

**Facultad de Odontología**

**Universidad Nacional de La Plata**



**Especialización en Ortodoncia**

**TRABAJO INTEGRADOR FINAL**

Tema: Evaluación de la efectividad del Hipoclorito de sodio y la clorhexidina sobre *S.mitis* y *S. salivarius* presentes en dispositivos de ortopedia.

Alumno: Valentina Carballeira

Directora: Prof. Dra. Ivana Perdomo Sturniolo

Codirector: Prof. Dr. Ezequiel Escudero Giacchella

**Año: 2024**

## 1- Resumen:

Mantener la higiene de la aparatología ortopédica es sumamente relevante ya que no solamente nos ayuda a mejorar la salud bucal del paciente, sino que también colabora en la disminución de las infecciones estomatológicas relacionadas con el acúmulo de biofilm. La presencia de irregularidades en el acrílico de los distintos dispositivos favorece el desarrollo de las primeras formas bacterianas (colonización primaria), necesarias para el advenimiento de nuevos microorganismos que transforman al biofilm en un potencial peligro a la salud del paciente. Para lograr la disminución o eliminación de microorganismos se utilizaron productos químicos desinfectantes que juntamente con una técnica manual de cepillado evitan la proliferación de la biopelícula sobre la resina acrílica. El propósito del siguiente trabajo fue evaluar la eficacia del hipoclorito de sodio y la clorhexidina sobre *S. mitis* y *S. salivarius*, y de esta manera disminuir o eliminar la carga bacteriana en los aparatos de ortopedia. Para esto, se tomaron muestras antes y después del contacto con el agente químico, se procedió al cultivo y se analizó el desarrollo de colonias macro y microscópicamente. Los resultados obtenidos indicaron que el hipoclorito de sodio presentó una acción microbicida superior en relación a la clorhexidina. El conocimiento del mejor desinfectante en cada caso particular; su acción; concentración; tiempo de exposición; técnica; almacenamiento y el control de las indicaciones del fabricante optimizan los resultados esperados.

**Palabras clave:** aparatos de ortopedia, microorganismos, desinfectantes.

## Abstract:

Maintaining the hygiene of orthopedic appliances is extremely relevant since it not only helps us improve the patient's oral health, but also helps to reduce stomatological infections related to the accumulation of biofilm. The presence of irregularities in the acrylic of the different devices favors the development of the first bacterial forms (primary colonization), necessary for the advent of new microorganisms that transform the biofilm into a potential danger to the patient's health. To achieve the reduction or elimination of microorganisms, disinfectant chemicals are used that, together with a manual brushing technique, prevent the proliferation of biofilm on the acrylic resin. The purpose of the following work was to evaluate the effectiveness of sodium hypochlorite and chlorhexidine on *S. mitis* and *S. salivarius*, and in this way reduce or eliminate the bacterial load in orthopedic appliances. For this, samples were taken before and after contact with the chemical agent, culture was carried out and the development of colonies

was analyzed macro- and microscopically. The results obtained indicated that sodium hypochlorite presented a superior microbicidal action in relation to chlorhexidine. Knowledge of the best disinfectant in each particular case; his action; concentration; exhibition time; technique; Storage and control of the manufacturer's instructions optimize the expected results.

**Keywords:** orthopedic devices, microorganisms, disinfectants.

## ÍNDICE:

1- Introducción	Pág. 1-3
2- Objetivos	Pág. 4
2.1- Objetivo general	Pág. 4
2.2- Objetivos específicos	Pág. 4
2.3- Hipótesis relevante	Pág. 4
3- Marco teórico	Pág. 5-19
3.1- Definición y formación del biofilm	Pág. 5-7
3.2- <i>Streptococcus viridans</i>	Pág. 7-8
3.2.a- Clasificación	Pág. 8
3.3- Características generales de <i>S. mitis</i> y <i>S. salivarius</i>	Pág. 9
3.3.a- <i>Streptococcus mitis</i>	Pág. 9
3.3.b- <i>Streptococcus salivarius</i>	Pág. 9
3.4- Desinfección	Pág. 9-10
3.4.a- Factores a tener en cuenta en el uso de desinfectantes	Pág. 10-11
3.5- Hipoclorito de sodio	Pág. 12-15
3.6- Clorhexidina	Pág. 15-16
3.6.a- Composición	Pág. 16
3.6.b- Concentraciones	Pág. 16-17
3.6.c- Usos y aplicaciones de la clorhexidina en ortodoncia	Pág. 17
3.7- Uso del hipoclorito de sodio y clorhexidina en ortodoncia	Pág. 17-18
3.7.a- Ventajas y desventajas de NaClO y clorhexidina	Pág. 18
3.8- Toma de muestras en odontología	Pág. 18
3.8.a- Características de la muestra	Pág. 18-19
4- Materiales y métodos	Pág. 20-31
4.1- Diseño metodológico	Pág. 20
4.2- Criterios de inclusión y exclusión	Pág. 20-21
4.3- Pasos previos a la toma de muestras	Pág. 21
4.4- Toma de muestras	Pág. 21-23
4.5- Actividades de laboratorio	Pág. 23
4.5.a- Selección y acondicionamiento de elementos	Pág. 23-24
4.5.b- Preparación del medio de cultivo (siembra)	Pág. 24-28
4.6- Aspecto y visualización de las colonias	Pág. 28
4.6.a- Análisis macroscópico	Pág. 28-29
4.6.b- Análisis microscópico	Pág. 29
4.6.b.1- coloración de Gram	Pág. 29
4.6.b.2- Técnica	Pág. 29-30
4.7- Aspectos éticos del estudio	Pág. 31
5- Resultados	Pág. 32-35
5.1- Predominio bacteriano antes del uso de ag. químicos	Pág. 32-33
5.2- Predominio bacteriano luego del uso de NaClO	Pág. 33-34
5.3- Prevalencia bacteriana luego del uso de Clorhexidina	Pág. 34-35
6- Discusión	Pág. 36
7- Conclusiones	Pág. 37
8- Anexos	Pág. 38-39
9- Bibliografía	Pág. 40- 43

## 1- Introducción:

La ortodoncia es la rama de la odontología que estudia las malformaciones y defectos de las piezas dentarias, maxilares y su tratamiento. La palabra ortodoncia proviene del griego orto- (ὀρθο-, recto) -doncia (ὀδών, diente). El objetivo de la terapia ortodóncica es mejorar la salud bucal, la funcionalidad y la estética, lo que conlleva una mejora en la calidad de vida <sup>(1)</sup>.

El control de la placa es una de las claves para la prevención de las complicaciones periodontales y para el éxito del tratamiento ortodóncico. La colocación de aparatos de ortodoncia, tanto fijos como removibles, conlleva modificaciones desfavorables en la composición de la placa bacteriana, lo que aumenta considerablemente los riesgos periodontales y de caries.

Para evitar los posibles problemas que puedan aparecer es decisivo motivar y concienciar a los pacientes sobre la importancia de una buena higiene oral, ya que sin ello la placa se acumula alrededor de los aparatos y podría causar gingivitis y descalcificación del esmalte. En este sentido, el ortodoncista tiene una doble obligación: informar al paciente sobre los métodos para el control del biofilm oral y controlar la eficiencia de la higiene oral durante la consulta.

Los tratamientos ortodóncicos no provocan ninguna clase de patología periodontal, pero sí pueden desencadenarse en pacientes con mala higiene bucal.

Quintero<sup>(2)</sup> describe los efectos adversos en los pacientes con tratamiento ortodóncico debido a la mala higiene bucal durante la terapéutica.

Los aparatos ortodóncicos están dentro de los factores que proporcionan el acúmulo de placa bacteriana, la cual favorece la aparición de inflamación gingival, conocida como gingivitis, que, en dependencia de su severidad, puede evolucionar y derivar en problemas más graves como periodontitis, daño de las estructuras de los tejidos de soporte de los dientes.

La estomatitis sub protésica se considera una de las patologías más frecuentes (56%) que afecta a los tejidos bucales de los pacientes portadores de aparatos dentales removibles encontrándose con más frecuencia en el maxilar superior. La frecuencia de pacientes con esta patología podría estar relacionada con la presencia de factores

como son la higiene deficiente del aparato, así como el mayor tiempo de uso del mismo <sup>(3)</sup>.

Los aparatos removibles pueden ser importantes medios de transmisión de infecciones, en relación al manejo inadecuado de los mismos. Uno de los factores más importantes de contaminación es el lugar en el que se mantiene el aparato de ortopedia como puede ser la cocina, el baño, el piso, o la manipulación con las manos sucias sin una protección adecuada del aparato como un estuche.

La contaminación del aparato se produce principalmente en niños, quienes retiran el aparato de ortopedia de su boca, comen y se lo vuelven a colocar con las manos sucias y sin un previo cepillado de dientes ni del aparato. Debido a ello el dispositivo removible es colonizado por microorganismos, los cuales se transmiten al paciente portador.

Generalmente los pacientes que no tienen una buena higiene de sus aparatos suelen presentar halitosis, e inflamación de las encías por lo que pueden tener dolor, edema y eritema. El uso de métodos mecánicos y químicos como el uso de desinfectantes y de un cepillo de cerdas suaves favorece la eliminación de placa y manchas en los aparatos <sup>(4)</sup>.

Técnica mecánica: la misma consiste en retirar la ortopedia de la boca, humedecerla con agua tibia y frotar con cepillo de nylon por todas sus caras: la parte interna (que está en contacto con el paladar/encías) como la externa, dientes, resortes, retenedores y arcos. El aparato de ortopedia debe ser secado con papel tipo “tissue” (nunca debe dejarse en remojo) y posteriormente se colocará nuevamente en la boca o se guardará en un estuche adecuado.

Técnica con agentes químicos desinfectantes: ésta se basa en la utilización productos que inhiban o eliminen diferentes microorganismos (propios de la cavidad bucal como externos relacionados al contacto con distintas superficies). Entre los mas comunes se detallan: hipoclorito de sodio, clorhexidina, ácido acético, solución de peróxidos enzimáticos neutros, monopersulfato de potasio y productos con bicarbonato de sodio entre otros. Sin embargo, muchos de estos presentan un alto costo o tiempo de contacto prolongado.

Microorganismos: los aparatos de ortopedia (A.O) sufren cambios con el tiempo,

siendo reservorios de microorganismos potencialmente patógenos. Bacterias relacionadas con la colonización primaria, secundaria y hongos son algunos de los que presentan mayor frecuencia de aparición.

El *Streptococcus mitis* y el *S. salivarius* son los primeros colonizadores sobre los cuales se depositan otras formas bacterianas (sin estos no pueden producirse los mecanismos de agregación y coagregación).

La eliminación de estos microorganismos con las técnicas antes mencionadas evita posibles enfermedades y prolongan la vida útil de la aparatología.

## **2- OBJETIVOS:**

### **2.1- Objetivo General**

- Evaluar la efectividad del Hipoclorito de sodio al 2 % y la clorhexidina al 0.12 % sobre *S. mitis* y *S. salivarius* presentes en dispositivos de ortopedia.

### **2.2- Objetivos específicos**

- Identificar qué tipo de microorganismo (*S. mitis* y *S. salivarius*) puede contaminar más las placas de ortodoncia.
- Analizar la acción microbicida del hipoclorito de sodio en dispositivos de ortodoncia removible.
- Determinar el comportamiento de la clorhexidina sobre la superficie acrílica.
- Comparar ventajas y desventajas de ambos agentes químicos.
- Transferir los resultados al campo disciplinar práctico de la ortodoncia.

