.- Leport C, Vilde JL, Bricaire F, et al. Fifty cases of late prosthetic valve endocarditis: improvement in prognosis over a 15 year period. *Br. Heart. J.* 1987; 58:66-71.

- 84.- Wilson WR, Danielson GK, Giuliani ER et al. Prosthetic valve endocarditis. Mayo. Clin. Proc. 1982; 57:75-81.
- 85.- Blakemore WS, McGarrity GJ, Thurer RJ et al. Infection by airborne bacteria with cardiopulmonar bypass. Surgery. 1971; 70:830-37.
- 86.- Gnann JW, Dismukes WE. Prosthetic valve endocarditis: an overview. Herz.1983; 8:320-31.
- 87.- Wilson WR. Cardiac infection. Cur. Op. Infect. Dis. 1989; 2:202-5.
- 88.- Harris LF. Viridans streptococcal endocarditis. Ala. Med. 1989; 59:13-17.
- 89.-Sawae Y. Current diagnosis of infective endocarditis. Jpn.Circ. J. 1985; 49: 519-28.
- 90.-Whitby N, Fenech A. Infective endocarditis in adults in Glasgow,1976-81. Int. J. Cardiol. 1985; 7:391-403.
- 91.- Barco CT. Prevention of infective endocarditis: A review of the medical and dental literature. J. Periodontol. 1991; 62:510-24.
- 92.- Bayliss R, Clarke C, Oakley CM, Somerville W, Whitfield AGW, Young SEJ. The microbiology and pathogenesis of infective endocarditis. Br. Heart. J. 1983; 50:513-19.

- 93.- Horaus T, Delbos F. Viridans streptococci in infective endocarditis: Species distribution and susceptibility to antibiotics. *Eur. Heart. J.* 1984; 5:39-44.
- 94.- Tart RC, van de Rijn. Analysis of adherence of streptococcus defectivus and endocarditis associated streptococci to extracellular matrix. *Infect. Immun.* 1991; 59:857-62.
- 95.- Dall LH, Herndon BL. Association of cell-adherent glyocalix and endocarditis production by viridans group streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28:1698-700.
- 96.- Dall L, Barnes WG, Lanes JW, Mills J. Enzymatic modification of glyocalix in the treatment of experimental endocarditis due to viridans streptococci. *J. Infect. Dis.* 1987; 156:736-40.
- 97.- Straus DC, Mattingly SJ, Milligan TW. Production of extracellular material by streptococci associated with subacute bacterial endocarditis. *Infect. Immun.* 1977; 17:148-56.
- 98.- Mills J, Pullian I, Dall L, Marzouk J, Wilson W, Costerton JW. Exopolysaccharide production by viridans streptococci in experimental endocarditis. *Infect. Immun.* 1984; 43:359-67.

- 99.- Chang SC, Luh KT, Deng LJ, Hsieh WC. Bacteriology of viridans streptococcal bacteremia. *J. Microbiol. Immunol.* 1987; 20:311-8.
- 100.- Pujadas R, Escrivá E. Profilaxis de la endocarditis estreptocócica: ¿nuevos criterios en base a la tolerancia antibiótica?. *Enf. Infecc. Microbiol. Clin.* 1987; 5:261-64.
- 101.- Pullian L, Dall L, Inokuchi S, Wilson W, Hadley WK, Mills J. Effects of exopolysaccharide production by viridans streptococci on penicillin therapy of experimental endocarditis. *J. Infect. Dis.* 1985; 151:153-56.
- 102.- Dall L, Keilhofner M, Herndon B, Barnes W, Lane J. Clindamycin effect of glyocalix production in experimental viridans streptococcal endocarditis. *J. Infect. Dis.* 1990; 161: 1221-4.
- 103.- Sullan PM, Valone FH, Mills J. Mechanism of platelet aggregation by viridans group streptococci. *Infect. Immun.* 1987; 55:1743-50.
- 104.- Durack DT, Beeson P. Experimental bacterial endocarditis. II: survival of bacteria in endocardial vegetation. *Br. J. Exp. Pathol.* 1972;53:50-53.
- 105.- Lerner PI, Weinstein L. Infective endocarditis in the antibiotic era. *N. Engl. J. Med.* 1966; 274:199-206.

