



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO CUEPI
ESPECIALIDAD DE ENDODONCIA

TESIS

“DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A SOLUCIONES DESINFECTANTES, EN BACTERIAS AISLADAS DE CONOS DE GUTAPERCHA”

PRESENTA:

C.D. YURIKO GÓMEZ SILVA

Para obtener el grado de: **ESPECIALISTA EN ENDODONCIA**

ASESORES:

C.D.E.E. Adriana Lucía Arenas Pérez
M.C. Héctor Ruíz Reyes

ASESORES EXTERNOS:

Q.F.B. Ricardo Giovanni Soria Herrera
Q.F.B. Karla Gabriela Domínguez González
C.D.E.E. Diana Ened Rodríguez Zaragoza

MORELIA MICHOACÁN

Diciembre

2012



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO CUEPI
ESPECIALIDAD DE ENDODONCIA



TESIS

“DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A SOLUCIONES DESINFECTANTES, EN BACTERIAS AISLADAS DE CONOS DE GUTAPERCHA”

PRESENTA:

C.D. YURIKO GÓMEZ SILVA

Para obtener el grado de: **ESPECIALISTA EN ENDODONCIA**

ASESORES:

C.D.E.E. Adriana Lucía Arenas Pérez

M.C. Héctor Ruíz Reyes

ASESORES EXTERNOS:

Q.F.B. Ricardo Giovanni Soria Herrera

Q.F.B. Karla Gabriela Domínguez González

C.D.E.E. Diana Ened Rodríguez Zaragoza

MORELIA MICHOACÁN

Diciembre

2012

AGRADECIMIENTOS:

A Dios, por todos los días que me ha permitido existir, por cada una de las enseñanzas y lecciones de vida a las que me enfrenta sin vacilación. Porque sabe hacerme volver a la senda con mano dura y sabe hacerme permanecer en ella con amor.

A mis padres por haberme traído al mundo, por sus cuidados, por los valores que me inculcaron y los que me inculcan día con día, por su apoyo incondicional, por su cariño, por ese respeto profundo que siento por ellos y ellos por mí.

A mis hermanas que actúan como el eslabón entre el mundo y yo cada vez que pienso en desistir de mis metas o estoy demasiado cansada de seguir creyendo en las personas.

A todos mis profesores, desde aquellas maestras de preescolar que se han ido a un sitio más tranquilo, hasta mis estimados profesores del posgrado... He tomado de ustedes las bases de mis cimientos para formar mis propios conocimientos, he forjado con su vocación y devoción en su trabajo el hambre del saber, de querer superarme y conocer aún más de todo cuanto me rodea, por esta hambre, por este saber se los agradezco tremendamente.

A mi asesora y maestra C.D.E.E. Adriana Lucia Arenas Pérez, muchas gracias maestra por el tiempo que me ha dedicado a lo largo de este proceso, por sus ánimos y preocupación, por su auxilio no solo en este trabajo de tesis, sino también por transmitirme y compartirme de sus conocimientos clínicos con paciencia y dedicación.

A mis maestros en ciencia M.C. Héctor Ruíz Reyes y C.D.E.E. Diana Ened Rodríguez Zaragoza, quienes han sido de los mayores impulsores para que este trabajo culminara el día de hoy. Gracias por las pláticas no solo de ciencia, estadística y odontología, sino por aquellas pláticas de superación, de trazarse metas más altas, de alimentar no solo a la mente sino también al espíritu que habita en ella. Por enseñarme que para volar primero se deben tener alas.

A mi maestro C.D.E.E. Martín Alberto Loeza Ramírez por esas ocasiones en que me ha llamado la atención respecto a mi trabajo en clínica, por transmitirme no solo una lección en clase, sino por ayudarme a adquirir las herramientas necesarias para defenderme en la

práctica y ejercicio de mi profesión. Aprender no siempre es sencillo, pero lo que se aprende con trabajo y empeño difícilmente se nos olvida, de igual manera son los maestros que justamente exigen más a sus alumnos, los que mejor los preparan para la vida lejos de la Facultad. Maestro muchas gracias por todo.

A mi maestro C.D.E.E. Fernando Fernández Treviño, por su calidez humana, por su amor a Dios y por las palabras de aliento que ha tenido el tacto de brindarme cuando llegué a sentir desesperación. Por cada indicación y recomendación, por contarnos su experiencia propia como especialista en endodoncia, y por aquella lección que nos transmitió en clase: que es cuando uno se siente más confiado cuando la misma endodoncia nos devuelve los pies a la Tierra... que debemos ser humildes y no olvidar que solo somos humanos.

Al maestro C.D.E.E. Luis Pantoja Villa, quién fuera mi primer asesor de tesis. Mil gracias doctor con usted iniciamos pensando en un tema de tesis, me enseñó como aterrizar las ideas respecto a si el tema seleccionado era viable o no, a tomar y resumir lo más importante de un artículo científico y tener paciencia para volver y resumir una o mil veces más, quizás el tema sufrió múltiples cambios en el proceso y al final se enfocó por otro derrotero, pero siempre agradeceré la ayuda, la comprensión y el apoyo que me brindó durante el tiempo que nos tocó trabajar juntos.

Muchas gracias maestros porque cuando el alumno se encuentra lejos de su hogar y pasa la mayor parte de su tiempo en una escuela, ustedes muchas veces se convierten sin querer, en padres, madres o hermanos sustitutos.

A mis coasesores Q.F.B. Ricardo Jiovanni Soria Herrera y Q.F.B. Karla Gabriela Domínguez González, responsables del cepario-colección y personal docente de la facultad de QFB-UMSNH, gracias por la colaboración que me han brindado durante el desarrollo de la fase experimental de este trabajo de titulación, sin su ayuda nada de esto sería posible; gracias también por enseñarme desde esterilizar un asa de cultivo, estriar una placa, preparar un caldo de cultivo, hasta tomarle amor a esos minúsculos microorganismos. Muchas gracias este también es su trabajo.

A mis amigos, hermanos postizos y miembros de mi manada: Mónica Lucía Gutiérrez G, Valentín Mariscal Orozco y David Campos, por cada ocasión en que tomaron parte de su día y de su tiempo para escucharme y brindarme ánimos e impulsos para seguir, siempre los tengo muy cerca de mi cabeza como Pinocho a Pepe Grillo.

A mis amigos, carnales, camaradas y compañeros: Arely, Bertha, Alejandro, Day, Dianita, Jorge, Beny, Marco y Amado... Por cada rato, tarde y lugar dentro y fuera de la escuela, por tener el privilegio de decir que son mis amigos, por la excelente calidad de humanos que son, porque los quiero y porque independientemente que el posgrado ha concluido para todos nosotros, espero seguir teniendo la oportunidad de conocerlos en este camino de vida.

Finalmente agradezco a todos los trabajadores de esta institución, especialmente a Alma, Martita 1 y 2, Jazz, Mayra, Betty, Chilo, Don Andreu, Adriana. Mil gracias por toda su ayuda y su buen trato, siempre he de recordarlos con cariño. Me llevo conmigo grandes amigos entre ustedes.

DEDICATORIA:

A las personas que cuidaron de mí y me guiaron antes y después de mi nacimiento, a quienes han entregado su vida, su trabajo y su amor para verme crecer y transformarme de una niña frágil en una mujer fuerte, libre, independiente y dueña de sí misma... A mis padres a quienes amo con esa energía que va más allá del cuerpo. A Dios que llena cada célula y cada espacio de mi alma.

En el transcurso de tiempo que le dediqué a este trabajo me di cuenta que no solo adquirimos conocimientos científicos al estudiar.

En este año aparte de poner al rojo vivo el acero de un asa de cultivo, también he puesto al rojo vivo el acero de mi temple y la armadura de mi alma... Algo ha surgido de eso... he vuelto a nacer, para decirlo con otras palabras me gustaría recordar a un hombre que buscaba las respuestas en sí mismo:

“Para enseñar a los demás, primero has de hacer tú algo muy duro: has de enderezarte a ti mismo”

“Bienaventurados aquellos que dirigen sus mejores esfuerzos a disciplinarse y a lograr el dominio de sí mismos”

(Buda).

ÍNDICE GENERAL

	Página
AGRADECIMIENTOS-----	3
DEDICATORIA-----	6
RESÚMEN-----	10
1. Introducción -----	12
2. Marco teórico -----	15
2.1 <u>Antecedentes generales</u> -----	15
2.1.1 Gutapercha-----	15
2.1.2 Soluciones químicas-----	18
2.1.2.1 Hipoclorito de Sodio (NaOCl)-----	18
2.1.2.2 Clorhexidina (CHX)-----	21
2.1.2.3 Glutaraldehído-----	23
2.1.2.4 Alcohol Etílico-----	27
2.2 <u>Antecedentes específicos</u> -----	29
3. Planteamiento del problema -----	43
3.1 Pregunta de Investigación-----	46
4. Justificación -----	47
5. Hipótesis -----	49
5.1 Hipótesis de trabajo-----	49
5.2 Hipótesis nula-----	49
6. Objetivos -----	50
6.1 Objetivo general-----	50
6.2 Objetivos específicos-----	50
7. Material y métodos -----	51
7.1 Definición del universo de estudio-----	51
7.2 Criterios de elegibilidad-----	51
7.2.1 Criterios de inclusión-----	51
7.2.2 Criterios de no inclusión-----	51

7.3 Clasificación del estudio-----	52
7.4 Metodología -----	52
7.5 Análisis bioestadístico-----	70
8. Resultados-----	71
9. Discusión-----	81
10. Conclusiones-----	85
11. Recomendaciones-----	86
12. Bibliografía-----	87
13. Anexos-----	95

RESÚMEN:

Introducción

En el tratamiento endodóntico, se implementan diversos métodos de asepsia, antisepsia y desinfección para evitar que los microorganismos patógenos penetren y se establezcan en los conductos radiculares, además, se busca eliminar la mayor cantidad de bacterias que ya están presentes en ellos. Sin embargo, se presta poca atención a la desinfección de los conos de gutapercha que serán utilizados durante la obturación. Varios estudios han señalado que estos conos pierden su esterilidad una vez que se ha roto su selle hermético y por lo tanto, deber ser sanitizados. El endodoncista, ocasionalmente se enfrenta a casos de periodontitis apical crónica, que pareciera no tener un diagnóstico obvio; algunos investigadores han sugerido que este tipo de lesiones pudieran ser consecuencia de una obturación con conos de gutapercha contaminados.

Objetivo

El objetivo del presente estudio consistió en determinar la sensibilidad de cepas bacterianas aisladas de conos de gutapercha a cinco soluciones químicas: Hipoclorito de sodio (NaOCl) 5.25%, NaOCl 2.5%, clorhexidina (CHX) 2%, glutaraldehído 2%, alcohol etílico 70%.

Material y métodos

40 conos de gutapercha de un empaque nuevo se expusieron por 30 min al medio ambiente de una clínica endodóntica, se colocaron en tubos de ensayo con caldo BHI (infusión cerebro corazón), se incubaron a 37°C por 24h, se tomaron muestras de los tubos, se cultivaron en placas gelosa sangre de borrego y gelosa sal y manitol, se realizaron pruebas bioquímicas y tinciones de Gram para identificar el género y especie de las bacterias aisladas, se aislaron cepas puras cultivándose en placas Mueller Hinton a 37°C por 24h, se tomaron 10µL de cada una de las soluciones desinfectantes y se gotearon sobre las cepas, analizándose 24h después los halos de inhibición obtenidos. Se realizó también una prueba en medio de caldo soya tripticaseina para verificar la producción de biofilm. Los valores obtenidos fueron calculados mediante la prueba T Student a intervalos de confianza del 95%, significancia 0.05. Los datos se analizaron con la hoja de cálculo Excel y se procesaron con el software SPSS 17.0.

Resultados

Se aislaron de los conos de gutapercha las siguientes cepas bacterianas: *Staphilococcus epidermidis*, *Bacillus* spp, *Kocuria risofila*, *Staphilococcus xylosus*, *Staphilococcus* spp, *Staphilococcus sciuri* Sb. *Rodentium*, *Streptococcus* spp, *Streptococcus pneumoniae*, *Kocuria palustris*, *Kocuria kristinae*.

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

Durante la comparación estadística entre los 9 grupos (cepas bacterianas) respecto a la efectividad de las 5 soluciones (halo de inhibición), se observó que no existía diferencia estadísticamente significativa entre NaOCl 5.25% y CHX 2% (P=0.682).

Conclusiones

Varias de las especies bacterianas aisladas tuvieron la capacidad de formar biofilm (*Staphilococcus xylosus*, *Staphilococcus sciuri* Sb. *Rodentium*, *Kocuria palustris*, *Staphilococcus* spp).

Aunque no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre hipoclorito 5.25% y clorhexidina 2% (P=0.682), se observó que los halos de inhibición creados por el hipoclorito tenían bordes irregulares concluyéndose que los microorganismos presentaban una resistencia intermedia a esta solución.