### **2.3- Hipótesis relevante:**

El hipoclorito de sodio presenta una acción microbicida proporcionalmente superior a la clorhexidina sobre *S. mitis* y *S. salivarius* presentes en dispositivos de ortopedia.

### 3- Marco teórico:

Uno de los aspectos cruciales en el tratamiento ortodóncico es el control de la placa bacteriana. Tanto los aparatos fijos como los removibles pueden alterar la composición de la placa, aumentando así los riesgos de enfermedades periodontales y caries. Por lo tanto, es esencial concientizar a los pacientes sobre la importancia de una buena higiene oral para evitar complicaciones.

La acumulación de placa bacteriana alrededor de los aparatos removibles puede dar lugar a gingivitis e incluso descalcificación del esmalte dental. Además, la estomatitis subprotésica, una afección común en pacientes con aparatología acrílica suele afectar los tejidos bucales, especialmente en el maxilar superior.

La higiene inadecuada de los aparatos removibles puede convertirlos en vectores de infección. Por ejemplo, si se manipulan con las manos sucias o se almacenan en lugares poco higiénicos como la cocina o el baño, los microorganismos pueden colonizar el dispositivo y transmitirse al paciente.

Para prevenir estos problemas, se recomienda el uso de métodos mecánicos y químicos, como desinfectantes y cepillos de cerdas suaves, para eliminar la placa y las manchas de los aparatos. Asimismo, una buena higiene oral por parte del paciente es esencial para mantener la salud bucal durante el tratamiento ortodóncico.

#### 3.1- Definición y formación del biofilm:

La biopelícula se considera, un conjunto de biomasa con microcirculación, que permite a las diferentes comunidades bióticas complementarse nutricionalmente.

Es una unidad sellada, englobada en polisacáridos extracelulares, que le confiere resistencia ante las defensas del huésped y los antibióticos <sup>(5)</sup>.

Formación de la biopelícula: se puede dividir en tres fases:

- Formación de la película dental (película adquirida):

La formación de la película adquirida es la etapa inicial del desarrollo de la biopelícula. Todas las zonas de la boca, entre ellas las superficies de los tejidos blandos, los dientes y las de restauraciones fijas y removibles, están cubiertas por una película de glucoproteínas.

Ésta está constituida por componentes salivales y del líquido gingival, así como de

desechos, productos bacterianos y de células de los tejidos del huésped. Los mecanismos que intervienen en la formación de la película del esmalte incluyen fuerzas electrostáticas, de Van Der Waals e hidrófobas.

- Colonización inicial o colonización primaria:

Tras unas horas, aparecen las bacterias en la película dental. Los primeros colonizadores de la superficie dentaria cubierta con la película son los microorganismos Gram positivos facultativos, como *Actinomyces viscosus* y *Streptococcus mitis* y *salivarius* entre otros.

Estos colonizadores iniciales se adhieren a la película mediante moléculas específicas, denominadas adhesinas, presentes en la superficie bacteriana, que interactúan con receptores en la película dental. A continuación, la biomasa madura mediante la proliferación de especies adheridas, y se produce, además la colonización y el crecimiento de otras.

En esta sucesión ecológica de la biopelícula, hay transición de un ambiente aerobio inicial, caracterizado por especies Gram positivas facultativas, a otro notablemente escaso de oxígeno, debido al consumo de este gas por parte de las bacterias pioneras que favorecen el predominio de gérmenes anaerobios gramnegativos.

- Colonización secundaria y maduración

Las bacterias comienzan a aumentar en número y se da inicio a un proceso de sucesión ecológica autogénica. Los microorganismos residentes modifican el ambiente, de tal forma, que ellos mismos pueden ser sustituidos por otros más adaptados al hábitat modificado. Los colonizadores secundarios son los microorganismos que no colonizaron en un principio superficies dentales limpias, entre ellos *Prevotella intermedia*, *Prevotella loescheii*, especies de *Capnocytophaga*, *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis*. Dichos patógenos se adhieren a las células de bacterias ya presentes en la masa de la biopelícula. Entre todas las bacterias que forman la biopelícula, existen tres que tienen una relevancia especial en el inicio y la progresión de la enfermedad periodontal: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg) y *Tannerella forsythensis* (Tf) <sup>(6)</sup>.

En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas, como proteínas, ácidos nucleicos y diversos productos procedentes de la lisis bacteriana. El conjunto de polisacáridos, ácidos nucleicos y proteínas se conocen con el nombre de sustancias

poliméricas extracelulares.

En la matriz también pueden hallarse: cristales de sales minerales, partículas de corrosión, de sedimento o ambas, o componentes sanguíneos.

Los exopolisacáridos pueden estar asociados con iones metálicos y cationes bivalentes. Pueden tener carga neutra o polianiónica, según el tipo de exopolisacárido, lo que les permitirá interactuar con distintos antimicrobianos, de forma tal que estos pueden quedar atrapados en la matriz sin capacidad para actuar sobre las bacterias. La arquitectura de la matriz no es sólida. Los microorganismos viven en torreonos celulares, que se extienden en forma tridimensional desde la superficie a la cual están adheridas. Estos torreonos están compuestos por microcolonias de diferentes células bacterianas, tanto aeróbicas como anaeróbicas, englobadas por exopolisacáridos y separadas unas de otras por espacios intersticiales huecos, llamados canales de agua <sup>(7)</sup>.

Estos permiten el flujo de líquido y actúan como un sistema circulatorio primitivo para el transporte y difusión de nutrientes y oxígeno a las bacterias ubicadas en su interior, incluso a aquellas situadas en las zonas más profundas de la biopelícula.

Asimismo, constituyen un mecanismo para la remoción de desechos metabólicos.

### 3.2- *Streptococcus viridans*:

Los estreptococos del grupo viridans son habitantes normales de la mucosa oral, respiratoria y gastrointestinal de los mamíferos y del tracto genital en la mujer, donde juegan un papel importante en la prevención de la colonización de patógenos potenciales. Las infecciones clínicas por este grupo ocurren, mayoritariamente, tras una lesión en las zonas de su hábitat normal. Es conocido que diversos microorganismos de este grupo, como *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mutans*, tienen la capacidad de producir dextranos extracelulares que actúan como mediadores en los mecanismos de fijación, favoreciendo el establecimiento de nichos en diferentes superficies como son, por ejemplo, las piezas dentarias y las válvulas cardíacas. A pesar de considerarse patógenos de poca virulencia, son agentes etiológicos de diversos procesos patológicos de gran importancia. Los estreptococos del grupo viridans, y especialmente *S. mutans*, son los agentes más importantes implicados en la caries dental que, sin ser una entidad que comprometa la vida, constituye una de las patologías actuales más frecuentes y costosas, con una duración de por vida. Por otro lado, el torrente sanguíneo puede ser invadido transitoriamente por los estos microorganismos tras un

traumatismo u otros procesos. En la actualidad los estreptococos del grupo viridans son responsables del 6-8% de los episodios de bacteriemias significativas en nuestro país. Cuando estos microorganismos acceden al torrente sanguíneo, las personas con válvulas cardíacas alteradas o pacientes con cáncer y neutropenia presentan un riesgo elevado de infección grave que puede comprometer la vida.

### 3.2.a- Clasificación:

Los estreptococos de este grupo, también denominados estreptococos orales, poseen las características comunes del género *Streptococcus*. Por lo tanto, se trata de cocos grampositivos, anaerobios facultativos, asociados en parejas o cadenas, que no producen catalasa y fermentan la glucosa con producción de ácido láctico. El término viridans deriva del latín viridis, que significa verde, ya que producen, en su mayoría, unas colonias pequeñas en agar sangre rodeadas de un halo estrecho de hemólisis verde debido a una destrucción incompleta de los eritrocitos (hemólisis  $\alpha$ ).

Este grupo heterogéneo de cocos grampositivos presenta, aún en la actualidad, dificultades para lograr una identificación de especie. Es por esto que han sufrido al cabo del tiempo distintas clasificaciones entre las que se mencionan: Colman y Williams (1972) Facklam (1977) Coykendall (1989) Bruckner y Colonna (1997). Con el desarrollo de la tecnología molecular en la última década, se ha establecido una clasificación más estable y aceptada por diversos investigadores basada en estudios mediante hibridación de DNA y análisis de secuencias del rRNA 16S y del gen que codifica la superóxido dismutasa, que han provocado cambios sustanciales en la taxonomía y nomenclatura del género *Streptococcus*.

C. y Williams (1972)	Facklam (1977)	Coykendall (1989)	Bruckner y Colonna (1997)
<i>S. salivarius</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>S. salivarius</i>
<i>S. mitior</i>	<i>S. mitis</i>	<i>S. mitis</i>	<i>S. mitis</i>
<i>S. sanguis</i>	<i>S. sanguis I y II</i>	<i>S. sanguis</i>	<i>S. sanguis</i>
<i>S. milleri</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. anginosus</i>	<i>S. milleri</i>
<i>S. mutans</i>	<i>S. anginosus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>
	<i>S. mutans</i>		
	<i>S. morbillorum</i>		
	<i>S. acidominimus</i>		
	<i>S. uberis</i>		

Tabla 1. Clasificaciones de *Streptococcus* del grupo viridans más aceptadas.

### 3.3- Características generales del *S. mitis* y *S. salivarius*

Presentan forma esférica y se agrupan en parejas o en cadenas largas. Miden entre 0,6 y 1 a 2 um. Son bacterias Gram + esto significa que se tiñen con el colorante primario de Gram kopellof, el violeta de genciana.

Son no esporuladas por lo tanto carecen de elementos de resistencia y flagelos por eso son inmóviles y pueden o no presentar capsula en su exterior. Frente la prueba de la catalasa se define como catalasa negativos.

El requerimiento de oxígeno varía según la situación, pero se definen como anaerobios facultativos.

#### 3.3.a- *Streptococcus mitis*

Es una especie mesófila, alfa hemolítica que habita en la boca humana. Es un coco Gram positivo que fermenta la glucosa, la maltosa, y la sacarosa, pero no el manitol, sorbitol glicerol.

Se pueden cultivar en agar sangre donde producen hemolisis o en AMS (agar Mitis Salivarius) <sup>(8)</sup>.

#### 3.3.b- *Streptococcus salivarius*

Es uno de los primeros microorganismos que infecta la cavidad bucal del niño después del nacimiento, encontrándolo en dorso de la lengua y en la saliva.

Su desarrollo en Agar Mitis Salivarius (medio de cultivo selectivo), es formando colonias grandes redondeadas con una zona alrededor semejante a una gota.

Ambos se encuentran dentro del complejo microbiano amarillo, clasificación que se generó para identificarlos con colores para relacionarlos con distintas patologías gingivoperiodontales <sup>(9)</sup>.

### 3.4- Desinfección

Se entiende por desinfección a la acción de sustancias químicas (desinfectantes) aplicadas sobre material inerte, para la destrucción de los diferentes organismos vivos capaces de causar enfermedades. El vehículo utilizado para disolver los diferentes desinfectantes es el agua. No todos los desinfectantes poseen la acción de destrucción sobre los diferentes patógenos. Por ello son importantes los pasos previos; estos eliminan a los

microorganismos mediante diferentes procesos: coagulación, sedimentación o filtración (10).

