

**UNIVERSIDAD PRIVADA DE TACNA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA**



TESIS

**EFICACIA ANTIMICROBIANA DEL HIPOCLORITO DE CALCIO
AL 2,5% Y AL 5,25% Y DEL HIPOCLORITO DE SODIO AL 2,5%
Y AL 5,25% SOBRE LOS BIOFILMS DE ENTEROCOCCUS
FAECALIS Y CÁNDIDA ALBICANS EVALUACIÓN IN VITRO.
TACNA -2020**

AUTOR:

Ayala Sulca, Brunno Manuel

<https://orcid.org/0009-0007-4275-5187>

ASESORA:

Loayza Ortiz, Sandra Ximena

<https://orcid.org/0009-0001-2088-8014>

Tesis para optar el Título Profesional de:
Cirujano Dentista

TACNA – PERÚ

2024

DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD

Yo, Brunno Manuel Ayala Sulca, en calidad de Bachiller de la Escuela Profesional de Odontología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Privada de Tacna, identificado con DNI 74895128, declaro bajo juramento que:

1. Soy autor de la tesis titulada:

“ EFICACIA ANTIMICROBIANA DEL HIPOCLORITO DE CALCIO AL 2,5% Y AL 5,25% Y DEL HIPOCLORITO DE SODIO AL 2,5% Y AL 5,25% SOBRE LOS BIOFILMS DE ENTEROCOCCUS FAECALIS Y CÁNDIDA ALBICANS EVALUACIÓN IN VITRO. TACNA -2020”

Asesorada por Loayza Ortiz, Sandra Ximena (0009-0001-2088-8014), la cual presente para optar el: Título Profesional de Cirujano Dentista.

2. La tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente, habiéndose respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas.

3. La tesis presentada no atenta contra los derechos de terceros.

4. La tesis no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.

5. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falsificados, ni duplicados, ni copiados.

Por lo expuesto, mediante la presente asumo frente a La Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse por la autoría, originalidad y veracidad del contenido de la tesis, así como por los derechos sobre la obra.

En consecuencia, me hago responsable frente a La Universidad de cualquier responsabilidad que pudiera ocasionar, por el incumplimiento de lo declarado o que pudiera encontrar como causa del trabajo presentado, asumiendo todas las cargas pecuniarias que pudieran derivarse de ello a favor de terceros con motivo de acciones, reclamaciones o conflictos derivados del incumplimiento de lo declarado o las que encontrasen causa en el contenido de la tesis.

De identificarse fraude, piratería, plagio, falsificación o que el trabajo de investigación haya sido publicado anteriormente; asumo las consecuencias y sanciones que de nuestra acción se deriven, sometiéndonos a la normatividad vigente de la Universidad Privada de Tacna.



DNI: 72969809

Fecha: 31 DE MARZO DEL 2026

DEDICATORIA

A mi amada familia, mi esposa Shirley y mi hijo Massimo, el faro que iluminan mi camino y me dan fuerzas para siempre seguir adelante

A mi querida madre Sonia, la mujer que siempre está apoyándome

A mi hermana Luciana quien, aunque por el momento se encuentra lejos se que es por un gran futuro y eso me llena de orgullo

A mi segunda madre, mi bisabuela Sonia el pilar que siempre me mantiene firme y me apoya y a mi tía y madrina Glenda y mi prima hermana Samira el logro alcanzado no es solo mío, también son de ellos, porque cada sección del estudio realizado lleva la huella y respaldo.

AGRADECIMIENTOS

A mi amada familia, mi esposa Shirley y mi hijo Massimo, el faro que iluminan mi camino y me dan fuerzas para siempre seguir adelante

A mi querida madre Sonia, la mujer que siempre está apoyándome

A mi hermana Luciana quien, aunque por el momento se encuentra lejos se que es por un gran futuro y eso me llena de orgullo

A mi segunda madre, mi bisabuela Sonia el pilar que siempre me mantiene firme y me apoya y a mi tía y madrina Glenda y mi prima hermana Samira

A mis docentes y asesora quienes con su apoyo y sabiduría me ayudaron a poder culminar con esta tesis

RESUMEN

Objetivo: tuvo como propósito evaluar la actividad antimicrobiana del hipoclorito de calcio en concentraciones de 2,5 % y 5,25 %, así como del hipoclorito de sodio en las mismas concentraciones, frente a biofilms de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Candida albicans* ATCC 10231 en condiciones in vitro. El estudio se desarrolló bajo un enfoque experimental, prospectivo y de corte transversal. Para ello se emplearon cultivos de ambas cepas microbiológicas, los cuales fueron sembrados en placas de Petri y distribuidos aleatoriamente de acuerdo con los tratamientos establecidos. En cada caso se utilizaron discos impregnados con las diferentes soluciones evaluadas: hipoclorito de sodio al 2,5 % y 5,25 %, así como hipoclorito de calcio al 2,5 % y 5,25 %, considerándose ocho discos por cada concentración. En total se trabajó con 32 placas, cada una con cuatro discos estériles, lo que permitió analizar la capacidad inhibitoria de las sustancias mediante la medición de los halos de inhibición.

Palabras clave: Hipoclorito de calcio, Hipoclorito de sodio, *Enterococcus Faecalis*, *Cándida albicans*, Actividad antimicrobiana.

ABSTRACT

Objective: The present study aimed to evaluate the antimicrobial activity of calcium hypochlorite at concentrations of 2.5% and 5.25%, as well as sodium hypochlorite at the same concentrations, against biofilms of *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *Candida albicans* ATCC 10231 under in vitro conditions. The research was conducted using an experimental, prospective, and cross-sectional design. Microbial cultures of both strains were grown in Petri dishes and randomly distributed according to the established treatments. Discs impregnated with the tested solutions were used, including sodium hypochlorite at 2.5% and 5.25% and calcium hypochlorite at 2.5% and 5.25%, with eight discs considered for each concentration. A total of 32 plates were used, each containing four sterile discs, allowing the inhibitory capacity of the substances to be analyzed through the measurement of inhibition halos.

Keywords: Calcium hypochlorite, Sodium hypochlorite, *Enterococcus Faecalis*, *Candida albicans*, Antimicrobial activity.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	7
CAPÍTULO I.....	9
EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	9
1.1 Fundamentación del Problema	9
1.2 Formulación del Problema	9
1.3 Objetivo de la Investigación	10
1.3.1 Objetivo General	10
1.3.2. Objetivos Específicos	10
1.4. Justificación	11
CAPÍTULO II.....	12
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	12
2.1. Antecedentes de la Investigación.....	12
2.2. Marco Teórico	19
2.2.1. Biofilm	19
2.2.2. Irrigación endodóntica	23
CAPÍTULO III.....	27
HIPÓTESIS, VARIABLES Y DEFINICIONES OPERACIONALES.....	27
3.1 Hipótesis.....	27
3.2 Operacionalización de las variables.....	27
CAPÍTULO IV	28
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	28
4.1 Diseño de la Investigación.....	28
4.2 Ámbito de estudio	28
4.3 Muestra y Unidad de Estudio.....	28
4.4 Procedimientos y métodos	29
CAPÍTULO V	40
PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE DATOS	40
CAPÍTULO VI.....	41
RESULTADOS	41
DISCUSIÓN.....	50
CONCLUSIONES	52
RECOMENDACIONES	53
BIBLIOGRAFÍA	54
ANEXOS	57

INTRODUCCIÓN

El tratamiento de endodoncia busca conservar las piezas dentales dañadas para prevenir su pérdida y la subsiguiente reabsorción de hueso y tejidos adyacentes al diente que se haya perdido. Para ello, se extrae la pulpa dental y el espacio resultante se rellena, sellando con material biocompatible y resistente (1).

Limpiar y desinfectar es fundamental del conducto radicular. Eficazmente el conducto radicular, con el fin de erradicar los microorganismos. No obstante, durante la terapia del conducto radicular y por su misma anatomía compleja, la penetración de irrigantes y medicamentos es complicada, por lo que las bacterias resistentes pueden permanecer dentro del sistema del conducto y reinfectar el conducto si estas no son eliminadas (2).

El uso de soluciones químicas favorece exponencialmente a la erradicación de bacterias remanentes y residuos de tejido orgánico y a su vez ayuda a desinfectar el sistema de conducto radicular ya que estas actúan en zonas inaccesibles (3).

El hipoclorito de sodio (NaClO) es irrigante endodóntico más empleado en varias concentraciones. Sus características fundamentales son la habilidad para disolver la materia orgánica y suprimir los microorganismos, lo que permite eliminar el tejido pulpar y los residuos necróticos. No obstante, el Solución de cloro activo tiene propiedades citotóxicas y puede provocar necrosis tisular local si esta es extruida al área periapical, además estudios muestran que el NaClO en altas concentraciones y asociado a un agente quelante puede alterar el elemento orgánico e inorgánico de la dentina disminuyendo la fortaleza de los dientes ante fracturas y afectando de manera negativa el poder de unión de las restauraciones adhesivas a la dentina (6).

Otra limitación importante del Solución de cloro activo es su inestabilidad química, agentes externos como la temperatura, condiciones de almacenamiento y la luz, influyen en la disponibilidad de iones de cloro, que a la par influyen en el pronóstico del tratamiento de conducto.

Debido a estas características se están buscando alternativas de soluciones irrigantes, siendo el hipoclorito de calcio $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ como irrigante con propiedades antibacterianas y gran capacidad para promover disolución de tejidos blandos al mismo nivel que El Solución de cloro activo (NaClO) y, según investigaciones recientes, el hipoclorito de calcio ha demostrado ser biocompatibles y tener una citotoxicidad adecuada cuando se utilizan como solución para irrigar. mostrando resultados favorables de viabilidad e

induciendo un bajo nivel respuesta inflamatoria en comparación con el Solución de cloro activo .

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Fundamentación del Problema

En la terapia del conducto radicular varios irrigantes endodónticos han sido utilizados, sin embargo, no existe ningún irrigante endodóntico que sea considerado como irrigante ideal; por este motivo, se siguen estudiando soluciones irrigantes alternativas. Estudios científicos actuales afirman que el Solución de cloro activo (NaClO) es la solución irrigante más usada por su potente actividad antimicrobiana y su capacidad de disolución orgánica, no obstante, su citotoxicidad a concentraciones altas posee efectos negativos sobre la supervivencia y diferenciación de las células madre de la papila apical, estos factores interfieren en la reconstrucción periapical y la regeneración pulpar (7).

El hipoclorito de calcio ha sido estudiado como irrigante endodóntico, demostrando tener capacidad de disolución de tejidos y mayor contenido de cloro que el Solución de cloro activo en su misma concentración. La preparación de una solución de hipoclorito de calcio puede ser mucho más exacta que la del NaClO, ya que el Ca (ClO)₂ se puede pesar y agregar al agua antes de ser usado, mientras que una solución de NaClO se prepara diluyendo una solución de mayor concentración siendo ésta más inestable, y al mismo tiempo dificultando conseguir una concentración precisa de NaClO (8).

1.2 Formulación del Problema

Pregunta general

- ¿Cuál será la eficacia antimicrobiana del hipoclorito de calcio al 2,5% y 5,25% y el hipoclorito de sodio al 2,5% y 5,25% sobre los biofilms de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Cándida albicans* ATCC 10231?

Preguntas específicas

- ¿Cuál será la actividad antimicrobiana del hipoclorito de calcio al 2,5 % y al 5,25% sobre los biofilms de *Enterococcus faecalis* y *Cándida albicans*?
- ¿Cuál será la actividad antimicrobiana del Hipoclorito de sodio al 2,5 % y al 5,25% sobre los biofilms de *Enterococcus faecalis* y *Cándida albicans*?
- ¿Cuál será la diferencia entre la actividad antimicrobiana del hipoclorito de calcio al 2,5% y 5,25% y el hipoclorito de sodio al 2,5% y 5,25% frente a los biofilms de *Enterococcus faecalis* y *Cándida albicans*?

1.3 Objetivo de la Investigación

1.3.1 Objetivo General

- Determinar la eficacia antimicrobiana del hipoclorito de calcio al 2,5 % y 5,25% y el hipoclorito de sodio al 2,5% y 5,25% sobre los biofilms de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Cándida albicans* ATCC 10231 en un estudio in vitro Tacna 2020.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Medir la actividad antimicrobiana del hipoclorito de calcio al 2,5 % y al 5,25% sobre los biofilms de *Enterococcus faecalis* y *Cándida albicans*.
- Medir la actividad antimicrobiana del Hipoclorito de sodio al 2,5 % y al 5,25% sobre los biofilms de *Enterococcus faecalis* y *Cándida albicans*.
- Establecer si hay diferencia entre la actividad antimicrobiana del hipoclorito de calcio al 2,5% y 5,25% y el hipoclorito de sodio al 2,5% y 5,25% frente a los biofilms de *Enterococcus faecalis* y *Cándida albicans*.

1.4. Justificación

Con el presente trabajo de investigación se pretende comparar y evaluar la eficacia antimicrobiana del hipoclorito de calcio al 2,5% y 5,25% y el Solución de cloro activo al 2,5% y 5,25% , para poder ofrecer nuevas alternativas de irrigación endodóntica frente a microorganismos presentes en reinfecciones endodónticas, tales como el *Enterococcus faecalis* el cual se puede encontrar en conductos radiculares infectados con un porcentaje desde 32% hasta 70% , específicamente en procesos crónicos, también es común encontrar en procesos reincidentes a **Cándida albicans** la cual se encuentra en un porcentaje desde 1% hasta 17% en infecciones de conductos radiculares, en su gran mayoría en infecciones refractarias endodónticas.

Los resultados de la investigación serán de ayuda para nuevos estudios y permitirá resolver si el hipoclorito de calcio tiene el efecto antibacteriano deseado, para poder ayudar a la búsqueda del irrigante ideal en tratamientos de conducto.

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Antecedentes de la Investigación

Coaguila Llerena H. “Effects of Calcium Hypochlorite and Octenidine Hydrochloride on L929 And Human Periodontal Ligament Cells” Brazil : 2019

El objetivo fue evaluar la citotoxicidad y la migración celular del hipoclorito de calcio. [Ca (ClO) 2] e hidrocloreuro de octenidina - OCT (Octenisept®, Schülke & Mayr, Norderstedt, Alemania) en células L929 y del ligamento periodontal (hPDL). Las células fueron expuestas a diferentes dosis de diferentes soluciones: 2,5% y 5% Ca(ClO)₂, OCT al 0,1%, NaClO al 2,5% y CHX al 2% durante 10 min.

La viabilidad celular fue evaluada por metil-tiazol-tetrazolio (MTT) y neutral, ensayos de rojo (NR), y la migración celular se determinó mediante ensayo de cicatrización de heridas. Mediante ANOVA bidireccional y pruebas de Bonferroni ($\alpha = 0,05$). Los ensayos MTT y NR revelaron que el 0,1% de OCT fue menos citotóxico en las células hPDL ($p < 0,05$), de 2% CHX y 2,5% Ca(ClO)₂ ($p < 0,05$). No hubo diferencia significativa entre 2,5% NaClO y 5% Ca(ClO)₂ ($p > 0,05$), pero estas soluciones mostraron mayor citotoxicidad que las otras. El resultado fue el mismo para las células L929, excepto que no hubo diferencia entre 2% CHX y 2,5% Ca(ClO)₂ ($p > 0,05$). El ensayo de cicatrización de heridas en células L929 y hPDL mostró que la migración celular de OCT al 0,1%, CHX al 2% y Ca(ClO)₂ al 2,5% 2 grupos fue superior al 5% Ca(ClO)₂ y grupos de NaClO al 2,5% hasta 24 h ($p < 0,05$). En conclusión, 0,1% OCT tuvo menor citotoxicidad en las líneas celulares probadas que CHX, Ca(ClO)₂ y NaClO. La migración celular fue mayor para OCT al 0,1%, CHX al 2% y Ca(ClO)₂ al 2,5%. Por tanto, en términos de citotoxicidad, OCT y Ca(ClO)₂ de utilizarse como irrigantes del conducto radicular. (9)

Gómez C.R. “Evaluación in vitro de la eficacia antimicrobiana del Hipoclorito de Calcio al 2,5% y el Hipoclorito de Sodio al 2,5% sobre un Biofilm de *Enterococcus faecalis* y *Cándida albicans*.”; Perú: 2018

Un estudio se realizó para evaluar la efectividad antimicrobiana del hipoclorito sódico al 2,5% y del hipoclorito cálcico al 2,5% sobre biofilm; para ello, se reactivaron cepas de *Cándida albicans* y *Enterococcus faecalis* inoculando las colonias por separado a 0,5 en la escala de turbidez Mc Farland para garantizar (UFC/ml). Se mezclaron (5 ml) en solución salina. El biofilm fue sembrado en Agar BHI en diez placas Petri utilizando cuatro discos estériles por cada placa embebidos por soluciones de hipoclorito cálcico e hipoclorito sódico al 2,5%. Se utilizó agua destilada como control negativo y el hipoclorito sódico al 5,25% como control positivo. Tras incubar a 37 °C durante veinticuatro horas se midieron los halos inhibitorios. Se concluyó que el hipoclorito sódico y el cálcico presentan efecto antifúngico y antibacteriano comparable contra *Enterococcus faecalis* y *Cándida albicans*. (10)

De Paula K.B. “Calcium hypochlorite solutions An in vitro evaluation of antimicrobial action and pulp dissolution”. Brasil: 2018

Se comparó la habilidad de disolverse y la actividad antimicrobiana tisular de una solución de hipoclorito de calcio con otra solución de Solución de cloro activo con concentraciones de 0,5%, 1%, 2,5% y 5,25%. se usaron fragmentos de pulpa bovina para probar la disolución , y se usó el método de contacto con caldo para determinar el tiempo necesario para *Enterococcus faecalis* y se utilizó difusión en Agar para determinar los halos producidos por las sustancias del ensayo frente a *Enterococcus faecalis*, la conclusión de este estudio fue que la solución de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ demostró actividad antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis* y también puede disolver tejidos pulpaes. (11)

Cardozo L.R. “Effect of EDTA, sodium, and calcium hypochlorite on the inorganic component of root canal dentin: A SEM análisis”. Brasil: 2018

Se evaluó la influencia de los protocolos de irrigación de conductos con ; hipoclorito de calcio al 5,25% Ca(ClO), Solución de cloro activo al 5,25% (NaClO) y solución EDTA al 17% sobre el componente inorgánico de la dentina del conducto radicular utilizando sesenta raíces divididas en seis grupos al azar ; (n= 10): solución salina solución (SS) (control) ; solución salina (SSE) + EDTA al 17%; CH – 5,25% Ca (ClO)₂; CHE- 5,25% Ca(ClO) + EDTA al 17%; SH- 5,25% de NaClO; 5,25% de NaClO + 17% de EDTA , luego de la irrigación del canal, las muestras se dividieron longitudinalmente, como resultado final se concluye que el Ca(ClO)₂ y NaClO tienen un rendimiento similar para sacar la capa de mancha y eliminar el componente inorgánico sin embargo en el tercio apical NaClO con EDTA. (12)

Diaz Quispe. Y. “Evaluación del efecto antibacteriano de los irrigantes endodónticos contra cepas del Enterococcus Faecalis (ATCC29212).”; Perú: 2017