1. INTRODUCCIÓN:

Debido a que las bacterias y sus productos, están involucrados en el inicio y perpetuación de la periodontitis apical; el control, erradicación y prevención de las infecciones radiculares, son parámetros importantes del tratamiento de conductos (Takehashi y cols. 1965). Dentro de la prevención, se incluye el análisis e implementación de estrictas medidas asépticas, para evitar que los microorganismos patógenos penetren y se establezcan en el sistema de conductos radiculares, durante el tratamiento endodóntico (Siqueira y cols. 1998). Por lo tanto, por medio de la instrumentación e irrigación química, uno de los objetivos principales de la terapia endodóntica es reducir, o en lo posible, eliminar, a los microorganismos que ya están presentes dentro del conducto radicular, el clínico debe también prevenir que estos microorganismos patógenos no sean transportados al interior del conducto durante la instrumentación y conformación mediante el uso de instrumentos inapropiadamente esterilizados y/o materiales de obturación contaminados, para lo cual, se han establecido diversas normas de asepsia y antisepsia, con el fin de impedir que el instrumental y material de obturación se contaminen y actúen como una vía de pasaje para los agentes patógenos al sistema de conductos (Attin y cols. 2001). Lo ideal, es que todos los microorganismos sean erradicados previamente a la obturación, sin embargo, las bacterias pueden persistir dentro de los conductos a pesar del desbridamiento y desinfección implementados durante la limpieza y conformación de los mismos (Shur y cols. 2003). Por estos y otros factores, Grossman (1940) planteo que el material de obturación ideal, debía ser bacteriostático. Esta propiedad aseguraría que los microorganismos que permanezcan en el sistema de conductos queden aislados e imposibilitados de continuar con su reproducción.

Los conos de gutapercha son ampliamente utilizados como material de obturación (Stabholz 1987), y hasta la fecha, aún no se ha desarrollado ningún material que los sustituya con estos fines (Tsukada y cols. 2004). Estos conos fueron introducidos por Bowman en el año 1867, y son utilizados hasta la actualidad debido a las propiedades físicas y químicas que presentan. La composición química de estos conos, ha cambiado a lo largo del tiempo; existiendo también variaciones de sus componentes de acuerdo a la marca comercial con el afán de mejorar sus propiedades: Yodo, Iones de Calcio, Clorhexidina

(CHX), etc. En general, los conos de gutapercha convencionales están constituidos por: Oxido de Zinc (66%), Sulfato de Bario (11%), Resinas-Ceras (3%), y Gutapercha (20%) (Avila Galia 2000). Las propiedades bacteriostáticas del cono de gutapercha, son atribuidas al Oxido de Zinc, por lo tanto, no debería presentarse crecimiento bacteriano sobre la superficie de los conos de gutapercha. Aún así, en la práctica clínica, el endodoncista se enfrenta ocasionalmente con infecciones que ocurren posteriormente a la obturación del espacio del conducto radicular.

Doolittle y cols. 1975 demostraron, que los conos de gutapercha se encuentran estériles dentro del paquete sellado para su comercialización. Sin embargo, Montgomery (1971), reportó, que el 8% de los conos que extrajo directamente de un empaque nuevo, y que fueron sometidos al análisis de su investigación, mostraban crecimiento bacteriano (especies de *Bacilos*); similarmente, Gomes y cols. (2005). reportaron, que el 5.5% de los conos extraídos inmediatamente tras la apertura del empaque, estaban contaminados, y que él microorganismo que se encontró con mayor frecuencia, fue el *Staphilococcus epidermidis*.

Es importante señalar además, que luego de la colonización inicial, son sintetizadas grandes cantidades de polisacáridos extracelulares o limo, formando un biofilm protector, alrededor de las colonias (Gill y cols. 2005). El biofilm formado en el área extrarradicular del cono se relaciona con la patología periapical refractaria, por lo tanto, en casos de sobreobtención, los conos de gutapercha pueden desempeñar un rol importante en la iniciación de infecciones que muestran lesiones periapicales (Noiri y cols. 2002; Takemura y cols. 2004). Por lo anteriormente señalado, puede deducirse, que luego de romper el selle hermético, y quedar expuestos al medio ambiente de la clínica, los conos de gutapercha serán progresivamente colonizados por múltiples microorganismos patógenos.

Nan-Shim y cols. (2007). realizaron una investigación, con el objeto de identificar las especies microbianas que tenían la capacidad de contaminar las puntas de gutapercha expuestas al medio ambiente de la clínica endodóntica, encontrando que el 19.4% (N = 150) de los conos expuestos, mostraban crecimiento bacteriano, y que el total de dichas células bacterianas eran vegetativas (*Staphilococcus spp*), identificándose que los

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

Staphylococcus spp y *Staphylococcus epidermidis* eran los que prevalecían en un 62.5%, seguidos por *Staphylococcus caprae* (25%), *Staphylococcus capitis* (9.4%) y *Staphylococcus xylosus* (3.1%). Por lo tanto, es necesario que se realice una desinfección previa de los conos de gutapercha, antes de que estos sean empleados como material de obturación.

Debido a que este material es termolábil no puede ser esterilizado bajo condiciones de calor como son el autoclave o el horno de calor seco, por ello se han utilizado diversas sustancias químicas como: Hipoclorito de Sodio (NaOCl), Clorhexidina (CHX), Glutaraldehído, Alcohol Etilico (etanol), Iodopovidona, Gas Formaldehído, etc., en el intento de mantener la cadena aséptica y evitar una posible fuente de contaminación exógena.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio de investigación está enfocado en determinar la sensibilidad de cepas bacterianas aisladas de los conos de gutapercha a cinco soluciones químicas: NaOCl 5.25%, NaOCl 2.5%, CHX 2%, Glutaraldehído 2%, y Alcohol etílico (etanol) 70%.

2. MARCO TEÓRICO:

2.1 ANTECEDENTES GENERALES.

2.1.1 Gutapercha:

Fue introducida al área endodóntica por Bowman en 1867, es un producto de secreción vegetal que se emplea para la fabricación de los conos de gutapercha que se utilizan como material de relleno de los conductos radiculares en el tratamiento endodóntico.

Su nombre deriva de dos palabras malayas, “*getah*” que significa goma y “*pertja*” que significa árbol. Originalmente la gutapercha proviene de la resina que exudan una serie de árboles de Asia, dentro de los cuales se mencionan los del género *Ulmus* familia *eucomiaceae* cuyo nombre común es “árbol de la gutapercha”, el cual produce una goma, o gutapercha, en muy poca cantidad para ser comercializado (Toledo Vásquez 2006). Otros árboles que se mencionan, son los originarios de Malasia, de los géneros *Payena* o *palaquium*. Se menciona también al *Isonandra guta*, *Palauium oblongifolium*, *P. bornéense* y *P. treubii* de la familia de las *sapotáceas*. Actualmente el producto que se ofrece a la profesión dental puede no ser la verdadera gutapercha. Los fabricantes, admiten discretamente, que desde hace algún tiempo utilizan para fines comerciales la Balata, que es el jugo seco de varios árboles, entre los cuales están el *Manilkarabindentata* de Brasil, el *Mimusops balata* y *Mimusopshuberi* de la región de Sumatra y Filipinas. Desde el punto de vista químico y físico, la balata y la gutapercha son idénticas. En cualquier caso este punto es irrelevante, ya que ambos productos pueden denominarse como gutapercha (Mondragón y cols. 2002).

La gutapercha es un isómero “trans” de polisopreno. El estado natural de la gutapercha es la forma Alfa que si es sometida a su temperatura de fusión (65°C) cambiará a una gutapercha amorfa que al enfriarse adoptará una nueva forma cristalina llamada gutapercha Beta (es la que se expende en el comercio dental), con el enfriamiento lento de la gutapercha amorfa, se produce la recristalización a su forma Alfa (temperatura de fusión 56°C) (Goldberg 1982).

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

La gutapercha es un hidrocarburo insaturado 2-metil-1-3 butadieno, presenta dobles enlaces alternados, el grupo metilo del segundo átomo de C, y el H del tercero, pueden saturarse en diferentes formas, las isomerías.

Tabla 1. Componentes químicos de la gutapercha.

ELEMENTOS ORGÁNICOS	ELEMENTOS INORGÁNICOS
1. Gutapercha: 18-22% (Matriz, si es menor el % hay fragilidad, y si es mayor el %, mejor adaptación a las paredes del conducto).	7. Compuestos metálicos: 1-18% Sulfato de Bario, Estroncio, Magnesio (Para obtener radioopacidad).
2. Ceras: 1-4%	
3. Resinas: 1-4%	9. Óxido de Zinc, Silicato de Zinc 59-76% (Como relleno y para obtener rigidez, si disminuye el % es más frágil, si aumenta el % es más débil).
4. Plastificantes	10. Otros: Carbonato de Calcio, Fósforo, Aluminio, Cloro (Para dar plasticidad).
5. Colorantes: Aceite de clavo	
6. Antioxidantes: Ácido tánico 1-4% (Junto con los colorantes modifican la elasticidad).	

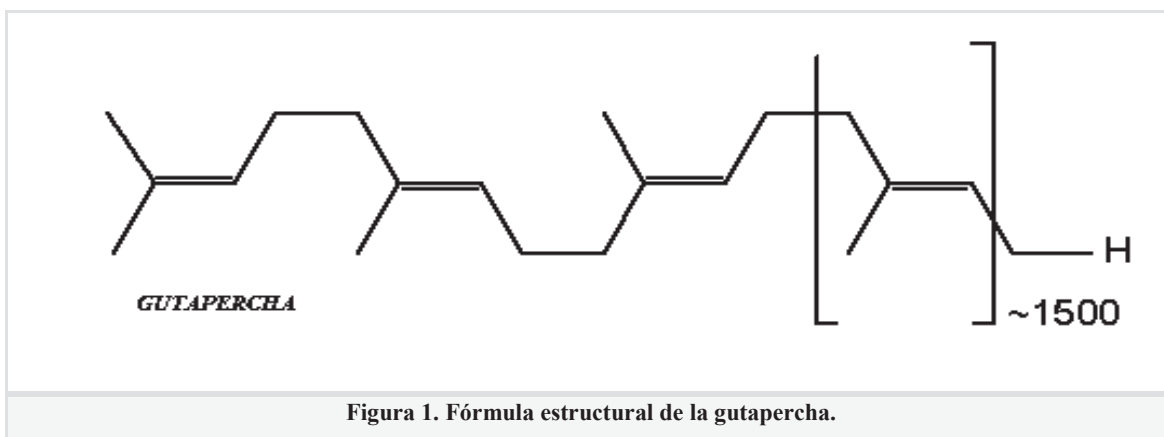
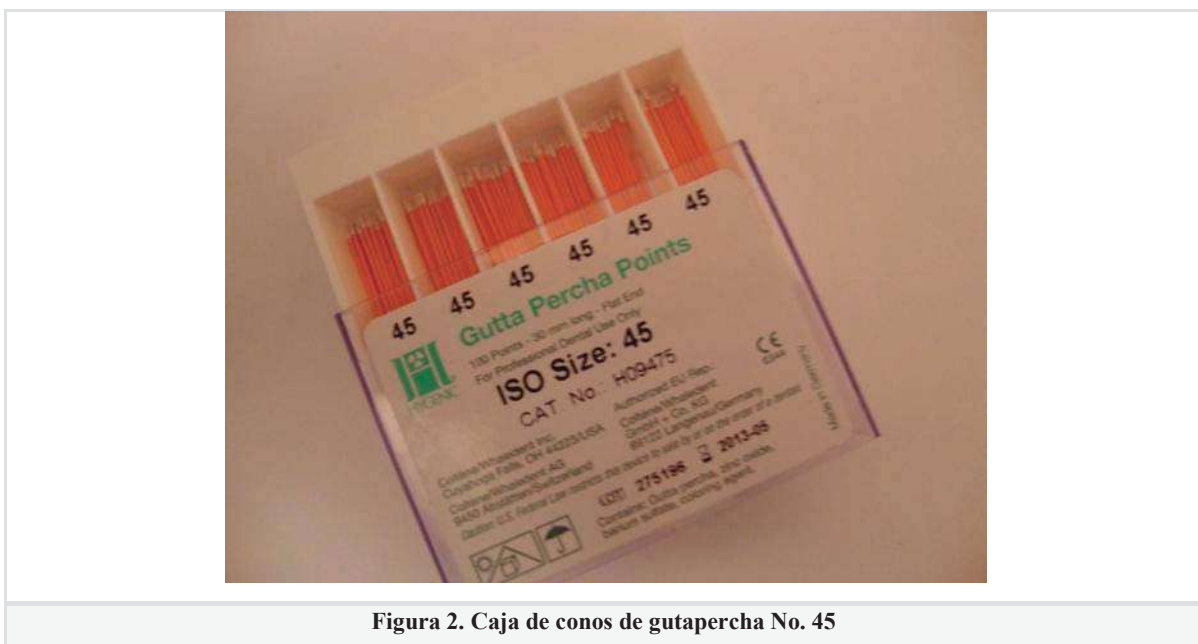


Figura 1. Fórmula estructural de la gutapercha.

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

Se han añadido a la gutapercha diferentes compuestos como son los antibióticos para aumentar su eficacia antibacteriana (Hoelscher y cols. 2006; Canalda y cols. 2007).

No hay que olvidar que algunos conos pueden tener una función antiséptica gracias a la adición en su composición de Clorhexidina, Hidróxido de Calcio, Yodoformo; por otro lado las gutaperchas pueden ser medicadas con sustancias con efectos anti-fúngicos y antimicrobianos (Bodrumiu y Alacann, 2006).



