

Estudio de Supervivencia de *Streptococcus mutans* en un Tipo de Fómite

Survival Study of *Streptococcus mutans* in a Type of Fomite

Recibido: 19/07/2023

Aceptado: 15/09/2023

Cutrerera MC^{1,3}, Cornejo CF^{2,3},
Molgatini SL^{1,3}, Squassi A^{2,3},
Gliosca LA^{1,3}

1 Universidad de Buenos Aires. Facultad de Odontología. Cátedra de Microbiología y Parasitología. Buenos Aires, Argentina.

2 Universidad de Buenos Aires, Facultad de Odontología. Cátedra de Odontología Preventiva y Comunitaria. Buenos Aires, Argentina.

3 Universidad de Buenos Aires. Facultad de Odontología. Instituto de Investigaciones en Salud Pública IISAP. Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la supervivencia de *Streptococcus mutans* (*S.mutans*) en un tipo de fómite. **Método:** Se reactivó una cepa de *S.mutans* ATCC 25175 criopreservada en agar TYCSB. El inóculo se estandarizó en PBS *buffer* hasta obtener turbidez equivalente al 0,5 de Mc Farland y un OD = 0.01 por espectrofotometría. Bloques plásticos de 2cm²/superficie fueron seleccionados como fómites. La descontaminación de los bloques se realizó por inmersión en alcohol etílico 70% v/v durante 10 minutos, los que fueron secados en cabina de seguridad biológica. La contaminación de los mismos se realizó por inmersión en inóculo estandarizado durante 10 minutos. Los bloques contaminados se extrajeron y depositaron sobre placas de Petri estériles hasta cumplir los tiempos propuestos (T0-T4 con intervalos de 30 minutos). A cada tiempo, los bloques fueron eluidos en 20 ml de *buffer* PBS y agitados en vortex durante 30 segundos. 100 µl de cada eluato fueron sembrados por dispersión en agar TYCSB e incubados en anaerobiosis por 48 horas a 37°C. El recuento de colonias (UFC/ml) se realizó bajo lupa estereoscópica 50X. **Resultados:** El recuento inicial de *S.mutans* fue de 7,8 X 10⁶ (DS+1,7 X 10⁶) UFC/ml y para cada tiempo de estudio fue de: T0=3.25 X 10⁴ (DS+1.9 X 10³); T1=2.63X10⁴ (DS+4,50E+0³); T2= 1.85 X 10⁴ (DS+9,45E+0²); T3=1.93 X10³(DS+1,29E+0³) y T4=1.2X10³ (DS+7,21x10²). **Conclusión:** En los rangos de tiempos establecidos, la cepa de *S.mutans* ensayada permaneció viable sobre la superficie plástica.

Palabras clave: *Streptococcus mutans*, supervivencia, bloques de plástico, transmisión horizontal, fómite.

ABSTRACT

Aim: To evaluate the survival time of *Streptococcus mutans* (*S.mutans*) in a type of fomites. **Method:** A strain of cryopreserved *S.mutans* ATCC 25175 was reactivated in TYCSB agar. The inoculum was standardized in the PBS *buffer* to obtain turbidity equivalent to 0.5 Mc Farland and OD = 0.01 by

spectrophotometry. Plastic blocks of 2 cm²/surface were selected as fomites. Decontamination of the blocks was carried out for 10 minutes by immersion in ethyl alcohol 70% v/v, which were dried in a biosafety chamber. Contamination was carried out by immersion in standardized inoculum for 10 minutes. The contaminated blocks were extracted and put on sterile Petri dishes until the proposed times were met (T0-T4 at 30-minute intervals). At each time, the blocks were eluted in 20 ml of PBS buffer and vortexed for 30 seconds. 100 µl of each eluate were dispersed on TYCSB agar and incubated anaerobically for 48 hours at 37°C. Colony count (CFU/ml) was performed under a 50X stereoscopic magnifying glass. Results: The initial *S.mutans* count was 7,8 X 10⁶ (DS+1,7 X 10⁶) CFU/ml and for each study time was: T0=3.25 X 10⁴ (DS+1.9 X 10³); T1=2.63X10⁴ (DS+4,50E+0³); T2= 1.85 X 10⁴ (DS+9,45E+0²); T3=1.93 X10³(DS+1,29E+0³) y T4=1.2X10³ (DS+7,21x10²). Conclusion: Within the established time ranges, the tested *S.mutans* strain remained viable on the plastic surface.