Se llevó a cabo una comparación in vitro de tres soluciones irrigantes para endodoncia (NaOCl 5%, clorhexidina 2% y EDTA 17%) sobre cepas de Enterococcus faecalis (ATCC29212) para la cual se realizó un muestreo de diez pocillos por grupo para el análisis de efectos sobre el crecimiento bacteriano a las 24, 48 y 72 horas, el cual consistió en la realización de cuatro ensayos: actividad antibacteriana con método en agar BHI, CMI (concentración mínima inhibitoria), CMB (efecto bactericida y bacteriostático) mediante un medio de dilución en BHI, y la prueba de citotoxicidad con la línea celular MDCK tras un ensayo colorimétrico por MTT. A partir de dicha comparación se puede decir que entre las tres soluciones irrigantes para endodoncia, la que más efecto antibacterial tiene es la CHX al 2%. y con menor efecto citotóxico. (13)

Ferraz Blattes G.B. “Cell migration, viability and tissue reaction of calcium hypochlorite based-solutions irrigants: An in vitro and in vivo study”. Brasil: 2017

Este estudio hizo un análisis in vitro de citotoxicidad para 3T3 cultivo de fibroblastos fue expuesto a diferentes concentraciones de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ y de NaClO , y se realizó un ensayo de raspado, la viabilidad se analizó con el ensayo de azul tripán, ambos fueron inyectados con soluciones de concentraciones al 1% y al 2,5%. En el tejido subcutáneo de ratas Wistar macho de 18 semanas, se evaluaba la respuesta inflamatoria a las 2 horas, 24 horas y 14 días tras inyecciones. Las muestras analizadas cualitativamente con microscopía óptica. Concluyó que el hipoclorito de calcio con efecto positivo sobre la viabilidad e induce un nivel bajo de inflamación, mostrando una biocompatibilidad y citotoxicidad adecuadas como solución irrigante. (14)

Dumani A. y Col. “Antibacterial Efficacy of Calcium Hypochlorite with Vibringe Sonic Irrigation System on *Enterococcus faecalis*: An In Vitro Study”. Turquía: 2016

Este análisis fue comparar de la Solución de cloro activo frente al hipoclorito de calcio con la irrigación sónica mediante el sistema de irrigación sónica (Vibringe), en conductos radiculares de 84 premolares unirradiculares ensanchados hasta una lima 40, que posteriormente se esterilizaron en autoclave, inoculándolas con *Enterococcus faecalis*, para después incurrir durante tres semanas respectivas. Los grupos muestrales se clasificaron en siete lotes dependiendo del protocolo de riego aplicado: G0: sin tratamiento; G1: agua destilada; G2: NaClO 2,5%; G3: $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ 2,5%; G4: agua destilada con activación sónica; G5: NaClO 2,5% con activación sónica; G6: $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ 2,5% con activación sónica. Posteriormente a la descontaminación se tomaron muestras microbiológicas y se llevaron a cabo los recuentos en forma de unidades de forma de colonia para el cálculo de los porcentajes de reducción. Se llegó a la conclusión de que la irrigación convencional como la sónica tienen propiedades antimicrobianas del NaClO y el $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ correspondientes para eliminar *Enterococcus faecalis* en el conducto de dientes extraídos de humanos. (15)

Santos Oliveira J “Quantitative Assessment of Root Canal Roughness with Calcium-Based Hypochlorite Irrigants by 3D CLSM” Brazil: 2014

Este estudio busco cuantificar la rugosidad del canal de Solución de cloro activo por microscopia de barrido laser confocal (CLSM), cincuenta y dos premolares humanos mandibulares fueron seccionados y organizados de manera aleatoria en trece grupos (n= 8); solución salina (control) ; 1%,2,5% y 5% de NaClO; 1%, 2,5% y 5% Ca(ClO)₂ , los grupos de hipoclorito se dividieron en con o sin EDTA, las concentraciones de cloro de las diferentes soluciones se midieron mediante tinción de yodo. La rugosidad superficial fue cuantificada por CLS, se pudo concluir que Ca(ClO)₂ modifico al NaClO, a las mismas concentraciones y combinaciones de EDTA utilizadas en este estudio, Ca(ClO)₂ y NaClO, ambos al 5% presentan una rugosidad significativa de la dentina alterada, superando la asociación de EDTA, por lo tanto las concentraciones de Ca(ClO)₂ que van del 1% al 2,5% pueden ser soluciones adecuadas para los protocolos para irrigar el conducto radicular. (16)

Dutta A. “Comparative Evaluation of Calcium Hypochlorite and Sodium Hypochlorite on Soft-tissue Dissolution”. Estados unidos: 2012

Con objetivo comparar in vitro del tejido del 5% e hipoclorito de calcio al 10% con dos concentraciones (1,36% y 4,65%) de Solución de cloro activo en el tejido muscular bovino, la solución de cloro de cada irrigante se determinó mediante titulación yodométrica, Se introdujeron en 5 ml de cada solución de prueba de muestra, pasados los 5 minutos , se secaron y lavaron, este proceso se repitió cada 5 minutos con una alícuota nueva de 5 ml de la solución de prueba durante 60 minutos o hasta que la disolución del tejido se completó, al final del estudio se determinó que no existieron diferencias relevantes entre las soluciones. (17)

Gómez C, Salcedo-Moncada D, Ayala G, Watanabe R, Pineda M, Alvéz-Temoche D, et al. Antimicrobial Efficacy of Calcium and Sodium Hypochlorite at Different Concentrations on a Biofilm of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*: An In Vitro Comparative Study. J Contemp Dent Pract. 1 de febrero de 2020;21(2):178-82.

Objetivo: Comparar la efectividad antimicrobiana del Solución de cloro activo (NaClO al 2,5% y 5,25%) y del Ca(ClO)₂ al 2,5% sobre una biopelícula de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Candida albicans* ATCC 10231.

Materiales y métodos: estudio experimental in vitro utilizando cepas previamente reactivadas de *C. albicans* y *E. faecalis*. Las colonias seleccionadas se estandarizaron para alcanzar una concentración de 10⁸ (UFC/mL) usando la escala de turbidez de McFarland (0,5). Posteriormente, el biofilm cultivado en agar infusión cerebro-corazón fue inoculado en 42 discos estériles que habían sido previamente impregnados con las soluciones experimentales. En cada placa de Petri se añadieron las soluciones de NaClO al 2,5% y Ca(ClO)₂. Luego, las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas en halos de inhibición utilizando la técnica de Kirby-Bauer.

Resultados: La media de los halos de inhibición que se obtuvieron con el uso de Ca(ClO)₂ y NaClO al 2,5% fue 13,42 ± 0,62 mm y 13,38 ± 0,64 mm respectivamente. De acuerdo con el análisis hecho a partir de la prueba de Tukey, no se encontraron diferencias significativas de los grupos de hipoclorito que se han utilizado (p = 0,989).

Conclusión: Tanto el Ca(ClO)₂ como el NaClO muestran eficiencia antimicrobiana similar contra las biopelículas formadas por *E. faecalis* y *C. albicans*, sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre ambos. (18)

Valera MC, Maekawa LE, Oliveira LD de, Jorge AOC, Shygei É, Carvalho CAT. In vitro antimicrobial activity of auxiliary chemical substances and natural extracts on Candida albicans and Enterococcus faecalis in root canals. Journal of Applied Oral Science. abril de 2013;21(2):118.

Objetivo:

fue analizar cómo la actividad antimicrobiana de extractos naturales y compuestos químicos auxiliares impacta sobre *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis*

Material y métodos:

Se utilizaron 72 raíces de dientes humanos, las cuales fueron contaminadas con *C. albicans* y *E. faecalis* a lo largo de 21 días. Los equipos se distribuyeron en función del agente químico utilizado: G1) Solución de cloro activo (NaClO) al 2,5%. G2) Gel con clorhexidina (CHX) al 2%. G3) Aceite de ricino. G4) Extracto glicólico de aloe vera. G5) Extracto glicólico de jengibre. G6) Solución salina estéril. Las muestras del conducto radicular se recolectaron en distintos momentos: recolección inicial, a los 21 días de la contaminación; 1.^a recolección, tras la instrumentación.

Resultados:

Los resultados fueron objeto de análisis mediante las pruebas estadísticas correspondientes de Kruskal-Wallis y de Dunn (5%) (Kruskal y Wallis 1952, Dunn 1961). El NaClO y la CHX eradican totalmente los microorganismos presentes en los conductos radiculares, mientras que el aceite de ricino y el extracto de jengibre lograron reducir significativa y sensiblemente el número de UFC de las bacterias utilizadas. La disminución de UFC/mL en la 1. y 2. recolecta es mayor en los grupos G1, G2, G3 y G4 en comparación con los grupos G5 y G6.

Conclusión:

Se llegó a la conclusión de que el hipoclorito sódico al 2.5% y el gel clorhexidina al 2% fueron los más efectivos en la erradicación de *C. albicans* y *E. faecalis*; a continuación, se encontraban el aceite de ricino y el extracto glicólico de jengibre.

(19)

2.2. Marco Teórico

2.2.1. Biofilm

La inclusión de hongos como huéspedes en la biopelícula oral es una innovación importante en la biología oral, las comunidades microbianas que habitan en la boca se desarrollan en una película biológica con una matriz extracelular protectora, las biopelículas específicas colonizan las superficies bucales blandas y duras, pero no todos los miembros del microbioma son formadores de biopelículas, además de bacterias y hongos, también contienen arqueas, parásitos y virus que infectan el epitelio oral que se transmiten mediante la saliva y las secreciones respiratorias. En la salud bucal, las biopelículas modulan el sistema inmunológico del huésped, que a su vez la tolera. (4)

Las bacterias y hongos comensales y su matriz polimérica e hidrata constituyen una defensa de primera línea contra los microorganismos patógenos, cualquier ruptura favorece las infecciones locales (gingivitis y periodontitis, caries dentales e infecciones endodónticas, candidiasis bucal, mucositis, periimplantitis) así como neumonía por aspiración e infecciones de transmisión sanguínea (endocarditis infecciosa, abscesos profundos).

Las infecciones bucales a menudo se complican con dolor bucal y pérdida de dientes, lo que aumenta el riesgo de anorexia y desnutrición, la evidencia apunta una asociación entre infecciones orales, la inflamación resultante y enfermedades neurodegenerativas. (4)

2.2.1.1. *Enterococcus faecalis*

Es un integrante ubicuo del microbiota intestinal humana sana, también es un patógeno oportunista común y uno de los causantes de infecciones nosocomiales. Este microbio resistente está bien preparado para infectar y perdurar en diversos nichos dentro del huésped mamífero y puede concordar rápidamente su metabolismo para responder a nuevos ambientes, permitiendo la infección en sitios que incluyen el tracto gastrointestinal, tracto urinario, epitelio herido, corazón y sangre. Para resistir y persistir frente a las respuestas inmunitarias del huésped, *Enterococcus faecalis* tiene un arsenal de estrategias para eliminar o inactivar los mecanismos inmunes innatos y adaptativos. (20)

La flora microbiana presente en los canales después del fracaso del tratamiento de endodoncia está limitado a una reducida cantidad de especies microbianas, preponderantemente Gram positivas. Anaerobios facultativos, en especial *Enterococcus spp*, son los más comunes en estos casos y entre ellos la especie más frecuente aislada es *Enterococcus faecalis*, estudios demostraron que la frecuencia de especies de *Enterococcus* en raíces obturadas que presentan periodontitis apical puede llegar incluso a un 70%. (21)

El género *Enterococcus* pertenece a bacterias cocáceas, Gram positivas de tipo anaerobio facultativo, integran la flora normal de la cavidad oral, del tracto genital femenino, y del tracto gastrointestinal humano, y son reconocidos como causa del fracaso endodóntico y de algunas afecciones sistémicas como infecciones de tracto urinario, infecciones de heridas quirúrgicas, bacteriemia y endocarditis bacteriana, han desarrollado resistencia de alto nivel a los agentes antimicrobianos y disponen de considerables factores de virulencia como son ; sustancias de agregación, proteínas de superficie, gelatinosa, producción de superóxido extracelular, polisacáridos capsulares y determinante de resistencia a los antibióticos , estas bacterias se reconocen como potenciales patógenos humanos, responsables del 12% de las infecciones

nosocomiales. De esta especie de *Enterococcus*, *Enterococcus faecalis* es la más recurrente en reinfecciones endodónticas, siendo esta un patógeno oportunista por su fuerte presencia en canales radiculares donde el tratamiento de conductos ha fracasado, y en la cual su permanencia en los canales representa una problemática terapéutica importante. (21)

Según las condiciones que se presentan en los conductos radiculares, algunas bacterias tienen mayor capacidad de supervivencia y pueden multiplicarse más que otras. Es muy frecuente encontrar anaerobios estrictos en canales infectados de manera primaria y anaerobios facultativos en casos de tratamientos de endodoncia fallidos. (21)

2.2.1.2. *Candida albicans*

La familia cándida pertenece a Un conjunto de levaduras que invitan a los humanos residen en el tracto digestivo, las mucosas, la piel, el tracto respiratorio alto y el tracto genitourinario. Tienen la capacidad de volverse patógenos oportunistas, produciendo candidiasis, la cual la mayoría de las veces afecta a individuos inmunosuprimidos o con el sistema inmunológico bajo. Este microorganismo es considerado La especie más dañina del reino Fungi por su habilidad para crecer, multiplicarse y, sobre todo, por su capacidad de adherirse. (5)

El microorganismo que se aísla con mayor regularidad en la cavidad bucal es la Cándida, especialmente en la placa dentaria, en el interior de los dientes o como parte de la flora subgingival y en los canales de los dientes.

Existen más de 200 especies de Cándida, lo que significa que hay algunas que pertenecen a la flora normal de la cavidad oral; sin embargo, solamente nueve especies son consideradas como patógenas en el hombre, dado que se adaptan a la temperatura que con frecuencia tiene un rango de 37°C, la cual es la mejor para que la Cándida pueda desarrollarse.

Los pacientes que tienen factores de riesgo, como:

- Inmunodeprimidos
- Mujeres que están en estado de embarazo
- Individuos con diabetes
- Pacientes que están recibiendo quimioterapia
- Empleo de antibióticos durante un tiempo largo
- Pacientes que son positivos al VIH
- Terapias con corticosteroides
- Saliva ácida
- Xerostomía
- Fumar
- Lesiones erosivas en la mucosa de la boca
- Higiene oral inadecuada
- Uso excesivo de antisépticos bucales
- Carencia de hierro y vitaminas

La enfermedad provocada por *Cándida* en la boca puede llegar a ser letal al tratarse de una infección que podría ser capaz de extenderse a los músculos profundos de la boca, a la faringe o a la laringe y obstruir las vías respiratorias debido a la inflamación, que puede llegar a ser muy severa, y, si el hongo penetra en el torrente sanguíneo, puede causar una micosis sistémica. Esta enfermedad es conocida como candidiasis oral. (22)

Se ha comprobado que tiene características de virulencia y desempeña un papel significativo en el proceso infeccioso. Los mecanismos implicados en la patogénesis son:

- Capacidad de adaptarse a la diversidad de condiciones del medio
- Aderencia a superficies diversas
- Producción de enzimas hidrolíticas.
- Cambio morfológico
- Biopelícula
- Evasión de las defensas del hospedador/inmunomodulación de las defensas del hospedador

Investigaciones han demostrado que las levaduras logran ser aisladas de 1 a 17% en reinfecciones de los conductos radiculares, debido a su virulencia es capaz de resistir cambios ambientales durante y después de ser sometido a tratamiento de conducto. Se ha distinguido que por ser un microorganismo dentinofílico es capaz de afiliarse al colágeno tipo I tipo IV y de coagregarse utilizando la dentina como fuente de nutrición con varias bacterias orales, tiene la capacidad de formar biopelícula en superficies diferentes y esta propiedad que la caracteriza del resto de las especies que son menos capaces de formar biofilm por lo que se la considera muy patógena. (23)

2.2.2. Irrigación endodóntica

Ésta es la introducción de tratamientos en la cavidad pulpar (ya sea antes, durante o después de preparación mecánica) mediante la cual se consigue descontaminar y desinfectar el sistema de conductos para dar con el tratamiento. No hay, lógicamente, ninguna sustancia que se utiliza en endodoncia que se ajuste a la definición de irrigante ideal. (24)

2.2.2.1. Características ideales de un irrigante endodóntico

En lo ideal, el antibacteriano muestra una eficacia de bactericida y/o bacteriostático ya que se considera un tratamiento de la eliminación de los microorganismos y sus respectivas toxinas. Por lo tanto se podría conllevar a una posible conclusión de que si no se pueden eliminar, el fracaso endodóntico puede llegar a ocurrir.

-Disolvente de restos orgánicos e inorgánicos: el hipoclorito tiene la capacidad de desnaturalizar proteínas e introducirse en restos de tejido pulpar en ubicaciones casi inaccesibles o que se pueden producir de situaciones anatomofisiológicas relacionadas con accidentes en los conductos, pero esta es la razón fundamental por la cual presenta una alta toxicidad.

-Baja tensión superficial: esta característica fluya dentro de los canalículos intrarradiculares a veces inaccesibles, mientras más

baja sea la tensión superficial, mayor será la capacidad de penetrar en los túbulos dentinales.

-Fácil aplicación: todo irrigante ideal debe tener esta cualidad

-Acción rápida: una vez dentro del conducto, esta propiedad debe permitir y facilitar el trabajo sin que sus características químicas y físicas retarden y no faciliten el trabajo. (25)

2.2.2.2. Irrigante endodóntico

a) Hipoclorito de sodio (NaClO)

Contiene ácido hipocloroso (HClO) e hidróxido sódico (NaOH). Por lo tanto, dado que presenta propiedades antivirales, antimicóticas y antimicrobianas, como por ejemplo la del virus de la inmunodeficiencia humana, se utiliza como irrigante principal en los tratamientos endodónticos, además de tener un efecto residual de hasta 72 horas.(6) Es usado en diferentes concentraciones. (6)

El Solución de cloro activo presenta propiedades específicas: Disminuye El pH. Desde las soluciones de este compuesto en estado puro son de 12, lo que quiere decir que el cloro accesible en esas concentraciones es totalmente C; y también se precisa que las disoluciones con un pH van a ser menos tóxicas. (6)

No obstante, El bicarbonato y el Solución de cloro activo, al combinarse, generan una solución inestable que tiene un tiempo de vida útil en almacén inferior a una semana.