2.1.2 Soluciones químicas

Debido a que los conos de gutapercha, son un material termolábil, no pueden ser esterilizados bajo condiciones de calor, como son: el autoclave o el horno de calor seco. Por ello para sanitizar los conos de gutapercha se han implementado diversas sustancias químicas, en la terapia endodóntica, tales como: NaOCl, CHX, Glutaraldehído, Alcohol Etilico, Iodopovidona, Gas Formaldehído, etc., en el intento de mantener la cadena aséptica, evitando con ello una posible fuente de contaminación exógena al interior del sistema de conductos radiculares, previniendo que puedan presentarse infecciones periapicales por el uso de puntas de gutapercha contaminadas durante el procedimiento de obturación.

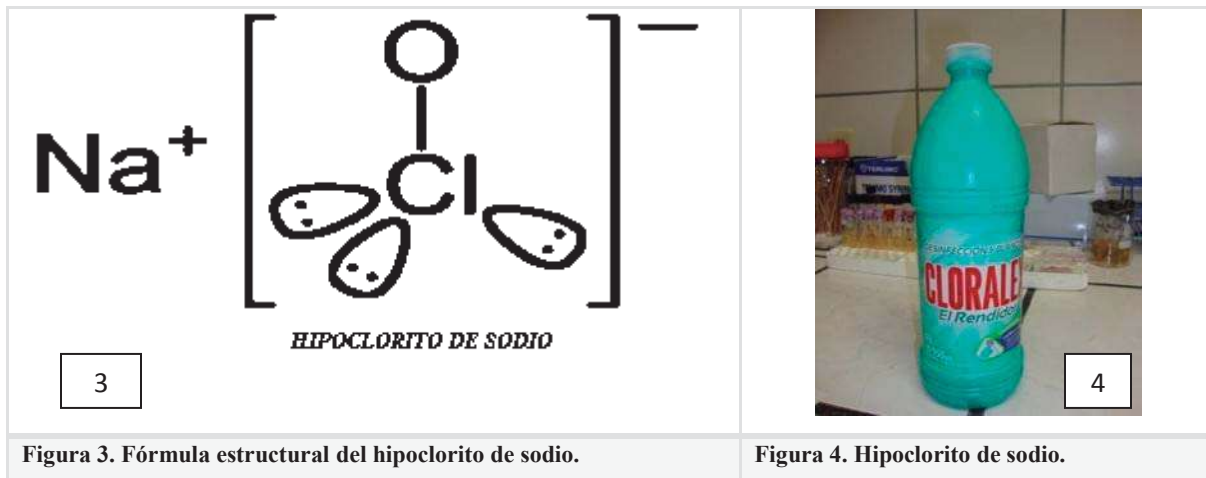
2.1.2.1 Hipoclorito de Sodio (NaOCl):

El NaOCl fue recomendado por primera vez como solución antiséptica para irrigar heridas abiertas por Henry Dakin durante la primera guerra mundial (Dakin 1915). Varios años después, el uso de soluciones a base de soda clorada se recomendó para la realización de la terapia de conductos (Walker 1936).

El cloro existe en combinación con sodio, potasio, calcio y magnesio (Zehnder 2006). En el cuerpo humano, los compuestos del cloro son parte del sistema inmune no específico. Estos compuestos son generados por los neutrófilos mediante la vía de cloración de los compuestos nitrógenos ó conjunto de compuestos, mediada por mieloperoxidasa (Test y cols. 1984). El Hipoclorito de Sodio ganó una amplia aceptación como desinfectante en el área médica luego de los estudios que realizaron sobre esta solución Koch y Pasteur a finales del siglo diecinueve. Además de ser una solución de amplio espectro, y tener un efecto mortal no específico sobre todos los microorganismos, las preparaciones de hipoclorito, son esporicidas y viricidas (McDonnell y cols. 1999) y muestran efectos más amplios en la disolución tisular de tejidos necróticos que en los vitales (Austin y cols. 1918). Estas características impulsaron el uso del hipoclorito de sodio acuoso en la

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

endodoncia como el principal irrigante según las recomendaciones de Coolidge cerca de 1919 (Coolidge 1919).



MECANISMO DE ACCIÓN:

El hipoclorito de sodio exhibe un balance dinámico como se muestra en la siguiente reacción:



Actúa como solvente para los ácidos grasos orgánicos y grasas degradantes, transformándolos en sales de ácidos grasos (jabón) y glicerol (alcohol) que reducen la tensión superficial de la solución remanente. El hipoclorito de sodio neutraliza los aminoácidos formando agua y sal (reacción de neutralización). Con la salida de iones hidroxilo hay una reducción del pH.

El ácido hipocloroso (sustancia presente en la solución del hipoclorito de sodio) cuando se encuentra en contacto con los tejidos orgánicos, actúa como solvente y libera cloro que, combinado con las proteínas del grupo amino, forma cloraminas (reacción de cloraminación) que interfiere en el metabolismo celular.

El ácido hipocloroso (HOCl) y los iones del hipoclorito (OCl) conducen a la degradación aminoácida e hidrólisis.

El hipoclorito de sodio (fuerte oxidante) presenta una acción antimicrobiana, inhibiendo las enzimas bacterianas induciendo una oxidación irreversible del grupo SH (grupo sulfhidrilo) de las enzimas esenciales bacterianas.

La solución de hipoclorito de sodio es una base potente con $\text{pH} > 11$. El alto pH del hipoclorito de sodio interfiere en la integridad de la membrana citoplasmática con una inhibición enzimática irreversible, alteraciones en la biosíntesis del metabolismo celular, y se observa una degradación fosfolipídica en la peroxidación lipídica.

La reacción de cloraminación de aminoácidos forma cloraminas que interfieren con el metabolismo celular. La oxidación promueve una inhibición enzimática bacteriana irreversible, sustituyendo el hidrógeno con cloro. Esta inactivación enzimática puede observarse en la reacción del cloro con los grupos amino (NH_2^-) y una oxidación irreversible de los grupos sulfhidrilos (SH) de las enzimas bacterianas (cisteína). Por lo anteriormente descrito, es que el hipoclorito de sodio presenta una actividad antimicrobiana. La disolución del tejido orgánico puede verificarse en la reacción de saponificación cuando el hipoclorito de sodio degrada los ácidos grasos y lípidos, resultando en jabón y glicerol (Estrela y cols. 2002, Mohammadi 2008).

Actualmente las soluciones de NaOCl siguen siendo sumamente populares como irrigantes para los conductos radiculares debido a sus propiedades (Barbakow y cols. 1995, Sirtes y cols. 2005).

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

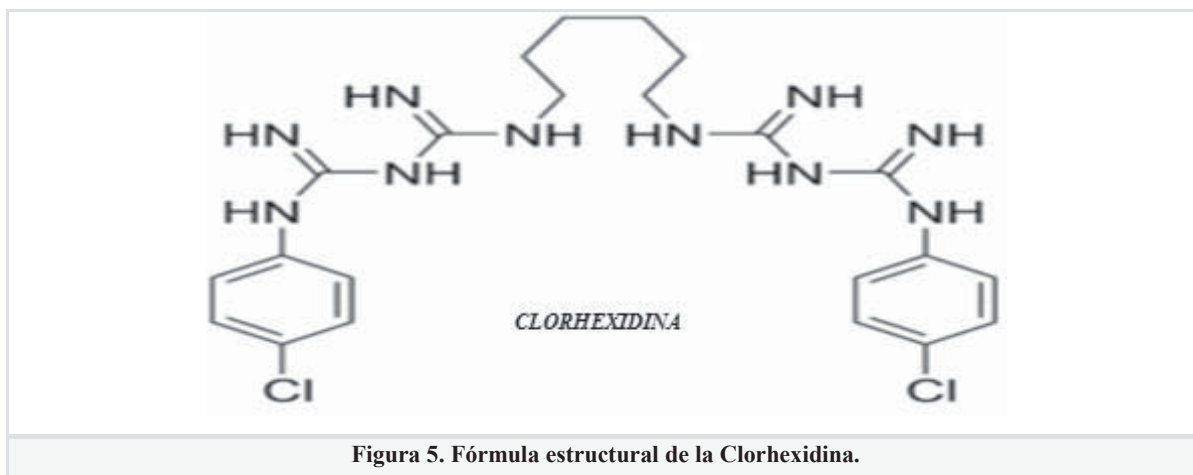
2.1.2.2 Clorhexidina (CHX):

La CHX fue desarrollada a finales de 1940 en los laboratorios de investigación Imperial Chemical Industries Ltd. Macclesfield, Inglaterra (Zehnder 2006).

Actualmente se fabrica como gluconato de clorhexidina que es una sustancia eficaz contra microorganismos grampositivos, gramnegativos, levaduras, aerobios, anaerobios, y facultativos; los microorganismos de mayor susceptibilidad a la clorhexidina son: *Staphilococcus*, *Streptococcus mutans*, *S. salivarius*. Con mediana susceptibilidad: *Streptococcus sanguis*. Con baja susceptibilidad: *Klebsiella* spp.

Los microorganismos anaerobios aislados más susceptibles son: bacterias propiónicas. Los menos susceptibles: cocos gramnegativos y *Veillonella* spp.

ESTRUCTURA Y MECANISMOS DE ACCIÓN:



La Clorhexidina es una bi-guanidina catiónica sintética que consiste en dos anillos simétricos 4-clorofenil y dos grupos biguanida, conectados por una cadena hexametileno central (Greenstein y cols. 1986).

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

La CHX es una molécula hidrofóbica y lipofílica positivamente cargada que interactúa con los fosfolípidos y lipopolisacáridos en la membrana celular de la bacteria, para luego entrar a la célula, a través de algún tipo de mecanismo de transporte activo o pasivo (Athanassiadis y cols. 2007).

Su efectividad se debe a la interacción de la carga positiva de la molécula y la carga negativa de los grupos fosfato en las paredes celulares microbianas (Gomes y cols. 2003), de manera que se altera el equilibrio osmótico de las células. Esto aumenta la permeabilidad de la pared celular, lo que permite que la molécula CHX penetre en la bacteria.

La CHX es una base y es estable como sal. El gluconato de clorhexidina es la preparación oral más común, es soluble en agua y con un pH fisiológico se disocia fácilmente y libera el componente CHX positivamente cargado (Greenstein y cols. 1986).

En una baja concentración (0.2%) se filtran fuera de la célula sustancias de bajo peso molecular, específicamente potasio y fósforo.

Por otro lado, a una mayor concentración (2%), la CHX es bactericida y ocurre una precipitación de los contenidos citoplasmáticos, lo que resulta en una muerte celular (Gomes y cols. 2003).



Figura 6. Clorhexidina de uso odontológico.

2.1.2.3 Glutaraldehído:

ALDEHÍDOS:

Los aldehídos poseen una elevada actividad antimicrobiana frente a bacterias, esporas bacterianas, formas miceliales, esporas de hongos y frente a diversos tipos de virus.

Los aldehídos pertenecen a un grupo de agentes electrofilicamente activos, los cuales, debido a la deficiencia de un electrón en el grupo carbonilo, reaccionan con componentes nucleofílicos de la célula, ejerciendo su actividad antimicrobiana.

Los aldehídos se pueden considerar como “quimioesterilizadores” dada su capacidad de destruir bacterias, hongos y sus correspondientes esporas, bacilos, y virus. Una propiedad muy importante de los aldehídos es su eficiencia esporicida. Es activo en presencia de materia orgánica (como el suero) y de acción rápida (las bacterias son destruidas en 1 minuto y la mayoría de virus en 10 minutos) (<http://www.calier.es/pdf/DESPADAC2.pdf>).

MECANISMO DE ACCIÓN DEL GLUTARALDEHÍDO:



Figura 7. Fórmula estructural del Glutaraldehído.



Figura 8. Glutaraldehído.

El mecanismo de acción microbicida del Glutaraldehído se basa en sus dos grupos toxofóricos (aldehídos) los cuales pueden interaccionar con los constituyentes de la célula microbiana, como por ejemplo los grupos amino y tiol de las proteínas.

En un estado ácido, la adición de surfactantes permite una mayor penetración del aldehído a través de la pared celular, incrementando su actividad.

GLUTARALDEHÍDO AL 2%:

Es una solución estable, bactericida de amplio espectro, eficaz contra virus, de efectiva acción esporicida.

Resulta activo ante la presencia de materia orgánica. Algunas publicaciones indican que no es corrosivo para los metales, gomas y lentes, mientras que otras indican presencia de corrosión a largo plazo.

Actúa afectando las lipoproteínas de la membrana celular y el citoplasma de las formas bacterianas vegetativas, altera el sistema enzimático y el daño en la membrana, permite la salida de sustancias y componentes intracelulares, y facilita la entrada directa del desinfectante al citoplasma.

FACTORES QUE INFLUENCIAN SU ACTIVIDAD:

- 1.- pH: Solución alcalina 7.9
- 2.- Concentración: 2%
- 3.- Temperatura: Ambiente
- 4.- Materia orgánica: Tratar de disminuir su presencia en los materiales a desinfectar. Uno de los factores más importantes es la limpieza previa del material, requisito sin el cual el proceso de desinfección fracasaría. El Glutaraldehído es incrustante de la sangre.

Recientes estudios han demostrado que las concentraciones del Glutaraldehído disminuyen del 2,1% (pH 8.5) al 1,3% (pH 7.4) a lo largo de un período de 28 días a temperatura ambiente.

VIDA MEDIA:

El Glutaraldehído tiene una vida media entre 14 y 28 días. Los preparados comerciales tienen una solución “activadora”, un inhibidor de corrosión y Glutaraldehído al 2%. La solución “activadora” se coloca en el momento de preparar el producto para usar por primera vez. Debe tenerse la precaución de mezclar muy bien la preparación, para evitar obtener una solución parcialmente activada.