Keywords: *Streptococcus mutans*, survival, plastic blocks, horizontal transmission, fomite.

INTRODUCCIÓN

Especies estreptocócicas como *S.mutans* constituyen menos del 1% de la microbiota bucal en eubiosis. (Zhang et al., 2018; Marcantoni, 2018b; Marsh y Martin, 2011). Sin embargo, en estado disbiótico, producto de la acción de factores intrínsecos como los ecológicos y extrínsecos como la dieta, oportunidad de ingesta y los hábitos de higiene; incrementan su abundancia en la microbiota bucal (Bhaumik et al., 2021).

Es aceptado ampliamente el potencial patogénico de *S.mutans*, atribuible a sus propiedades acidogénicas, acidofílicas y acidúricas, que sumados al potencial redox electronegativo, favorecen la desregulación genética para la síntesis de polisacáridos extracelulares insolubles que les garantiza su supervivencia en una amplia gama de condiciones (Marcantoni, 2018a). Si bien a *S.mutans* se lo asocia mayormente con la caries dental, estudios acerca del bacterioma oral indican la participación conjunta de otros géneros (Fakhrudin et al., 2019).

La saliva es el fluido que baña todo el ecosistema bucal y se comporta como reservorio y fuente de infección de estos microorganismos (Baca et al., 2012).

Durante la etapa de oralidad en la primera infancia, los juguetes son elementos de intercambio entre los infantes (Doméjean et al., 2010). Componentes de la microbiota oral pueden sobrevivir sobre distintas superficies y condiciones ambientales. El objetivo de este trabajo fue determinar *in vitro*, el tiempo de supervivencia de *S.mutans* en un fómite plástico.

MATERIALES Y MÉTODOS

1- REACTIVACIÓN DE LA CEPA

La reactivación de la cepa a *Streptococcus mutans*

(ATCC 25175) criopreservada a -80 °C se realizó por duplicado en agar TYCSB (Tryptona, Yeast extract Cystine, Sucrose and Bacitracin agar) e incubada en condiciones de anaerobiosis (Jarra 2,5 L, AnaeroJar OXOID™); AnaeroPack® - Anero, MGC) por 48 horas a 37°C ± 1 °C.

2- PREPARACIÓN DEL INÓCULO

El inóculo se preparó a partir de un cultivo puro de *Sm*. Una única colonia se repicó en 2.5ml de caldo Todd Hewitt (TH) en tubo tipo Falcon (n= 3) con perlas de vidrio "glass-beads". La incubación se realizó con agitación a 200 rpm calefaccionada a 37°C (Agitador orbital calefaccionado BM081, Biomint) en condiciones de aerobiosis durante 9 hs (Cutrera et al., 2022). El contenido de los tubos se colocó en un vaso de precipitado estéril. La masa microbiana se ajustó con medio fresco hasta obtener una densidad óptica equivalente al 0.5 de Mac Farland y un OD = 0.01 por espectrofotometría (Filter Max F3 Molecular Devices). El recuento inicial (Ti) de *S.mutans* viables se obtuvo por medio de diluciones seriadas al décimo (100µl del inóculo: 900 µl *buffer* PBS 10⁻¹ a 10⁻⁶) sembradas por duplicado en placa de agar TYCSB. La incubación se realizó en anaerobiosis (AnaeroPack® - Anero, MGC, en jarra (Bio-Rad® de 2.5L) a 37°C durante 48 hs. (Figura 1).