### 3.4.a- Factores a tener en cuenta en la acción y el uso de los desinfectantes:

#### a- Concentración del desinfectante:

La concentración varía de acuerdo al tipo de desinfectante que se utiliza, sin embargo, es importante tener en cuenta que esta propiedad es inversamente proporcional al tiempo de exposición: cuanto mayor sea la concentración, menor tendrá que ser el tiempo de exposición. Este factor puede estar relacionado a la muerte de los microorganismos, ya que, en ciertos productos, las concentraciones muy pequeñas, no causan la destrucción del microbiota total.

#### b- pH.:

Es otra de las causas que condicionan la acción de los agentes químicos. Este factor determina el grado de disociación del producto químico actuante, teniendo en cuenta que la mayoría de los productos atraviesan más fácilmente las paredes y membranas plasmáticas de los microorganismos, cuando se encuentran en un estado químico liposoluble no ionizable o no disociado.

#### c- Dianas celulares de acción de los desinfectantes:

Los desinfectantes se seleccionan de acuerdo al sustrato sobre el que será aplicado y de acuerdo al grado de actividad selectiva sobre el mismo y a la microbiota que se desea combatir. Para ello se deben considerar las diferentes “dianas celulares” sobre las que actúan los distintos agentes químicos a utilizar. Las principales son:

- Pared celular:

Es la encargada de proteger la integridad de los microorganismos y mantener en cierta forma su supervivencia. En ella se pueden encontrar ciertas sustancias como los lipolisacáridos y fosfolípidos estabilizados por medio de iones de calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) y magnesio ( $\text{Mg}^{++}$ ). Estos elementos se integran a un grupo de proteínas y otras sustancias de acuerdo al microorganismo que integren. Por lo tanto, para que un desinfectante pueda ser bien absorbido o repelido por la carga eléctrica de la membrana dependerá de su estado de disociación.

- Membrana citoplasmática:

Algunas sustancias simples pueden atravesar esta estructura lipoproteica por el mecanismo de difusión pasiva. Otras, utilizarán el transporte activo. La mayoría de los desinfectantes más utilizados en Odontología como los fenoles, los derivados del amonio cuaternario y las bisguanidas entre otros, producen fisuras a nivel de los compuestos de bajo peso molecular causando la desnaturalización proteica y la lisis celular.

- **Metabolismo energético:**

Ciertos desinfectantes actúan sobre el Adenosin Tri Fosfato (ATP) inhibiendo su síntesis. Por este motivo, se produce un desequilibrio de los procesos oxidativos y por ende se impide el suministro energético colapsando su metabolismo.

- **Citoplasma y núcleo:**

Algunos productos químicos interfieren a nivel enzimático o proteico, mientras que otros como los oxidantes o alquilantes pueden actuar sobre el ácido Ribonucleico (ARN) o desoxirribonucleico (ADN). En el primer caso inhiben la síntesis de proteínas y en el segundo alteran la reproducción celular.

- **Esporos:**

Ciertas bacterias poseen en su pared celular el ácido dipicolínico lo que genera una importante resistencia a los desinfectantes en comparación con las formas vegetativas. Algunos agentes químicos oxidantes como las formas cloradas son capaces de desestabilizar este compuesto en los esporos. Son pocos los desinfectantes con efecto esporicida, como sucede con los derivados de los amonios cuaternarios o fenoles. Sin embargo, pueden poseer un efecto sobre la viabilidad en algunos estadios del ciclo esporogénico de ciertas bacterias; siendo tres las áreas sobre las que pueden causar un efecto inhibitorio o letal:

- Durante las diferentes fases de la esporulación.
- Sobre el espora maduro como el glutaraldehído, formaldehído, hipoclorito de sodio y el dióxido de etileno.
- Durante la germinación y/o el crecimiento. Ej. fenoles y cresoles.

Los desinfectantes con propiedades lipofílicas son activos sobre las envolturas virales. El cloro, los derivados de yodo, los agentes oxidantes, el glutaraldehído, los ácidos y álcalis fuertes, son activos sobre la mayoría de los virus <sup>(11)</sup>.

### 3.5- Hipoclorito de sodio:

El hipoclorito de sodio (NaClO) es un compuesto oxidante de rápida acción utilizado a gran escala para la desinfección de superficies, de equipos y de mesas de trabajo resistentes a la oxidación, de ropa hospitalaria y del agua. También, para descontaminar salpicaduras de sangre y eliminar olores. Los equipos o muebles metálicos tratados con cloro, tienden a oxidarse rápidamente en presencia de hipoclorito de sodio. El hipoclorito de sodio es comercializado en una solución clara de ligero color verde-amarillento y un olor característico. Como agente blanqueante de uso doméstico normalmente contiene 5-6.5% de hipoclorito de sodio (con un pH de alrededor de 11, es irritante y corrosivo a los metales). Cuando el hipoclorito se mantiene en su envase a temperatura ambiente y sin abrirlo puede conservarse durante 1 mes. Al haberse utilizado para preparar soluciones se recomienda su cambio diario. Entre sus muchas propiedades se incluyen la amplia y rápida actividad antimicrobiana, relativa estabilidad, fácil uso y bajo costo.

El hipoclorito es letal para varios microorganismos, virus y bacterias vegetativas. Es menos efectivo contra esporas bacterianas, hongos y protozoarios. La actividad del hipoclorito se ve reducida en presencia de iones metálicos, biocapas, materiales orgánicos, bajo pH o luz UV. Las soluciones de trabajo deben ser preparadas diariamente. El cloro comercial que contiene 5-6% que será utilizado para la desinfección de superficies, debe ser diluido 1:10 para obtener una concentración final de aproximadamente 0.5% de hipoclorito. Cuando se quieren desinfectar líquidos que pueden contener material orgánico, debe prepararse una concentración final de 1% de hipoclorito <sup>(12)</sup>. Al disponerse fácilmente de este químico, se utiliza asiduamente en unidades hospitalarias. Los fabricantes presentan diferentes indicaciones y presentaciones respecto al producto. Cualquier concentración puede ser utilizada para obtener una solución de hipoclorito diluida empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Fórmula: } \left( \frac{\% \text{ de hipoclorito de sodio concentrado}}{\% \text{ de hipoclorito de sodio deseado}} \right) - 1$$

$$\text{Ejemplo: } \left( \frac{4.5\%}{05\%} \right) - 1 = 9 - 1 = \mathbf{8 \text{ partes de agua por parte de Hipoclorito de sodio}}$$

Por ejemplo, para preparar una solución 0.5% a partir de una 4.5% de hipoclorito de sodio se utilizarán 8 partes de agua con 1 parte de hipoclorito de sodio. Donde "parte" puede ser utilizado para cualquier unidad de medida (litro, mililitro, galones u otros) como medidor puede emplearse una taza, frasco o cualquier envase. En países de habla francesa la cantidad de hipoclorito se expresa como "grados de cloro". Un grado de cloro = 0.3% de cloro activo.

El cloro es uno de los elementos más ampliamente distribuidos en la tierra. No se encuentra en un estado libre en la naturaleza, pero existe en combinación con el sodio, potasio, calcio, y magnesio. En el cuerpo humano, los compuestos de cloro son parte de la defensa inmune no específica. Se generan por los neutrófilos a través de la cloración de mieloperoxidasa mediada por un compuesto nitrogenado o un conjunto de compuestos. El compuesto activo del hipoclorito es el cloro el cual en todas las soluciones de hipoclorito se denomina "cloro libre". El hipoclorito de sodio es el irrigante de elección durante los tratamientos de conductos radiculares debido a su eficacia contra los microorganismos patógenos y la degradación del material orgánico, tejido necrótico y efecto bactericida <sup>(13-14)</sup>. Como irrigante en endodoncia se utiliza actualmente como solución en concentraciones que van del 1% al 5,25%, -1 -1= 9-1= 8 partes de agua por parte de Hipoclorito de sodio entre las más comunes; aunque se han reportado concentraciones de hasta 10%.

Las soluciones comerciales de 5,25% de NaClO son de uso frecuente (15). Es un compuesto halogenado utilizado como un agente proteolítico no específico capaz de eliminar magnesio y iones de carbonato. Se han publicado efectos indeseables de la solución como el citotóxico (accidentes graves al ser inyectado en los tejidos vivos), corrosión del metal, olor desagradable y eliminación de la parte orgánica de la capa de barro dentinario. Tiene capacidad de penetración en los túbulos dentinarios de 77 a 300 micras. Hallazgos de distintos autores describen que el hipoclorito puede eliminar a los microorganismos en cuestión de segundos, incluso a bajas concentraciones. Otros autores mencionan tiempos considerablemente más largos para la muerte de las mismas especies.

Fue producido por primera vez en 1789 en Javel (Francia), haciendo pasar gas cloro a través de una solución de carbonato de sodio. El líquido resultante conocido como "Eau de Javel" o "agua de Javel" era una solución diluida de hipoclorito de sodio. Este proceso no fue muy eficiente y se buscaron métodos de producción alternativos.

Uno de los métodos implicó la extracción de cal clorada (conocido como polvo de blanqueo) con carbonato de sodio para producir bajos niveles de cloro disponible. Este método se utiliza habitualmente para producir soluciones de NaClO para su uso como un antiséptico hospitalario que se vende bajo los nombres comerciales "Eusol" y "solución de Dakin." El hipoclorito de sodio como una solución tamponada al 0,5% se recomendó para la irrigación de heridas durante la Primera Guerra Mundial.

El mecanismo de acción ha sido ampliamente estudiado y se da cuando se contactan las proteínas del tejido y el NaClO. En esta reacción en corto tiempo se forma formaldehído y nitrógeno. Los enlaces peptídicos se rompen para disolver las proteínas. Durante este proceso el hidrógeno en los grupos amino (NH) se sustituye por el cloro (NCl). La formación de cloraminas desempeña un papel importante para la eficacia antimicrobiana. Por lo tanto, el tejido necrótico y el material purulento se disuelven. Así, el agente antimicrobiano puede alcanzar y limpiar mejor las áreas infectadas.

El NaClO también se utiliza comúnmente para desproteinizar tejidos duros en aplicaciones biomédicas. El hipoclorito de sodio actúa como un disolvente orgánico y de la grasa, degradando los ácidos grasos y transformándolos en sales de ácidos grasos (jabón) y glicerol (alcohol); reduciendo la tensión superficial de la solución restante (reacción de saponificación).

El hipoclorito de sodio neutraliza aminoácidos que forman agua y sal (reacción de neutralización). Con la salida de iones hidroxilos hay una reducción del pH. Cuando el cloro se disuelve en agua y está en contacto con la materia orgánica forma ácido hipocloroso. Este es un ácido débil que actúa como un oxidante.

El ácido hipocloroso (HClO) e hipoclorito (iones ClO) conducen a la degradación del aminoácido y a la hidrólisis, presenta acción antimicrobiana mediante la inhibición de enzimas bacterianas que llevan a la oxidación irreversible de grupos SH (grupo sulfhidrilo) de las enzimas bacterianas esenciales.

La eficacia antimicrobiana del hipoclorito de sodio se da en base a su pH alto <sup>(16)</sup> (acción de iones hidroxilo). Siendo similar al mecanismo de acción del hidróxido de calcio. El alto pH de este químico interfiere en la integridad de la membrana citoplasmática, con una inhibición enzimática irreversible, alteraciones en el metabolismo celular de biosíntesis y la degradación de fosfolípidos observados en la peroxidación lipídica.