MATERIALES QUE SE DESCONTAMINAN CON GLUTARALDEHÍDO:

Aluminio, zinc, acero de carbono, carburo de tungsteno, acero inoxidable, acero cromado, cloruro de polivinilo, policarbonato, polietileno, poli-propeno, sondas de neopreno, silicón, tubos de látex, nylon rígido. Su uso resulta de utilidad para descontaminar materiales que no pueden ser sometidos a procedimientos de descontaminación habituales o por calor (autoclave) y en aquellos materiales a los que el Hipoclorito de sodio ya sea al 1 o al 10% les produce, con el tiempo, un importante deterioro, entre estos materiales se clasifican los endoscopios, luces ópticas, gutapercha, etc.

Se debe controlar diariamente, hasta que se establezca un promedio para el uso y duración del Glutaraldehído “activado”, con tiras medidoras de pH, y con tiras medidoras del porcentaje de concentración, que debe mantenerse siempre al 2%.

La capacidad germicida de la solución varía según el uso del producto “activado”. A mayor uso diario, se produce una disminución de la vida media del mismo. Se recomienda su medición y no el uso estandarizado durante 14 o 28 días (posibilidad de presencia del bacilo de Koch).

La contaminación de la solución con materia orgánica (sangre, pus) influenciará la pérdida de actividad del Glutaraldehído, ya que la materia orgánica actúa protegiendo especies microbianas o compitiendo con la molécula desinfectante, reduciendo su actividad.

Cuando se utiliza como desinfectante de alto nivel en instrumentos sometidos a limpieza previa, la mayoría de los estudios sugieren un tiempo de contacto no menor a 10 minutos.

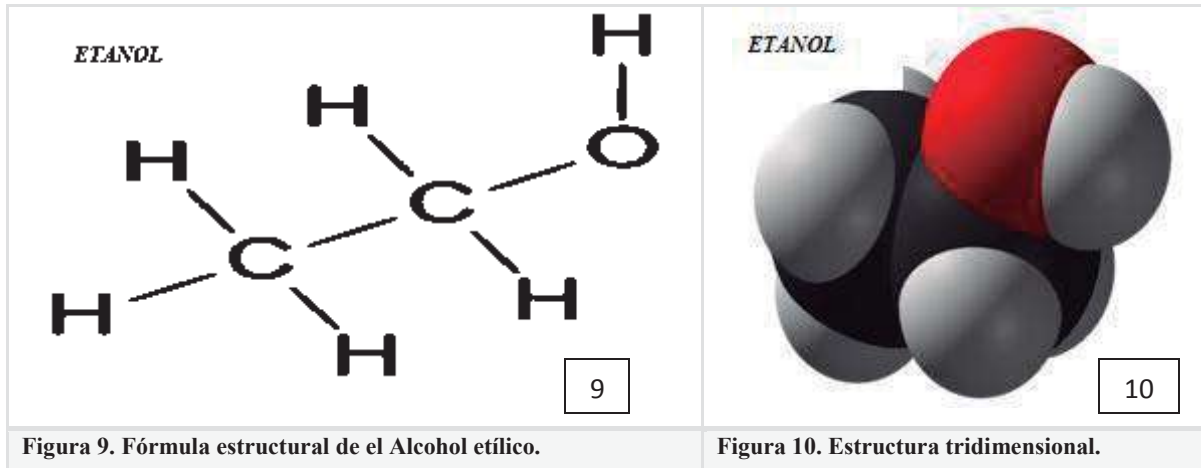
Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

Cuando la finalidad es la descontaminación el tiempo se extenderá a 30 minutos, y cuando el objetivo es la esterilización se recomiendan 10 horas o más de sumersión.

Algunas investigaciones mostraron que los plásticos y las gomas absorben el 10% del Glutaraldehido y lo liberan luego de 24 horas.

La absorción del Glutaraldehido depende del tiempo de contacto entre el enjuague del material. Se sugiere que la inmersión del material en agua estéril luego del contacto con el Glutaraldehido se realice en tres baños diferentes, agitando frecuentemente el material (2 minutos en total) (<http://www.ramosmejia.org.ar/s/inf/recomend/desinf.htm>).

2.1.2.4 Alcohol Etílico:



El Etanol o alcohol etílico actúa precipitando las proteínas del elemento microbiano exclusivamente en medio acuoso (la presencia de agua aumenta la desnaturalización de las proteínas microbianas, mecanismo de acción antimicrobiano del alcohol etílico), por lo tanto una condición particular del etanol es que si se usa como antiséptico en una solución pura, al 100%, carece casi por completo de acción germicida, por lo tanto el alcohol etílico debe estar diluido para tener efecto. Las concentraciones eficaces de esta sustancia oscilan entre un 60 y 90%. La clínica ha demostrado que la solución germicida más efectiva es el alcohol etílico 70% (70ml de $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ + 30ml de H_2O). Las soluciones más concentradas que se venden comercialmente tienen una menor efectividad.

El etanol 70% es un desinfectante de nivel intermedio, letal para bacterias incluyendo el bacilo de Koch, es un irregular fungicida y viricida, y no actúa sobre las esporas.

Tiene un uso limitado, particularmente como antiséptico profiláctico en la piel previo a la introducción de agujas. Sin embargo, para obtener los resultados germicidas esperados deben pasar 2 minutos como mínimo en contacto con la piel (latencia de acción). El alcohol es un buen antiséptico pero no se lo considera como el mejor. No debe administrarse en heridas pues es irritante (Universidad de Chile, sede Oriente 1999 <http://www.quirofanoweb.netfirms.com/desinfectantes.htm>).

Un uso más de este antiséptico es como desinfectante de conos de gutapercha. Stabholz y cols. (1987) encontraron que los conos de gutapercha eran desinfectados luego de estar expuestos por 15 minutos con alcohol etílico 70%.

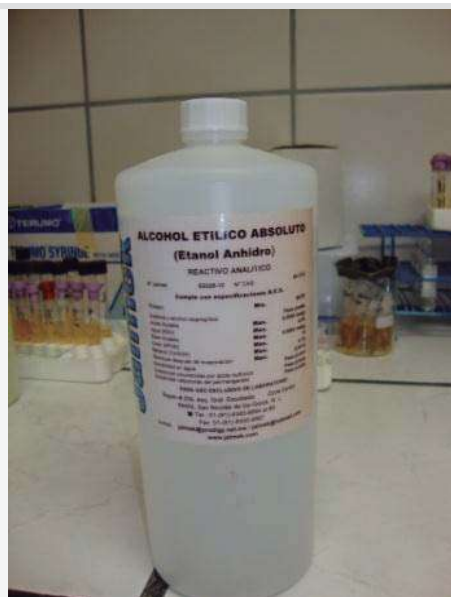
Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

Tabla 2. Denominaciones, presentación, acciones e indicaciones del alcohol etílico.

DENOMINACIÓN GENÉRICA	DENOMINACIÓN COMERCIAL	PRESENTACIÓN	ACCIONES/INDICACIONES
Alcohol etílico	Genérico	Alcohol etílico 95% Alcohol etílico 70%	Muy eficaz, confiere una rápida protección frente a formas vegetativas de bacterias Gram + y Gram -, actividad favorable frente al bacilo de Koch, hongos y numerosos virus. La concentración al 70% es mucho más eficaz como antiséptico que la concentración al 95%.

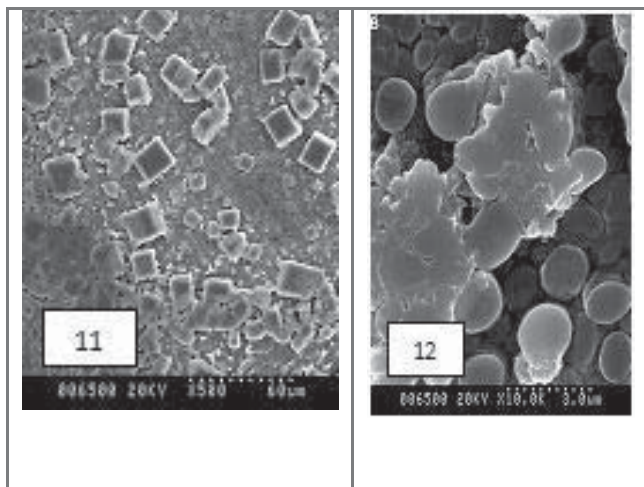
Tabla 3. Concentración, espectro de acción y usos del Alcohol etílico.

ALCOHOL ETÍLICO (ETANOL)	
Solución de mayor eficacia:	Etanol 70%.
Espectro de acción:	Nivel intermedio.
No se incluye acción contra:	Esporas.
Regular acción contra:	Virus y hongos.
Usos:	1. Antisepsia profiláctica de piel. 2. Ampollas inyectables y termómetros.



2.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.

Nan-Shim y Cols. 2007 Los objetivos de este estudio fueron identificar los microorganismos que se encuentran en la superficie de los conos de gutapercha (conos GP) usando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y evaluar el efecto de esterilización del NaOCl 5.25%, CHX 2% y CloraPrep sobre estas bacterias. Se compararon las alteraciones de la textura de la superficie y propiedades físicas de los conos GP luego de la esterilización. Se seleccionaron al azar un total de 150 conos GP en las clínicas de endodoncia, y se realizó un ensayo PCR para identificar a los microorganismos contaminantes. Los conos GP fueron sumergidos en los tres desinfectantes químicos luego de ser inoculados con los mismos microorganismos y de haberlos dejado secando por 1 día. Los efectos de la esterilización fueron evaluados midiendo la turbidimetría y realizando sub-cultivos. Los cambios en la textura de la superficie fueron observados por microscopía electrónica de escaneo y se usó un aparato instron 5500 (instron Corp, Canton, MA) para medir la fuerza de tensión y la proporción de elongación de los conos GP luego de su esterilización química. Se realizó un análisis estadístico. Los resultados indicaron que el 19.4% de los conos GP de la clínica estaban contaminados y que todas las especies pertenecían al género *Staphilococcus*. Los tres desinfectantes químicos fueron todos efectivos en la desinfección rápida de los conos GP contra los *Staphilococcus* spp, y fue adecuado 1 minuto de sumersión de los conos GP para desinfectarlos. Las Microfotografías del cono mojado en NaOCl mostraron un acumulo de cristales cuboidales (Figuras 11 y 12). La fuerza de tensión entre los grupos mojados con NaOCl y CHX (Tabla 4) fue estadísticamente diferente ($p < 0.05$), pero, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos mojados con NaOCl y CloraPrep ($p > 0.05$). Todos los desinfectantes aumentaron significativamente la proporción de elongación (Tabla 5) en comparación con los conos GP frescos ($p < 0.05$), especialmente el CloraPrep (Medi-flex, Leawood, KS). Estos resultados muestran que los tres desinfectantes químicos son agentes efectivos para la rápida esterilización de los conos GP.



Figuras 11 y 12. Imágenes SEM de la superficie de los conos GP luego de 5 minutos de esterilización con 5.25% NaOCl. Acumulo de cristales cuboidales (A) y algunos componentes disueltos del cono (B) fueron mostrados en la superficie de los conos GP (magnificación 500X y 10,000X).

TABLA 4. Fuerza de tensión de los conos GP sumergidos en desinfectantes químicos por 5 minutos (MPa).

Grupo	Media (SD)
Control	0.2091 (0.0147) a
2% CHX	0.2053 (0.0135) a
ChloraPrep	0.2179 (0.0159) a, b
5.25% NaOCl	0.2264 (0.0183) b

Control: cono GP que no fue sumergido en desinfectante químico.
Las letras diferentes denotan una significancia estadística ($p < 0.05$).

TABLA 5. Cambios en la proporción de elongación de los conos GP sumergidos en desinfectantes químicos por 5 minutos.

Grupo	Media (SD)
Control	167.9 (22.5)a
5.25% NaOCl	216.9 (16.6)b
2% CHX	269.7 (31.9)c
Clora-Prep	326.3 (42.0)d

Control: cono GP que no fue sumergido en desinfectantes químicos.
Las letras diferentes denotan significancia estadística ($p < 0.05$).
Medidas de elongación, el porcentaje cambia respecto a la longitud antes de la fractura (%).

Lanzagorta Rebollo y cols. 2006 evaluaron la acción antimicrobiana de Gluconato de Clorhexidina e Hipoclorito de Sodio, para la desinfección de los conos de gutapercha. En su experimento I se utilizaron conos de gutapercha expuestos al medio ambiente, para comprobar si había crecimiento bacteriano (Tabla 6). En su experimento II los conos se sumergieron en CHX .12%, 2% y 4%, y en NaOCl 1%, 3% y 6% por periodos de tiempo de 1 a 5 min. 1 y 24 H y 7 días (Tabla 7.) En el experimento I se observó crecimiento bacteriano, identificándose cocos y bacilos Gram + En el experimento II los conos se depositaron en tubos de ensayo con caldo BHI incubándose a 37°C durante 48 horas, finalmente se tomaron muestras de los tubos para realizar tinción de Gram y analizar dichas muestras con microscopia. Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas $p < 0.05$ al comparar el efecto del CHX gel 0.12% y NaOCl 1%, obteniendo una mejor desinfección con el CHX gel. Los resultados indican que el Gluconato de Clorhexidina es tan efectivo para la desinfección de los conos de gutapercha como el Hipoclorito de Sodio, y que una concentración mínima de clorhexidina (0.12%) puede funcionar de igual manera que el NaOCl al 6%, ambos en un tiempo de sumersión de 1 minuto (Tabla 8); y que en ningún caso el Hipoclorito de Sodio resultó tener una capacidad desinfectante significativamente mayor que el Gluconato de Clorhexidina.