- 106.- Hermans PE. The clinical manifestations of infective endocarditis. *Mayo. Clin. Proc.* 1982; 57:13-20.
- 107.- Washintong JA II, Ilstrup DM. Blood cultures: issues and controversies. *Rev. Infect. Dis.* 1986; 8:792-804.
- 108.- Bouvet A, Acar JF. Prevention of bacterial endocarditis. *Ann. Cardiol. Angeiol.* 1985; 34:1-3.
- 109.- Delaye J, Etienne J, Feruglio GA, Fraile J, Glauser MP, Gruer LD et al. Prophylaxis of infective endocarditis for dental procedures. Report of a working party of the European Society of Cardiology. *Eur. Hear. J.* 1985; 6:826-28.
- 110.- Profilaxis antibiótica de la endocarditis infecciosa. Recomendaciones del grupo de trabajo sobre endocarditis de la British Society for antimicrobial Chemoterapy. *Lancet.* 1990; 1:88-89.
- 111.- Tejerina JM, Martos F, Echeverría JJ, López-Alba AJ. Endocarditis infecciosa y periodontitis juvenil. *Arch. Odont-Estomatol.* 1989; 5: 582-83.
- 112.- Sartor C, Bonet E, Goudard A, Millet Y, Sambuc R. Prophylaxie de l'endocardite infectieuse: les connaissances des candidats à l'internat. *Press. Med.* 1994; 23:596-598.

- 113.- Matsumoto S, Ito T, Sekine I, Sada T, Okabe F, Ebisawa K, Oka Y. Medical treatment of infective endocarditis and its limitations. *Jpn. Circ. J.* 1983; 47:1121-27.
- 114.- Horstkotte D, Rosin H. Therapy and prevention of infectious endocarditis. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 1984; 114:1575-86.
- 115.- Henry NK, Wilson WR, Roberts RB, Acar JF, Geraci JE. Antimicrobial therapy of experimental endocarditis caused by nutritionally variant viridans group streptococci. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1986; 30:465-67.
- 116.- Fernández ML. Tratamiento antimicrobiano de la endocarditis infecciosa. *Rev. Esp. Quimioterap.* 1988; 1:61-71.
- 117.- Enzler MJ, Rouse MS, Henry NK, Geraci JE, Wilson WR. In vitro and in vivo studies of streptomycin-resistant, penicillin susceptible streptococci from patients with infective endocarditis. *J. Infect. Dis.* 1987; 155:954-58.
- 118.- Farber BF, Yee Y. High level aminoglycoside resistance mediated by aminoglycoside modifying enzymes among viridans streptococci: implication for the therapy for endocarditis. *J. Infect. Dis.* 1987; 155:948-53.

- 119.- Hess J, Dankert J, Durack D. Significance of penicillin tolerance in vivo: prevention of experimental *Streptococcus sanguis* endocarditis. Antimicrob. Chemoter. 1983; 11: 555-64.
- 120.- Brennan RO, Durack DT. Therapeutic significance of penicillin tolerance in experimental streptococcal endocarditis. Antimicrob. Agents. Chemoter. 1983; 23:273-77.
- 121.- Meeson J, McColm AA, Acred P, Greenwood D. Differential response to benzylpenicillin in vivo of tolerant and no tolerant variants of *Streptococcus sanguis* II. J. Antimicrob. Chemoter. 1990; 25:103-9.
- 122.- Powley L, Meeson J, Greenwood D. Tolerance to penicillin in streptococci of viridans group. J. Clin. Pathol. 1989; 42:77-80.
- 123.- Holbrook WP, Olafsdottir D, Magnusson HB, Benediktsdottir E. Penicillin tolerance among oral streptococci. J. Med. Microbiol. 1988; 27:17-22.
- 124.- Cowen LD, Segelman BA. Antibiotics in historical perspective. MSD International. USA. 1981.
- 125.- Dámaso D. Antibacterianos. Marketing Pharm S.A., 1990.