3- TRATAMIENTO DEL FÓMITE

3.1- Selección

Para la experiencia se eligieron bloques de plástico tipo Lego®. (3 por cada tiempo de estudio con una N total de 15 unidades de 2 cm x 1 cm)

3.2- Descontaminación

La totalidad de los bloques fueron descontaminados por inmersión en solución etílica 70% v/v durante 10 minutos.

3.3- Secado

Para ello fueron dispuestos sobre placas de Petri bajo cortina de aire estéril en cabina de seguridad biológica (ABL2 ESCO).

3.4- Contaminación

La contaminación de los bloques se realizó por inmersión en 300 ml de inóculo estandarizado de *S.mutans* durante 10 minutos.

Posteriormente, los bloques fueron extraídos y colocados sobre placas de Petri estériles, hasta cumplir los tiempos pautados (Figura 2).

3.5- Tiempo de contacto con el inóculo

Se pautaron 5 tiempos de estudio T0 - T1 - T2 - T3 - T4 con intervalos de 30 minutos. La experiencia se realizó por triplicado.

3.6- Elución

A medida que se cumplimentaron los tiempos pautados, cada bloque plástico fue eluido en 20 ml de *buffer* PBS/ tubo Falcon de 50 ml. El conjunto fue

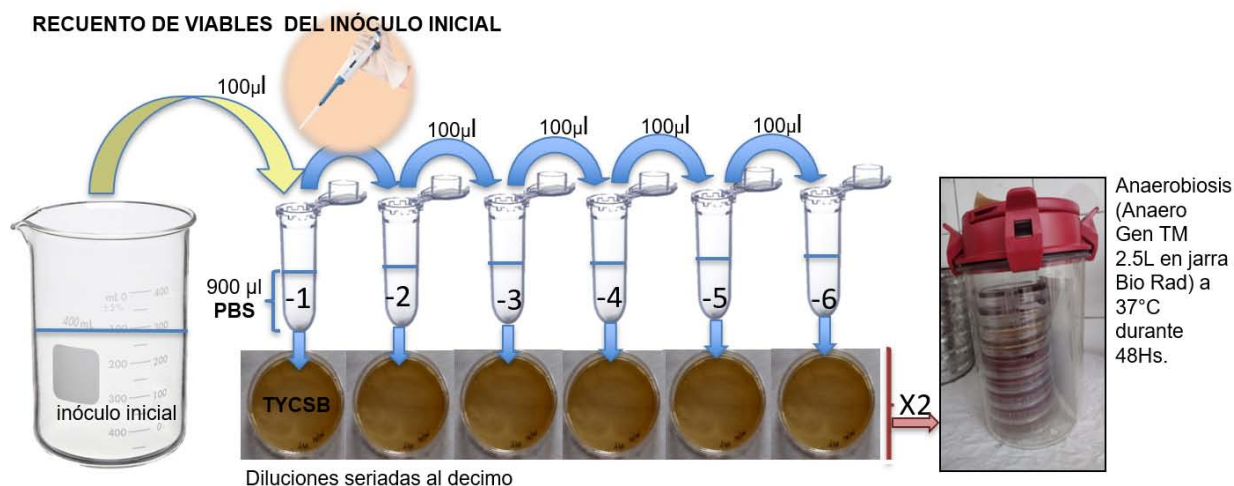


FIGURA 1. Diluciones seriadas al décimo del inóculo inicial en buffer PBS. Siembra en superficie por diseminación con espátula de Drigalsky en agar TYCSB. Incubación en anaerobiosis.