Tabla 6. Resultado de la valoración de crecimiento y tipo de microorganismos de los conos de gutapercha expuestos al medio ambiente.		
Tubo	Crecimiento	Microorganismos
1	Positivo	Cocos Gram +
2	Positivo	Bacilos Gram +
3	Positivo	Cocos Gram +
4	Positivo	Cocos Gram +
5	Positivo	Cocos Gram +
6	Positivo	Cocos Gram +
7	Positivo	Cocos Gram +
8	Positivo	Bacilos Gram +
9	Positivo	Cocos Gram +
10	Positivo	Cocos Gram +

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

Tabla 7. Concentraciones y tiempos de inmersión de los conos de gutapercha en las soluciones estudiadas.

Solución	1 min	5 min	1 hr	24 hrs	7 días
CHX 0.12%	3	3	3	3	3
CHX 2%	3	3	3	3	3
CHX 4%	3	3	3	3	3
NaOCl 1%	3	3	3	3	3
NaOCl 3%	3	3	3	3	3
NaOCl 6%	3	3	3	3	3
Agua	3	3	3	3	3

Tabla 8. Resultado de las pruebas de las soluciones en las concentraciones y tiempos estudiados.

	Solución				Tiempo de Inmersión	
	%	1m	5m	1h	24h	7d
CHX	0.12	---	---	---	---	---
	2	---	---	---	---	---
	4	---	---	---	---	---
NaOCl	1	+++	++-	---	---	---
	3	++-	---	---	---	---
	6	---	---	---	---	---
Agua	+++	+++	+++	+++	+++	

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

Nurban Özalp y cols. 2006 evaluaron la desinfección rápida de los conos de gutapercha contaminados intencionalmente con *Bacillus subtilis*, se emplearon para la desinfección las soluciones Glutaraldehido 2% (sumergiendo los conos por espacios de tiempo de 10, 15, 30, 60 minutos) y NaOCl 2.5% (5, 10, 15, minutos) (Tabla 9), a continuación los conos se transfirieron a tubos de ensayo con 10mL de medio nutritivo, incubándolos a 37°C por 48 horas, y se determinó el crecimiento bacteriano por medio de turbidimetría. Estos autores concluyen que el NaOCl 2.5% fue efectivo en la sanitización de los conos de gutapercha en todos los tiempos de desinfección propuestos, mientras que el Glutaraldehido no fue eficaz desinfectando los conos incluso luego de 15 minutos de contacto.

TABLA 9. Efectividad de las soluciones analizadas en la esterilización de los conos de gutapercha.						
Grupo Experimental	Tubos*	Tiempo (min)	Periodo de Observación			
			24 h		48 h	
			Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
2% Glutaraldehido	4	10	4	-	4	-
	4	15	-	4	-	4
	4	30	-	4	-	4
	4	60	-	4	-	4
	4	600	-	4	-	4
	4	720	-	4	-	4
2.5% NaOCl	4	5	-	4	-	4
	4	10	-	4	-	4
	4	15	-	4	-	4

*Número de tubos conteniendo 10 conos de gutapercha sumergidos en caldo nutritivo.

Gomes y cols. 2005 Analizaron diversas concentraciones y tiempos de sumersión de Hipoclorito de Sodio (0.5, 1, 2.5, 4, 5.25%) y Clorhexidina (0.2, 1.0, 2.0%) en la desinfección de los conos de gutapercha contaminados previamente con las especies: *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sanguis*, *Staphilococcus aureus*, *Candida albicans* y *Bacillus subtilis* (Tabla 10). Verificaron también la contaminación de los conos de gutapercha en sus cajas (Tabla 11) e identificaron a los microorganismos que presentaban los conos luego de una contaminación intencional manipulando los conos manualmente (Tabla 12).

Los conos fueron sumergidos en las soluciones y el crecimiento bacteriano se analizo mediante turbidimetría, llegando a la conclusión de que el Hipoclorito de Sodio 5.25% es un agente efectivo para realizar una rápida descontaminación de los conos. Y, que aunque CHX 2% fue capaz de eliminar las formas vegetativas de microorganismos en poco tiempo, no eliminó las esporas de *Bacillus subtilis* dentro de los tiempos en que fue probada.

Tabla 10. Tiempo requerido para desinfectar los conos de gutapercha sumergidos en CHX y NaOCl.

Soluciones Químicas	<i>B. subtilis</i> (forma vegetativa) ATCC 19659	<i>B. subtilis</i> (esporas) ATCC 19659	<i>C. albicans</i> NTCC 3736	<i>S. faecalis</i> ATCC 29212	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. sanguis</i> ATCC 25923
0.5% NaOCl	30 min ab A	30 min ab A	30 min a A	30 min a A	30 min ab A	30 min a A
1.0% NaOCl	20 min ab A	20 min ab A	20 min a A	20 min ab A	20 min ab A	20 min a A
2.5% NaOCl	10 min ab A	10 min b A	10 min ab A	10 min ab A	10 min ab A	10 min ab A
5.25% NaOCl	45 s b A	1 min b A	45 s ab A	45 s b A	45 s ab A	45 s ab A
0.2% CHX gel	2 h a AB	>72 h a A	10 min ab B	2 h a AB	10 min ab B	10 min ab B
1.0% CHX gel	15 min ab A	>72 h a A	15 s b B	15 min ab A	30 s b B	15 s b B
2.0% CHX gel	1 min b AB	>72 h a A	15 s b B	1 min b AB	15 s b B	15 s b B
0.2% CHX Líquida	30 s b B	>72 h a A	15 s b B	30 s b AB	15 s b B	15 s b B
1.0% CHX Líquida	15 s b B	>72 h a A	15 s b B	15 s b B	15 s b B	15 s b B
2.0% CHX Líquida	15 s b B	>72 h a A	15 s b B	15 s b B	15 s b B	15 s b B

Las letras diferentes (de la a- d y de la A-B) representan diferentes valores.
 Las letras mayúsculas muestran el análisis estadístico horizontal (Kruskal-Wallis P<.05).
 Las letras minúsculas muestran el análisis estadístico vertical (Kruskal-Wallis P<.05).

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

Tabla 11. Contaminación de los conos de gutapercha de acuerdo al tiempo de apertura de las cajas.

Tiempo de apertura	Número de muestras	Crecimiento microbiano	Sin crecimiento microbiano
De reciente apertura	30	03	27
Mayor a 6 meses	23	02	21
7 meses a 1 año	09	01	08
1.1 año a 2 años	22	00	22
Más de 2 años	01	00	01
Total	85	06	79

Tabla 12. Microorganismos aislados de los conos manipulados manualmente (n = 15)

Especies	Número de conos	Porcentaje
<i>Staphilococcus aureus</i>	8	53.3
<i>Staphilococcus epidermidis</i>	14	93.3
<i>Micrococcus spp.</i>	5	33.3
<i>Propionibacterium acnés</i>	5	33.3
<i>Streptococcus salivarius</i>	4	26.7
<i>Bacillus spp.</i>	3	20.0
<i>Lactobacillus spp.</i>	2	13.3

Valois y cols. 2005 La microscopía de fuerza atómica (MFA) es una metodología bien establecida para la caracterización estructural de los materiales. El propósito de este estudio fue investigar los efectos de las soluciones NaOCl sobre la estructura de los conos de gutapercha usando MFA (Figura 13). Se cortaron en una base de cristal tres conos de gutapercha estandarizados a 3mm por encima de la punta y se sumergieron en soluciones NaOCl de 0.5, 2.5 ó 5.25%, luego de 1 ó 5 minutos las muestras fueron posicionadas en el microscopio de fuerza atómica. Los análisis fueron realizados en 12 puntos diferentes (n=12) localizados entre los primeros 1 ó 2 mm de la punta, luego de cada periodo de inmersión en el NaOCl. Se uso como control el cono de gutapercha que no recibió ningún tratamiento con NaOCl. Se midieron los parámetros de la media cuadrática (RMS) para el modo de contacto de la imagen (Figura 14) y las variaciones en la microscopía de fuerza modulada (Figura 15). Las diferencias entre los valores RMS fueron probados con ANOVA mediante la prueba LSD protegida para múltiples comparaciones de Fisher ($p < 0.05$). Se observaron efectos de deterioro agresivo en la elasticidad del cono de gutapercha tratado con NaOCl 5.25% a 1 min cuando se comparó con el grupo control ($p < 0.05$). Más que esto, las soluciones NaOCl 2.5 y 5.25% causaron cambios topográficos luego de 5 minutos cuando se compararon con el grupo control ($p < 0.05$). A la inversa, la solución NaOCl 0.5% no ocasionó ninguna alteración topográfica o de elasticidad en la estructura del cono de gutapercha cuando se comparó con el control ($p < 0.05$). En consecuencia, la solución de NaOCl 0.5% es una alternativa segura para la rápida descontaminación de los conos de gutapercha.

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

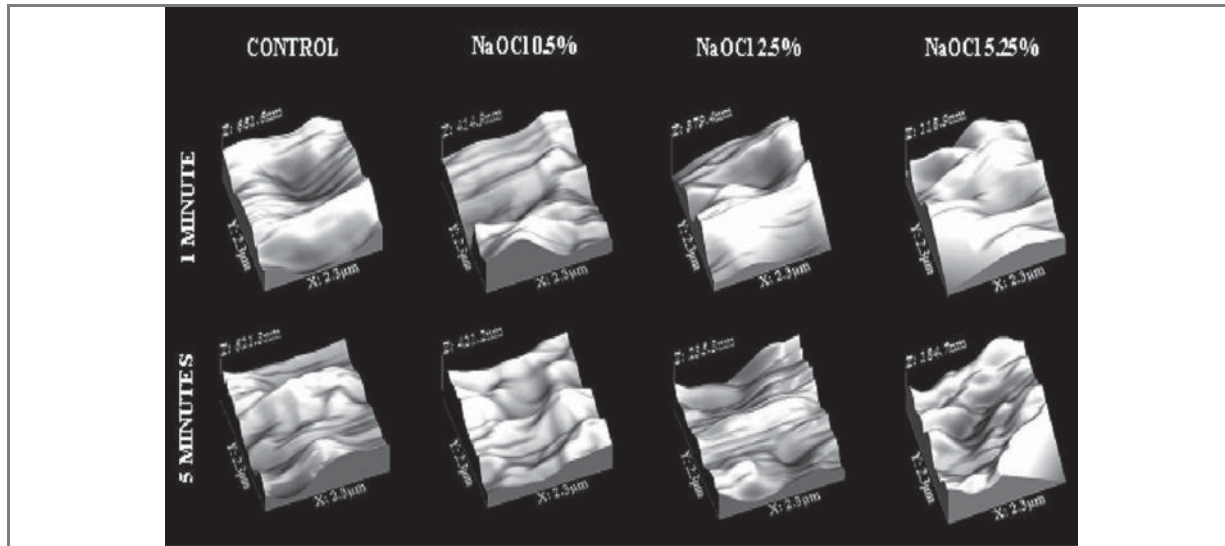


Figura 13. Modo de contacto en las imágenes tridimensionales, MFA, de una topografía típica de conos de gutapercha del grupo control (sin tratamiento) y luego del tratamiento químico con soluciones de NaOCl (0.5, 2.5, ó 5.25%) de acuerdo a intervalos de tiempo de (1 ó 5 min) de inmersión para cada grupo.

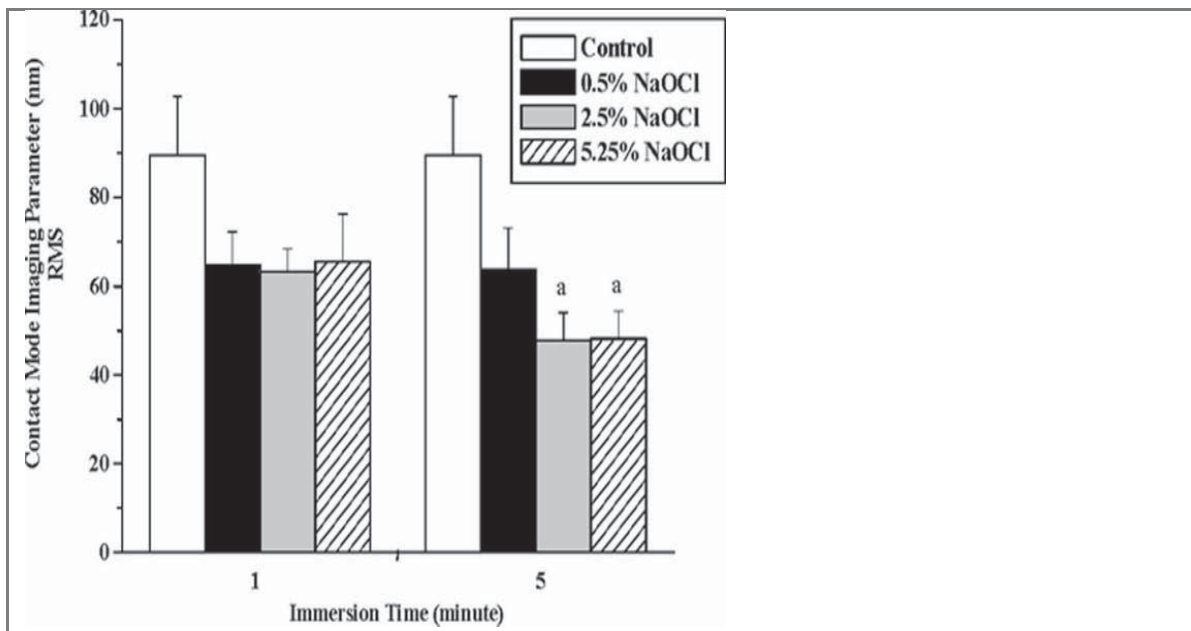


Figura 14. Comparación de medias RMS (+/- SEM) valores de modo de contacto de la imagen entre las soluciones NaOCl en función del tiempo. (a) Estadísticamente diferente del grupo control ($p < 0.05$).