- 126.- Cami J, Laporte JR. Penicilinas y Cefalosporinas. En: Drobnic L, Salva-Miquel JA. Curso sobre antibioticoterapia. Madrid: Ruán S.A., 1980:205-218.
- 127.- Simon C, Stille W, Perea EJ. Manual de terapéutica antimicrobiana. Barcelona: Salvat S.A., 1987.
- 128.- Livermore DM. Enzymes involved in bacterial resistance to betalactams and other antibiotics. Symposium on antibiotics resistance and cross resistance. New Orleans. 1986:22-27.
- 129.- Waxman DJ, Strominger JL. Penicillin binding proteins and the mechanism of action of betalactam antibiotics. Annu. Rev. Biochem. 1983. 52; 825-869.
- 130.- Nikaido H. Cell membrane and antibiotic characteristics and interactions. Symposium on antibiotics resistance and cross resistance. New Orleans. 1986:17-21.
- 131.- Campos J. Bacterias resistentes y mecanismos de resistencia. Med. Clin. 1987; 89:861-863.
- 132.- Reynolds PE. Resistance of the antibiotic target site. Br. Med. Bull. 1984; 40:3-10.
- 133.- Seeberg A, Wiedeman B. Application of "in vitro" models: development of resistance. J. Antimicrob. Chemoter. 1985; 15:241-249.

- 134.- López R, García E. Tolerancia antibiótica. Rev. Esp. Quimioterap. 1989; 11:119-124.
- 135.- Mariscal F, García J, Galván B. Cefalosporinas, cefamicinas y oxicefaminas. Moerreina S.A. Madrid, 1986.
- 136.- Spratt BG, Jobaputra V, Zimmerman W. Binding of thienamycin and clavulanic acid to the penicillin binding proteins of *Escherichia coli* K-12. Antimicrob. Agents. Chemoter. 1977; 12:406-409.
- 137.- Kropp H, Gerkens L, Sindelof JG, Kahan FM. Antibacterial activity of imipenen: the first thienamycin antibiotic. Rev. Infect. Dis. 1985; 7:389-410.
- 138.- Bryan LE. Mechanisms of action of aminoglycoside antibiotics. In: Root RK, Sande MA. New dimensions in antimicrobial therapy. Churchill Livingstone, Inc. New York. 1984;17-36.
- 139.- Stratton CW, Cooksey C. Susceptibility test: Special test. In: Balow A. Manual of Clinical Microbiology. Massachusetts. 1991;1153-1165.
- 140.- Arévalo MA, Tejedor F, Polo F, García-Ballester JP. Modo de acción de los macrólidos a nivel molecular. Estructura de su sitio de interacción en el ribosoma. Encuentro Macrólidos 90, IDEPSA. 1988;5-13.

- 141.- Menninger JP, Otto Dp. Mode of action and resistance mechanisms of macrolides. *Antimicrob. Agents. Chemoter.* 1982; 21:811-818.
- 142.- Nieto M, Perkins HR. Physicochemical properties of vancomycin and iodovancomycin and their complexes with diacetyl-L-Lysyl-D-Alanyl-D-alanine. *Biochem. J.* 1971; 123:773-787.
- 143.- Cooksey RC. Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. In: Balow A. *Manual of Clinical Microbiology.* Massachusetts. 1991;1099-1104.
- 144.- Baker CN, Thornsberry C. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus mutans* isolated from patients with endocarditis. *Antimicrob. Agents. Chemoter.* 1984; 5:268-271.
- 145.- Ferreti JJ, Ward M. Susceptibility of *Streptococcus mutans* to antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents. Chemoter.* 1976; 10:274-276.
- 146.- Little WA, Thonsom LA, Bowen WH. Antibiotic susceptibility of *Streptococcus mutans*: comparison of serotype profiles. *Antimicrob. Agents. Chemoter.* 1979; 15:440-443.
- 147.- Liébana J, Parejo E, Castillo A, Gutierrez A, García-Mendoza A, Piédrola G. In vitro activity of macrolides and lincosamides against oral streptococci: a therapeutic