TRATAMIENTO DEL FÓMITE

3.1- SELECCIÓN

3.2- DECONTAMINACIÓN
Alcohol 70% v/v, 10'

3.3- SECADO

3.4-CONTAMINACIÓN

3.5-TIEMPO DE CONTACTO
CON EL INÓCULO DE *Sm*

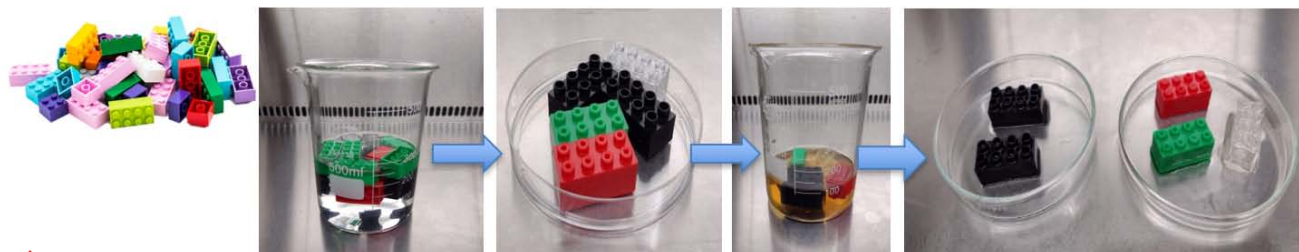


FIGURA 2. Descontaminación del fómite por inmersión en alcohol etílico 70%V/V.- Secado bajo aire estéril en cabina biológica. - contaminación por inmersión con inóculo estandarizado. - colocación del fómite tratado sobre placas estériles.

agitado en vortex durante 30 segundos para obtener el eluato.

El recuento de sobrevivientes de *S.mutans* expresado en UFC/ml (unidades formadoras de colonia por mililitro) se realizó a partir de 100 µl de cada eluato sembrado por diseminación en superficie en agar TYCSB. Las placas se incubaron en anaerobiosis (AnaeroPack® -Anaero MG, 2.5L en jarra Bio Rad) a 37°C durante 48 hs.

4- Recuentos de *S.mutans* viables

La lectura del número de colonias se realizó con magnificación (lupa estereoscópica de 50X) por investigador calibrado a las 48 hs.

Para el análisis de los datos se calculó el promedio y desvío estándar. La expresión de la viabilidad de *S.mutans* se realizó mediante el cálculo del promedio y desvío estándar de los triplicados, según los volúmenes de elución utilizados.

Para establecer la velocidad de muerte del 90 % del

inóculo empleado, se calcula el tiempo de reducción decimal en condiciones normales de presión y temperatura (Santos et al., 2011).

RESULTADOS

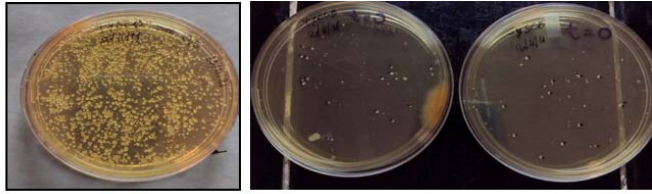
El resultado obtenido del recuento de colonias en el tiempo inicial fue de (Ti) $7,8 \times 10^6$ (DS+ $1,7 \times 10^6$) UFC/ml. En cada tiempo de estudio se obtuvieron los siguientes recuentos: T0= $3,25 \times 10^4$ (DS+ $1,9 \times 10^3$); T1= $2,63 \times 10^4$ (DS+ $4,50 \times 10^3$); T2= $1,85 \times 10^4$ (DS+ $9,45 \times 10^2$); T3= $1,93 \times 10^3$ (DS+ $1,29 \times 10^3$) y T4= $1,2 \times 10^3$ (DS+ $7,21 \times 10^2$) (Figura 3).

El tiempo de reducción decimal (Dt) para *S.mutans* en condiciones ambientales de presión y temperatura (Temp: 21; DS+30 C; Presión 1012 +1011 mmHg/SNM) fue de 30,4643 minutos (Figura 4).