A nivel odontológico, dentro de la cavidad bucal, el hipoclorito disuelve de manera efectiva restos de pulpa, colágeno y los principales componentes orgánicos de la dentina. Es el único irrigante del conducto radicular que disuelve el tejido necrótico orgánico y vital.

Este desinfectante tiene amplia actividad antibacteriana y se ha comprobado la efectividad contra los microorganismos más resistentes presentes en los conductos radiculares, como *Enterococo Faecalis* en concentración del 5.25% <sup>(17)</sup>.

Otras cualidades del hipoclorito como irrigante se relacionan con: la baja tensión superficial, la neutralización de productos tóxicos en periodos cortos y su acción detergente y desodorizante. Juega un papel importante como agente antimicrobiano ya que libera oxígeno y cloro al entrar en contacto con el tejido pulpar <sup>(18-19)</sup>.

Con respecto a la acción antifúngica se ha comprobado que el hipoclorito de sodio tiene una alta capacidad de dilución frente a *Candida albicans*. Este último residente de la familia de los hongos frecuentes en la cavidad bucal.

### 3.6- Clorhexidina

La clorhexidina es una molécula bicatiónica simétrica consistente en dos anillos: cuatro clorofenil y dos grupos bisguanida conectados por una cadena central de decametileno (clorofenilbisguanida)

La clorhexidina fue desarrollada en la década de los 40 por Imperial Chemical Industries en Inglaterra por científicos que realizaban un estudio sobre la malaria. En ese momento los investigadores fueron capaces de desarrollar un grupo de compuestos denominados polibisguanidas, que demostraron tener un amplio espectro antibacteriano y salió al mercado en 1954 como antiséptico para heridas de la piel. Posteriormente comenzó a usarse en medicina y cirugía tanto para el paciente como para el cirujano. En odontología se utilizó inicialmente para antisepsia de la boca y endodoncia.

El estudio definitivo que introdujo la clorhexidina en el mundo de la periodoncia fue el realizado por Løe y Schiott en 1970, donde se demostró que un enjuague de 60 segundos dos veces al día con una solución de gluconato de clorhexidina al 0,2% en ausencia de cepillado normal, inhibía la formación de placa

Actúa contra la pared celular de los microorganismos causando alteraciones en la

movilidad electroforética, alterando la integridad de la pared celular y facilitando la liberación de los componentes intracelulares.

A bajas concentraciones es bacteriostático, las sustancias de bajo peso molecular, (K y P) pasan a través de la membrana celular y a altas concentraciones es bactericida, produce precipitación del citoplasma <sup>(20)</sup>.

#### 3.6.a- Composición:

Este compuesto es una base fuerte dicatiónica a pH superior a 3,5 con dos cargas positivas en cada extremo del puente de hexametileno. Es esta naturaleza dicatiónica la que la hace extremadamente interactiva con los aniones, lo que es relevante para su eficacia, seguridad, efectos secundarios locales y dificultad para formularla en productos.

Aunque es una base, la clorhexidina se mantiene más estable en forma de sal y la preparación más común es la sal de digluconato por su alta solubilidad en agua.

Se une fuertemente a la membrana celular bacteriana, lo que a bajas concentraciones produce un aumento de la permeabilidad con filtración de los componentes intracelulares incluido el potasio (efecto bacteriostático), en concentraciones más altas produce la precipitación del citoplasma bacteriano y muerte celular (efecto bactericida).

En boca se absorbe rápidamente a las superficies, incluidos los dientes con película adquirida, proteínas salivales y a la hidroxiapatita. La clorhexidina absorbida se libera gradualmente en 8-12 horas en su forma activa. Después de 24 horas aún pueden recuperarse concentraciones bajas de clorhexidina, lo que evita la colonización bacteriana durante ese tiempo. Su pH óptimo se encuentra entre 5,5 y 7.

En función del pH ejerce su acción frente a diferentes bacterias. Con un pH entre 5,0 y 8,0 es activa frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. El desarrollo de resistencias es muy escaso.

También reduce los microorganismos aerobios y anaerobios de la placa en un 54-97% en un periodo de seis meses (PDR, 1993). En un periodo de 2 años no se desarrollan resistencias ni presencia de oportunistas o efectos adversos en la cavidad oral <sup>(21)</sup>.

#### 3.6.b- Concentraciones:

La clorhexidina suele presentarse en dos concentraciones, al 0,12% y al 0,2%, se recomienda realizar un buche con 10ml de producto a una concentración del 0,2% y de

15ml al 0,12%. Esto es debido a la dosis total de clorhexidina, ya que 10ml al 0,2 % libera 20mg, y 15ml al 0,12% libera 18mg, observándose que los resultados con ambas formulaciones son igual de efectivos <sup>(22-23)</sup>.

### 3.6.c- Usos y aplicaciones de la clorhexidina en ortodoncia:

La descalcificación del esmalte, las aftas orales y la inflamación gingival son complicaciones frecuentes durante los tratamientos de ortodoncia. Este agente químico es uno de los indicados para tratar este tipo de afecciones. Presentaciones:

- Colutorios: principalmente en dos concentraciones (0,12% Y 0,2%) que a dosis total similar tienen unos resultados muy parecidos.
- Gel: al 0,2 % o al 0,12% para aplicación en localizaciones concretas.
- Sprays: especialmente recomendados para discapacitados físicos.
- Dentífricos: es difícil formular la clorhexidina dentro de una crema dental.
- Barnices: como prevención de la caries radicular.
- Irrigadores: fracasan en conseguir un buen control de placa y gingivitis cuando no se combinan con medidas de higiene mecánica, aunque se han demostrado eficaces en el control de las regiones interproximales y subgingivales. Sin embargo, han sido eficaces para reducir la inflamación periodontal y controlar la placa subgingival.

La evidencia indica que la clorhexidina es un agente antiplaca con alto grado de confiabilidad demostrada por la estructura química que posee, utilizado de una manera racional aporta un medicamento a tener en cuenta en sus múltiples aplicaciones en afecciones odontológicas como: estomatitis subprotésica, candidiasis bucal, pericoronaritis, periodontitis, gingivitis, periimplantitis, la estomatitis aftosa y para la irrigación de conductos en tratamientos de endodoncia <sup>(24)</sup>.

### 3.7- Uso del hipoclorito de sodio y clorhexidina para desinfección de placas de ortodoncia:

El hipoclorito de sodio y la clorhexidina son dos agentes químicos que variando su concentración y tiempo de contacto pueden actuar como antisépticos o desinfectantes. Presentan un nivel intermedio de acción <sup>(25)</sup>. Sobre la aparatología removible se

recomienda utilizar el hipoclorito al 2 % en tiempos variables que oscilan entre 3 a 30 minutos, describiendo su efectividad a los 10 minutos contra hongos y bacterias. <sup>(26)</sup>

La clorhexidina es utilizada en forma de digluconato al 0.12 % en tiempos variables de inmersión que varían entre los 3 y 5 minutos hasta 8 horas de duración. <sup>(27)</sup>

3.7.a- Ventajas y desventajas del hipoclorito de sodio y de la clorhexidina sobre los aparatos de ortopedia:

HIPOCLORITO DE SODIO	
VENTAJAS	DESVENTAJAS
BACTERICIDA - FUNGICIDA	CORROSIVO
ACCIÓN BLANQUEADORA	MAL SABOR
BAJO COSTO	IRRITANTE
	DEBE DILUIRSE SEGÚN SU USO
CLORHEXIDINA	
VENTAJAS	DESVENTAJAS
BACTERICIDA - FUNGICIDA	PIGMENTA
NO ES CORROSIVO	ALTO COSTO
NO ES IRRITANTE	PUEDO GENERAR ARDOR (USO PROLONGADO)
DILUIDO COMERCIALMENTE	

Imagen N°1 . Ventajas y desventajas del NaClO y la clorhexidina.

3.8- Toma de muestras en odontología:

La información diagnóstica que los estudios microbiológicos pueden proporcionar depende de factores que incluyen la calidad de la muestra recibida.

Por ello, un procedimiento inadecuado para la recolección de la muestra, una muestra pobremente recogida o inclusive mal transportada es causal de un posible diagnóstico erróneo y por ende a un tratamiento inadecuado del paciente.

La toma de muestras es una técnica rápida y eficaz que debe realizarse cada vez que quieran tipificarse los microorganismos y por ende seleccionar la mejor opción antimicrobiana.

3.8.a- Características de la muestra:

- Debe ser representativa del proceso a investigar tanto en cantidad como en calidad de la muestra.
- Estar libre de contaminación cruzada.
- Usar un medio de transporte adecuado.
- Identificación adecuada.

- La conservación debe ser correcta tanto en temperatura y atmósfera.
- Enviar al laboratorio en el menor tiempo posible.

El incumplimiento de estas indicaciones podría dar lugar a la contaminación de la muestra con microorganismos de otros sitios. Si esto ocurre el informe microbiológico será incorrecto y las medidas terapéuticas inadecuadas <sup>(28-29)</sup>.

## 4-MATERIALES Y METODOS:

### 4.1-Diseño metodológico:

Este trabajo se enmarca en una investigación básica y aplicada. El diseño metodológico fue experimental y de tipo transversal. La línea de investigación contribuirá conocimientos a distintas áreas de la ciencia odontológica.

Para el logro de los objetivos propuestos en este estudio se trabajó “In- Vitro” tomando muestras de las placas acrílicas antes y después de ponerlas en contacto con los distintos desinfectantes.

El número de muestras estuvo representado por un total de 100 (N=100), 50 de las cuales fueron tomadas antes de someterlas a la acción de los desinfectantes y 50 correspondientes al momento posterior al contacto con los agentes químicos. Las mismas fueron obtenidas a partir de dispositivos ortopédicos de acrílico suministrados por pacientes que se encontraban transitando su tratamiento en consultorios odontológicos del sector privado de la región oeste de la localidad de Bernal. Para ello, se seleccionó al azar una población de 50 participantes, de diferentes sexos, que aceptaron voluntariamente participar del estudio. Por lo tanto, cada participante y/o su representante legal rubricó la planilla de consentimiento informado donde consta la información vinculada con el trabajo de investigación y sus consideraciones éticas. Las actividades de siembra, repique, preparación de cultivos, esterilización, recuento, coloraciones, entre otras fueron realizadas en el laboratorio de microbiología de la FOLP mediante métodos específicos para cada caso.

Los desinfectantes utilizados para demostrar la acción de cada uno de ellos sobre las colonias bacterianas desarrolladas fueron: hipoclorito de sodio al 2% durante 10 minutos y clorhexidina al 0.12% durante 10 minutos.

La lectura de la presencia de los microorganismos seleccionados (*S. mitis* y *S. salivarius*), se llevó a cabo mediante un análisis macroscópico y microscópico, utilizando un microscopio óptico Leica DM 500, y una lupa binocular Baeco. Se aplicó el sistema de software y el programa Microsoft Excell. Los resultados obtenidos fueron representados mediante gráficos de barra tal como se observan en el capítulo 5.

### 4.2- Criterios de inclusión y exclusión:

#### 4.2.a- Criterios de inclusión:

- Aparatos de ortopedia con acrílico en el sector palatino.
- Dispositivos con más de 6 meses de uso.

#### 4.2.b- Criterios de exclusión:

- Aparatología rota o defectuosa.
- Pacientes que utilicen otros métodos químicos para la realización de la limpieza de los dispositivos.

#### 4.3- Pasos previos a la toma de muestras:

En este primer paso se le solicitó al paciente portador de aparatología removible que la extraiga de su boca mediante el método habitual y la deposite sobre una compresa estéril, para posteriormente comenzar con la toma de muestras.