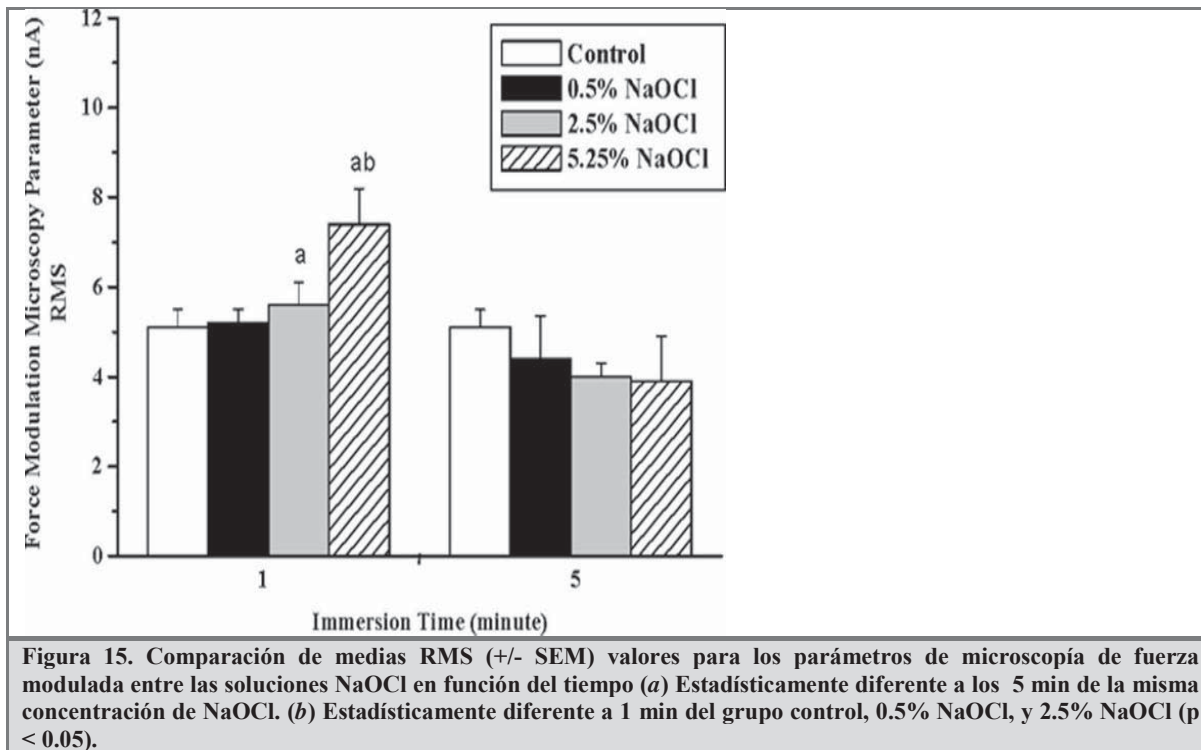


Figura 15. Comparación de medias RMS (+/- SEM) valores para los parámetros de microscopía de fuerza modulada entre las soluciones NaOCl en función del tiempo (a) Estadísticamente diferente a los 5 min de la misma concentración de NaOCl. (b) Estadísticamente diferente a 1 min del grupo control, 0.5% NaOCl, y 2.5% NaOCl ($p < 0.05$).

Da Motta y cols. 2001 El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia del NaOCl 2.5% y el Glutaraldehído 2.2% ('Cidex') como agentes de esterilización de los conos de gutapercha. También se evaluó la eficacia de almacenaje de los conos en presencia o ausencia de Paraformaldehído (Figuras 16 y 17). Los conos de gutapercha fueron intencionalmente inoculados con una suspensión de *Bacillus stearothermophilus* sumergiéndolos en las soluciones: Hipoclorito de Sodio 2.5 % (por espacios de tiempo de 5, 10 y 15 minutos) y Glutaraldehído (Cidex) 2.2% (en espacios de tiempo de 10, 15, 30 y 60 minutos, 10h, 12h) (Tabla 13). Posteriormente los conos se colocaron en 10mL de medio de cultivo tioglicolato y se incubaron a 60°C por 48 horas, el crecimiento bacteriano se analizó y determinó mediante la visualización de la turbidez del medio de cultivo. En conclusión sus resultados muestran que el Hipoclorito de Sodio 2.5% era efectivo luego de 5, 10 y 15 minutos, mientras que se necesitaban de 10 a 12 minutos de contacto con el Glutaraldehído 2.2% para obtener una esterilización. También se demostró que no hay contaminación de los conos cuando son almacenados con o sin Paraformaldehído (Tabla 14).

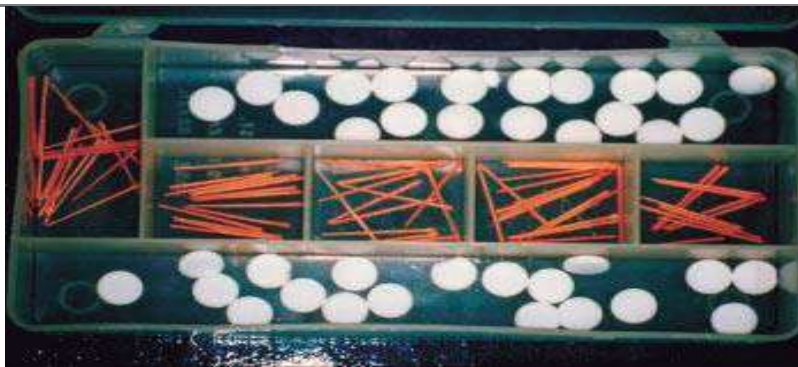


Figura 16. Conos de gutapercha almacenados con tabletas de paraformaldehído.

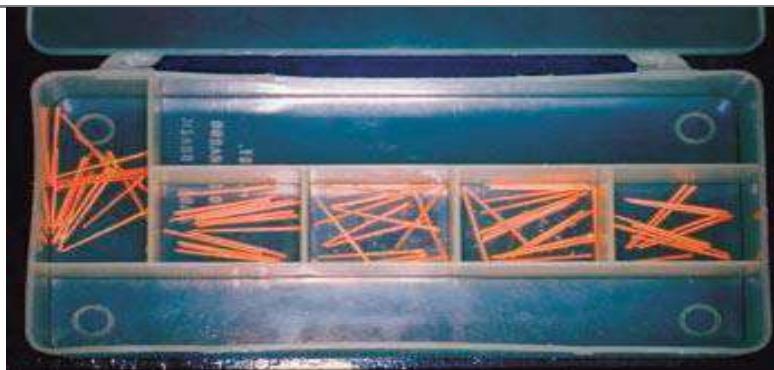


Figura 17. Conos de gutapercha almacenados sin tabletas de paraformaldehído.

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

Tabla 13. Efecto de las soluciones Glutaraldehído 2.2% y NaOCl 2.5% para la esterilización de los conos de gutapercha.

Grupos Experimentales		n*	Periodos de Observación			
			24h		48h	
			Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Glutaraldehído 2.2%	10 min	4	4	-	4	-
	15 min	4	2	2	4	-
	30 min	4	2	2	4	-
	60 min	4	2	2	2	2
	10 h	4	-	4	-	4
	12 h	4	-	4	-	4
Hipoclorito de Sodio 2.5%	5 min	4	-	4	-	4
	10 min	4	-	4	-	4
	15 min	4	-	4	-	4

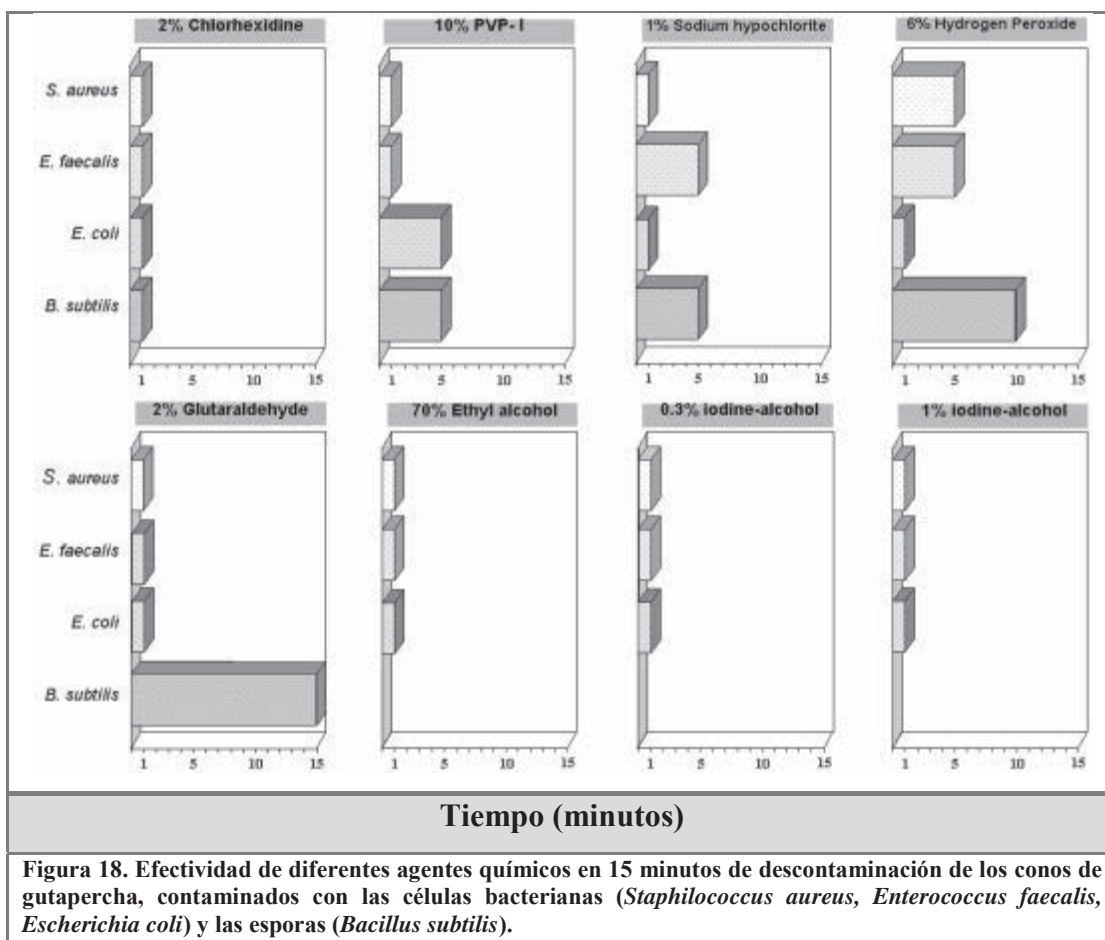
*Número de tubos que contenían 10 conos de gutapercha sumergidos en un medio de tioglicolato.

Tabla 14. Evaluación de los conos de gutapercha almacenados.

Método de almacenamiento	n*	Periodos de Observación			
		24 h		48 h	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Con Paraformaldehído	4	-	4	-	4
Sin Paraformaldehído	4	-	4	-	4

*Número de tubos que contenían 12 conos de gutapercha sumergidos en medio tioglicolato.

Cardoso y cols. 2000 Evaluaron y compararon la eficacia de 4 agentes químicos en la descontaminación de conos de gutapercha contaminados previamente con saliva y *Enterococcus faecalis* (Figura 18). Los agentes químicos evaluados fueron: NaOCl 1%, CHX 2%, iodopovidona (PVP-I) 10% y solución salina 0.9% (grupo control). Los conos se sumergieron en las soluciones por periodos de tiempo de 1 a 10 minutos. Luego de realizar el procedimiento de desinfección, los conos se incubaron en infusión cerebro corazón (BHI), la presencia de crecimiento bacteriano se analizó con turbidimetría del medio (Tabla 15). Obteniendo como resultados que: el sumergir los conos de gutapercha en CHX 2% por 1 minuto, es un método efectivo para la desinfección de los conos de gutapercha, mientras que, se necesitan más de 10 minutos de inmersión en PVP-I 10%, y NaOCl 1% para desinfectar los conos.



Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

Tabla 15. Log₁₀ de la media de dos determinaciones¹ cuentas viables de los experimentos de transporte control 1 a 4.