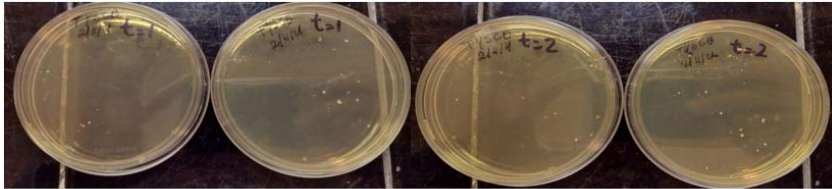
DISCUSIÓN

Distintos ensayos *in vitro* de bacterias como *Escherichia coli* o *Enterococcus* spp. mostraron que en

RESULTADOS

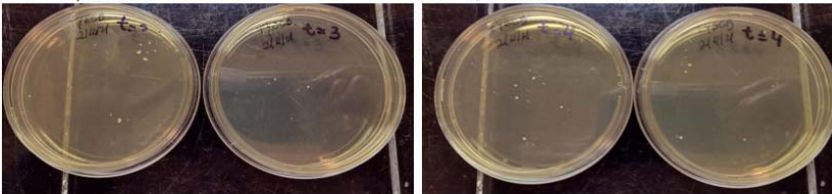


RECuento INICIAL: $T_0 = 3,25 \times 10^4$ UFC/ml
 $5,2 \times 10^6$ UFC/ml



$T_1 = 2,63 \times 10^4$ UFC/ml

$T_2 = 1,85 \times 10^4$ UFC/ml



$T_3 = 1,93 \times 10^3$ UFC/ml

$T_4 = 1,2 \times 10^3$ UFC/ml

FIGURA 3. Recuento de unidades formadoras de colonias cultivadas en medio agar TYCSB de los tiempos estudiados (por duplicado) transcurridas las 48 hs de incubación.