Activación ultrasónica: son las reacciones químicas se aceleran, se crea un efecto cavitacional y la acción de limpieza se vuelve más efectiva. Sin embargo, investigaciones muestran que la diferencia con el sistema convencional es mínima. (6)

b) Hipoclorito de calcio

El hipoclorito de calcio (Ca (OCl)₂) es un polvo químicamente

similar al Solución de cloro activo, relativamente estable con una alta disponibilidad de cloro de hasta 65%, forma dos veces más ácido hipocloroso que el Solución de cloro activo, y que el hidróxido de calcio cuando se mezcla con agua, esta solución comenzó a estudiarse como una opción al NaOCl para su uso durante tratamientos de conducto. A diferencia de NaOCl. (26)

El hipoclorito de calcio pertenece a la clase de compuestos químicos conocidos como sales de oxiácido de halógeno, también se le conoce como cal clorada, se produce disolviendo gas cloro (Cl_2) en una solución de óxido de calcio (CaO) e hidróxido de sodio. es ampliamente utilizado en tratamiento de aguas por su alta efectividad contra bacterias, algas, moho, hongos y microorganismos peligrosos para la salud humana, también es un agente blanqueador, con apariencia granulosa, color beige claro, en un estado acuoso desprende un olor parecido al del Solución de cloro activo. (26)

Estudios recientes concluyen que las soluciones de hipoclorito de calcio son extremadamente alcalinas y tienen una tensión superficial mayor que Solución de cloro activo. En cuanto al

Cuando se conservan a 25 °C, estas soluciones tienden a ser estables durante 30 días.. (26)

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS, VARIABLES Y DEFINICIONES OPERACIONALES

3.1 Hipótesis

HO: La eficacia antimicrobiana del hipoclorito de calcio al 2,5% y 5,25% es menor que la del Solución de cloro activo al 2,5% y 5,25% sobre los biofilms de *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212 y *Cándida Albicans* ATCC 10231.

H1: La eficacia antimicrobiana del hipoclorito de calcio al 2,5% y 5,25% es mayor que la del Solución de cloro activo al 2,5% y 5,25% sobre los biofilms de *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212 y *Cándida Albicans* ATCC 10231.

3.2 Operacionalización de las variables

Variables de estudio			Indicadores	Categorización	Escala de medición
Independiente	Soluciones irrigantes	Hipoclorito de calcio	Concentración	2,5% 5,25%	Nominal
		Hipoclorito de sodio	Concentración	2,5% 5,25%	Nominal
Dependiente	Efectividad antimicrobiana	Método de difusión en Agar	Presencia de halo de inhibición	Razón continua	

CAPÍTULO IV

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

4.1 Diseño de la Investigación

Experimental: al ser un estudio in vitro donde introducimos intencionalmente una o más variables (variable independiente) para demostrar si hay un efecto sobre la otra variable (variable dependiente).

Prospectiva: la información fue recopilados y obtenidos de primera fuente.

Transversal: las variables fueron estudiadas en un determinado momento en el tiempo.

4.2 Ámbito de estudio

El presente estudio se desarrolló en la Universidad Privada de Tacna específicamente en la Facultad de Ciencias de la Salud, en el laboratorio de Microbiología con el propósito de evaluar la efectividad antibacteriana del hipoclorito de calcio y el hipoclorito de sodio ante biofilm de *Enterococcus faecalis* y *cándida albicans*.

4.3 Muestra y Unidad de Estudio

Conformada por las colonias de *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212 y *Cándida Albicans* ATCC 10231 y el conjunto de cultivo de placas Petri, organizando la división por grupos para evaluar la actividad antimicrobiana, obteniéndose:

- 8 discos para *Enterococcus faecalis* al 5,25% para/ con hipoclorito de calcio
- 8 discos para *Candida albicans* al 5,25% para hipoclorito de calcio
- 8 discos para *Enterococcus faecalis* al 2,5% para hipoclorito de calcio
- 8 discos para *Candida albicans* al 5,25% para hipoclorito de calcio
- 8 discos para *Enterococcus faecalis* al 5,25% para hipoclorito de sodio
- 8 discos para *Candida albicans* al 5,25% para hipoclorito de sodio
- 8 discos para *Enterococcus faecalis* al 2,5% para hipoclorito de sodio
- 8 discos para *Candida albicans* al 5,25% para hipoclorito de sodio
- 4 discos para control positivo
- 4 discos para control negativo

en total 18 placas con 4 discos estériles por placa, que incluyen dos placas de control: una positiva y otra negativa.

Examinando de esta manera el efecto antibacteriano, utilizando los irrigantes de Solución de cloro activo y hipoclorito de calcio en concentraciones del 2.5% y del 5.25%.

4.3.1 Criterios de inclusión

- Cepa de “*Enterococcus Faecalis* ATCC 29212” viable
- Cepa de “*Candida albicans* ATCC 10231” viable
- Solución clorada de sodio al 2,5%
- Solución clorada de sodio al 5,25%
- Solución de hipoclorito de calcio al 2,5%
- Solución de hipoclorito de calcio al 5,25%

4.3.2 Criterios de exclusión

- Placas Petri que están contaminadas en la investigación de cultivo.
- Colonias de *Enterococcus faecalis* contaminadas.
- Colonias de *Candida albicans* contaminadas.
- Discos de sensibilidad de ceftriaxona en mal estado o contaminados
- Discos de sensibilidad de nistatina en mal estado o contaminados
- Discos de sensibilidad vencidos

4.4 Procedimientos y métodos

4.4.1 Activación de las cepas liofilizadas

Se emplearon en esta investigación dos cepas de bacterias adquiridas a partir de un medio comercial: *Cándida albicans* (ATCC 10231) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), obtuvieron de GenLab del Perú S.A.C.

El primer paso es la reactivación de *Enterococcus Faecalis*, utilizando el medio de cultivo Agar soya tripticasa, manteniendo condiciones aerobias $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante un periodo de 24 a 48 horas; además hacemos la reactivación de *Cándida albicans* sobre Agar Sabouraud al 2% con incubaciones de entre 2 a 7 días en $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

4.4.2 Preparación del inóculo

- Se utilizó un asa de Kolle para recoger diversas colonias con un aspecto parecido que habían crecido en medios de cultivo. Estas se pasaron a un tubo con 10 ml de caldo BHI, donde se homogeneizaron con un vórtex. Luego, ese tubo se incubó a $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ y en condiciones anaerobias. La incubación continuó hasta estar turbidez alcanzó el estándar de 0,5 de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ microorganismos/ml). Esto se consiguió, por lo general, en un periodo de 2 a 3 horas.

Tabla de comparación para escala de Mc Farland (anexo 07)

- Se utilizó la técnica de difusión en disco, inspirada en el método Kirby-Bauer.

4.4.2.1 preparación de los discos

Se diseñaron sensibilidad con nistatina para *Cándida albicans* y ceftriaxona para *Enterococcus faecalis*, y se dejaron en un beaker de 100 ml con agua para ser esterilizados y desnaturalizados en autoclave (121°C , 15 lb x 15 minutos).

Después, el agua del vaso de precipitados que contenía la solución desnaturalizada fue eliminada. Luego, los discos fueron llevados a un horno regulado a 180 °C durante media hora para secarse y posteriormente ser utilizados.

Se uso el procedimiento de difusión en disco para analizar la acción antibacteriana del Solución de cloro activo y del hipoclorito de calcio con concentración del 2,5% y 5,25%. Los discos de 6 mm de diámetro, que habían sido esterilizados con anterioridad, se impregnaron con una cantidad específica de solución irrigadora. Con 8 repeticiones por cada bacteria y levadura, por cada concentración por cada irrigante.

Las pruebas también incluyen un control negativo y positivo

4.4.2.2 inoculación

Se inoculó agar Mueller-Hinton con una suspensión bacteriana de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. Luego se añadieron 100 μ l del inóculo en cada placa y se distribuyeron uniformemente con asa de Drigalsky, dejándose secar a temperatura ambiente. entre 3 y 5 minutos antes de poner los discos con las concentraciones correspondientes. Se colocaron cuatro discos en cada placa de agar Mueller Hinton con la ayuda de una pinza estéril después de que se absorbió el inóculo. Se agregó a los discos soluciones de Solución de cloro activo (2,5 % y 5,25 %) y de hipoclorito de calcio (2,5 % y 5,25 %), se impregnaron los discos con las mismas y se presionó levemente para garantizar el contacto con el medio.

4.4.2.3 incubación

Las placas se incubaron durante 18 a 24 horas en una cámara anaeróbica a una temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ para observar los halos de inhibición.

4.4.2.4 lectura (kirby Bauer)

La lectura midiendo los halos de inhibición con el vernier digital en relación al desarrollo del microorganismo alrededor del disco. En relación con los microorganismos analizados, la actividad antifúngica y antibacteriana del Solución de cloro activo (2,5% y 5,25%) y del hipoclorito de calcio (2,5% y 5,25%) fue directamente proporcional al diámetro de la zona de inhibición. Se utilizaron las directrices de Duraffourd y Lapraz (1983) para analizar los resultados.

- resistente si fue menor o igual a 9 mm.
- intermedio de 9 a 14 mm.
- Sensible de 15 a 14 mm.

Tabla de recolección de datos

CANDIDA ALBICANS								
Ca(ClO)2 2,5%	16.83	16.92	16.79	17.01	16.95	16.79	16.99	17.03
Ca(ClO)2 5,25%	22.70	20.88	22.50	20.91	22.81	21.80	22.95	22.50

CANDIDA ALBICANS								
NaClO 2,5%	20.52	19.91	20.45	20.30	19.95	19.89	20.35	20.20
NaClO 5,25 %	22.59	23.10	22.69	23.12	22.91	22.89	22.90	22.79

ENTEROCOCCUS FAECALIS								
Ca(ClO)2 2,5%	16.37	16.21	16.40	16.69	16.52	16.45	16.35	16.29
Ca(ClO)2 5,25%	26.99	26.06	26.20	27.01	26.35	26.85	26.22	26.25

ENTEROCOCCUS FAECALIS								
NaClO 2,5%	19.69	19.81	19.89	19.91	19.60	19.75	19.71	19.90
NaClO 5,25 %	24.98	25.01	24.80	24.85	24.89	24.79	25.02	24.97

4.4.2.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) (Valdezate et al., 2001)

Ecuación a mg para determinar la concentración que habrá

5,25 g → 100 ml 2,5 g → 100 ml

52,50 g → 1000 ul X → 30 ul

X → 30 ml X = 0,00075 g → 30 ul

X = 1,575 g → 1575 mg

7,5 mg

4.4.2.5.1 PREPARACIÓN DEL CMI (CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA) PARA *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*.

Se compararon los distintos tratamientos con los controles siguientes: uno era un tubo que contenía 2900 ul de medio y 100 ul de DMSO, y el otro, una solución bacteriana de 100 ul (control positivo).

NaClO / 2,5 %

Nº de tubo	Volumen de solución Madre	Concentración en 1000 ul (S.M.) (mg/ml)	Vol. Caldo Mueller Hinton	Bacteria <i>Enterococcus faecalis</i>	Volumen total
1	0 ul	0 mg	2700 ul	300 ul	3000 ul
2	12 ul	0,1 mg	2,388 ul	300 ul	3000 ul
3	24 ul	0,2 mg	2,376 ul	300 ul	3000 ul
4	36 ul	0,3 mg	2,364 ul	300 ul	3000 ul
5	48 ul	0,4 mg	2,252 ul	300 ul	3000 ul
6	60 ul	0,5 mg	2,340 ul	300 ul	3000 ul
7	72 ul	0,6 mg	2,328 ul	300 ul	3000 ul
8	90 ul	0,75 mg	2,310 ul	300 ul	3000 ul

Ca (ClO)₂ / 2,5 %

Nº de tubo	Volumen de solución Madre	Concentración en 1000 ul (S.M.) (mg/ml)	Vol. Caldo Mueller Hinton	Bacteria <i>Enterococcus faecalis</i>	Volumen total
1	0 ul	0 mg	2700 ul	300 ul	3000 ul
2	12 ul	0,1 mg	2,388 ul	300 ul	3000 ul
3	24 ul	0,2 mg	2,376 ul	300 ul	3000 ul
4	36 ul	0,3 mg	2,364 ul	300 ul	3000 ul
5	48 ul	0,4 mg	2,252 ul	300 ul	3000 ul
6	60 ul	0,5 mg	2,340 ul	300 ul	3000 ul
7	72 ul	0,6 mg	2,328 ul	300 ul	3000 ul
8	90 ul	0,75 mg	2,310 ul	300 ul	3000 ul

NaClO / 5,25 %

Nº de tubo	Volumen de solución Madre	Concentración en 1000 ul (S.M.) (mg/ml)	Vol. Caldo Mueller Hinton	levadura <i>Candida albicans</i>	Volumen total
1	0 ul	0 mg	2700 ul	300 ul	3000 ul
2	12 ul	0,1 mg	2,388 ul	300 ul	3000 ul
3	24 ul	0,2 mg	2,376 ul	300 ul	3000 ul
4	36 ul	0,3 mg	2,364 ul	300 ul	3000 ul
5	48 ul	0,4 mg	2,252 ul	300 ul	3000 ul
6	60 ul	0,5 mg	2,340 ul	300 ul	3000 ul
7	72 ul	0,6 mg	2,328 ul	300 ul	3000 ul
8	90 ul	0,75 mg	2,310 ul	300 ul	3000 ul

CaClO / 5,25 %					
Nº de tubo	Volumen de solución Madre	Concentración en 1000 ul (S.M.) (mg/ml)	Vol. Caldo Mueller Hinton	Levadura <i>Candida albicans</i>	Volumen total
1	0 ul	0 mg	2700 ul	300 ul	3000 ul
2	12,857 ul	0,225 mg	2387,14 ul	300 ul	3000 ul
3	25,71 ul	0,45 mg	2374,285 ul	300 ul	3000 ul
4	38,571 ul	0,625 mg	2361,428 ul	300 ul	3000 ul
5	51,428 ul	0,9 mg	2348,571 ul	300 ul	3000 ul
6	64,285 ul	1,125 mg	2335,714 ul	300 ul	3000 ul
7	77,142 ul	1,35 mg	2322,857 ul	300 ul	3000 ul
8	90 ul	1,575 mg	2310 ul	300 ul	3000 ul

Anaerobiosis por 24 horas a 37°C

4.4.3. PREPARACIÓN DE INOCULO BACTERIANO DE *Enterococcus faecalis* Y FUNGICO DE *Candida albicans*

La bacteria empleada en este trabajo fue cultivada de agar Mueller Hinton para su conservación. Las colonias se transfirieron a un tubo que contenía 5 ml de caldo Mueller Hinton (UFC).

LECTURA

Señala el crecimiento bacteriano, se puede observar después de 24 horas. Se conoce como Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) a la concentración que no presenta crecimiento, lo cual se determina por la ausencia de turbidez (en comparación con la control negativo).

4.5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) Y FUNGICIDA (CMA)

Se tomaron tres tubos de cada uno de los primeros que no mostraban turbidez, lo que hace un total de tres., después de lo cual fueron incubadas en cámara de anaerobiosis a 37°C por un periodo de 24 horas. Después de este periodo, se registró la cantidad de unidades.

CAPÍTULO V

PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE DATOS

El estudio se basó en un diseño experimental totalmente aleatorio y utilizó el método de difusión en disco (Stell y Torrie, 1985) para analizar la sensibilidad de las bacterias patógenas al Solución de cloro activo a concentraciones del 2,5 % y 5,25 %. La información fue procesada a través de SPSS versión 20 para Windows, haciendo uso de la estadística descriptiva, que se muestra en tablas y gráficos. Además, el análisis inferencial con la prueba de Tukey y ANOVA, para determinar las diferencias producidas por las concentraciones de hipoclorito de calcio y sodio (5,25 % y 2,5 %) utilizando el método de difusión en disco (Durafourd y Lapraz, 1983) sobre *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis*. Los halos de inhibición se expresaron en mg/ml, por su parte sensibles se dieron en milímetros (mm).

CAPÍTULO VI

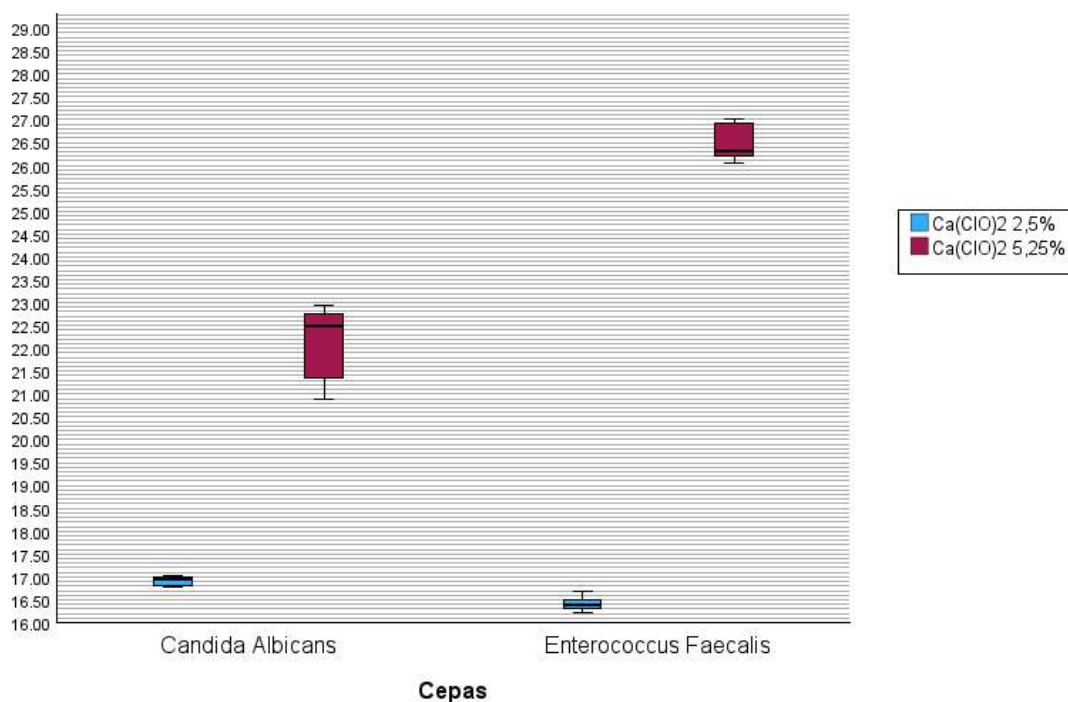
RESULTADOS

Tabla 1. Actividad antimicrobiana del hipoclorito de calcio al 2,5 % y al 5,25% en *Cándida albicans* ATCC 10231 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Cándida albicans ATCC 10231					
Concentración	N	Mínimo	Máximo	Media	DS
Ca(ClO) ₂ al 2,5%	8	16,79	17,03	16,9138	0,09826
Ca(ClO) ₂ al 5,25%	8	20,88	22,95	22,1313	0,83609
Enterococcus faecalis ATCC 29212					
Concentración	N	Mínimo	Máximo	Media	DS
Ca(ClO) ₂ al 2,5%	8	16,21	16,69	16,4100	0,14726
Ca(ClO) ₂ al 5,25%	8	26,06	27,01	26,4913	0,39080

Fuente: Elaboración propia.

Gráfico 1. Actividad antimicrobiana del hipoclorito de calcio al 2,5 % y al 5,25% en *Cándida albicans* ATCC 10231 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.



Fuente: Elaboración propia.