Agentes Químicos	S. aureus Experimento #1		E. coli Experimento #2		E. Faecalis Experimento #3		B. subtilis Experimento #4	
	Transporte ²	Control ³	Transporte	Control	Transporte	Control	Transporte	Control
2% CHX	5.23	5.18	5.85	5.84	5.07	5.20	3.56	3.70
1% NaOCl	5.25	5.33	5.35	5.26	5.64	6.03	3.78	3.88
10% PVP-I4	5.14	5.18	5.63	5.70	4.79	4.62	2.66	2.82
6% Peróxido de H	5.36	5.30	6.73	5.87	5.12	5.05	3.56	3.52
2% Glutaraldehído	5.03	5.22	4.70	4.36	5.79	5.53	3.46	3.44
70% Alcohol Etilico	5.17	5.10	5.53	5.51	5.20	5.26	3.34	3.65
0.3% Alcohol Yodo	4.46	4.49	5.38	5.30	4.81	4.86	3.38	3.50
1% Alcohol Yodo	5.22	5.35	5.93	5.57	5.52	5.11	3.45	3.06

1. Cuenta en triplicado. Técnica de colocación en plato (Miles et al., 1938).
2. Cono contaminado más cono tratado con agente químico.
3. Cono contaminado tratado con solución salina estéril.
4. PVP-I 10% (con Yodo activo 1%).

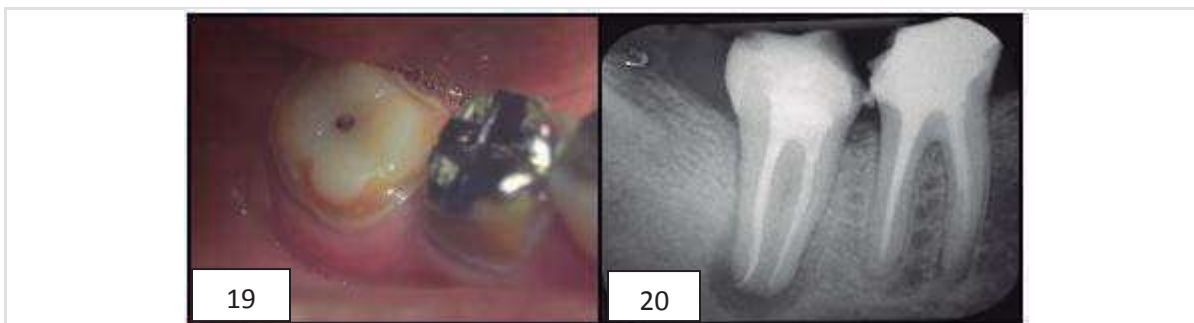
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Prevenir la contaminación del sistema de conductos radiculares es un aspecto sumamente importante de la terapia endodóntica.

Los procedimientos endodónticos, involucran un esfuerzo considerable en la remoción de los microorganismos que ya están presentes en el interior de los conductos radiculares.

En la práctica clínica, el dentista ocasionalmente se enfrenta a infecciones que ocurren luego de la obturación del espacio del conducto radicular (Valois y cols. 2005). La contaminación puede ocurrir por utilizar instrumentos endodónticos impropriamente esterilizados, ó por introducir conos de gutapercha contaminados al interior del conducto. Por ello es importante que el clínico no solo se preocupe de la flora microbiana oral endógena, sino que también ponga atención de la contaminación bacteriana exógena (Gomes y cols. 2005).

La literatura internacional posee amplios estudios que avalan la importancia de desinfectar los conos de gutapercha, que serán utilizados para realizar la obturación del sistema de conductos, pues estos, luego de la apertura de su selle hermético, se ven contaminados por diversos microorganismos, que pueden ser un factor etiológico importante en la persistencia de una periodontitis apical (Figuras 19, 20).



Figuras 19, 20. Imagen clínica y radiográfica de segundo molar inferior derecho, con diagnóstico de periodontitis apical crónica persistente. Evaluación 20 meses posteriores a la realización del tratamiento de conductos.

http://www.carlosboveda.com/Odontologosfolder/odontoinvitadoold/odontoinvitado_41.htm

De acuerdo a los resultados de dichos estudios aún no es concluyente cuál es la concentración, y tiempo de sumersión ideal, del material de obturación, en las sustancias

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

químicas utilizadas para este propósito, puesto que cada investigador refiere diferentes recomendaciones (Tabla 16).

Tabla 16. Estudios clínicos que han evaluado la desinfección de los conos de gutapercha con diversas soluciones químicas.

AUTOR Y AÑO	SUSTANCIA RECOMENDADA	TIEMPO DE CONTACTO CON LA GUTAPERCHA	MICROORGANISMO
Lanzagorta Rebollo y cols. 2006	CHX 0.12% igual de efectivo que el NaOCl al 6%	1 minuto	Cocos y Bacilos Gram + (aislados de las puntas de gutapercha).
de Almeida Gomes y cols. 2005	NaOCl 5.25%	1 minuto	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Streptococcus sanguis</i> , <i>Staphilococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Bacillus subtilis</i> (inoculados en las puntas de gutapercha).
da Motta y cols. 2001	NaOCl 2.25%	5 minutos	<i>Bacillus Stearothermophilus</i> (inoculados en las puntas de gutapercha).
Cardoso y cols. 2000	CHX 2%	1 minuto	<i>S. faecalis</i> (inoculados en las puntas de gutapercha).
Cardoso y cols. 1999	NaOCl 1% , 0.5%	1 y 5 minutos respectivamente	<i>Staphilococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> (inoculados en las puntas de gutapercha).
Siqueira y cols. 1998	NaOCl 5.25%	1 minuto	<i>Bacillus subtilis</i> (inoculados en las puntas de gutapercha).

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

Cardoso y cols. 1998	Glutaraldehido	15 minutos	<i>Bacillus subtilis</i> (inoculados en las puntas de gutapercha).
Frank y Pelleu 1983	NaOCl 5.25%	1 minuto	<i>Bacillus subtilis</i> (inoculado en las puntas de gutapercha).
Senia y cols. 1975	NaOCl 5.25%	1 minuto	<i>Staphilococcus epidermidis</i> , <i>Corinebacterium xerosis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> , y <i>Bacillus subtilis</i> (inoculados en las puntas de gutapercha).

Por lo anteriormente citado, podemos concluir que en la actualidad no existe ningún protocolo establecido para la desinfección de los conos de gutapercha. Esto puede deberse a que en su metodología experimental, gran parte de los artículos científicos que abordan el tema, utilizan conos de gutapercha a los que se les han inoculado, de manera artificial, especies bacterianas que por sí mismas no podrían crecer sobre la superficie de estos conos, y que además son resistentes, o de difícil erradicación para varias de las sustancias desinfectantes disponibles en el mercado.

3.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Qué índice de sensibilidad se presentará en cepas bacterianas provenientes de conos de gutapercha contaminados, al confrontarse con las soluciones químicas: NaOCl 2.5%, NaOCl 5.25%, Digluconato de Clorhexidina 2%, Glutaraldehido 2% y alcohol etílico 70%, comúnmente utilizadas como desinfectantes de estos materiales de obturación?

4. JUSTIFICACIÓN:

Uno de los objetivos principales de la terapia endodóntica es el eliminar o reducir significativamente a los microorganismos del conducto radicular a través de una apropiada preparación químico-mecánica, pero se debe tener cuidado y prevención durante este procedimiento, para que el instrumental y material de obturación no se contaminen y se produzca una infección cruzada (Montgomery, 1971).

Actualmente, se reconoce ampliamente en la práctica endodóntica, la importancia de realizar una rápida descontaminación de los conos de gutapercha, durante el tratamiento endodóntico, para no romper la cadena de asepsia, factor esencial en el éxito de la terapia endodóntica (Cardoso y cols. 1999).

Ya que la gutapercha es un material termoplástico, los conos fabricados de este material para obturación del espacio radicular, pueden verse dañados al ser sometidos a los métodos estandarizados de esterilización a altas temperaturas, por este motivo, los dentistas recurren a los métodos químicos para mantener la cadena de asepsia (Frank & Pelleu, 1983).

La literatura no contiene la información suficiente, de datos, relacionados con experimentos controlados, que avalen el uso de agentes de esterilización, seleccionados para la descontaminación de los conos de gutapercha. Los investigadores han recomendado el uso de múltiples agentes. Y los tiempos recomendados de contacto entre los conos de gutapercha con estos agentes varían de una simple acción de limpieza, a un continuo almacenamiento (Senia y cols. 1975).

Debido a que los resultados de las investigaciones internacionales consultadas, muestran una amplia variabilidad en cuanto a cual es la concentración ideal de la solución desinfectante, y cuál es el tiempo apropiado de inmersión de los conos de gutapercha para una correcta desinfección, Gómez Silva Y. C.D. estudiante de la especialidad en endodoncia de la UMSNH, en el 2010 aplico una encuesta, para conocer los medios de desinfección de los conos de gutapercha, que están siendo utilizados en México.

ENCUESTA APLICADA A C.D. PARA CONOCER LOS MÉTODOS DE DESINFECCIÓN QUE UTILIZAN PARA SANITIZAR LOS CONOS DE GUTAPERCHA.

Se aplicó la encuesta a 50 cirujanos dentistas especialistas en endodoncia, y cirujanos dentistas que realizan tratamientos endodónticos de forma regular en su práctica clínica, provenientes de diversos estados de la República Mexicana, con el fin de conocer los métodos de desinfección (soluciones desinfectantes) que utilizan para sanitizar los conos de gutapercha, antes de realizar (con ellos) la obturación del espacio de los conductos radiculares, concluyéndose que la sustancia más utilizada en México para este propósito es el NaOCl (82% de la población encuestada) a concentraciones de 5.25% (58% de la población) y 2.50% (24% de la población).

La mayoría de los artículos científicos coinciden en que el NaOCl al 5.25% es la solución desinfectante más eficaz para realizar la sanitización de los conos de gutapercha, y que basta 1 minuto de contacto entre esta solución y la gutapercha, para eliminar, incluso, las esporas bacterianas. Sin embargo, estos mismos artículos son realizados utilizando conos de gutapercha inoculados con especies bacterianas, que por sí mismas, no se encuentran sobre este tipo de material y que son usualmente de difícil erradicación. Más que esto, Valois y col. en el 2005 demostraron, a través de la microscopía de fuerza atómica, que la exposición de la gutapercha por un minuto al NaOCl 5.25% causa cambios estructurales en su elasticidad. Es por esto, que en este estudio, decidimos investigar que especies bacterianas son capaces de contaminar de forma natural las puntas de gutapercha dentro de una clínica endodóntica, comprobando además, que efecto tienen las soluciones desinfectantes usadas en México sobre dichas bacterias.

5. HIPÓTESIS:

5.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO.

H_T: Los microorganismos aislados de los conos de gutapercha, mostrarán una mayor sensibilidad ante la solución química desinfectante CHX 2% (G1) respecto a NaOCl 2.5% (G2), NaOCl 5.25% (G3), Glutaraldehido 2% (G4), Alcohol etílico 70% (G5).

$$H_T: G1 > G2 = G3 = G4 = G5$$

5.2 HIPÓTESIS NULA.

H₀: La sensibilidad de los microorganismos aislados de los conos de gutapercha ante las soluciones químicas desinfectantes: CHX 2% (G1), NaOCl 2.5% (G2), NaOCl 5.25%(G3), Glutaraldehido 2% (G4), Alcohol etílico 70% (G5), será estadísticamente igual.

$$H_0: G1 = G2 = G3 = G4 = G5$$

6. OBJETIVOS:

6.1 OBJETIVO GENERAL.

El objetivo del presente estudio consistió en determinar la sensibilidad de cepas bacterianas aisladas de conos de gutapercha, ante las soluciones químicas: NaOCL 5.25%, NaOCl 2.5%, CHX 2%, Glutaraldehido 2%, y Alcohol etílico 70%.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

6.2.1 Valorar la uniformidad de la superficie estructural de los conos de gutapercha, mediante la observación de imágenes obtenidas con el microscopio electrónico de barrido.

6.2.2 Aislamiento de microorganismos a partir de 40 conos de gutapercha número 45 expuestos al medio ambiente de la clínica del posgrado de endodoncia U.M.S.N.H. por 30 minutos.

6.2.3 Realizar la taxonomía de los microorganismos aislados.

6.2.4 Determinar que géneros y especies de los microorganismos aislados son capaces de formar una película de biofilm.

6.2.5 Determinar la sensibilidad que presentan los microorganismos aislados de las puntas de gutapercha frente a las soluciones químicas desinfectantes: NaOCl 2.5%, NaOCl 5.25%, Digluconato de Clorhexidina 2%, Glutaraldehido 2% y alcohol etílico 70%.

7. MATERIAL Y MÉTODOS:

7.1 DEFINICIÓN DEL UNIVERSO DE ESTUDIO.

El tamaño de la muestra se determinó a través de una muestra no probabilística por cuota que consistió en 40 conos de gutapercha número 45 para aislamiento e identificación de especies bacterianas.

7.2 CRITERIOS DE ELEGIBILIDAD.

7.2.1 Criterios de inclusión:

Conos de gutapercha nuevos, extraídos directamente del empaque en el momento del desarrollo de la fase experimental.

Conos de gutapercha número 45.

Conos de gutapercha cuya fecha de caducidad no esté vencida.

Conos de gutapercha marca Hygenic.

7.2.2 Criterios de no inclusión:

Conos de gutapercha contenidos en empaques abiertos.

Conos de gutapercha que no correspondan al número 45.

Conos de gutapercha cuya fecha de caducidad este vencida.