CURVA DE SUPERVIVENCIA DE *S. MUTANS*

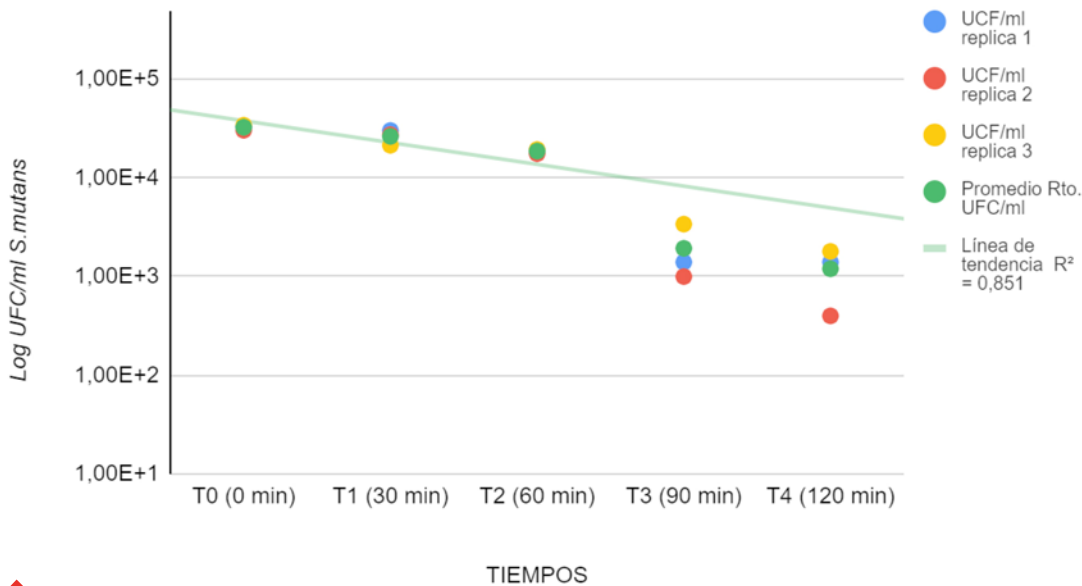


FIGURA 4. Recuento de *S. mutans* (Tiempo/ UFC/ml): $T_i = 5,33E+06$ DS: $4,92E+06$; T_0 (0 min) $3,25E+04$ DS: $1,94E+03$; T_1 (30 min) $2,63E+04$ DS: $4,50E+03$; T_2 (60 min) $1,87E+04$ DS: $9,45E+02$; T_3 (90 min) $1,93E+03$ DS: $1,29E+03$; T_4 (120 min) $1,20E+03$ DS: $7,21E+02$. Tiempo de reducción decimal $Dt = t / \text{Log}(N_i/N_f) = 30,46$

condiciones ambientales favorables presentan una viabilidad de 16 y 4 meses respectivamente sobre superficies inertes (Castañeda y Ordoñez, 2014; Kramer et al., 2006). Escasas investigaciones han analizado la supervivencia de *Streptococcus mutans* y la capacidad de los fómites para intervenir en su transmisión (Kraay et al., 2018). En nuestras condiciones

de trabajo, *S. mutans* permaneció viable durante 2 horas. El estudio, realizado por Köhler y Bratthall, (1978), sobre cucharas contaminadas con saliva, observó una disminución significativa del número de UFC de *S. mutans* a partir de las 7 hs. Saravia et al., (2008), realizaron una experiencia en condiciones similares a la nuestra; pero emplearon cepillos den-

tales, como fómites. Su experiencia demostró que *S.mutans* solo permaneció viable durante las primeras 8 hs. Sin embargo, los trabajos antes mencionados, no emplean el tiempo de reducción decimal para estimar el número de sobrevivientes.

Las diferencias en los tiempos de sobrevida podrían asociarse con las características metabólicas de los microorganismos, los diferentes tipos de materiales estudiados, texturas y características de las superficies. Factores ambientales como temperatura, presión y humedad también condicionan la viabilidad de los microorganismos (Katzenberger et al., 2021).

La persistencia de los microorganismos sobre las superficies de elementos inertes los convierte en fómites, que facilitarían su transmisión por un mecanismo indirecto. Mientras más tiempo permanezca un agente infeccioso sobre una superficie habrá un mayor riesgo de transmisibilidad e infección. La cinética de supervivencia ensayada, estima una disminución del 90% de la carga bacteriana en un plazo de 3,5 horas. Por consiguiente 2 horas podrían ser suficientes para convertir a los bloques plásticos en fómites habituales dentro de los elementos de juego en la primera infancia.

CONCLUSIÓN

En las condiciones experimentales, acorde al tiempo de reducción decimal de este ensayo, *S.mutans* permaneció viable sobre las superficies empleadas al cabo de 2 horas. En iguales condiciones, la sobrevida de *S.mutans* podría extenderse por otros 90 minutos.

REFERENCIAS

Baca, P., Castillo, A. M., Liébana, M. J., Castillo, F., Martín-Platero, A., y Liébana, J. (2012). Horizontal transmission of *Streptococcus mutans* in schoolchildren. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 17(3), e495–e500. <https://doi.org/10.4317/medoral.17592>

Bhaumik, D., Manikandan, D., y Foxman, B. (2021). Cariogenic and oral health taxa in the oral cavity among children and adults: a scoping review. *Archives of Oral Biology*, 129, 105204. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2021.105204>

Castañeda, N. J. L., y Ordoñez, O. J. (2014). La supervivencia de los gérmenes intrahospitalarios en superficies inanimadas. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*, 27.28(107), 394–396. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=52277>

Cutrera, C., Cornejo, C., Squassi, A., Molgatini, S., y Gliosca, L. (30-31 octubre 2022). Estandarización del inóculo de *Streptococcus mutans* por medio de curvas de crecimiento [resumen presentación]. En D'Eramo, L. (comp), *Libro de Resúmenes de la LV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Odontológica, Buenos Aires, Argentina*. (pp. 89). Sociedad Argentina de Investigación Odontológica. https://saio.org.ar/wp-content/uploads/2022/12/LibroRRAASAI02022_v3.pdf