- alternative in prophylaxis for infective endocarditis. *Inter. J. Antimicrob. Agents.* 1993; 2:255-261.
- 148.- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: proposed guideline. 1987. M26-P. NCCLS. Villanova PA.
- 149.- James PA. Comparison of four methods for the determination of MIC and MCB of penicillin for viridans streptococci and the implications for penicillin tolerance. *J. Antimicrob. Chemother.* 1990; 25:209-216.
- 150.- Shetlar MR, Foster JV, Hadley WK. Determination of serum polysaccharides by the tryptophan reaction. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1948; 67:125-130.
- 151.- Dall L, Herndon B. Quantitative assay of glycolyx produced by viridans group streptococci that cause endocarditis. *J. Clin. Microbiol.* 1989; 27:2039-2041.
- 152.- Manford M, Matharu J, Farrington K. Infective endocarditis in a district general hospital. *J. R. Soc. Med.* 1992; 85:262-266.
- 153.- McCartney AC. Changing trends in infective endocarditis. *J. Clin. Pathol.* 1992; 45:945-948.

- 154.- Douglas CW, Heath J, Hampton KK, Preston FE. Identity of viridans streptococci isolated from cases of infective endocarditis. *J. Med. Microbiol.* 1993; 39:179-182.
- 155.- Knox KW, Hunter N. The role of oral bacteria in the pathogenesis of infective endocarditis. *Aust. Den. J.* 1991; 36:286-292.
- 156.- Lu JR, Wu HC. Morphologic and biochemical characteristics of viridans streptococci isolated from dental plaque. *Chung Hua Min Kuo Wei Sheng Wu Chi Mien I Hsueh Tsa Chih.* 1992; 25:91-100.
- 157.- Adnan S, Li N, Miura H, Hashimoto Y Yamamoto H, Ezaki T. Covalently immobilized DNA plate for luminometric DNA-DNA hybridization to identify viridans streptococci in under 2 hours. *FEMS Microbiol. Lett.* 1993; 106:139-142.
- 158.- Rudney JD, Larson CJ. Use of restriction fragment polymorphism analysis of rRNA genes to assign species to unknown clinical isolates of oral viridans streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32:437.
- 159.- Schlerka G. The automicrobic system (AMS): a new test method for the classification and susceptibility testing of bovine mastitis streptococci. *DTW Dtsch. Tierarztl. Wocheschr.* 1990; 97:342-346.

- 160.- Watanakunakorn C, Glotzbecker C. Synergism with aminoglycosides of penicillin, ampicillin and vancomycin against non enterococcal group D streptococci and viridans streptococci. J. Med. Microbiol. 1977; 10:133-138.
- 161.- Chen HY, Williams D. Transferable resistance and aminoglycoside modifying enzymes in enterococci. J. Med. Microbiol. 1985; 20:187-196.
- 162.- Collatz E, Carlier C, Courvalin P. Characterization of high level aminoglycoside resistance in a strain of *Streptococcus pneumoniae*. J. Gen. Microbiol. 1984; 130:1665-1671.
- 163.- Hummel H, Piepersberg W, Bock A. 30S subunit mutations relieving restriction of ribosomal misreading caused by L6 mutations. Mol. Gen. Genet. 1988; 179:147.
- 164.- Lietman PS. Aminoglucósidosy espectinomicina: aminociclitolos. En: Enfermedades infecciosas: principio y práctica. Mandell, Douglas, Bennett. Buenos Aires: Ed. Panamericana, 1991:281-295.
- 165.- Etienne J, Gruer LD, Fleurette J. Antibiotic susceptibility of streptococcal strains associated with infective endocarditis. Eur. Heart. J. 1984; 5:33-37.
- 166.- Slater GJ, Greenwood D. Detection of penicillin tolerance in streptococci. J. Clin. Pathol. 1983; 36:1353-1356.