#### 4.4- Toma de muestras: (misma técnica antes y después de la acción de los agentes químicos)

Para este procedimiento se utilizó un hisopo estéril (Deltalab), que comercialmente se presenta en un tubo con un medio de transporte (Stuart). Éste mantiene la viabilidad de la muestra desde el momento donde es tomada, hasta que llega al laboratorio.



Imagen N° 2 . Packaging que contiene tubo de ensayo plástico con hisopo estéril y medio de transporte.

El medio de Stuart es apto para microorganismos que requieren bajas condiciones de oxígeno.

#### **Composición:**

Glicerofosfato de sodio 10g

Tioglicolato de sodio 0.5g

Clorhidrato de cisteína 0.5g

Cloruro de calcio 0.1g

Azul de metileno 0.001g

Agar 5g

El tubo posee también una etiqueta que se rotuló mediante un código de letras y números para preservar la información de cada paciente.

El hisopo estéril fue frotado en distintas direcciones sobre la superficie de la aparatología acrílica, específicamente en las zonas de mayor contacto con el maxilar superior.

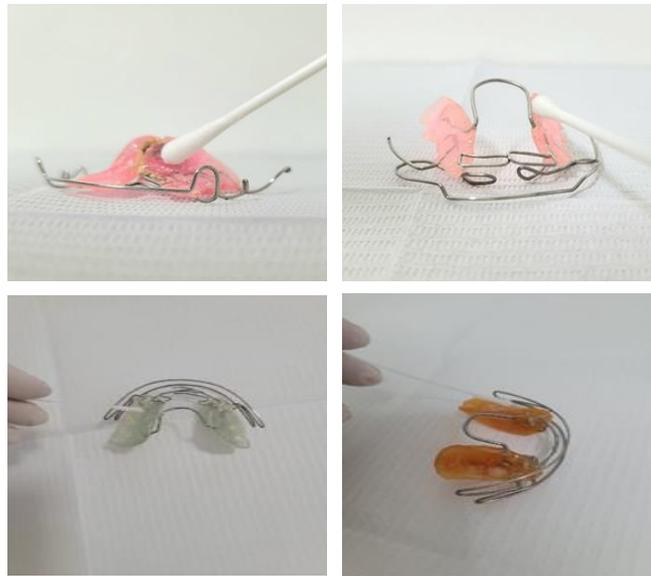


Imagen N°3 . La figura muestra la técnica de toma de muestra sobre distintas aparatologías.

Una vez culminado el procedimiento de toma de muestras se introdujo el hisopo dentro del tubo ejerciendo una leve presión hasta cerrarlo herméticamente.



Imagen N° 4 . La figura indica el frente del tubo y su cierre.

Posteriormente, se preparó hipoclorito de sodio al 2% de acuerdo a la fórmula descrita en el punto 3.5 y se sumergió el dispositivo durante 10 minutos. Luego se extrajo la aparatología, se retiró el excedente, se secó con papel absorbente descartable y se efectuó la toma de muestra como indica en el ítem 4.4.

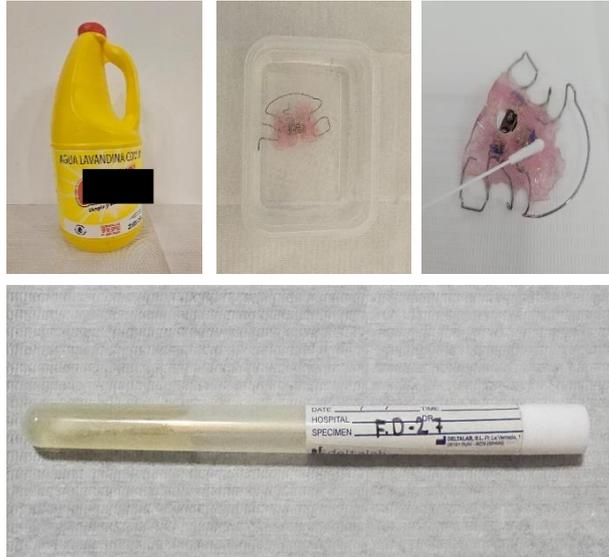


Imagen N°5 . la figura muestra la aparatología en contacto con el hipoclorito y la toma de muestra correspondiente.

Para evaluar la acción de la clorhexidina fue utilizada una solución en forma de digluconato al 0.12%. Sobre ésta fue colocada la aparatología hasta cubrirla totalmente durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se retiró el dispositivo, se secó con papel absorbente para retirar el agente químico sobrante y se efectuó la toma de muestras. Finalmente se llevó el hisopo dentro del tubo.



Imagen N° 6. la figura muestra la aparatología en contacto con clorhexidina y la toma de muestra correspondiente.

4.5- Actividades de laboratorio: estas comprenden acondicionamiento de instrumental metálico, de vidrio, plástico y eléctrico/electrónico, siembra, repique, preparación de cultivos, esterilización, plaqueo, cultivo, recuento y coloraciones.

4.5.a- Selección y acondicionamiento de elementos de laboratorio:

- Instrumental de vidrio:
  - Matraz de Erlenmeyer
  - Varilla mezcladora
  - Portaobjetos
  - Probeta graduada
  - Vaso de precipitado
  
- Instrumental metálico:
  - Cuchara
  - Mechero
  - Trípode
  - Bandeja y soporte para coloración
  - Asa bacteriológica
  
- Instrumental plástico:
  - Placas de Petri
  
- Instrumental eléctrico/electrónico:
  - Balanza
  - Autoclave
  - Microscopio
  - Lupa
  - Estufa de cultivo
  
- Otros:
  - Medio de cultivo (agar mitis salivarius)
  - Kit para Gram
  - Algodón, papel de aluminio, papel, bandas elásticas, agua destilada

Los materiales de vidrio y plástico fueron desinfectados con alcohol 70° previo al lavado mediante la técnica habitual.

#### 4.5.b- Preparación del medio de cultivo, emplacado, siembra y cultivo:

La preparación de este medio de cultivo se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante (90 gramos (gr) de polvo x cada 1000 mililitros (ml) de agua destilada). El Agar Mitis Salivarius (AMS) es un medio selectivo que permite el desarrollo de las

especies objeto de estudio en este trabajo.



Imagen N° 7. Envase de agar mitis salivarius de laboratorios Difco™

▪ Composición:

- Caseína (6.0g)
- Proteasa peptona el N3 (9.0g)
- Proteasa peptona (5.0g)
- Dextrosa (1.0 g)
- Sacarosa (50.0 g)
- Dipotasio fosfato (4.0 g)
- Tripan azul (75.0mg)
- Cristal violeta (0.8mg)
- Agar (15.0 g).

Para realizar una dosificación adecuada y optimizar los recursos solo se fue preparando la cantidad necesaria de AMS (27 gr. de polvo x 300 ml de agua destilada). Para este procedimiento se utilizó balanza digital (Modelo Electronic SF-400) y probeta graduada para establecer la cantidad de líquido.



Imagen N° 8. Balanza Electronic SF-400 y probeta graduada de 100 ml.

Una vez establecida la relación polvo/líquido, se utilizó un matraz de Erlenmeyer por ser

el frasco más adecuado para la preparación de medios de cultivo. El mismo está graduado y es resistente a la temperatura.

Se procedió a la mezcla polvo/líquido bajo la acción del calor, revolviendo continuamente con varilla de vidrio hasta lograr un líquido cristalino. Seguidamente, se realizó un tapón con algodón para cubrir la boca del matraz y sobre éste se colocó papel aluminio y papel blanco con una bandita elástica para permitir su rotulación.



Imagen N° 9. Preparación de AMS en matraz de Erlenmeyer.

Finalmente se esterilizó en autoclave con nivel priónico (134° - 18 minutos a 2 atmósferas de presión). Cada proceso fue controlado física y químicamente.



Imagen N° 10. Esterilizador a vapor marca Arcano de 18 litros.

Transcurrido el tiempo de esterilización, se procedió al empaclado en cajas de Petri

descartables. Esta acción fue realizada a una distancia entre 10 y 15 cm del mechero Bunsen para evitar la contaminación del medio con microorganismos ambientales.



Imagen N° 11. Colocación de AMS en placa de Petri

Una vez solidificadas las placas, se inició el proceso de siembra; la cual fue realizada por duplicado para obtener una mayor confiabilidad en los resultados.

La técnica de siembra fue efectuada en superficie, extrayendo el mismo hisopo del tubo utilizado en la toma de muestras y realizando movimientos de zigzag por toda la extensión de la placa.

Las placas sobrantes que no fueron utilizadas fueron conservadas en heladera.



Imagen N° 12. Siembra en AMS.

Debido a que *S. mitis* y *S. salivarius* son anaerobios facultativos y al no disponer de jarra de anaerobiosis, tuvo que emplearse el sistema ANAERO PACKS, que reproduce las condiciones atmosféricas que los microorganismos necesitan para cumplir con su ciclo vital. Con respecto al cultivo, fue utilizada una estufa marca HESS, calibrada a una

temperatura de 37 grados centígrados.

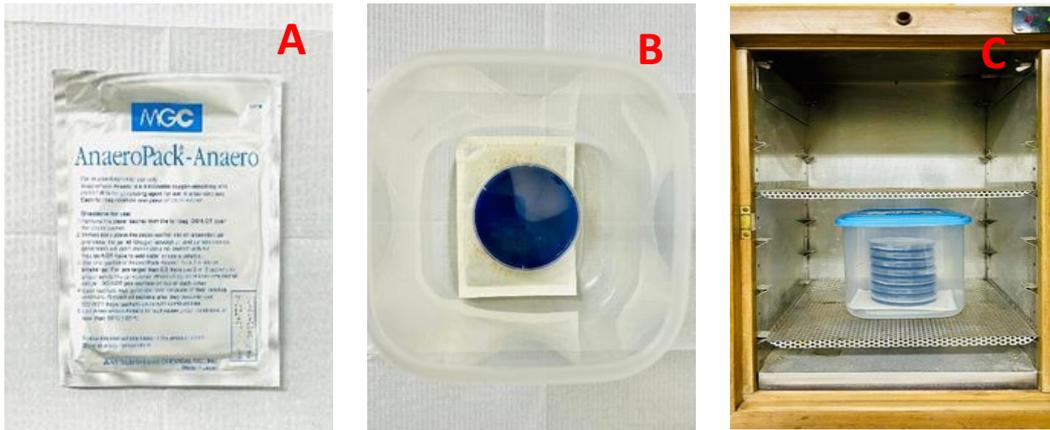


Imagen N° 13. A) Anaero pack para microorganismos anaerobios. B) Recipiente con kit de anaerobiosis y placa con AMS sembrada. C) estufa de cultivo con placas sembradas.

La lectura de las placas fue realizada a las 48- 72 horas de efectuada la siembra.