Doméjean, S., Zhan, L., DenBesten, P. K., Stamper, J., Boyce, W. T., y Featherstone, J. D. (2010). Horizontal transmission of *mutans streptococci* in children. *Journal of Dental Research*, 89(1), 51–55. <https://doi.org/10.1177/0022034509353400>

Fakhrudin, K. S., Ngo, H. C., y Samaranyake, L. P. (2019). Cariogenic microbiome and microbiota of the early primary dentition: a contemporary overview. *Oral Diseases*, 25(4), 982–995. <https://doi.org/10.1111/odi.12932>

Katzenberger, R. H., Rösel, A., y Vonberg, R. P. (2021). Bacterial survival on inanimate surfaces: a field study. *BMC Research Notes*, 14(1), 97. <https://doi.org/10.1186/s13104-021-05492-0>

Köhler, B., y Bratthall, D. (1978). Intrafamilial levels of *Streptococcus mutans* and some aspects of the bacterial transmission. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 86(1), 35–42. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1978.tb00605.x>

Kraay, A. N. M., Hayashi, M. A. L., Hernandez-Ceron, N., Spicknall, I. H., Eisenberg, M. C., Meza, R., y Eisenberg, J. N. S. (2018). Fomite-mediated transmission as a sufficient pathway: a comparative analysis across three viral pathogens. *BMC Infectious Diseases*, 18(1), 540. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3425-x>

Kramer, A., Schwebke, I., y Kampf, G. (2006). How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases*, 6, 130. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-130>

Marcantoni, M. (2018a). Caries dental. En Negroni, M. *Microbiología estomatológica. Fundamentos y guía práctica*. (3ra ed.) (pp. 245–258). Panamericana.

Marcantoni, M. (2018b). Ecología de la cavidad bucal. En Negroni, M. *Microbiología estomatológica. Fundamentos y guía práctica*. (3ra ed.) (pp. 229–244). Panamericana.

Marsh, P. D., y Martin, M. V. (2011). *Microbiología oral*. (5ta ed.). Amolca.

Santos, M. V., Zaritzky, N. E., y Califano, A. N. (abril 2011). Inactivación microbiana en productos cárneos acoplada a la simulación numérica de transferencia de energía [conferencia]. *I Jornadas de Investigación y Transferencia. La Plata, Buenos Aires, Argentina*. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/18074>

Saravia, M. E., Nelson-Filho, P., da Silva, R. A., Faria, G., Rossi, M. A., y Ito, I. Y. (2008). Viability of *Streptococcus mutans* toothbrush bristles. *Journal of Dentistry for Children*, 75(1), 29–32. <https://www.ingentaconnect.com/content/aapd/jodc/2008/00000075/00000001/art00007>

Zhang, Y., Wang, X., Li, H., Ni, C., Du, Z., y Yan, F. (2018). Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 99, 883–893. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.146>

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su gratitud al Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico y Molecular de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Odontología.

Este trabajo contó con el aporte económico del subsidio: 01-02-18 “Epidemiología de Enfermedades Bucales Prevalentes en la República Argentina: Prevalencia, Factores de Riesgo y Asociación con Condiciones Sistémicas”, otorgado por la Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires y el “Premio Colgate Palmolive” de la División Argentina (SAIO) International Association for Dental Research (IADR)” obtenido por el equipo de investigación en la LV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones Odontológicas 2022.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés

Dirección para correspondencia

Cátedra de Microbiología
Facultad de Odontología
Universidad de Buenos Aires
Marcelo T de Alvear 2142, Piso 2
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, C1122AAH
mcelia.cutrer@odontologia.uba.ar

La Revista de la Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires se encuentra bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 2.5 Argentina