- 167.- Holloway Y, Dankert J, Hess J. Penicillin tolerance and bacterial endocarditis. Lancet. 1980; 15:589.
- 168.- James PA, Young SE, White DG. Incidence of penicillin tolerance among blood culture isolates of *Streptococcus sanguis*, 1987-88. J. Clin. Pathol. 1991; 44:160-163.
- 169.- Anderson AW, Cruickshank JG. Endocarditis due to viridans type streptococci tolerant to beta-lactam antibiotics: therapeutic problems. Br. Med. J. 1982; 285:854.
- 170.- Wilson WR, Zak O, Sande MA. Penicillin therapy for treatment of experimental endocarditis caused by viridans streptococci in animals. J. Infect. Dis. 1985; 151:1028-1033.
- 171.- Van der Meer JT, Van Vianen W, Hu E, VanLeeuwen WB, Valkenburg HA, Thompson J, Michel MF. Distribution, antibiotic susceptibility and tolerance of bacterial isolates in culture-positive cases of endocarditis in The Netherlands. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1991; 10:728-734.
- 172.- Bourgault AM, Wilson WR, Washington II JA. Antimicrobial susceptibilities of species of viridans streptococci. J. Infect. Dis. 1979; 140:316-321.

- 173.- Shanson DC, Akash S, Harris M, Tadayon M. Erythromycin stearate, 1.5 mg, for the oral prophylaxis of streptococcal bacteraemia in patients undergoing dental extraction: efficacy and tolerance. *J. Antimicrob. Chemother.* 1985; 15:83-90.
- 174.- Glauser MP, Francioli P. Successful prophylaxis against experimental streptococcal endocarditis with bacteriostatic antibiotics. *J. Infect. Dis.* 1982; 146:806-810.
- 175.- Etienne J, Coulet M, Brun Y, Blanchon JF, Demoux F. Susceptibilities of streptococcal strains associated with infective endocarditis to nine antibiotics. *Chemotherapy.* 1988; 34:113-116.
- 176.- Shanson DC, Shehata A, Tadayon M, Harris M. Comparison of intravenous teicoplanin with intramuscular amoxycillin for the prophylaxis of streptococcal bacteraemia in dental patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 1987; 20:85-93.
- 177.- Venditti M, Gelfusa V, Serra P, Brandimarte C, Micozzi A, Martino P. 4 week treatment of streptococcal native valve endocarditis with high dose teicoplanin. *Antimicrob. Agent. Chemother.* 1992; 36:723-726.
- 178.- Dickinson G, Rodriguez K, Arcey S, Alea A, Greenman R. Efficacy of imipenem/cilastatin in endocarditis. *Am. J. Med.* 1985; 78:117-121.

- 179.- Dornbusch K, Henning C, Linden E. In vitro activity of the new penems FCE 22101 and FCE 24362 alone or in combination with aminoglycosides against streptococci isolated from patient with endocarditis. J. Antimicrob. Chemother. 1989; 23:109-117.
- 180.- Hook EW III, Sande MA. Role of the vegetation in experimental *Streptococcus viridans* endocarditis. Infect. Immun. 1974; 10:1433-1438.
- 181.- Yersin BR, Glauser MP, Freedman LR. Effect of nitrogen mustard on natural history of right sided streptococcal endocarditis in rabbits: role for cellular host defenses. Infect. Immun. 1982; 35:320-325.
- 182.- Dall LH, Herndon BL, Smith R. Reactivity of the glycocalix of endocarditis-producing viridans group streptococci. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 1993; 17:259-264.
- 183.- Munro CL, Macrina FL. Sucrose derived exopolysaccharides of *Streptococcus mutans* V403 contribute to infectivity in endocarditis. Mol. Microbiol. 1993; 8:133-142.