INTERPRETACIÓN

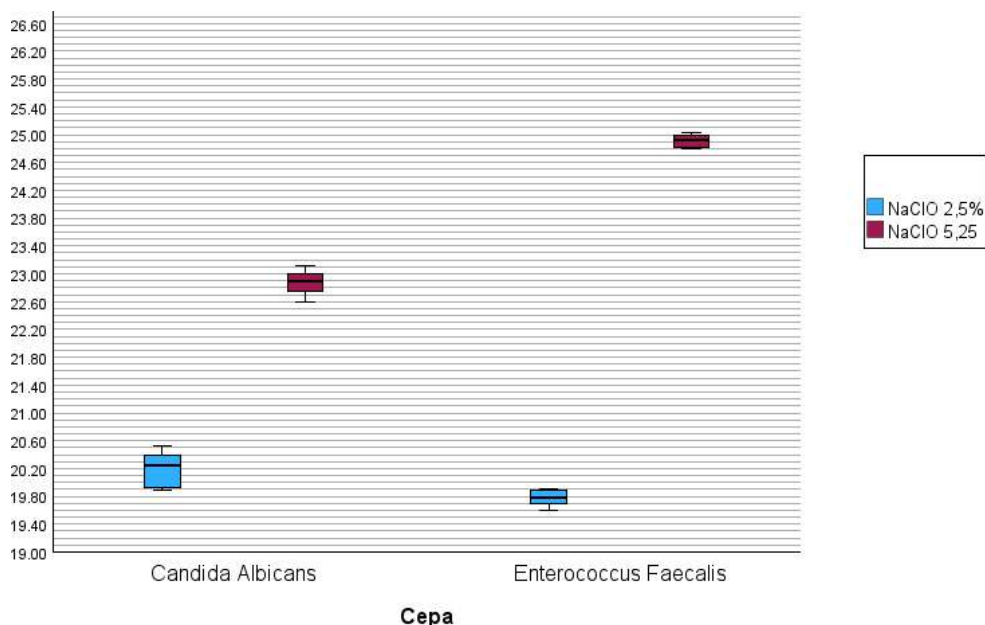
En la tabla y gráfico 1 podemos observar que en las placas de *Cándida albicans* ATCC 10231 fue el hipoclorito de calcio con concentración del 5,25% el que provocó mayor halo de inhibición con 22,13 ($\pm 0,84$), en el caso de las placas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 éste halo de inhibición fue inclusive mayor con el hipoclorito de calcio con concentración del 5,25% ya que el valor fue 26,49 ($\pm 0,39$).

Tabla 2. Actividad antimicrobiana del hipoclorito de sodio al 2,5 % y al 5,25% en *Cándida albicans* ATCC 10231 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Cándida albicans ATCC 10231					
Concentración	N	Mínimo	Máximo	Media	DS
NaClO al 2,5%	8	19,89	20,52	20,1963	0,25071
NaClO al 5,25%	8	22,59	23,12	22,8738	0,18338
Enterococcus faecalis ATCC 29212					
Concentración	N	Mínimo	Máximo	Media	DS
NaClO al 2,5%	8	19,60	19,91	19,7825	0,11374
NaClO al 5,25%	8	24,79	25,02	24,9138	0,09334

Fuente: Elaboración propia.

Gráfico 2. Actividad antimicrobiana del hipoclorito de sodio al 2,5 % y al 5,25% en *Cándida albicans* ATCC 10231 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.



Fuente: Elaboración propia.

INTERPRETACIÓN

En la tabla y gráfico 2 podemos observar que en las placas de *Cándida albicans* ATCC 10231 fue el Solución de cloro activo con concentración del 5,25% el que provocó mayor halo de inhibición con 22,87 ($\pm 0,18$), en el caso de las placas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 éste halo de inhibición fue inclusive mayor con el Solución de cloro activo con concentración del 5,25% ya que el valor fue 24,91 ($\pm 0,09$).

Tabla 3. Prueba de normalidad en hipoclorito de calcio e hipoclorito de sodio al 2,5% y 5,25% en *Cándida albicans* ATCC 10231.

Concentración	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Ca(ClO) ₂ al 2,5%	0,885	8	0,208
Ca(ClO) ₂ al 5,25%	0,827	8	0,055
NaClO al 2,5%	0,895	8	0,263
NaClO al 5,25%	0,946	8	0,673

Fuente: Elaboración propia.

INTERPRETACIÓN

La normalidad nos muestra que los valores de los cuatro tipos de sustancias y concentraciones utilizadas para valorar la actividad antimicrobiana en las placas de *Cándida albicans* ATCC 10231 mantienen una distribución normal (Sig.>0,05). Por lo tanto, es posible utilizar una prueba paramétrica para la evaluación de diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 4. Comparación de la actividad antimicrobiana del hipoclorito de calcio al 2,5% y 5,25% y el Solución de cloro activo al 2,5% y 5,25% frente a los biofilms de *Cándida albicans*.

ANOVA					
	Suma	de	Media	F	Sig.
	cuadrados	gl	cuadrática		
Entre grupos	169,966	3	56,655	281,456	,000
Dentro de grupos	5,636	28	,201		
Total	175,603	31			

Fuente: Elaboración propia.

INTERPRETACIÓN

La prueba estadística ANOVA utilizada en muestras independientes nos permite conocer que al contar con un Sig. menor a 0,05 podemos asumir que entre las diversas sustancias y concentraciones utilizadas como antimicrobiano en los biofilms de *Cándida albicans*, existió diferencias estadísticamente significativas. La extensión e identificación de estas diferencias fueron analizadas con pruebas PostHoc.

Tabla 5. Prueba HSD Tuckey para comparación de la actividad antimicrobiana del hipoclorito de calcio al 2,5% y 5,25% y el Solución de cloro activo al 2,5% y 5,25% frente a los biofilms de *Candida albicans*.

(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	confianza al 95%	
					inferior	superior
Ca(ClO)2 2,5%	Ca(ClO)2 5,25%	-5,21750*	,22433	,000	-5,8300	-4,6050
	NaClO 2,5%	-3,28250*	,22433	,000	-3,8950	-2,6700
	NaClO 5,25%	-5,96000*	,22433	,000	-6,5725	-5,3475
Ca(ClO)2 5,25%	Ca(ClO)2 2,5%	5,21750*	,22433	,000	4,6050	5,8300
	NaClO 2,5%	1,93500*	,22433	,000	1,3225	2,5475
	NaClO 5,25%	-,74250*	,22433	,013	-1,3550	-,1300
NaClO 2,5%	Ca(ClO)2 2,5%	3,28250*	,22433	,000	2,6700	3,8950
	Ca(ClO)2 5,25%	-1,93500*	,22433	,000	-2,5475	-1,3225
	NaClO 5,25%	-2,67750*	,22433	,000	-3,2900	-2,0650
NaClO 5,25%	Ca(ClO)2 2,5%	5,96000*	,22433	,000	5,3475	6,5725
	Ca(ClO)2 5,25%	,74250*	,22433	,013	,1300	1,3550
	NaClO 2,5%	2,67750*	,22433	,000	2,0650	3,2900

Fuente: Elaboración propia.

INTERPRETACIÓN

La prueba PostHoc HSD Tuckey mediante el nivel de significancia (sig.<0,05) nos permite comprender que las diferencias estadísticamente significativas registradas inicialmente en la prueba ANOVA se encuentran presentes entre todos los tipos de sustancias y sus concentraciones. De esta manera podemos comprender que las diferencias se reflejan de manera bidireccional entre el grupo conformado por hipoclorito de calcio al 2,5% con el hipoclorito de calcio al 5,25%, con el Solución de cloro activo al 2,5% y con Solución de cloro activo al 5,25% y entre cada uno de ellos; además de que NaClO 5,25% presento mayor efectividad (mayor halo de inhibición).

Tabla 6. Prueba de normalidad en hipoclorito de calcio e Solución de cloro activo al 2,5% y 5,25% en *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Concentración	Shapiro-Wilk Estadístico	gl	Sig.
Ca(ClO) ₂ al 2,5%	0,963	8	0,840
Ca(ClO) ₂ al 5,25%	0,828	8	0,056
NaClO al 2,5%	0,922	8	0,444
NaClO al 5,25%	0,889	8	0,230

Fuente: Elaboración propia.

INTERPRETACIÓN

La prueba muestra que los valores de los cuatro tipos de sustancias y concentraciones utilizadas para valorar la actividad antimicrobiana en las placas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 mantienen una distribución normal (Sig.>0,05). siendo posible utilizar una prueba paramétrica para la evaluación de diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 7. Comparación de la actividad antimicrobiana del hipoclorito de calcio al 2,5% y 5,25% y el Solución de cloro activo al 2,5% y 5,25% frente a los biofilms de *Enterococcus faecalis*.

ANOVA

	Suma cuadrados	de gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	518,289	3	172,763	3524,686	,000
Dentro de grupos	1,372	28	,049		
Total	519,662	31			

Fuente: Elaboración propia.

INTERPRETACIÓN

La prueba estadística ANOVA de un factor utilizada en muestras independientes nos permite conocer que al contar con un Sig. menor a 0,05 podemos asumir que entre las diversas sustancias y concentraciones utilizadas como antimicrobiano en los biofilms de *Enterococcus faecalis*, existió diferencias estadísticamente significativas. La extensión e identificación de estas diferencias fueron analizadas con pruebas PostHoc.

Tabla 8. Prueba HSD Tuckey para comparación de la actividad antimicrobiana del hipoclorito de calcio al 2,5% y 5,25% y el Solución de cloro activo al 2,5% y 5,25% frente a los biofilms de **Enterococcus faecalis**.

(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
	Ca(ClO) ₂ 5,25%	-10,08125*	,11070	,000	-10,3835	-9,7790
Ca(ClO) ₂ 2,5%	NaClO 2,5%	-3,37250*	,11070	,000	-3,6747	-3,0703
	NaClO 5,25%	-8,50375*	,11070	,000	-8,8060	-8,2015
	Ca(ClO) ₂ 2,5%	10,08125*	,11070	,000	9,7790	10,3835
Ca(ClO) ₂ 5,25%	NaClO 2,5%	6,70875*	,11070	,000	6,4065	7,0110
	NaClO 5,25%	1,57750*	,11070	,000	1,2753	1,8797
	Ca(ClO) ₂ 2,5%	3,37250*	,11070	,000	3,0703	3,6747
NaClO 2,5%	Ca(ClO) ₂ 5,25%	-6,70875*	,11070	,000	-7,0110	-6,4065
	NaClO 5,25%	-5,13125*	,11070	,000	-5,4335	-4,8290
	Ca(ClO) ₂ 2,5%	8,50375*	,11070	,000	8,2015	8,8060
NaClO 5,25%	Ca(ClO) ₂ 5,25%	-1,57750*	,11070	,000	-1,8797	-1,2753
	NaClO 2,5%	5,13125*	,11070	,000	4,8290	5,4335

Fuente: Elaboración propia.

INTERPRETACIÓN

La prueba PostHoc HSD Tuckey mediante el nivel de significancia (sig.<0,05) nos permite comprender que las diferencias estadísticamente significativas registradas inicialmente en la prueba ANOVA se encuentran presentes entre todos los tipos de sustancias y sus concentraciones. De esta manera podemos comprender que las diferencias se reflejan de manera bidireccional entre el grupo conformado por hipoclorito de calcio al 2,5% con el hipoclorito de calcio al 5,25%, con el Solución de cloro activo al 2,5% y con Solución de cloro activo al 5,25% y entre cada uno de ellos; además de que Ca(ClO)₂ 5,25% presento mayor efectividad (mayor halo de inhibición).

DISCUSIÓN

La instrumentación en endodoncia tiene un papel esencial, ya que se encarga de la disminución de bacterias que se encuentran a nivel intracanal este procedimiento debe ser complementado con el uso de aquellas sustancias que sirven para la irrigación bacteriana, en esta investigación el objetivo principal fue determinar la eficacia antimicrobiana del hipoclorito de calcio al 2,5 % y 5,25% y el Solución de cloro activo al 2,5% y 5,25% sobre los biofilms de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 solamente el hipoclorito de calcio al 5,25% demostró tener una mayor eficacia antimicrobiana que el Solución de cloro activo, mientras que para *Cándida albicans* ATCC 10231 el hipoclorito de calcio al 2,5% y 5,25% no demostró tener una eficacia antimicrobiana mayor al Solución de cloro activo resultado que difiere con Diaz Quispe (13) ya que él al comparar tres irrigantes endodónticos (Solución de cloro activo al 5%, clorhexidina al 2% y EDTA al 17%) halló que la CHX al 2% es el irrigante con mayor efecto antibacteriano y con menor efecto citotóxico. Sin embargo, otro factor que influye para una adecuada irrigación es el mecanismo que se usa como lo menciona el autor Dumani A. y Col. (15) quien comparó la irrigación con jeringa convencional y la irrigación sónica siendo este último el que posee mayor eficacia al momento de eliminar *Enterococcus faecalis* del conducto.

Al medir la actividad antimicrobiana del hipoclorito de calcio al 2,5 % y al 5,25% sobre los biofilms de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*, se halló que el hipoclorito de calcio con concentración al 5,25% demostró formar mayor halo de inhibición en la placa de *Cándida albicans* ATCC 10231 con una media de 22,13 ($\pm 0,84$), mientras que en la placa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 este promedio fue aún mayor con 26,49 ($\pm 0,39$) resultado similar al hallado por Paula K.B. (11) quien indica en su investigación que el Ca(OCl) demostró tener una actividad antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis* además de disolver tejidos pulpaes.

Al medir la actividad antimicrobiana del Solución de cloro activo al 2,5 % y al 5,25% sobre los biofilms de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*, la única concentración que demostró formar mayor halo de inhibición en la placa de *Cndida albicans* ATCC 10231 con una media de 22,87 ($\pm 0,18$) fue la concentración al 5,25%., mientras que en la placa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 este promedio fue aún mayor con 24,91 ($\pm 0,09$) resultado diferente al de Valera MC et al (19) ya que en su investigación utilizó una baja concentración Solución de cloro activo (2,5%) el cual fue más efectivo para erradicar *Calbicans* y *E. faecalis*. Las diferencias en la concentración del

NaClO, las

características de los biofilms estudiados, y las variaciones metodológicas entre los estudios podrían explicar por qué el NaClO al 5,25% fue más efectivo en el presente estudio, mientras que la concentración al 2,5% mostro resultados adecuados en el estudio de Valera MC et al.

Finalmente, al evaluar si hay diferencia entre la actividad antimicrobiana del hipoclorito de calcio al 2,5% y 5,25% y el Solución de cloro activo al 2,5% y 5,25% frente a los biofilms de *Enterococcus faecalis* y *Cándida albicans*, se halló que existieron diferencias estadísticamente significativas (sig.<0,05) resultado que coindice con lo hallado por Cardozo L.R. (12) pero difieren con el autor Gómez C.R. (10) quien halló que la acción antibacteriana y antifúngica del hipoclorito de calcio y el Solución de cloro activo fue similar frente a *Enterococcus faecalis* y *Cándida albicans* y con Dutta A. , **Gómez C et al** (18) y Coaguila Llerena H. (9) quienes concluyeron que no hubo diferencias significativas entre las soluciones.

Las diferencias observadas entre los estudios podrían explicarse por la combinación de factores como las concentraciones de las soluciones, las condiciones experimentales, las características de los microorganismos utilizados, y los métodos estadísticos aplicados.

CONCLUSIONES

1. Con los datos presentados podemos concluir que tanto en el caso de los biofilms de *Cándida Albicans* ATCC 10231 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 el hipoclorito de calcio al 5,25% demostró tener una eficacia antimicrobiana mayor al hipoclorito de calcio al 2,5%.
2. Con los datos presentados podemos concluir que tanto en el caso de los biofilms de *Cándida Albicans* ATCC 10231 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 el Solución de cloro activo al 5,25% demostró tener una eficacia antimicrobiana mayor al hipoclorito de sodio al 2,5%.
3. Existieron diferencias (sig.<0,05) entre el hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio al 2,5% y 5,25% en su actividad antimicrobiana en los biofilms de *Cándida albicans* y *Enterococcus faecalis*. Con la prueba PostHoc se pudo identificar que estas diferencias estaban presentes entre todos los grupos de análisis.
4. Entre los grupos de valoración compuestos por el hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio en sus dos concentraciones, podemos concluir que sobre los biofilms de *Enterococcus faecalis* el Ca (ClO)₂ 5,25% presentó mayor efectividad. En cuanto a los biofilms de *Cándida albicans* el NaClO 5,25% presento mayor efectividad.

RECOMENDACIONES

- Las investigaciones futuras deben llevarse a cabo utilizando biofilms que contengan una mayor cantidad de microorganismos presentes en infecciones y reinfecciones periapicales.
- En investigaciones futuras, se emplearán distintas concentraciones de estas soluciones, utilizando métodos de irrigación activa y pasiva para compararlas y analizando los resultados a largo plazo a través de estudios in vitro.
- Establecer una relación entre los resultados del CMI y las dosis que sean tolerables en pruebas biológicas futuras, lo cual podría hacer posible la elaboración de un producto comercial.