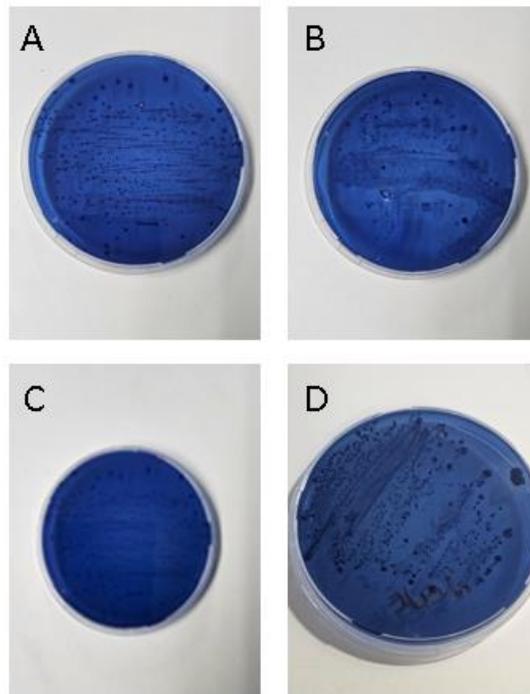


Imagen N° 14. A) Placa con crecimiento bacteriano B) Duplicado C) Placa con desarrollo de microorganismos D) Duplicado

4.6- Aspecto y visualización de las colonias:

4.6.a- **Análisis macroscópico:**

Para estudiar macroscópicamente a las colonias, fue utilizada una lupa binocular marca Baeco, donde se tuvieron en cuenta las siguientes características:

El *S. mitis* se caracteriza por presentar sobre AMS, colonias pequeñas, planas, duras, de color azul fuerte y centro abovedado.

El *S. salivarius* se observa superficialmente desarrollando colonias grandes, de color azul pálido, aspecto mucoide “pegajoso” similar a gotas de goma reluciente.



Imagen N° 15. Lupa binocular Baeco

#### 4.6.b- Análisis **microscópico**:

Para corroborar la presencia de cocos Gram+ fue realizada la técnica de Gram Kopeloff empleando los reactivos y los pasos que se detallan:

##### 4.6.b.1- Coloración de Gram: (Britania) Componentes:

- Violeta de Genciana.
- Lugol concentrado.
- Decolorante (alcohol acetona).
- Safranina.

##### 4.6.b.2- Técnica:

- Toma de muestra: realizada con un ansa de Kolle desinfectada.
- Extendido: en la parte central de un portaobjetos limpio y desengrasado se colocó una alícuota de la cepa bacteriana.
- Fijación: a través del método de Koch, que consiste en pasar tres veces el portaobjeto con la muestra sobre la llama de un mechero.
- Aplicación del colorante primario (violeta de genciana) durante 20 segundos.
- Lavado con agua durante 10 segundos.
- Colocación del mordiente (lugol) durante 30 segundos. Dicho producto tiene como función intensificar la acción del colorante primario. Lavado por 10 seg
- Decoloración: realizada con alcohol acetona. Para este paso es importante hacer una leve presión en el envase plástico para lograr un chorro fino que arrastre el colorante primario. Lavado con agua durante 10 segundos.
- Aplicación del colorante secundario (safranina) durante 20 segundos.
- Lavado, secado y observación por microscopía óptica.

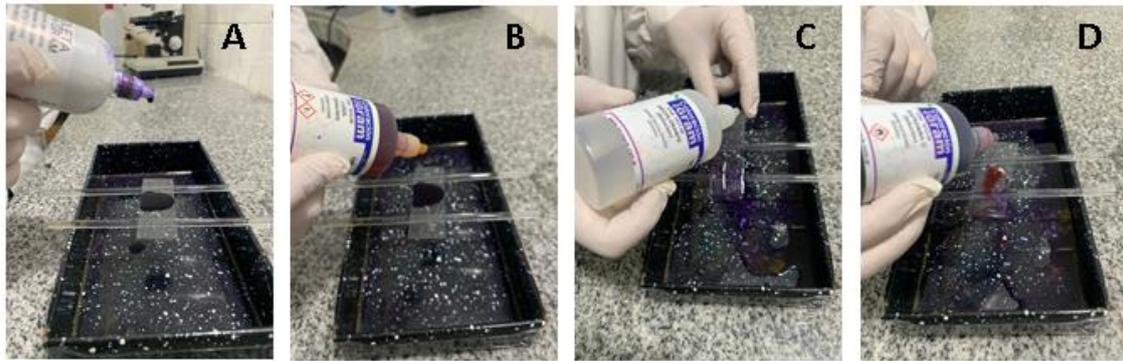


Imagen N° 16. Coloración de gram (paso a paso) A) colorante primaria B) mordiente C) decolorante D) colorante secundario.

Una vez concluida la técnica se observó a través de microscopía óptica (microscopio Leica modelo DM500).



Imagen N° 17. Microscopio Leica DM500.

#### 4.7- Aspectos éticos del estudio

El presente estudio ha previsto su acuerdo con las Declaraciones Internacionales de Ética de Investigación en Seres Humanos, entre las que se destacan la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (WMA) como así también la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos de la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) y las Pautas Éticas Internacionales del Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS).

Asimismo, se ha respetado la vigente legislación nacional y provincial vinculada con la investigación, como también con el Código de Ética de la Facultad de Odontología de la UNLP en sus aspectos vinculados con los estudios de investigación en seres humanos y muestras biológicas.

En virtud de garantizar la privacidad, intimidad, confidencialidad y voluntariedad de los diferentes procesos descriptos metodológicamente se codificaron las muestras biológicas obtenidas con letras F o M de acuerdo al género y A o D dependiendo si la muestra corresponde a antes o después de la acción del agente químico. Conjuntamente a estas letras se colocó un guión y un número para cada muestra. También se evitó el uso de datos personales de los participantes en el tratamiento de los resultados. Es por ello que se previeron espacios para explicar los diferentes procesos descriptos a los sujetos de investigación y/o sus representantes legales con la intención que brinden su consentimiento libre y voluntario.

Por otra parte, se declara que no existen conflictos de interés y se adjunta en el anexo 1 el consentimiento informado de investigación.

Finalmente, el Comité de Bioética de la Facultad de Odontología de la UNLP presentó dictamen favorable para la realización de este protocolo de trabajo.

## 5- RESULTADOS:

Con base a lo mencionado en los capítulos anteriores fue evaluada la efectividad del hipoclorito de sodio y la clorhexidina sobre *S.mitis* y *S. salivarius* presentes en dispositivos de ortopedia.

El análisis de los datos se efectuó según la descripción de los datos obtenidos (anexo 2), los objetivos específicos y la hipótesis planteada. E software utilizado para el análisis de los datos fue Microsoft Excell.

### 5.1- Predominio bacteriano en placas de Petri con AMS antes de la acción de los agentes químicos:

Una vez realizado el procedimiento indicado en el ítem 4.5.b (preparación del medio de cultivo, emplacado, siembra y cultivo), se llevó a cabo la observación macroscópica de *S. mitis* y *S. salivarius* sobre placas de Petri con AMS antes de la acción del hipoclorito de sodio y de clorhexidina. En ambos casos se evidenció un notable desarrollo de colonias de estos microorganismos; sin embargo, *S. mitis* fue predominante.

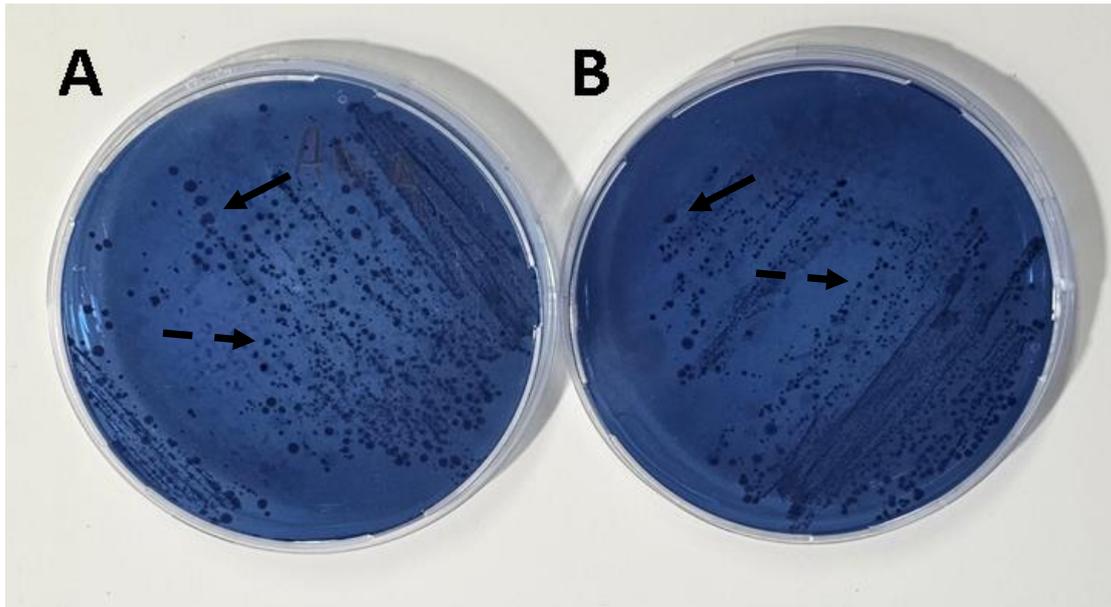


Imagen N° 18. Ejemplo del crecimiento de *S. mitis* y *S. salivarius* sobre placas de Petri en AMS antes de la acción de hipoclorito de sodio (A) y clorhexidina (B). La flecha negra continua indica la presencia de *S. salivarius*, mientras que la flecha negra discontinua muestra a *S. mitis*

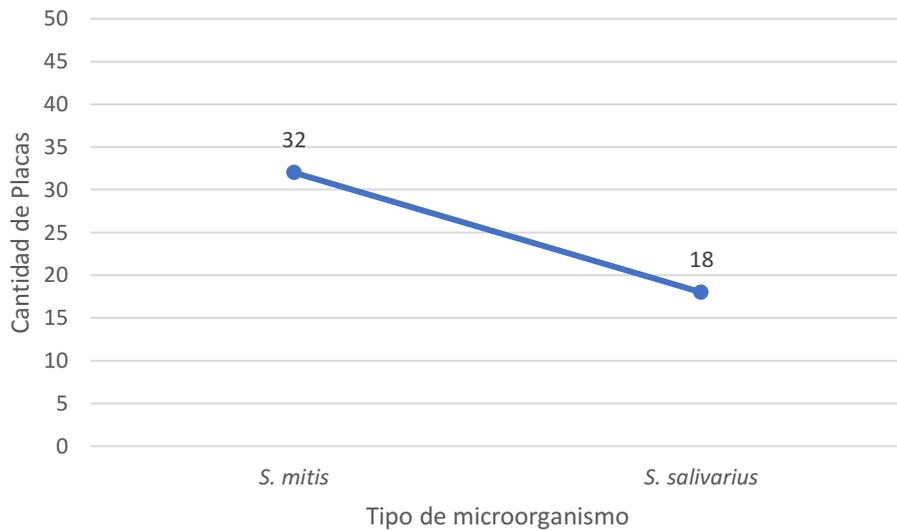


Figura 1. Marcado desarrollo de *S. mitis*.

### 5.2- Predominio bacteriano en placas de Petri con AMS luego de la acción de hipoclorito de sodio:

Al evaluar la efectividad del Hipoclorito de sodio sobre *S. mitis* y *S. salivarius* pudo observarse que, al sumergir completamente los 25 aparatos de ortopedia durante 10 minutos, realizar la toma de muestra correspondiente y sembrarla en AMS a 37° durante 48 horas no hubo desarrollo en ninguna placa por lo que puede comprobarse su acción bactericida.