BIBLIOGRAFÍA

1. Torabinejad M, Fouad AF, Shabahang S. Endodoncia: Principios y práctica. Elsevier Health Sciences; 2021. 519 p.
2. Soares IJ, Goldberg F. Endodoncia. Técnica y fundamentos. Ed. Médica Panamericana; 2002. 348 p.
3. Bergenholtz G, Horsted-Bindslev P, Reit C. Endodoncia. Editorial El Manual Moderno; 2011. 399 p.
4. Duggan JM, Sedgley CM. Biofilm Formation of Oral and Endodontic Enterococcus faecalis. Journal of Endodontics. 1 de julio de 2007;33(7):815-8.
5. Lima SM de F, Sousa MG da C, Freire M de S, Almeida JA de, Cantuária AP de C, Silva TAM e, et al. Immune Response Profile against Persistent Endodontic Pathogens Candida albicans and Enterococcus faecalis In Vitro. Journal of Endodontics. 1 de julio de 2015;41(7):1061-5.
6. Marín Botero ML, Gómez Cándida B, Cano Orozco AD, Cruz López S, Castañeda Peláez DA, Castillo Cándida EY, et al. Hipoclorito de sodio como irrigante de conductos. Caso clínico, y revisión de literatura. Avances en Odontostomatología. abril de 2019;35(1):33-43.
7. Mena AG, Rodríguez SAV, Chavira EDG, Sepúlveda AGR, Elizondo RT. Irrigantes endodónticos. Revista Mexicana de Estomatología. 30 de junio de 2018;5(1):34-6.
8. Fernández Battilana RM. Sustancias irrigantes en endodoncia. En: Sustancias irrigantes en endodoncia [Internet]. 2010 [citado 22 de noviembre de 2024]. p. 25-25. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1018751>
9. Coaguila-Llerena H, Rodrigues EM, Tanomaru-Filho M, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria G. Effects of Calcium Hypochlorite and Octenidine Hydrochloride on L929 And Human Periodontal Ligament Cells. Braz Dent J. junio de 2019;30(3):213-9.
10. Gómez Loayza CR. Evaluación in vitro de la eficacia antimicrobiana del Hipoclorito de Calcio al 2,5% y el Hipoclorito de Sodio al 2,5% sobre un Biofilm de Enterococcus faecalis y Candida albicans. 2017.
11. Paula KBD, Carlotto IB, Marconi DF, Ferreira MBC, Grecca FS, Montagner F. Calcium Hypochlorite Solutions - An In Vitro Evaluation of Antimicrobial Action and Pulp Dissolution. Eur Endod J. 2019;4(1):15-20.
12. Cardoso LR, Baldasso FER, Delai D, Montagner F, Kopper PMP. Effect of EDTA, sodium, and calcium hypochlorite on the inorganic component of root canal dentin: A SEM analysis. Microsc Res Tech. febrero de 2019;82(2):128-33.
13. Díaz Quispe Y. Evaluación del efecto antibacteriano de los irrigantes endodonticos contra cepas del Enterococcus Faecalis (ATCC29212). Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC) [Internet]. 14 de marzo de 2017 [citado 21 de noviembre

de 2024]; Disponible en:

<https://repositorioacademico.upc.edu.pe/handle/10757/621311>

14. Blattes GBF, Mestieri LB, Böttcher DE, Fossati ACM, Montagner F, Grecca FS. Cell migration, viability and tissue reaction of calcium hypochlorite based-solutions irrigants: An in vitro and in vivo study. *Arch Oral Biol.* enero de 2017;73:34-9.
15. Dumani A, Guvenmez HK, Yilmaz S, Yoldas O, Kurklu ZGB. Antibacterial Efficacy of Calcium Hypochlorite with Vibringe Sonic Irrigation System on *Enterococcus faecalis*: An In Vitro Study. *Biomed Res Int.* 2016;2016:8076131.
16. Oliveira JS, Raucci Neto W, Faria NS de, Fernandes FS, Miranda CES, Abi Rached-Junior FJ. Quantitative assessment of root canal roughness with calcium-based hypochlorite irrigants by 3D CLSM. *Braz Dent J.* 2014;25(5):409-15.
17. Dutta A, Saunders WP. Comparative Evaluation of Calcium Hypochlorite and Sodium Hypochlorite on Soft-tissue Dissolution. *Journal of Endodontics.* 1 de octubre de 2012;38(10):1395-8.
18. Gómez C, Salcedo-Moncada D, Ayala G, Watanabe R, Pineda M, Alvétez-Temoche D, et al. Antimicrobial Efficacy of Calcium and Sodium Hypochlorite at Different Concentrations on a Biofilm of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*: An In Vitro Comparative Study. *J Contemp Dent Pract.* 1 de febrero de 2020;21(2):178-82.
19. Valera MC, Maekawa LE, Oliveira LD de, Jorge AOC, Shygei É, Carvalho CAT. In vitro antimicrobial activity of auxiliary chemical substances and natural extracts on *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* in root canals. *Journal of Applied Oral Science.* abril de 2013;21(2):118.
20. Kao PHN, Kline KA. Dr. Jekyll and Mr. Hide: How *Enterococcus faecalis* Subverts the Host Immune Response to Cause Infection. *J Mol Biol.* 26 de julio de 2019;431(16):2932-45.
21. Rodríguez-Niklitschek C, Oporto V GH, Rodríguez-Niklitschek C, Oporto V GH. Implicancias clínicas de la contaminación microbiana por *Enterococcus faecalis* en canales radiculares de dientes desvitalizados: Revisión de la literatura. *Revista odontológica mexicana.* septiembre de 2015;19(3):181-6.
22. Baumgartner JC, Watts CM, Xia T. OR 58 Detection of *Candida albicans* in infected root canals using PCR. *Journal of Endodontics.* 1 de abril de 1999;25(4):296.
23. Fotos PG, Hellstein JW. *Candida* and candidosis. Epidemiology, diagnosis and therapeutic management. *Dent Clin North Am.* octubre de 1992;36(4):857-78.
24. Silva Herzog Flores D, Yacamán Bazaín F. Irrigación en endodoncia y su importancia clínica. *Rev ADM.* 1991;140-50.
25. Ozuna Enciso A. Irrigación y aspiración en endodoncia. En: *Irrigación y aspiración en endodoncia* [Internet]. 2009 [citado 21 de noviembre de 2024]. p. 67-67. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1018735>

26. Besegato JF, Bravo GR, Zaniboni JF, Belizário LG, de Almeida E, Gelio MB, et al. Bonding and Cleaning Effects of Irrigation Protocols Using Calcium Hypochlorite on the Post-space Radicular Dentin. *Oper Dent.* 2024;E1-11.

ANEXOS

ANEXO N° 01

Soluciones irrigantes hipoclorito de sodio al 7,5 % e hipoclorito de calcio al 100%



ANEXO N° 02

Hipoclorito de sodio a la concentración de 2,5% y 5,25% e hipoclorito de calcio a su concentración de 2,5% y 5,25%



ANEXO N° 03

Cepa liofilizada micótica en estudio *Cándida albicans* ATCC 10231



ANEXO N° 04

Cepa bacteriana liofilizada en estudio *Enterococcus faecalis* 29212



ANEXO N° 05

Protocolo de activación de células liofilizadas obtenidas de manera comercial según indicaciones de laboratorio GENLABPERU.SAC

INSTRUCTIONS FOR USE



-  KWIK-STIK™
-  KWIK-STIK™ Plus
-  LYFO DISK™

INTENDED USE

KWIK-STIK™, KWIK-STIK™ Plus and LYFO DISK™ microorganisms are intended to be used as controls to verify the performance of assays, reagents or media that are intended to be used in microbial testing for the detection and identification of a cultured microorganism isolate.

SUMMARY AND EXPLANATION

Microorganisms with known and predictable characteristics are used in quality control, education and proficiency programs.

PRINCIPLE

KWIK-STIK, KWIK-STIK Plus and LYFO DISK microorganisms provide equivalent results to traditional methods used in preparing, storing and maintaining reference stock culture collections. The microorganism preparations are traceable to the American Type Culture Collection (ATCC®) or other authentic reference culture collections.

COMPOSITION

KWIK-STIK, KWIK-STIK Plus and LYFO DISK pellets contain a pure population of microorganisms and excipients for the purpose of structure and/or stability including gelatin, skim milk, ascorbic acid, carbohydrate, and charcoal.

PRODUCT DESCRIPTION

- A. KWIK-STIK:** Each KWIK-STIK unit contains a lyophilized microorganism pellet, an ampoule of hydrating fluid, and an inoculating swab. Each device is sealed within a laminated pouch that contains a desiccant to prevent adverse moisture accumulation. KWIK-STIK microorganisms are 3 passages or fewer from the reference culture and are guaranteed to recover when processed using the recommended media and incubation requirements. Available in packs of 2 or 6.
- B. KWIK-STIK Plus:** Each KWIK-STIK Plus unit contains a lyophilized microorganism pellet, an ampoule of hydrating fluid, and an inoculating swab. Each device is sealed within a laminated pouch that contains a desiccant to prevent adverse moisture accumulation. KWIK-STIK Plus microorganisms are 2 passages from the reference culture and are guaranteed to recover when processed using the recommended media and incubation requirements. Available in packs of 5.



- A. LYFO DISK:** LYFO DISK microorganisms are packaged in a resealable vial that contains 6 lyophilized microorganism pellets and a desiccant to prevent adverse moisture accumulation. The LYFO DISK microorganisms are 3 passages or fewer from the reference culture and are guaranteed to recover when processed using the recommended media and incubation requirements.

These products have been registered as a medical device under Pakistan's medical device rules.

WARNING AND PRECAUTIONS

- These products are for in-vitro diagnostic use.
- Not intended for human, animal or pet consumption.
- Refer to the Safety Data Sheet (SDS) for more detailed information. The SDS can be located on our website at www.microbiologics.com or by contacting Technical Support at **320.229.7045** or U.S. TollFree **1.866.286.6691**.
- The hydrating fluid in the KWIK-STIK and KWIK-STIK Plus may cause serious eye irritation. If in eyes, rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If irritation persists, get medical advice/attention.
- Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. Wash hands thoroughly after handling.
- These devices contain viable microorganisms that may produce disease. Proper techniques must be employed to avoid exposure and contact with any microorganism growth.
- The microbiology laboratory must be equipped and have the facilities to receive, process, maintain, store and dispose of biohazard material.
- Only trained laboratory personnel should use these devices.
- Agencies and statutes regulate the disposal of all biohazard materials. Each laboratory must be aware of and comply with the proper disposal of biohazard materials.
- KWIK-STIK, KWIK-STIK Plus and LYFO DISK microorganisms are not made with natural rubber latex.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- LYFO DISK microorganisms require sterile tubes and 0.5 ml of a sterile liquid such as Tryptic Soy Broth, Brain Heart Infusion Broth, saline, or deionized water to hydrate the lyophilized preparation. Sterile swabs or inoculating loops are needed to transfer the hydrated preparation to an agar plate.
- KWIK-STIK, KWIK-STIK Plus and LYFO DISK microorganisms require non-selective, nutritive or enriched agar media and specific incubation times and conditions to optimize growth and recovery.

The Technical Information Bulletin (TIB.081) *Recommended Culture Methods* lists the recommended media and incubation requirements. This bulletin is available at www.microbiologics.com.

INSTRUCTIONS FOR USE

A. KWIK-STIK and KWIK-STIK Plus Microorganism Procedure

1. Allow the unopened KWIK-STIK pouch to equilibrate to room temperature. Tear open pouch at notch and remove the KWIK-STIK unit.
2. Tear off Pull-Tab portion on the label and attach it to the primary culture plate or QC record. Do not disassemble the device during hydration.
3. Over the edge of the work bench or counter, crack the ampoule at the top of the KWIK-STIK (just below the fluid meniscus) to release the hydrating fluid.
4. Hold vertically and tap on a hard surface to facilitate flow of the fluid through the shaft into the bottom of the unit where the pellet is contained.

1. Using a pinching action on the bottom portion of the unit, crush the pellet in the fluid until the pelletsuspension is homogenous.
2. Immediately heavily saturate the swab with the hydrated material and transfer to the appropriate agarmedium, or use according to the laboratory's SOP.
3. Inoculate the primary culture plate(s) by gently rolling the swab over one-third of the plate.
4. Using a sterile loop, streak to facilitate colony isolation.
5. Using proper biohazard disposal, discard the KWIK-STIK.
6. Immediately incubate the inverted inoculated primary culture plate(s) at temperature and conditionsappropriate to the microorganism. Culture method can be found on the product's page at www.microbiologics.com

B. LYFO DISK Microorganism Procedure

1. Remove the unopened LYFO DISK vial from 2°C to 8°C storage and allow to equilibrate to roomtemperature.
2. Aseptically remove 1 pellet with sterile forceps from the vial. Do not remove desiccant.
3. Place the pellet in 0.5 ml of sterile fluid (water, saline, TSB, or BHIB). Immediately stopper and recap vialand return to 2°C to 8°C storage.
4. Crush the pellet with a sterile swab until the suspension is homogenous. Immediately heavily saturate thesame swab with the hydrated material and transfer to agar medium.
5. Inoculate the primary culture plate(s) by gently rolling the swab over one-third of the plate.
6. Using a sterile loop, streak to facilitate colony isolation.
7. Using proper biohazard disposal, discard the remaining hydrated material.
8. Immediately incubate the inverted inoculated primary culture plate(s) at temperature and conditionsappropriate to the microorganism. Culture method can be found on the product's page at www.microbiologics.com

STORAGE AND EXPIRATION

Store LYFO DISK, KWIK-STIK and KWIK-STIK Plus microorganisms at 2°C to 8°C in the original, sealed vial orpouch containing the desiccant. LYFO DISK, KWIK-STIK and KWIK-STIK Plus microorganisms should not be used if:

- Stored improperly
- There is evidence of excessive exposure to heat or moisture
- The expiration date has passed

LIMITATIONS

This product may not be suitable for use with all kits and procedures.

KEY OF SYMBOLS

 Authorized Representative in the European Community	 Consult Instructions for Use
 Batch Code (Lot)	 <i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device
 Biological Risks	 Manufacturer
 Catalog Number	 Temperature Limitation
 Caution, Consult Accompanying Documents	 Use By
 CE Mark	

PRODUCT WARRANTY


These products are covered under warranty to meet the specifications and performance printed and illustrated in product inserts, instructions and supportive literature. The warranty, expressed or implied, is limited when:

- the procedures employed in the laboratory are contrary to printed and illustrated directions and instructions.
- the products are employed for applications other than the intended use cited in product inserts, instructions and supportive literature.
- If the resuscitated culture is frozen, Microbiologics cannot guarantee the stated characteristics of the product.

WEBSITE

Visit our website, www.microbiologics.com, for current technical information and product availability.

ACKNOWLEDGEMENTS

 Microbiologics, Inc.
200 Cooper Avenue North
St. Cloud, MN 56303 USA

Customer Service

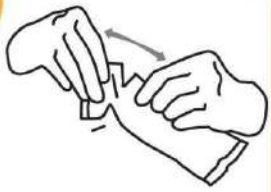
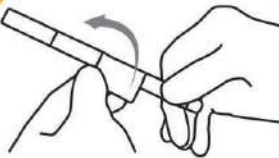
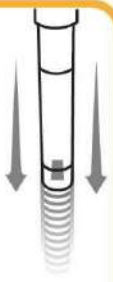





Tel. 320-253-1640
U.S. Toll Free. 800-599-BUGS (2847)
Email. info@microbiologics.com

Technical Support

Tel. 320-229-7045
U.S. Toll Free 866-286-6691
Email. techsupport@microbiologics.com
www.microbiologics.com


 MediMark® Europe
11, rue Emile Zola B.P. 2332
38033 Grenoble Cedex 2, France
Tel. 33 (0)4 76 86 43 22
Fax. 33 (0)4 76 17 19 82
Email. info@medimark-europe.com


ILLUSTRATED INSTRUCTIONS

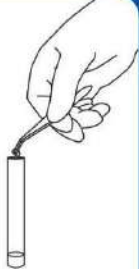
<p>1</p>  <p>Allow the unopened KWIK-STIK pouch to equilibrate to room temperature. Tear open pouch at notch and remove the KWIK-STIK unit.</p>	<p>2</p>  <p>Tear off pull-tab portion on the label and attach it to the primary culture plate or QC record. Do not disassemble the device during</p>	<p>3</p> <p>Over the edge of the work bench or counter, crack the ampoule at the top of the KWIK-STK (just below the fluid meniscus of the ampoule) found in the cap to release the hydrating fluid.</p>
<p>4</p>  <p>Hold vertically and tap on a hard surface to facilitate flow of the fluid through the shaft into the bottom of unit where the pellet is contained.</p>	<p>5</p>  <p>Using a pinching action on the bottom portion of the unit, crush the pellet in the fluid until the suspension is homogenous.</p>	<p>6</p>  <p>Immediately heavily saturate the swab with the hydrated material and transfer to the appropriate agar medium, or use according to the laboratory's SOP.</p>
<p>7</p> 	<p>8</p> 	<p>9</p>  <p>Using proper biohazard disposal, discard the KWIK-STIK</p> <p>10</p>

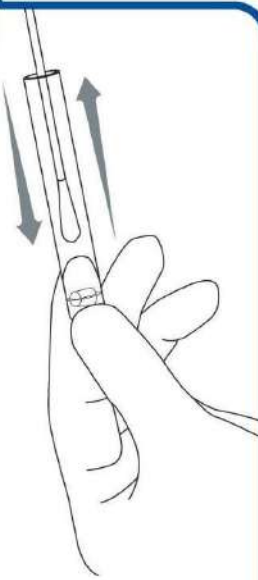
LYFO·DISK™

ILLUSTRATED INSTRUCTIONS


- 


Remove the unopened LYFO DISK vial from 2°C to 8°C storage and allow to equilibrate to room temperature.
- 


Aseptically remove 1 pellet with sterile forceps from the vial. Do not remove desiccant.
- 


Place the pellet in 0.5 ml of sterile fluid (water, saline, TSB, or BHIB). Immediately stopper and recap vial and return to 2°C to 8°C storage.
- 

Crush the pellet with a sterile swab until the suspension is homogenous.

Immediately heavily saturate the same swab with the hydrated material and transfer to agar medium.
- 

Inoculate the primary culture plate(s) by gently rolling the swab over one-third of the plate.
- 

Using a sterile loop, streak to facilitate colony isolation.
- 

Using proper biohazard disposal discard the remaining hydrated material.
- 

Immediately incubate the inverted inoculated primary culture plate(s) at temperature and conditions appropriate to the microorganism.

Culture method can be found on the product's page at microbiologics.com

ANEXO 06

ABREVIATURAS

CMI	:	Concentración mínima inhibitoria
CMB	:	Concentración mínima bactericida
mg/ml	:	Miligramo por mililitro
μl	:	Microlitro
mm	:	Milímetro
C°	:	Grados Celsius
g/ml	:	Gramo por mililitro
ANOVA:		Análisis de varianza
g	:	Gramo
ml	:	Mililitro
UFC	:	Unidades formadoras de colonia
NCCLS:		Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards
NaClO	:	hipoclorito de sodio
Ca(ClO)2	:	hipoclorito de calcio

ANEXO 07

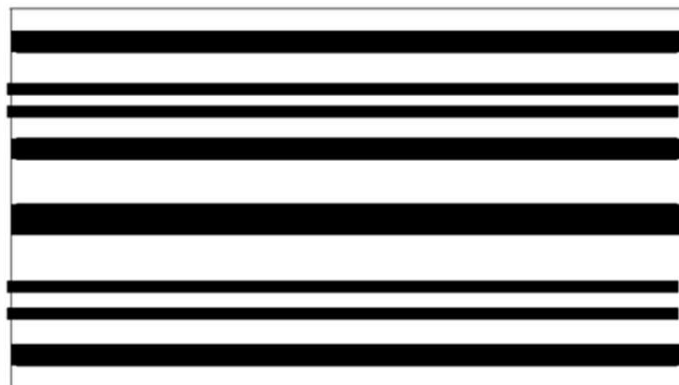
Activación para crecimiento de bacteria y levadura en estudio *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* en medio agar Mueller Hinton y posterior reactivación en agar soya tripticasa y agar sabouraud 2%.