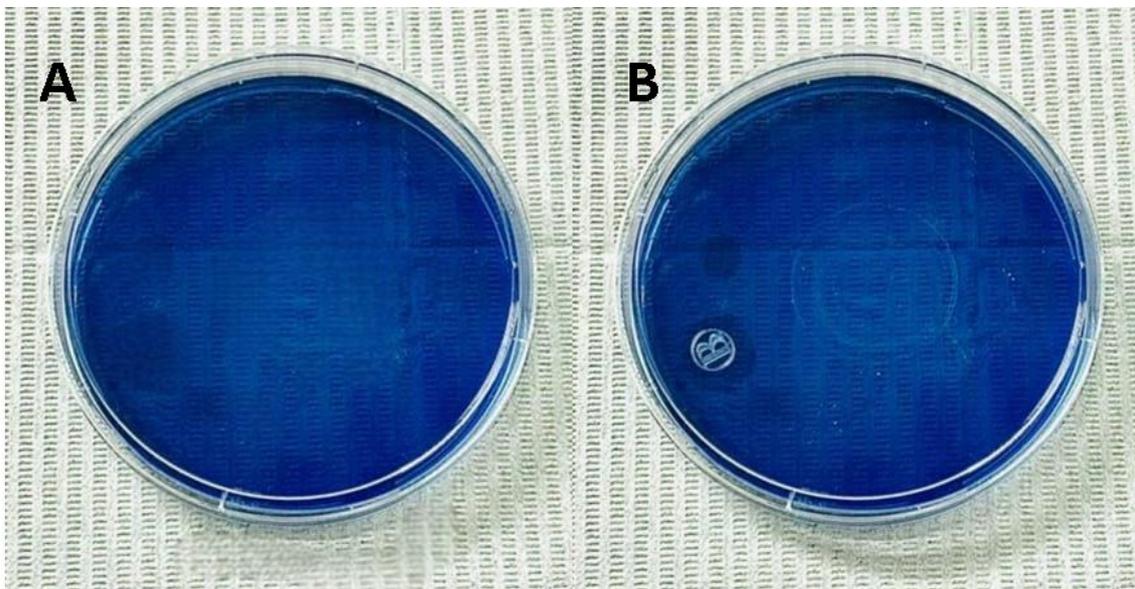


Imagen N° 19. Ejemplo de dos placas (A y B) con AMS sin desarrollo de *S. mitis* y *S. salivarius* luego de la acción de hipoclorito de sodio.

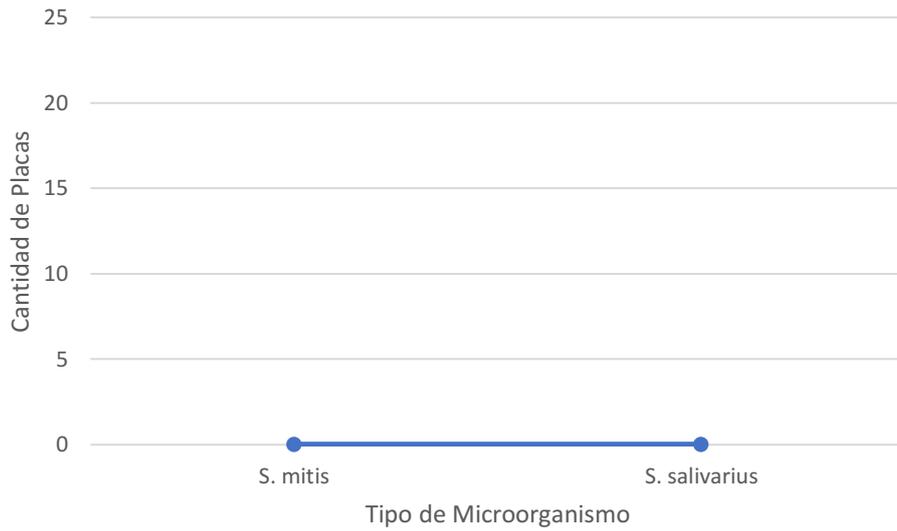


Figura 2: Placas de Petri sin crecimiento de ambas especies.

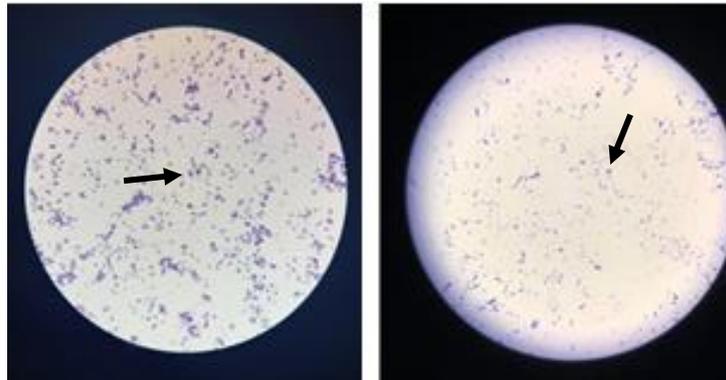


Imagen N° 20. La flecha negra continua corrobora la presencia de *S. mitis* y *S. salivarius* mediante el uso de la coloración de Gram y microscopía óptica.

### 5.3- Prevalencia de *S. mitis* y *S. salivarius* en placas de Petri con AMS luego de la acción de clorhexidina:

Durante la prueba de eficacia de clorhexidina 0.12% sobre *Streptococcus mitis* y *Streptococcus salivarius* presentes en 25 dispositivos removibles de ortodoncia pudo establecerse que: 16 placas de Petri no presentaron desarrollo bacteriano, en 4 solo pudo constatar el crecimiento de *S. mitis*, en 2 de *S. salivarius*, mientras que en 3 predominaron ambas especies.

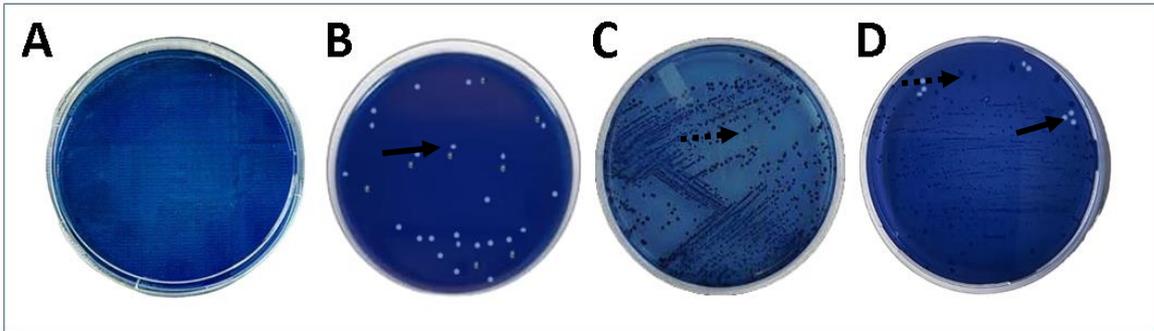


Imagen 21. Ejemplo del comportamiento de la clorhexidina sobre *Streptococcus mitis* y *Streptococcus salivarius*.  
 A- Placa sin desarrollo. B- La flecha negra continua indica la presencia de *S. salivarius*. C- La flecha negra discontinua muestra el desarrollo de *S. mitis*. D- la flecha negra continua y discontinua revela el crecimiento de ambos.

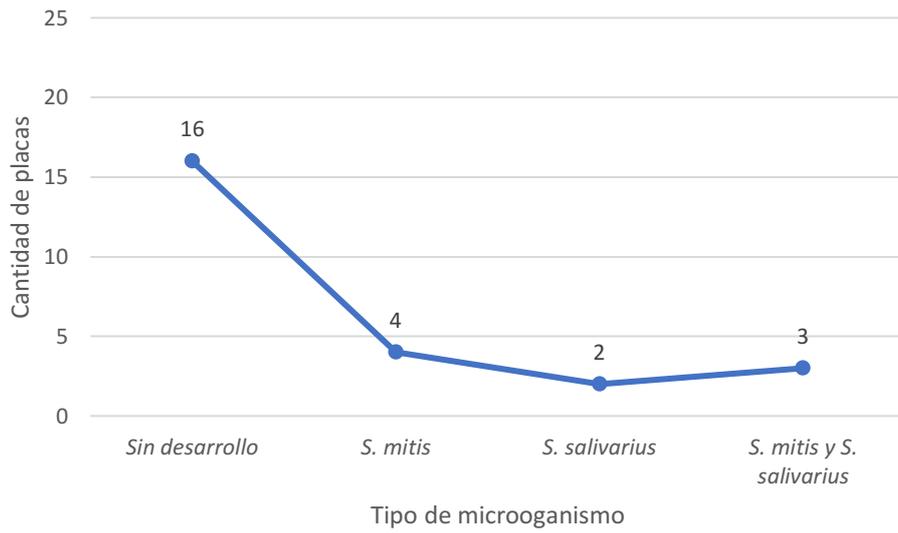


Figura 3. Comportamiento de *S. mitis* y *S. salivarius* en placas de Petri .

## 6- DISCUSIÓN:

Para evaluar la efectividad del Hipoclorito de sodio y la clorhexidina sobre *S. mitis* y *S. salivarius* presentes en dispositivos de ortopedia fueron realizadas 100 tomas de muestra. (50 antes de someterlas a la acción de los desinfectantes y 50 luego de estar en contacto con los agentes químicos).

En lo referente al hipoclorito de sodio pudo comprobarse su efecto bactericida al no observar desarrollo sobre la superficie de las placas de Petri a los 10 minutos de contacto con los aparatos removibles. Este dato es coincidente con un estudio realizado por Cornejo Lecaros, M en el año 2017 donde describe el efecto de dos soluciones limpiadoras de prótesis totales en el control de placa bacteriana concluyendo que el hipoclorito de sodio es más efectivo como agente limpiador ya que remueve bacterias y hongos a partir de los 5 minutos <sup>(30)</sup>.

Calderón Alemán, D en un estudio experimental in vitro donde utilizó 72 muestras de resina acrílica de termocurado con medidas de 15mm x 15 mm x 3mm de espesor, estableció el nivel bactericida del hipoclorito de sodio eliminando incluso *Candida albicans* <sup>(31)</sup>.

Carballo Torres, P y Orellana, A publicaron en el año 2013 un artículo comparando al hipoclorito de sodio al 2% con otros 2 desinfectantes. Describen la efectividad de este agente químico desde los 5 minutos de contacto con el acrílico <sup>(32)</sup>.

Abarca Pazmiño, A.B et al. Citan el efecto de la Clorhexidina al 0,12% y ácido acético al 5% como desinfectantes de cepillos dentales, mencionado la aparición de *Streptococcus viridans* y la disminución o eliminación completa de UFC/ml luego de la exposición durante 5 minutos de contacto <sup>(33)</sup>.

Otro artículo de investigación redactado por Lizbeth Acero Condori sobre la Acción antibacteriana de colutorios de uso ortodóntico sobre Streptococcus orales, expone que la clorhexidina es un agente químico ampliamente utilizado para la prevención de la formación de biofilm dental y elimina agentes patógenos como el Streptococcus spp. 0.12%. También refiere efectos secundarios como un sabor desagradable que genera sequedad y sensación de quemazón en la cavidad bucal, así como, una decoloración que conlleva hacia la insatisfacción del paciente <sup>(34)</sup>.