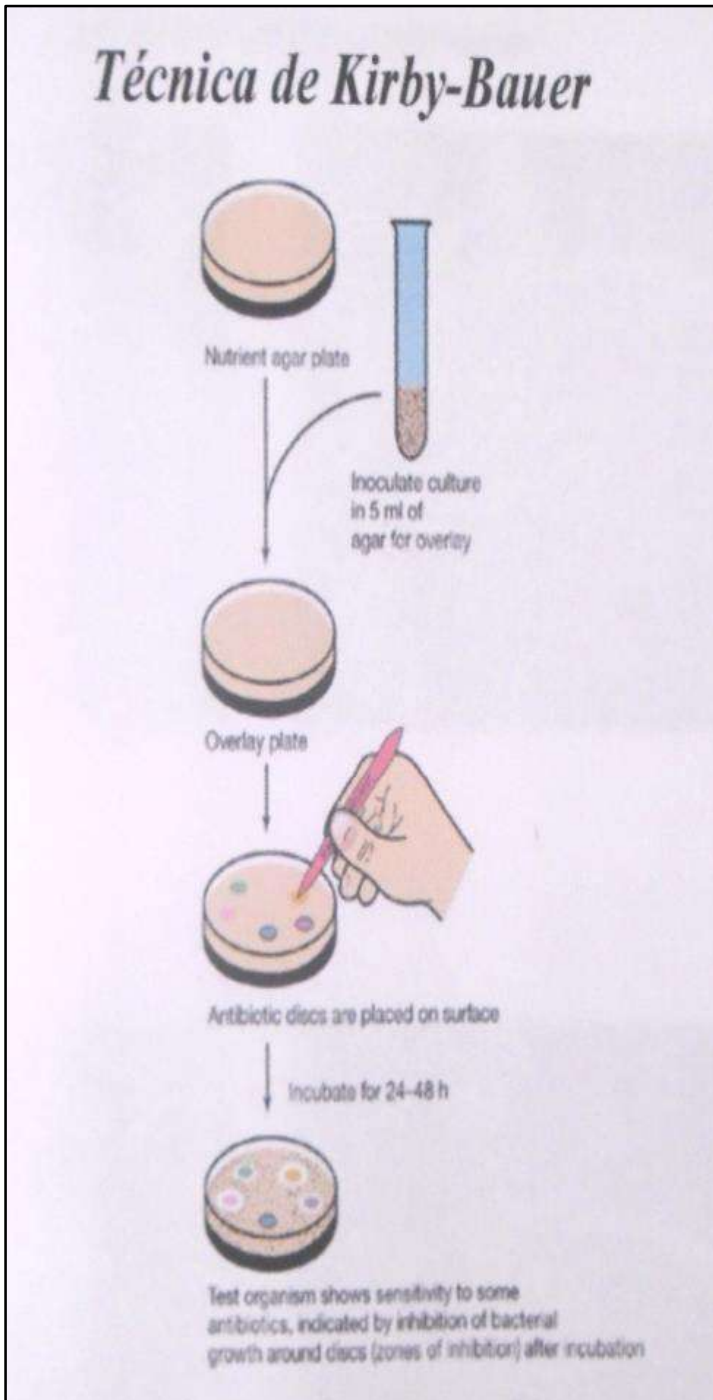
ANEXO 7

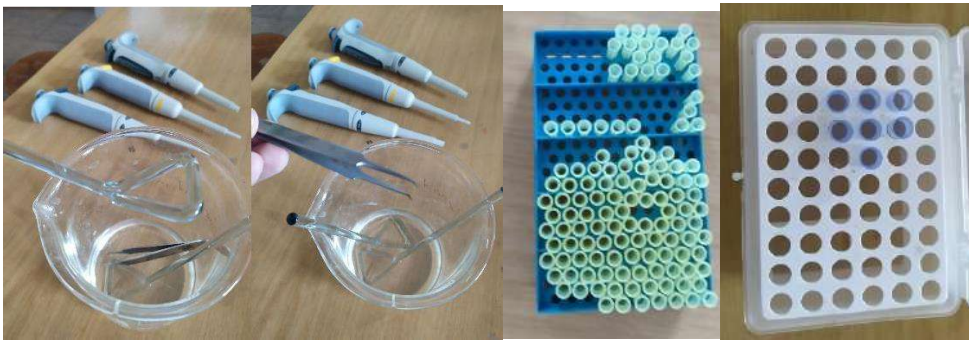
Preparación del inculo, comparación tubo 0,5 de la escala de Mac Farland

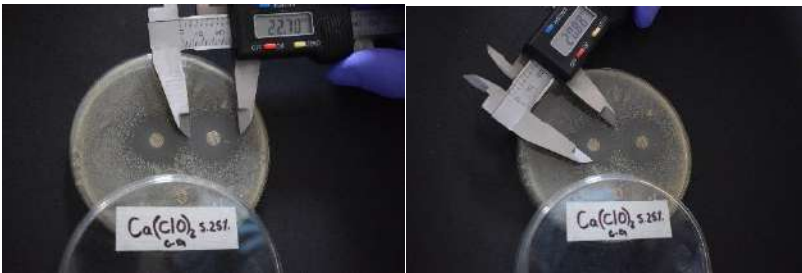
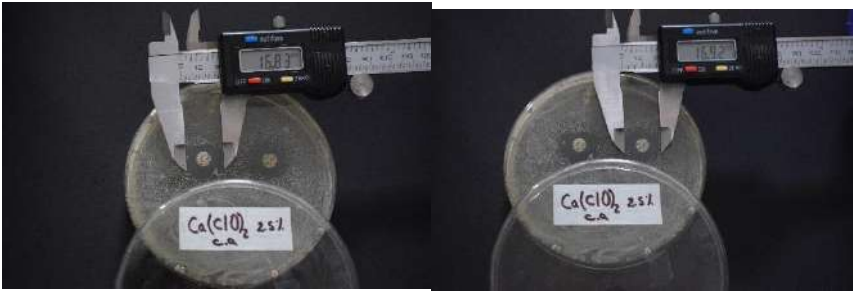


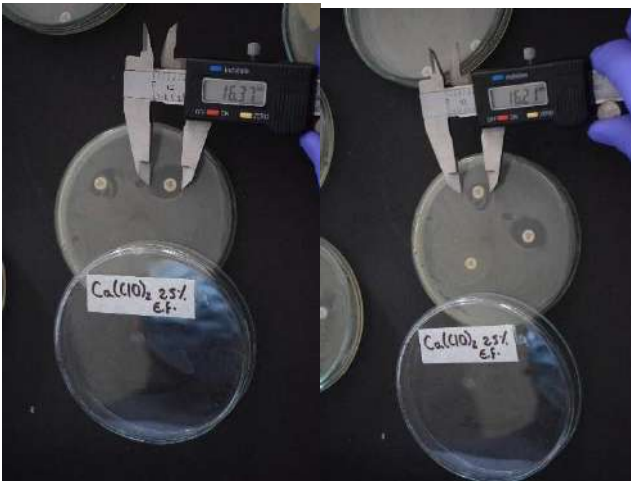
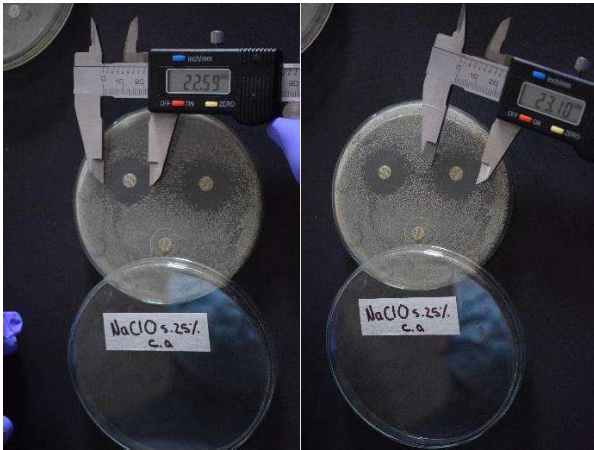
ANEXO 8

Preparación de inóculo y discos, técnicas de Kirby- Bauer



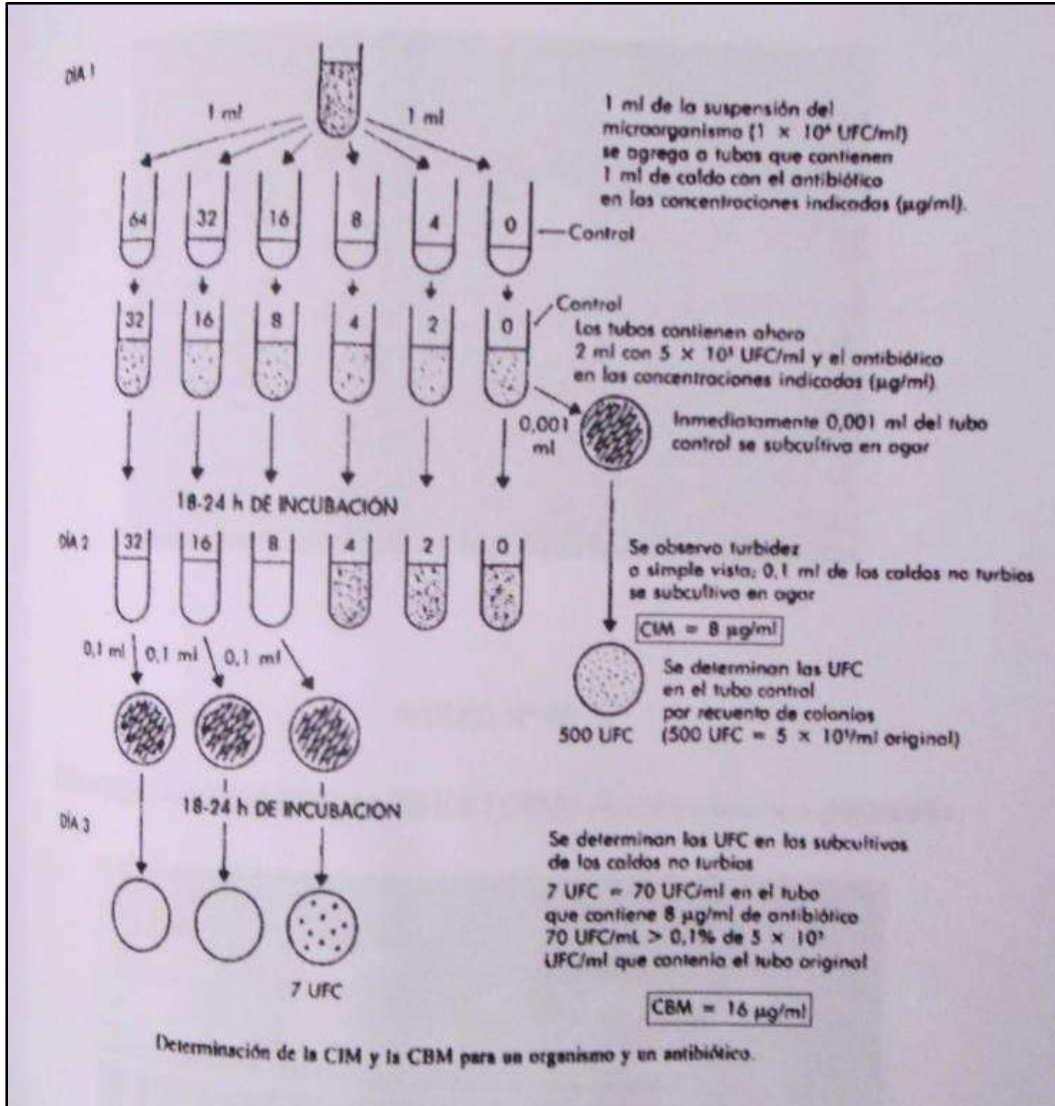






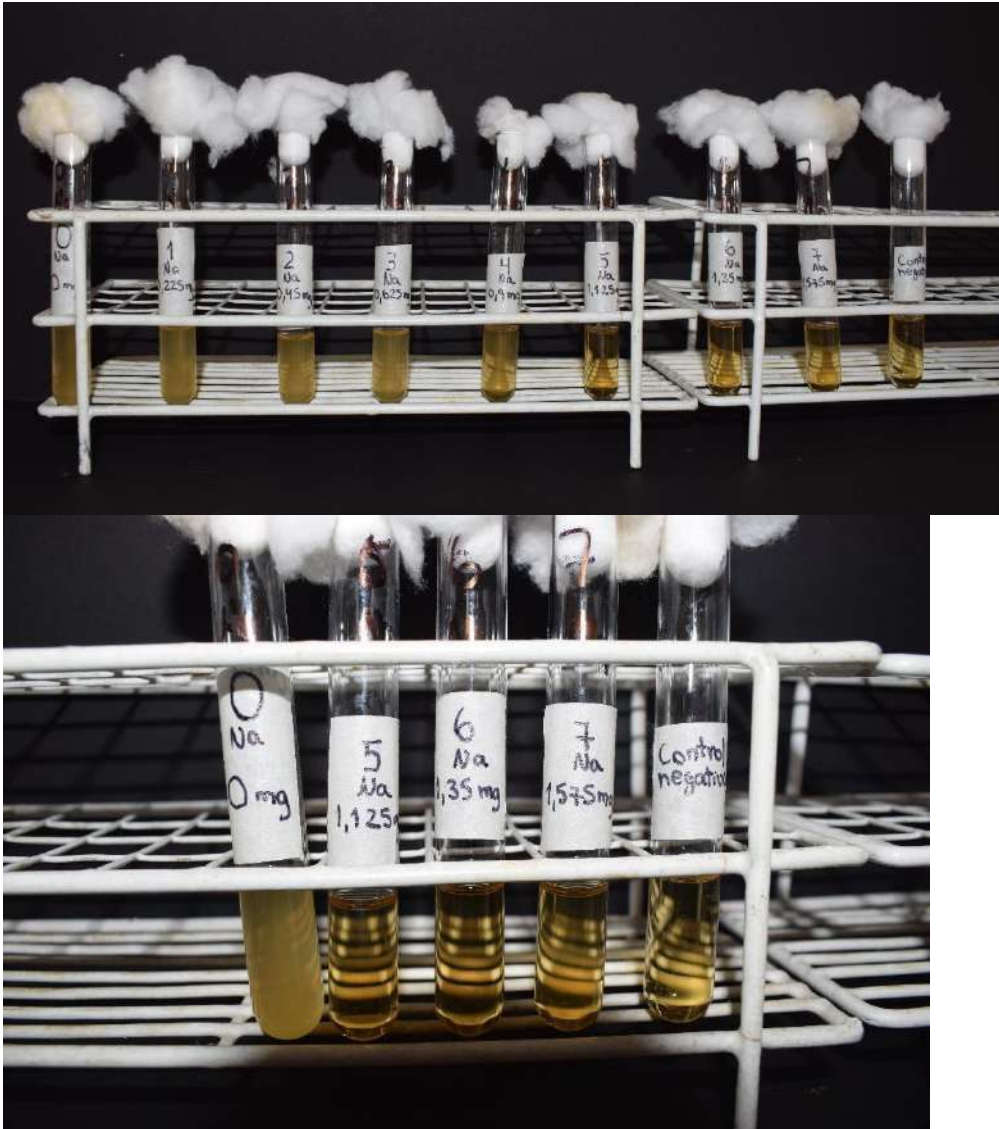
ANEXO 09

Técnica de susceptibilidad en caldo de dilución

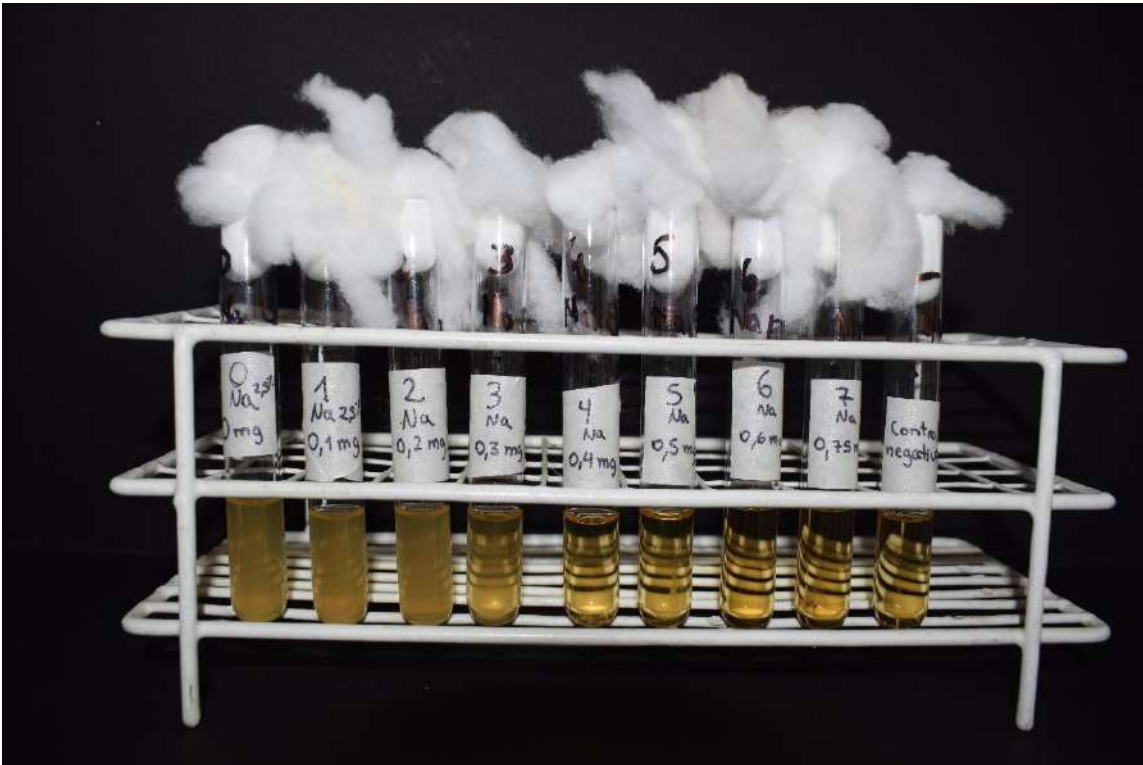


ANEXO 10

Concentración Mínima Inhibitoria de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* frente a soluciones irrigadoras frente a sus dos concentraciones













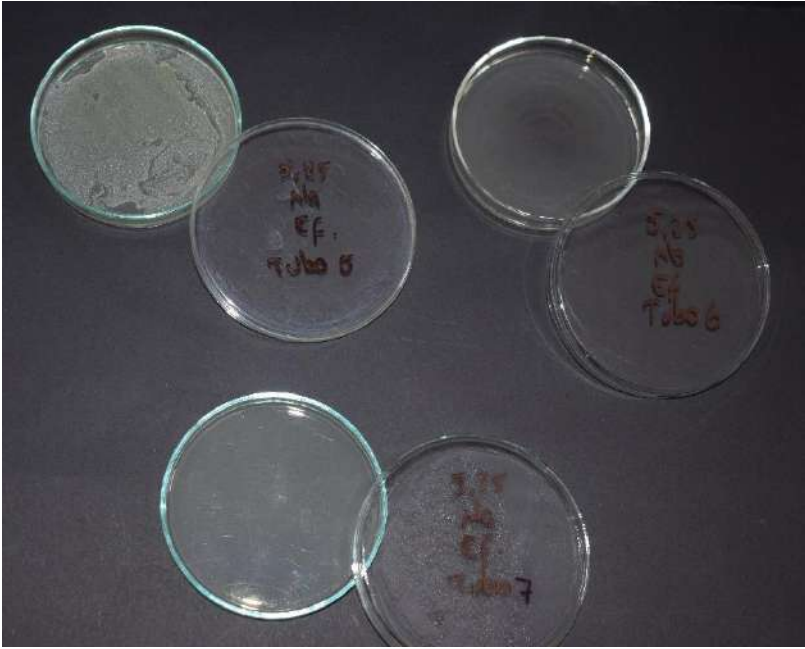


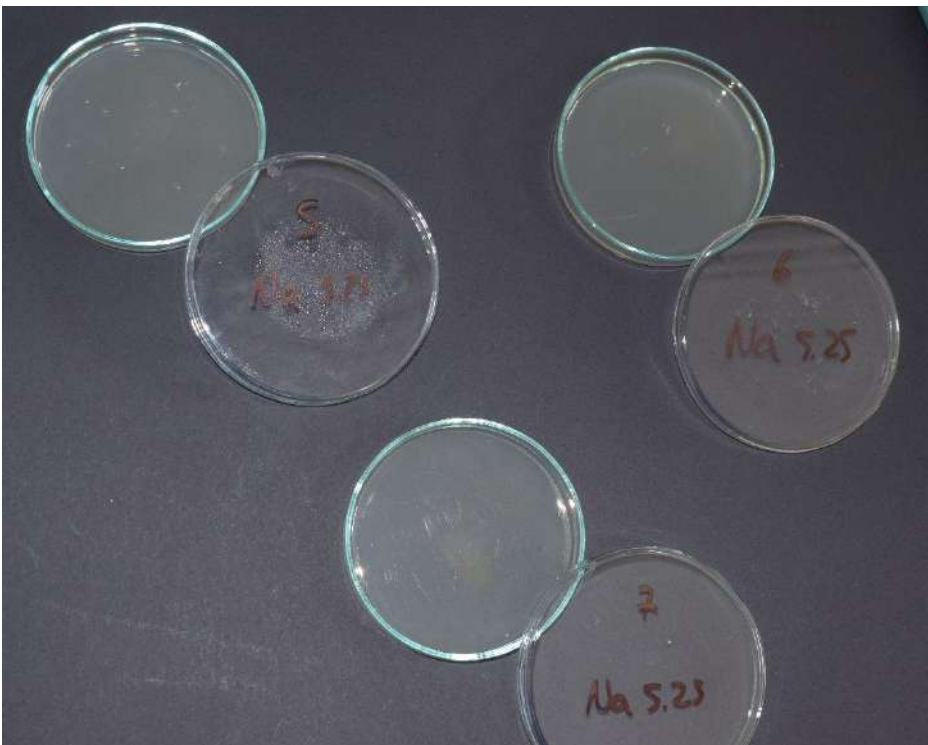


ANEXO 11

Concentración Mínima Bactericida y fungicida de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*







ANEXO 11

Métodos de cultivo recomendados para microorganismos

Recommended Culture Methods for Microorganisms

Selection of Growth Requirements

1. Primary growth on a nonselective agar medium is preferred. Primary growth in a fluid medium should only occur in special instances or when recommended. Because of the manipulations required during hydration, it is difficult to obtain purity of a lyophilized strain in a fluid medium. A contaminant may completely overgrow and obscure the presence of the lyophilized strain.
2. The following information lists which method should be used to grow the various microorganism species. Descriptions of methods follow the microorganism list.

Microorganism	Method	Notes
<i>Acetobacter</i> species	Method 36	
<i>Achromobacter</i> species	Method 1	
<i>Acinetobacter</i> species	Method 1	
<i>Actinobacillus</i> species	Method 3	
<i>Actinomyces</i> species	Method 4	
<i>Aerococcus</i> species	Method 1	
<i>Aeromonas</i> species	Method 2	Exceptions are <i>Aeromonas hydrophila</i> , Microbiologics 0870 and <i>Aeromonas salmonicida</i> .
<i>Aeromonas hydrophila</i>, Microbiologics 0870	Method 31	
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Method 32	
<i>Aggregatibacter</i> species	Method 3	
<i>Alcaligenes</i> species	Method 1	
<i>Alicyclobacillus</i> species	Method 12	An exception is <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> .
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	Method 45	
<i>Alloiococcus</i> species	Method 2	
<i>Alternaria</i> species	Method 5	
<i>Amylomyces</i> species	Method 5	
<i>Aneurinibacillus</i> species	Method 1	
<i>Aquaspirillum</i> species	Method 20	.
<i>Arcanobacterium</i> species	Method 34	
<i>Arthrobacter</i> species	Method 21	
<i>Aspergillus</i> species	Method 5	An exception is <i>Aspergillus flavus</i> .
<i>Aspergillus flavus</i>	Method 46	
<i>Aureobasidium</i> species	Method 5	
<i>Bacillus</i> species	Method 49	
<i>Bacteroides</i> species	Method 4	
<i>Bifidobacterium</i> species	Method 4	An exception is <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i> .
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i>.	Method 39	
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Method 15	

Microorganism	Method	Notes
<i>Bordetella parapertussis</i>	Method 16	
<i>Bordetella pertussis</i>	Method 16	An exception is <i>Bordetella pertussis</i> , Microbiologics catalog number 0843.
<i>Bordetella pertussis</i> Microbiologics 0843	Method 57	
<i>Brevibacillus</i> species	Method 1	
<i>Brevundimonas</i> species	Method 1	
<i>Brochothrix</i> species	Method 21	
<i>Budvicia</i> species	Method 21	
<i>Burkholderia</i> species	Method 1	
<i>Campylobacter</i> species	Method 6	
<i>Candida</i> species	Method 5	
<i>Capnocytophaga</i> species	Method 3	
<i>Cedecea</i> species	Method 1	
<i>Cellulosimicrobium</i> species	Method 1	
<i>Chaetomium</i> species	Method 5	
<i>Chryseobacterium</i> species	Method 1	An exception is <i>Chryseobacterium shigense</i> .
<i>Chryseobacterium shigense</i>	Method 22	
<i>Citrobacter</i> species	Method 1	
<i>Cladosporium</i> species	Method 5	
<i>Clostridioides difficile</i>	Method 4	
<i>Clostridium</i> species	Method 40	Exceptions are <i>Clostridium perfringens</i> and <i>Clostridium sordellii</i> .
<i>Clostridium perfringens</i>	Method 41	An exception is <i>Clostridium perfringens</i> , Microbiologics 0318.
<i>Clostridium perfringens</i> Microbiologics 0318	Method 63	
<i>Clostridium sordellii</i>	Method 4	
<i>Corynebacterium</i> species	Method 1	An exception is <i>Corynebacterium urealyticum</i> .
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	Method 2	
<i>Cronobacter</i> species	Method 1	
<i>Cryptococcus</i> species	Method 62	An exception is <i>Cryptococcus gattii</i> , Microbiologics 01051.
<i>Cryptococcus gattii</i>	Method 47	
<i>Curtobacterium</i> species	Method 1	
<i>Cutibacterium</i> species	Method 44	
<i>Deinococcus</i> species	Method 1	An exception is <i>Deinococcus radiophilus</i> , Microbiologics 01184.
<i>Deinococcus radiophilus</i> Microbiologics 01184	Method 23	
<i>Delftia</i> species	Method 1	
<i>Desulfotomaculum</i> species	Method 17	
<i>Edwardsiella</i> species	Method 1	
<i>Eggerthella</i> species	Method 4	

Microorganism	Method	Notes
<i>Eikenella</i> species	Method 3	
<i>Elizabethkingia</i> species	Method 1	
<i>Enterobacter</i> species	Method 1	
<i>Enterococcus</i> species	Method 1	
<i>Erysipelothrix</i> species	Method 2	
<i>Escherichia coli</i>	Method 1	
<i>Eurotium rubrum</i>	Method 5	
<i>Exiguobacterium</i> species	Method 1	
<i>Finegoldia</i> species	Method 42	
<i>Fluoribacter</i> species	Method 8	
<i>Fusarium</i> species	Method 5	
<i>Fusobacterium</i> species	Method 4	An exception is <i>Fusobacterium mortiferum</i> , Microbiologics 01191.
<i>Fusobacterium mortiferum</i> Microbiologics 01191	Method 39	
<i>Gardnerella</i> species	Method 9	
<i>Gemella</i> species	Method 4	
<i>Geobacillus</i> species	Method 24	
<i>Geotrichum</i> species	Method 5	
<i>Haemophilus</i> species	Method 3	
<i>Hafnia</i> species	Method 1	
<i>Hanseniaspora</i> species	Method 5	
<i>Hermiimonas</i> species	Method 20	
<i>Issatchenkia</i> species	Method 5	
<i>Kingella</i> species	Method 33	
<i>Klebsiella</i> species	Method 1	
<i>Kloeckera</i> species	Method 5	
<i>Kocuria</i> species	Method 1	An exception is <i>Kocuria rosea</i> .
<i>Kocuria rosea</i>	Method 21	
<i>Lactobacillus</i> species	Method 65	Exceptions are <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i> , and <i>Lactobacillus leichmannii</i> .
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Method 11	
<i>Lactobacillus casei</i>	Method 11	
<i>Lactobacillus gasseri</i>	Method 11	
<i>Lactobacillus leichmannii</i>	Method 11	
<i>Lactococcus</i> species	Method 2	
<i>Leclercia</i> species	Method 1	
<i>Legionella</i> species	Method 8	
<i>Listeria</i> species	Method 1	
<i>Lysinibacillus</i> species	Method 1	
<i>Macrococcus</i> species	Method 1	
<i>Malassezia</i> species	Method 14	

Microorganism	Method	Notes
<i>Mannheimia</i> species	Method 1	
<i>Methylobacterium</i> species	Method 25	An exception is <i>Methylobacterium extorquens</i> .
<i>Methylobacterium extorquens</i>	Method 26	
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Method 5	
<i>Microbacterium</i> species	Method 22	
<i>Micrococcus</i> species	Method 1	An exception is <i>Micrococcus luteus</i> , Microbiologics 0337 and <i>Micrococcus luteus</i> , Microbiologics 0689.
<i>Micrococcus luteus</i>, Microbiologics 0337	Method 27	
<i>Micrococcus luteus</i>, Microbiologics 0689	Method 67	
<i>Microsporium</i> species	Method 5	Exceptions are <i>Microsporium canis</i> and <i>Microsporium gypseum</i> .
<i>Microsporium canis</i>	Method 48	
<i>Microsporium gypseum</i>	Method 73	
<i>Moraxella</i> species	Method 2	
<i>Morganella</i> species	Method 1	
<i>Mucor racemosus</i>	Method 5	
<i>Mycobacterium</i> species	Method 13	Exceptions are <i>Mycobacterium fortuitum</i> , <i>Mycobacterium peregrinum</i> and <i>Mycobacterium haemophilum</i> , and <i>Mycobacterium smegmatis</i> .
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	Method 7	
<i>Mycobacterium haemophilum</i>	Method 18	
<i>Mycobacterium peregrinum</i>	Method 7	
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Method 7	
<i>Mycoplasma bovis</i>	Method 60	
<i>Mycoplasma hominis</i>	Method 58	
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Method 59	
<i>Myroides</i> species	Method 2	
<i>Neisseria</i> species	Method 37	
<i>Nocardia</i> species	Method 81	
<i>Novosphingobium</i> species	Method 21	
<i>Ochrobactrum</i> species	Method 1	
<i>Oligella</i> species	Method 2	
<i>Paecilomyces</i> species	Method 5	
<i>Paenibacillus</i> species	Method 1	An exception is <i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i> .
<i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i>	Method 82	
<i>Parabacteroides</i> species	Method 4	
<i>Parvimonas</i> species	Method 43	
<i>Pasteurella</i> species	Method 2	
<i>Pediococcus</i> species	Method 11	
<i>Penicillium</i> species	Method 5	

Microorganism	Method	Notes
<i>Peptoniphilus</i> species	Method 42	
<i>Peptostreptococcus</i> species	Method 4	
<i>Plesiomonas</i> species	Method 1	
<i>Pluralibacter gergoviae</i>	Method 1	
<i>Porphyromonas</i> species	Method 43	
<i>Prevotella</i> species	Method 43	
<i>Propionibacterium</i> species	Method 44	
<i>Proteus</i> species	Method 1	An exception is <i>Proteus hauseri</i> .
<i>Proteus hauseri</i>	Method 27	
<i>Prototheca</i> species	Method 5	
<i>Providencia</i> species	Method 1	
<i>Pseudomonas</i> species	Method 1	Exceptions are <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Microbiologics 0484, <i>Pseudomonas benneri</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas mosselii</i> , <i>Pseudomonas protegens</i> , and <i>Pseudomonas putida</i> .
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Microbiologics 0484	Method 28	
<i>Pseudomonas brenneri</i>	Method 21	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Method 21	
<i>Pseudomonas mosselii</i>	Method 21	
<i>Pseudomonas protegens</i>	Method 21	
<i>Pseudomonas putida</i>	Method 22	
<i>Ralstonia</i> species	Method 1	An exception is <i>Ralstonia pickettii</i> , Microbiologics 01197.
<i>Ralstonia pickettii</i> , Microbiologics 01197	Method 29	
<i>Raoultella</i> species	Method 1	
<i>Rhizopus</i> species	Method 5	
<i>Rhodococcus</i> species	Method 2	
<i>Rhodotorula</i> species	Method 5	
<i>Saccharomyces</i> species	Method 50	
<i>Salmonella</i> species	Method 1	
<i>Scopulariopsis</i> species	Method 5	
<i>Serratia</i> species	Method 1	
<i>Shewanella</i> species	Method 1	Exceptions are <i>Shewanella haliotis</i> and <i>Shewanella putrefaciens</i> .
<i>Shewanella haliotis</i>	Method 74	
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Method 75	
<i>Shigella</i> species	Method 1	
<i>Sphingobacterium</i> species	Method 1	
<i>Sphingomonas</i> species	Method 21	
<i>Sporidiobolus</i> species	Method 5	
<i>Staphylococcus</i> species	Method 1	An exception is <i>Staphylococcus aureus</i> , Microbiologics 0158.

Microorganism	Method	Notes
<i>Staphylococcus aureus</i>, Microbiologics 0158	Method 30	
<i>Stenotrophomonas</i> species	Method 22	
<i>Streptococcus</i> species	Method 34	Exceptions are <i>Streptococcus</i> species, Microbiologics 0978, and <i>Streptococcus pneumoniae</i> .
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Method 66	
<i>Streptococcus</i> species, Microbiologics 0978	Method 66	
<i>Streptomyces</i> species	Method 5	
<i>Talaromyces</i> species	Method 5	
<i>Thermoanaerobacterium</i> species	Method 56	
<i>Trichoderma</i> species	Method 5	
<i>Trichophyton</i> species	Method 51	
<i>Trichosporon</i> species	Method 5	
<i>Trueperella pyogenes</i>	Method 34	
<i>Ureaplasma</i> species	Method 61	
<i>Veillonella</i> species	Method 4	
<i>Vibrio</i> species	Method 10	An exception is <i>Vibrio alginolyticus</i> .
<i>Vibrio alginolyticus</i>, Microbiologics 0819	Method 54	
<i>Virgibacillus</i> species	Method 1	
<i>Wallemia mellicola</i>	Method 83	
<i>Yarrowia</i> species	Method 5	
<i>Yersinia</i> species	Method 1	An exception is <i>Yersinia ruckeri</i> , Microbiologics 0785.
<i>Yersinia ruckeri</i>, Microbiologics 0785	Method 21	
<i>Zygosaccharomyces</i> species	Method 5	Exceptions are <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> , Microbiologics 0803 and <i>Zygosaccharomyces parabaillii</i> , Microbiologics 01011.
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>, Microbiologics 0803	Method 53	
<i>Zygosaccharomyces parabaillii</i>, Microbiologics 01011	Method 52	

3. The following information lists methods for growing microorganisms. When possible, more than one type of agar medium per method is listed.

Method 1

Media	Tryptic Soy Agar (Soybean Casein Digest Agar), Nonselective Sheep Blood Agar, Standard Methods Agar (Plate Count Agar) or Nutrient Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	24 to 48 hours

Method 2

Media	Nonselective Sheep Blood Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	24 to 72 hours

Method 3

Media	Chocolate Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	5 to 7% Carbon Dioxide
Growth Time	24 to 48 hours

Method 4

Media	Anaerobic Blood Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	Anaerobic
Growth Time	48 to 72 hours

Note: Some obligate anaerobes may require 5-7 days to demonstrate sufficient growth.

Method 5

Media	Sabouraud Dextrose Emmons Agar
Temperature	25°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	2 to 7 days

Note: Nonselective Sheep Blood Agar is an appropriate alternative.

Nutrient Agar, Tryptic Soy Agar, Potato Dextrose Agar, and Standard Methods Agar (Plate Count Agar) are appropriate alternatives together with an additional period (24 hours) of incubation.

Method 6

Media	Chocolate Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	Microaerophilic
Growth Time	48 to 72 hours

Note: Do not open the inoculated agar medium petri plate for the first 48 hours.

Method 7

Media	Lowenstein Jensen Agar or Middlebrook Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	Aerobic or 5 to 7% Carbon Dioxide
Growth Time	2 to 30 days

Note: *M. fortuitum* subsp. *fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. peregrinum* will also grow on Tryptic Soy Agar (Soybean Casein Digest Agar) as well as Lowenstein Jensen and Middlebrook Agar but additional incubation time may be required.

Method 8

Media	Buffered Charcoal Yeast Extract Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	3 to 5 days

Method 9

Media	V Agar or Chocolate Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	5 to 7% Carbon Dioxide
Growth Time	48 hours

Method 10

Media	Tryptic Soy Agar (Soybean Casein Digest Agar) or Marine Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	24 to 48 hours

Note: Rehydrate in sterile Brain Heart Infusion Broth, Tryptic Soy Broth, or 0.85% Saline. Transfer a portion of hydrated material immediately to agar. Incubate aerobically at 35°C for 24 to 48 hours.

Note: Rehydration with water may result in decreased or no recovery. Rehydration with fluid provided in the KWIK-STIK™ unit provides satisfactory recovery when grown on the recommended media.

Method 11

Media	Phase 1: MRS (Man, Rogosa, Sharpe) Broth Phase 2: Columbia CNA with Sheep Blood or Tryptic Soy Agar with Sheep Blood
Temperature	Phase 1: 35°C Phase 2: 35°C
Atmosphere	Phase 1: Aerobic Phase 2: 5 to 7% Carbon Dioxide
Growth Time	Phase 1: 48 hours Phase 2: 48 hours

Note: For Phase 1, the primary growth medium is MRS (Man, Rogosa, Sharpe) Broth. Incubate at 35°C in aerobic atmosphere for 48 hours. For Phase 2, transfer to either Columbia CNA with Sheep Blood or Tryptic Soy Agar with Sheep Blood using a sterile swab or pipette. Incubate at 35°C in 5 to 7% carbon dioxide for 48 hours.

Method 12

Media	Potato Dextrose Agar
Temperature	55°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	24 to 48 hours

Method 13

Media	Lowenstein Jensen Agar or Middlebrook Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	Aerobic or 5 to 7% Carbon Dioxide
Growth Time	May require up to one month of incubation.

Method 14

Media	Leeming Notman Agar
Temperature	30°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	72 hours

Method 15

Media	Chocolate agar, Nonselective Sheep Blood Agar, Tryptic Soy Agar, and Bordet Gengou Agar with 15% Defibrinated Sheep Blood
Temperature	35°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	24 to 48 hours

Note: Standard Methods Agar (Plate Count Agar) or Nutrient Agar are appropriate alternatives together with an additional period (24 hours) of incubation.

Method 16

Media	Chocolate agar or Bordet Gengou Agar with 15% Defibrinated Sheep Blood
Temperature	35°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	2 to 7 days

Method 17

Media	Phase 1: ISF (modified Infant Soy Formula) Broth Phase 2: Sulfite Agar
Temperature	Phase 1: 55°C Phase 2: 55°C
Atmosphere	Phase 1: Anaerobic Phase 2: Anaerobic
Growth Time	Phase 1: 48 hours Phase 2: 48 hours to 7 days

Prepare and use ISF (modified Infant Soy Formula) Broth using the following steps:

1. Fill tubes with 10 ml Infant Soy Formula. Infant Soy Formula may be purchased at a grocery store.
2. Place a four-penny nail in each tube. A four-penny nail is approximately 1.5 inches, or 38 mm, in length. It should contain steel or iron.
3. Sterilize the broth.
4. Inoculate ISF Broth with one LYFO DISK™ or KWIK-STIK™.
5. Grow at 55°C in anaerobic conditions for 48 hours. The broth will turn grey, indicating growth.
6. Make two dilutions, 1:10 and 1:100.
7. Subculture with a swab to Sulfite Agar. Plate the undiluted sample and the 1:10 and 1:100 dilutions. It is necessary to plate the diluted samples because at higher concentrations the

colonies are pin-point which makes colony characteristics difficult to see. Sulfite Agar is used for detecting thermophilic anaerobes which produce sulfite.