## 7- CONCLUSIONES:

- Las pautas experimentales en un ensayo deben establecerse considerando las condiciones reales.
- Al analizar un desinfectante deben tenerse en cuenta las especificaciones del fabricante.
- El NaClO al 2% ejerce acción bactericida sobre *S. mitis* y *S. salivarius* a los 10 minutos de contacto.
- La clorhexidina al 0.12% durante 10 minutos mostró en algunos casos solo la reducción de colonias sobre las placas de Petri y en otros la eliminación completa de los Streptococcus incluidos en este estudio. Es decir la clorhexidina presentó menor acción en comparación con el hipoclorito de sodio.
- Conocer el mejor agente químico en cada instancia particular; la acción microbicida; el tiempo de exposición; la preparación; las ventajas y desventajas del producto optimizan los resultados esperados.

## ANEXO 1:

### Consentimiento informado.

Nombre del trabajo de investigación: Evaluación de la efectividad del Hipoclorito de sodio y la clorhexidina sobre *S. mitis* y *S. salivarius* presentes en dispositivos de ortopedia.

Datos del equipo: directora: Dra. Ivana Perdomo Sturniolo, Coodirector: Dr. Ezequiel Escudero, Alumno de posgrado: Valentina Carballeira mail: [valentinacraballeira@gmail.com](mailto:valentinacraballeira@gmail.com)

Yo (nombre del participante o su representante legal)  
.....

..... DNI..... Presto mi voluntad de manera desinteresada para que la Od Valentina Carballeira tome una muestra biológica de mi dispositivo de ortopedia en el marco de su trabajo de investigación “Evaluación de la efectividad del hipoclorito de sodio y la clorhexidina sobre *S. mitis* y *S. salivarius* presentes en dispositivos de ortopedia”.

Si el participante experimentara algún evento odontológico adverso vinculado con el presente trabajo de investigación será atendido en el marco del Hospital Odontológico Universitario.

Comprendo que mientras se realice el estudio puedo decidir abandonarlo, y solicitar se destruya la muestra biológica obtenida de mi cavidad bucal. Sin embargo, una vez que la muestra sea procesada, analizada, e incluida en los informes ya no será posible eliminar los resultados del trabajo de investigación. No obstante, se me explicó que no se revelará ningún dato personal, y que toda la información clínica y personal será resguardada solamente con fines académicos y científicos

Firma:

Aclaración:

Dni:



## 8- BIBLIOGRAFÍA:

- 1- Mora PCC, Álvarez MI, Blanco HA, et al. Desarrollo de la ortodoncia en la provincia Cienfuegos. *Medisur*.2018;16(2):309-321.
- 2- Quintero AM, García C. Control de la higiene oral en los pacientes con ortodoncia. *Rev.Nac. Odontol*.2013diciembre; 9(edición especial):37-45.
- 3- Aguilera Jiménez, J. E. (2016). Evaluación y métodos de higiene de los aparatos removibles de ortopedia en pacientes pediátricos (Tesis de pregrado). Universidad de las Américas, Quito.
- 4- Villon Acuña LF Tesis [Internet]. 2021-09[citadoel29deOctubrede2023]. Recuperado a partir de:<http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/56222>.
- 5- Sardu y Bermúdez Lázaro, González Díaz María Elena. La biopelícula: una nueva concepción de la placa dentobacteriana .*Medicentro Electrónica*[Internet].2016 Sep [citado 2023 Oct 29]20(3):167 175. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1029-es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-es).
- 6- Pontarolo C, Bozza FL, Galli FG, Bontá H, Molgatini SL, Caride F, Gliosca LA. Clinical and microbiological assessment in a subpopulation of young Argentine patients with severe periodontitis. *Acta Odontol Latinoam*. 2023 Apr 29;36(1):24-33. doi:10.54589/aol.36/1/24.PMID: 37315307; PMCID: PMC10283382.
- 7- Nazar C Julio. Biofilms bacterianos. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello* [Internet]2007. [citado2023Oct29]; 67(1):161-172. Disponible en: <http://www.scielo.cl/scielo.php>
- 8- Mitchell, J. "Streptococcus mitis: walking the line between commensalism and pathogenesis."*Molecularoralmicrobiology*26.2(2011): 89-98.
- 9- Delorme, Christine, et al. "Genomics of Streptococcus salivarius, a major human commensal." *Infection, Genetics and Evolution*33(2015): 381-392.
- 10- Diomedi Alexis y Col. Antisépticos y desinfectantes: Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Asociadas a la Atención de Salud, Sociedad Chilena de Infectología. *Rev. Chil .infectol*. [Internet]. 2017 Abr [citado 2023 Oct 29] ; 34( 2 ): 156-174.Disponible en: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci>
- 11- Escudero Giacchella, Ezequiel; Butler, Teresa Adela; León Peláez, Ángela María; Moretti,Ana; CorreaFranco, Mariana. Beneficios de los desinfectantes en la práctica odontológica. 2015. Oai :sedici.unlp.edu.ar:10915/115339.

- 12- Guevara Lizarazu D. Efecto De Diferentes Concentraciones De Hipoclorito De Sodio Como Irrigante Endodóntico Sobre Propiedades Físicas De La Dentina. Una Revisión De La Literatura. Tesis de la especialidad en Endodoncia. 2014; 6:24-6.
- 13- Zapparoli PCS D, Cruz-Filho A. Effect of sodium hypochlorite and EDTA Irrigation, Individually and in alternation, on dentin microhardness at the furcation area of mandibular molars. *Brazilian Dental Journal*. 2012; 23(6):654-8.
- 14- Otter J, Yezli S, French L. The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. *Infect Control Hosp. Epidemiol.* 2011; 32(7): 687-99
- 15- Nohayati, L, Hany Mohamed AA. The antibacterial activity of sodium hypochlorite and clorehexidine against *Enterococcus faecalis*: a review of agar diffusion and direct contact methods. *J Conserv Dent*. 2013, 16(1):9-16.
- 16- Calbo E, Freixas N, Xercavins M, Riera C, Monistrol NO. Foodborne nosocomial outbreak of SHV1 and CTX-M-15 producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology and control. *Clin. Infect. Dis.* 2011; 52:743-49.
- 17- Nohayati L, Han y Mohamed A. The antibacterial activity of sodium hypochlorite and clorehexidine against *Enterococcus faecalis*: a review of agar diffusion and direct contact methods. *J Conserv Dent*. 2013, 16(1):9-16.
- 18- Haapasalo M. Irrigation in Endodontics. Biblioteca Nacional de Medicina de los EE.UU. Institutos Nacionales de Salud. PubMed. 2014; (6): 299-303.
- 19- Poggio C, Dagna A, Arciola CR, Visai L. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite based solution. *The International Journal of artificial organs*. 2010; 33(9):654-9.
- 20- Utria-Hoyos J, Pérez-Pérez E, Rebolledo-Cobos M, Vargas-Barreto A. Características de las soluciones de clorhexidina al 2% y al 0,2% en odontología: una revisión. *Duazary*. 2018 mayo; 15(2): 181-194. DOI: <http://dx.doi.org/10.21676/2389783X.2103>.
- 21- Cherian B, Gehlot PM, Manjunath MK. Comparación de la eficacia antimicrobiana de Octenidine Dihydrochloride y clorhexidina con y sin irrigación ultrasónica pasiva - Un estudio *in vitro*. *J Clin Res*. 2016 Jun; 10(6):1-7
- 22- Trufello AM. Las concentraciones subclínicas de clorhexidina inhibieron la actividad de la gelatinasa en la dentina *in vitro*. *J Dent*. 2014 Mar; 59(1):81-6.
- 23- Bidar M. El efecto de diferentes concentraciones de clorhexidina gluconato en la compresión fuerza de mineral trióxido agregado. *J Dent Res*. 2015; 9(1):1-5.
- 24- Bidar M. El efecto de diferentes concentraciones y usos de clorhexidina gluconato en la compresión fuerza de mineral trióxido agregado. *J Dent Res*. 2015; 9(1):1-5.

- 25- McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and Disinfectants: activity, action and resistance. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 147-79.
- 26- Orozco Orozco N. Eficacia de la eliminación de bacterias con agentes químicos utilizados en la desinfección de dispositivos protéticos. Imbiomed. Vol 11. Año 2014. Pág. 58/64.
- 27- Torres P. Comparación in vitro de la eficacia de la clorhexidina al 0.12% y pastillas efervescentes sobre la reducción de Candida albicans en prótesis removibles.
- 28- Pacurucu Pinos Paola. Métodos de diagnóstico microbiológico desde el punto de vista odontológico. Revista Científica UOD: Universidad Odontológica Dominicana. Año 2021. Vol 9 N° 1. ISSN: 2409-5400.
- 29- Mühlhauser M, Rivas L. Laboratorio de microbiología: conocimientos básicos para un clínico. Rev. Med. Clin. Condes [Internet]. 2014 [citado 24 Nov 2020];25(3):559- 579. Disponible en: <https://doaj.org/article/826d1acc94af442aae43d9106190a83a>.
- 30- Cornejo Lecaros Mercedes lab; Juárez Vizcarra1 César Fernando a. Revista Ciencia y Tecnología Para el Desarrollo-UJCM 2017; 3(5):6-14. Efecto de dos soluciones limpiadoras de prótesis totales en el control de placa bacteriana.
- 31- Calderón Alemán Doris Eliana. Efficacy of three disinfecting agents for acrylic prostheses colonized by Candida albicans: an in vitro study. Revista AVFT Volumen 41, número 10, 2022 ISSN 2610-7988.
- 32- Carballo torres paulina , Orellana A. Comparacion in vitro de la eficacia del hipoclorito de sodio al 2 % y otros dos desinfectantes sobre la reducción de candida en dispositivos acrílicos removibles. 2013 Universidad de Valparaiso. Chile. <http://repositoriobibliotecas.uv.cl/handle/uvscl/9683>
- 33- Abarca Pazmiño, A.B et al. Efecto de la Clorhexidina al 0,12% y ácido acético al 5% como desinfectantes de cepillos dentales. Revista Eugenio Espejo ISSN: 1390-7581 ISSN: 2661-6742 revistaeugenioespejo@unach.edu.ec Universidad Nacional de Chimborazo Ecuador. DOI: <https://doi.org/10.37135/ee.04.08.08> Redalyc: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=572863747018>.
- 34- Acero Condori Lizbeth. Acción antibacteriana de colutorios de uso ortodóntico sobre Streptococcus orales. Rev. Salud vol.5 no.14 La Paz ago. 2022 Epub 30-Ago-2022. ISSN 2664-3243.

Bibliografía de consulta:

- 35- Basualdo JA, Coto C, de Torres R. Microbiología Biomédica. 3° ed. Buenos Aires: Editorial Atlante, 2021.

- 36- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología Médica. 9° ed. Barcelona. Elsevier, 2021.
- 37- Mandell GL, Dolin R, Blaser MJ. Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica. 9° ed, 2020, Saunders.
- 38- Tortora GJ, Case CL, Funke Berdell R. Introducción a la Microbiología. 12° ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2017.
- 39- Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC. Koneman Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas. 7ta ed. México DF: Editorial Wolters-Kluwer, 2017.
- 40- Carroll KC, Morse SA, Mietzner T, Miller S. Microbiología Médica. Jawetz, Melnick y Adelberg. 27° ed. México DF. Mcgraw-Hill/Interamericana Editores, 2016.
- 41- Microbiología Estomatológica. Fundamentos Y Guía Práctica - Negroni M. - 2ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana; 2009.
- 42- Microbiología Oral -.Liebana Ureña, J.- 2ª ed. España - McGraw-Hill Interamericana - 2002.