8. Incubate the agar in anaerobic environment at 55°C for 48 hours to 7 days.

Method 18

Media	Middlebrook 7H11 Agar
Temperature	30°C
Atmosphere	5 to 7% Carbon Dioxide
Growth Time	3 to 4 weeks

Note: An X factor strip must be placed on the agar in order for the organism to grow.

Method 19

Media	Sheep Blood Agar supplemented with Pyridoxal
Temperature	35°C
Atmosphere	5 to 7% Carbon Dioxide
Growth Time	24 to 48 hours

Method 20

Media	Tryptic Soy Agar (Soybean Casein Digest Agar), Nonselective Sheep Blood Agar, Standard Methods Agar (Plate Count Agar) or Nutrient Agar
Temperature	25°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	6 days

Method 21

Media	Tryptic Soy Agar (Soybean Casein Digest Agar), Nonselective Sheep Blood Agar, Standard Methods Agar (Plate Count Agar) or Nutrient Agar
Temperature	25°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	24 to 48 hours

Method 22

Media	Tryptic Soy Agar (Soybean Casein Digest Agar), Nonselective Sheep Blood Agar, Standard Methods Agar (Plate Count Agar) or Nutrient Agar
Temperature	30°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	24 to 48 hours

Method 23

Media	Tryptic Soy Agar (Soybean Casein Digest Agar), Nonselective Sheep Blood Agar or Nutrient Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	24 to 48 hours

Method 24

Media	Tryptic Soy Agar (Soybean Casein Digest Agar), Nonselective Sheep Blood Agar, Standard Methods Agar (Plate Count Agar) or Nutrient Agar
Temperature	55°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	24 to 48 hours

Method 25

Media	Standard Methods Agar (Plate Count Agar) or Nutrient Agar
Temperature	25°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	5 days

Method 26

Media	Standard Methods Agar (Plate Count Agar) or Nutrient Agar
Temperature	25°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	5 days

Note: Alternatively, *M. extorquens* may be grown on R2A Agar in 72 hours at 30°C.

Method 27

Media	Tryptic Soy Agar (Soybean Casein Digest Agar) or Nonselective Sheep Blood Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	24 to 48 hours

Method 28

Media	Tryptic Soy Agar (Soybean Casein Digest Agar), Nonselective Sheep Blood Agar, or Standard Methods Agar (Plate Count Agar)
Temperature	35°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	24 to 48 hours

Method 29

Media	Nonselective Sheep Blood Agar, Standard Methods Agar (Plate Count Agar), or Nutrient Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	24 to 48 hours

Method 30

Media	Tryptic Soy Agar (Soybean Casein Digest Agar), Nonselective Sheep Blood Agar, Standard Methods Agar (Plate Count Agar) or Nutrient Agar
Temperature	35°C

Atmosphere	Aerobic
Growth Time	24 to 48 hours

Note: The degree of resistance of *S. aureus*, Microbiologics 0158, to Vancomycin tends to decrease depending on age of culture, type of media, and number of subcultures. For best results, propagate strain on Brain Heart Infusion Agar with 4mcg/ml Vancomycin.

Method 31

Media	Nonselective Sheep Blood Agar
Temperature	30°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	24 to 72 hours

Method 32

Media	Nonselective Sheep Blood Agar
Temperature	25°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	24 to 72 hours

Method 33

Media	Nonselective Sheep Blood Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	5 to 10% Carbon Dioxide
Growth Time	24 to 72 hours

Method 34

Media	Nonselective Sheep Blood Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	24 to 72 hours

Note: *Streptococcus* will also recover well on Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood.

Note: Growth of some species such as *Streptococcus*, *Arcanobacterium* and *Trueperella* is enhanced by enrichment of the incubation atmosphere with carbon dioxide. 5% Carbon Dioxide is recommended for the culture of *Streptococcus pneumoniae* and other streptococcal species of the viridans group.

Method 35

Media	Nonselective Sheep Blood Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	Microaerophilic
Growth Time	24 to 72 hours

Method 36

Media	Chocolate Agar
Temperature	25°C
Atmosphere	5 to 7% Carbon Dioxide
Growth Time	3 to 4 days

Method 37

Media	Chocolate Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	5 to 7% Carbon Dioxide
Growth Time	24 to 48 hours

Note: Do not open the inoculated agar medium petri plate for the first 48 hours if using a candle jar.

Method 38

Media	Anaerobic Blood Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	Anaerobic
Growth Time	2 to 5 days

Note: *B. ureolyticus* colonies are very small. Several subculture plates may need to be inoculated to have adequate quantity of the microorganism for testing.

Method 39

Media	Anaerobic Blood Agar, Tryptic Soy Agar (Soybean Casein Digest Agar)
Temperature	35°C
Atmosphere	Anaerobic
Growth Time	48 to 72 hours

Method 40

Media	Anaerobic Blood Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	Anaerobic
Growth Time	48 to 72 hours

Note: Nutrient Agar, Tryptic Soy Agar (Soybean Casein Digest Agar), and Standard Methods Agar (Plate Count Agar) are appropriate alternatives for some *Clostridium* species together with an additional period (24 hours) of incubation. *Clostridium* species may have reduced recovery when using the alternative agars.

Method 41

Media	Anaerobic Blood Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	Anaerobic
Growth Time	24 hours

Note: Tryptic Soy Agar (Soybean Casein Digest Agar) and Standard Methods Agar are appropriate alternatives together with an additional period (24 hours) of incubation. Using alternative agars may result in reduced recovery for *Clostridium* species.

Method 42

Media	Anaerobic Blood Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	Anaerobic
Growth Time	3 to 4 days

Method 43

Media	Anaerobic Blood Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	Anaerobic
Growth Time	5 to 7 days

Method 44

Media	Anaerobic Blood Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	Anaerobic
Growth Time	3 to 5 days

Method 45

Media	Potato Dextrose Agar
Temperature	45°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	24 to 48 hours

Method 46

Media	Sabouraud Dextrose Emmons Agar
Temperature	25°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	2 to 7 days

Note: Nonselective Sheep Blood Agar is an appropriate alternative.

Note: Nutrient Agar, Tryptic Soy Agar, and Potato Dextrose Agar are appropriate alternatives together with an additional period (24 hours) of incubation.

Method 47

Media	Sabouraud Dextrose Emmons Agar or Malt Extract Agar
Temperature	25°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	2 to 7 days

Method 48

Media	Potato Dextrose Agar
Temperature	25°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	7 days

Note: Nonselective Sheep Blood Agar is an appropriate alternative.

Note: Nutrient Agar, Tryptic Soy Agar, and Standard Methods Agar (Plate Count Agar) are appropriate alternatives together with an additional period (24 hours) of incubation.

Method 49

Media	Tryptic Soy Agar (Soybean Casein Digest Agar), Nonselective Sheep Blood Agar, Standard Methods Agar (Plate Count Agar) or Nutrient Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	24 to 48 hours

Note: Some *Bacillus* spp. demonstrate better recovery on subculture when the stock organism growth is maintained at room temperature rather than 2° to 8°C.

Method 50

Media	Sabouraud Dextrose Emmons Agar
Temperature	25°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	2 to 7 days

Method 51

Media	Sabouraud Dextrose Emmons Agar
Temperature	25°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	7 to 14 days

Note: Nonselective Sheep Blood Agar is an appropriate alternative.

Note: Nutrient Agar, Tryptic Soy Agar, Potato Dextrose Agar, and Standard Methods Agar (Plate Count Agar) are appropriate alternatives together with an additional period (24 hours) of incubation.

Method 52

Media	Sabouraud Dextrose Emmons Agar
Temperature	25°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	2 to 7 days

Note: Potato Dextrose Agar and Standard Methods Agar (Plate Count Agar) are appropriate alternatives together with an additional period (24 hours) of incubation.

Method 53

Media	Sabouraud Dextrose Emmons Agar
Temperature	25°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	2 to 7 days

Note: Nonselective Sheep Blood Agar is an appropriate alternative.

Note: Nutrient Agar, Potato Dextrose Agar, and Standard Methods Agar (Plate Count Agar) are appropriate alternatives together with an additional period (24 hours) of incubation.

Method 54

Media	Marine Agar; See notes below for rehydration instructions
Temperature	35°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	24 to 48 hours

Note: Rehydrate in sterile Brain Heart Infusion Broth, Tryptic Soy Broth, or 0.85% Saline. Transfer a portion of hydrated material immediately to agar. Incubate aerobically at 35°C for 24 to 48 hours.

Note: Rehydration with water may result in decreased or no recovery. Rehydration with fluid provided in the KWIK-STIK™ unit provides satisfactory recovery.

Method 55

Media	See note below for important directions. Phase 1: MRS (Man, Rogosa, Sharpe) Broth Phase 2: MRS Agar
Temperature	Phase 1: 25°C Phase 2: 25°C
Atmosphere	Phase 1: Aerobic Phase 2: 5 to 7% Carbon Dioxide
Growth Time	Phase 1: 48 to 72 hours Phase 2: 72 to 96 hours.

Note: For Phase 1, *P. damnosus* may be grown in MRS broth at 25°C for 48 to 72 hours. When the broth becomes cloudy, begin Phase 2 by subculturing the broth to MRS agar using a sterile swab or pipette. Incubate the MRS agar at 25°C in 5 to 7% Carbon Dioxide for 72 to 96 hours.

Note: Alternatively, the lyophilized microorganism may be grown directly on MRS Agar at 25°C in 5 to 7% carbon dioxide for 5 to 7 days.

Method 56

Media	See note below for important directions. Phase 1: Cooked Meat Medium Phase 2: Anaerobic Blood Agar
Temperature	Phase 1: 45°C Phase 2: 45°C
Atmosphere	Phase 1: Aerobic Phase 2: Anaerobic
Growth Time	Phase 1: 72 hours Phase 2: 3 to 5 days

Note: Primary growth medium for *T. thermosaccharolyticum*, Microbiologics 0728, is Cooked Meat Medium. During Phase 1, incubation at 45°C for 72 hours is required. During Phase 2, the organism is transferred to Anaerobic Blood Agar which is incubated anaerobically at 45°C for 3 to 5 days.

Method 57

Media	Bordet Gengou Agar with 15% Defibrinated Sheep Blood
Temperature	35°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	2 days to 1 week

Method 58

Media	See note below for important directions. Phase 1: Mycoplasma Broth Phase 2: Mycoplasma Agar
Temperature	Phase 1: 35°C Phase 2: 35°C
Atmosphere	Phase 1: Aerobic Phase 2: 5 to 7% Carbon Dioxide
Growth Time	Phase 1: 48 hours Phase 2: 4 to 6 days

Note: Inoculate Broth with LYFO DISK™. For Phase 1, prepare a 1:10 serial dilution using Mycoplasma Broth. Incubate the broth aerobically at 35°C for 48 hours. After incubation, begin Phase 2 by plating 0.2 ml of the broth culture to Mycoplasma Agar. Incubate agar in 5 to 7% Carbon Dioxide at 35°C for 3 to 7 days. Do not use cotton swabs or wooden sticks. In order to see colonies, examine plates microscopically.

Method 59

Media	See note below for important directions. Phase 1: SP4 Glucose Broth Phase 2: SP4 Glucose Agar
Temperature	Phase 1: 35°C Phase 2: 35°C
Atmosphere	Phase 1: Aerobic Phase 2: Carbon Dioxide (Candle Jar)
Growth Time	Phase 1: 7 to 28 days Phase 2: 5 to 15 days

Note: Inoculate Broth with LYFO DISK™. For Phase 1, prepare a 1:10 serial dilution using SP4 Glucose Broth. Incubate broth aerobically at 35°C for 7 to 28 days until the broth turns yellow. Then plate 0.2 ml of the broth culture to SP4 Glucose Agar. Incubate agar in a candle jar for 5 to 15 days. Do not use cotton swabs or wooden sticks. In order to see colonies, examine plates microscopically.

Method 60

Media	See note below for important directions. Phase 1: Mycoplasma Broth Phase 2: Mycoplasma Agar
Temperature	Phase 1: 35°C Phase 2: 35°C
Atmosphere	Phase 1: Aerobic Phase 2: 5 to 7% Carbon Dioxide
Growth Time	Phase 1: 48 hours Phase 2: 3 to 7 days

Note: Inoculate Broth with LYFO DISK™. For Phase 1, prepare a 1:10 serial dilution using Mycoplasma Broth. Incubate the broth aerobically at 35°C for 48 hours. For Phase 2, plate 0.2 ml of the broth culture to Mycoplasma Agar. Incubate agar in 5 to 7% Carbon Dioxide at 35°C for 3 to 7 days. Do not use cotton swabs or wooden sticks. In order to see colonies, examine plates microscopically.

Method 61

Media	See note below for important directions. Phase 1: SP4 Urea Broth Phase 2: A8 Agar
Temperature	Phase 1: 35°C Phase 2: 35°C
Atmosphere	Phase 1: Aerobic Phase 2: Anaerobic
Growth Time	Phase 1: 24 to 96 hours Phase 2: 4 to 6 days

Note: Inoculate Broth with LYFO DISK™. For Phase 1, prepare a 1:10 serial dilution using SP4 Urea Broth. Incubate the broth aerobically at 35°C for 24 to 96 hours. As soon as the SP4 Urea Broth turns red, begin Phase 2 by plating 0.1 ml of the broth to A8 Agar and streak for isolation. Incubate A8 agar anaerobically at 35°C for 4 to 6 days. Do not use cotton swabs or wooden sticks. In order to see colonies, examine plates microscopically.

Method 62

Media	Sabouraud Dextrose Emmons Agar
Temperature	25°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	2 to 7 days

Note: *Cryptococcus* species grow poorly on Nonselective Sheep Blood Agar.

Note: Nutrient Agar, Tryptic Soy Agar, Potato Dextrose Agar, and Standard Methods Agar (Plate Count Agar) are appropriate alternatives together with an additional period (24 hours) of incubation.

Method 63

Media	Anaerobic Blood Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	Anaerobic
Growth Time	48 to 72 hours

Note: Tryptic Soy Agar (Soybean Casein Digest Agar) is an appropriate alternative together with an additional period (24 hours) of incubation time. Using the alternative agar may result in reduced recovery for *Clostridium* species.

Method 64

Media	Tryptic Soy Agar (Soybean Casein Digest Agar), Standard Methods Agar (Plate Count Agar) or Nutrient Agar
Temperature	55°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	24 to 48 hours

Method 65

Media	Nonselective Sheep Blood Agar or Columbia CNA with 5% Sheep Blood
Temperature	35°C
Atmosphere	5 to 7% Carbon Dioxide
Growth Time	48 hours

Note: Alternatively, the strain may be grown in MRS (Man, Rogosa, Sharpe) Broth in an aerobic atmosphere for 48 hours. Transfer to either Columbia CNA with Sheep Blood or Nonselective Sheep Blood Agar. Incubate at 35°C in 5 to 7% Carbon Dioxide for 48 hours.

Method 66

Media	Nonselective Sheep Blood Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	5% Carbon Dioxide
Growth Time	24 to 72 hours

Note: *Streptococcus* will also recover well on Columbia CNA with 5% Sheep Blood.

Method 67

Media	Tryptic Soy Agar (Soybean Casein Agar) or Nonselective Sheep Blood Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	24 to 48 hours

Note: Alternatively, the microorganism may be grown on Standard Methods Agar (Plate Count Agar) for a minimum of 72 hours.

Method 68

Media	Chocolate Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	Microaerophilic
Growth Time	48 hours

Method 69

Media	Malt Extract Agar
Temperature	25°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	5 to 7 days

Method 70

Media	Nonselective Sheep Blood Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	24 to 48 hours

Method 71

Media	Potato Dextrose Agar
Temperature	25°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	7-14 days

Method 72

Media	Nonselective Sheep Blood Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	24 hours

Method 73

Media	Sabouraud Dextrose Emmons Agar
Temperature	25°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	2 to 4 weeks

Note: Nonselective Sheep Blood Agar, Malt Agar, Nutrient Agar, Tryptic Soy Agar, Potato Dextrose Agar, and Standard Methods Agar (Plate Count Agar) are appropriate alternatives.

Method 74

Media	Tryptic Soy Agar (Soybean Casein Digest Agar), Nonselective Sheep Blood Agar or Standard Methods Agar (Plate Count Agar)
Temperature	30°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	24 to 48 hours

Note: Rehydrate in sterile Brain Heart Infusion Broth, Tryptic Soy Broth, or 0.85% Saline. Transfer a portion of hydrated material immediately to agar. Incubate aerobically at 30°C for 24 to 48 hours.

Note: Rehydration with water may result in decreased or no recovery. Rehydration with fluid provided in the KWIK-STIK™ unit provides satisfactory recovery when transferred to the recommended media.

Method 75

Media	Tryptic Soy Agar (Soybean Casein Agar) or Nonselective Sheep Blood Agar
Temperature	25°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	24 to 48 hours

Note: For optimal recovery, rehydrate in sterile Brain Heart Infusion Broth, Tryptic Soy Broth, or 0.85% Saline. Transfer a portion of hydrated material immediately to agar. Incubate aerobically at 25°C for 24 to 48 hours.

Note: Rehydration with water or the fluid provided in the KWIK-STIK™ unit may result in decreased or no recovery.

Method 76

Media	Potato Dextrose Agar
Temperature	25°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	One week

Method 77

Media	Potato Dextrose Agar
Temperature	25°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	2 to 4 days

Method 78

Media	Sabouraud Dextrose Emmons Agar
Temperature	25°C
Atmosphere	Aerobic

Growth Time	48 to 72 hours
--------------------	----------------

Method 79

Media	Potato Dextrose Agar
Temperature	25°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	3 to 7 days

Method 80

Media	Nutrient
Temperature	25°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	3 to 5 days

Method 81

Media	Tryptic Soy Agar (Soybean Casein Digest Agar), Nonselective Sheep Blood Agar, Standard Methods Agar (Plate Count Agar) or Nutrient Agar
Temperature	35°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	4 to 5 days

Note: Very small colonies develop within 48 hours. The colony morphology does not fully develop until 4 to 5 days.

Method 82

Media	Columbia Blood Agar
Temperature	30°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	48 to 72 hours

Note: Using alternative agars such as Tryptic Soy Agar (Soybean Casein Digest Agar), Nonselective Sheep Blood Agar, Standard Methods Agar (Plate Count Agar) or Nutrient Agar may result in reduced recovery.

Method 83

Media	Sabouraud Dextrose Emmons Agar
Temperature	25°C
Atmosphere	Aerobic
Growth Time	2 to 7 days

Note: Nutrient Agar, Potato Dextrose Agar, and Standard Methods Agar (Plate Count Agar) are appropriate alternatives together with an additional period (24 hours) of incubation.