Conos de gutapercha que no correspondan a la marca Hygenic.

7.3 CLASIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

El estudio se realizó en 40 conos de gutapercha para aislamiento e identificación de especies bacterianas, se utilizaron 18 cajas de Agar Mueller Hinton para valoración de la capacidad desinfectante de las soluciones NaOCl 5.25%, NaOCl 2.5%, CHX 2%, Glutaraldehido 2%, Alcohol Etilico 70%, Agua Bidestilada (Grupo Control), cada caja contenía una de las 9 cepas aisladas (análisis por duplicado).

PROSPECTIVO: Las muestras se incluyeron antes de presentarse el evento de interés.

LONGITUDINAL: Debido a que las cepas bacterianas, aisladas de los conos de gutapercha, se analizaron antes y después de ser sometidas al contacto con las diferentes soluciones químicas empleadas en este estudio.

COMPARATIVO: Ya que las cepas bacterianas se dividieron en varios grupos y se sometieron al contacto con diversas soluciones químicas.

EXPERIMENTAL: Puesto que el investigador tuvo una participación activa en el desarrollo de este estudio.

7.4 METODOLOGÍA.

7.4.1 Primer ensayo microbiológico:

En el laboratorio de análisis clínicos de la Facultad de Veterinaria U.M.S.N.H. se evaluó la contaminación de conos de gutapercha, luego de que el selle hermético de su empaque ha sido abierto. El estudio consistió en tomar cuatro conos de gutapercha de diversos diámetros (40, 35, 25, 20), directamente de un empaque de reciente apertura, estos fueron extraídos de su caja con pinza estéril y se colocaron en el medio de cultivo: Caldo Soya Tripticaseina, incubándose por 48 horas a 37°C. Posteriormente se tomaron muestras de este caldo y se inocularon en placas de Gelosa Sangre de Borrego. Los resultados del ensayo, indicaron la ausencia de crecimiento bacteriano.

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

7.4.1.1 Microscopía:

Posteriormente en coordinación con la Facultad de Metalúrgica U.M.S.N.H. los mismos conos que habían sido previamente analizados en la Facultad de Veterinaria U.M.S.N.H. se sometieron a un baño de plata (Fig. 21) para ser observados con el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) (Fig. 22), con la finalidad de observar la superficie de las puntas de gutapercha e identificar la presencia o ausencia de microorganismos (en la superficie se notaron varias irregularidades y grietas, así como presencia de algunas formas cocoides Figuras 23, 24, 25).

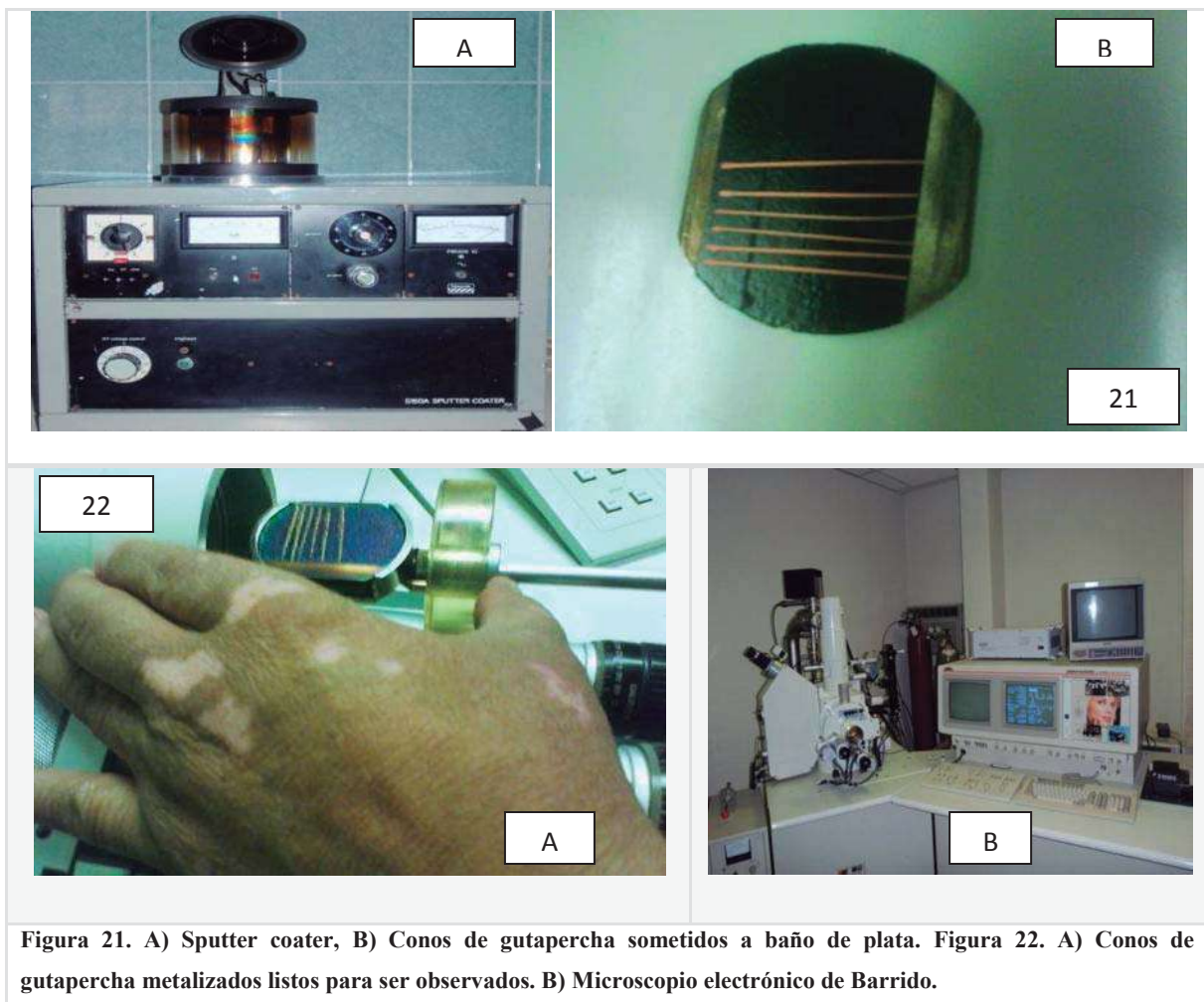
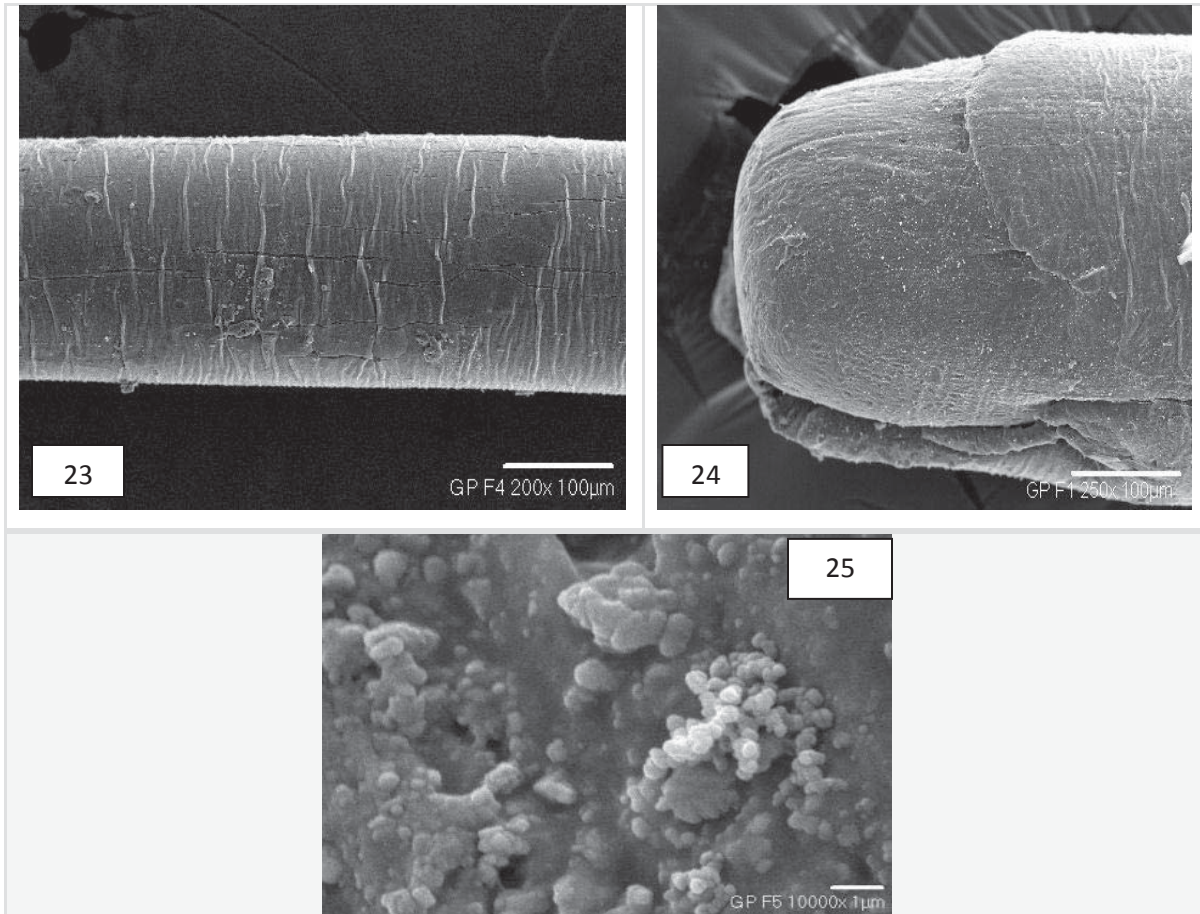


Figura 21. A) Sputter coater, B) Conos de gutapercha sometidos a baño de plata. Figura 22. A) Conos de gutapercha metalizados listos para ser observados. B) Microscopio electrónico de Barrido.

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

Se obtuvo una serie de imágenes a escala de 200X, 250X, 10000X (Figuras 23, 24 y 25 respectivamente) (Anexos Figuras 88-106).



Figuras 23, 24, 25. Conos de gutapercha observados con microscopía electrónica de barrido (MEB).

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

7.4.2 Segundo ensayo microbiológico:

7.4.2.1 ETAPA I. EXPOSICIÓN DE LOS CONOS DE GUTAPERCHA AL MEDIO AMBIENTE DE LA CLÍNICA DE ENDODONCIA C.U.E.P.I.

Se preparó caldo de infusión cerebro corazón (BHI) en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Químico-Farmacobiología U.M.S.N.H. (QFB-UMSNH) según las especificaciones del fabricante (Figuras 26, 27 y 28).



Figuras 26, 27 y 28. Preparación de la infusión cerebro corazón BHI según las especificaciones del fabricante.

Posteriormente en 10 tubos de ensayo con tapón de rosca se distribuyeron los 40mL de BHI, colocando 4mL en cada tubo por medio de una pipeta graduada de 10mL, finalmente en autoclave, a una presión de 15 libras y 121°C durante 15 minutos, se esterilizaron dichos tubos junto con 20 portaobjetos y 2 pinzas de curación (Figuras 29, 30, 31 y 32).

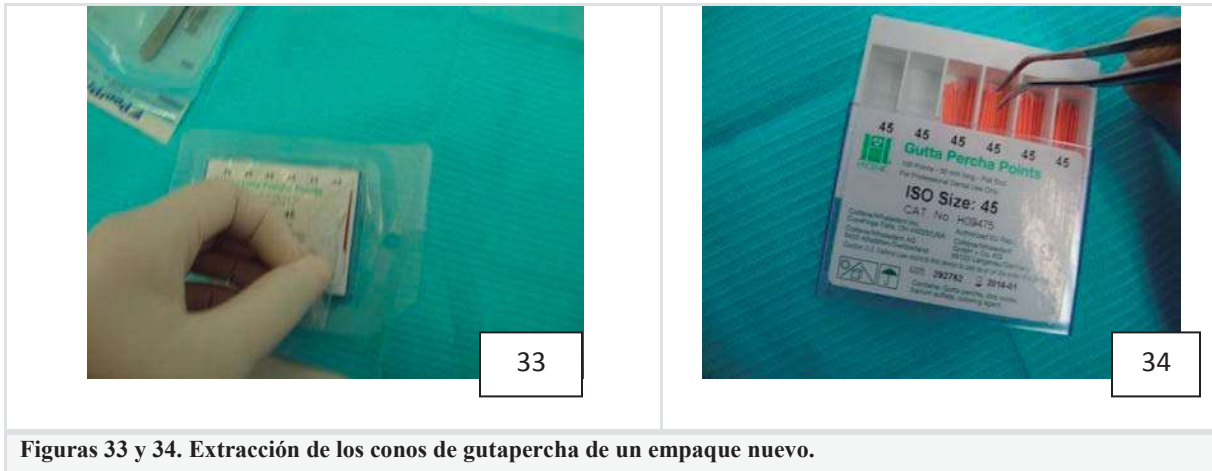


Figuras 29, 30, 31. Distribución y esterilización del BHI en 10 tubos de ensayo. Figura 32 portaobjetos y pinzas de curación esterilizados.

Se tomaron 40 conos de gutapercha (no.45) con pinza de curación estéril, de un empaque de reciente apertura, se distribuyeron en 20 portaobjetos estériles, colocando 4 puntas de

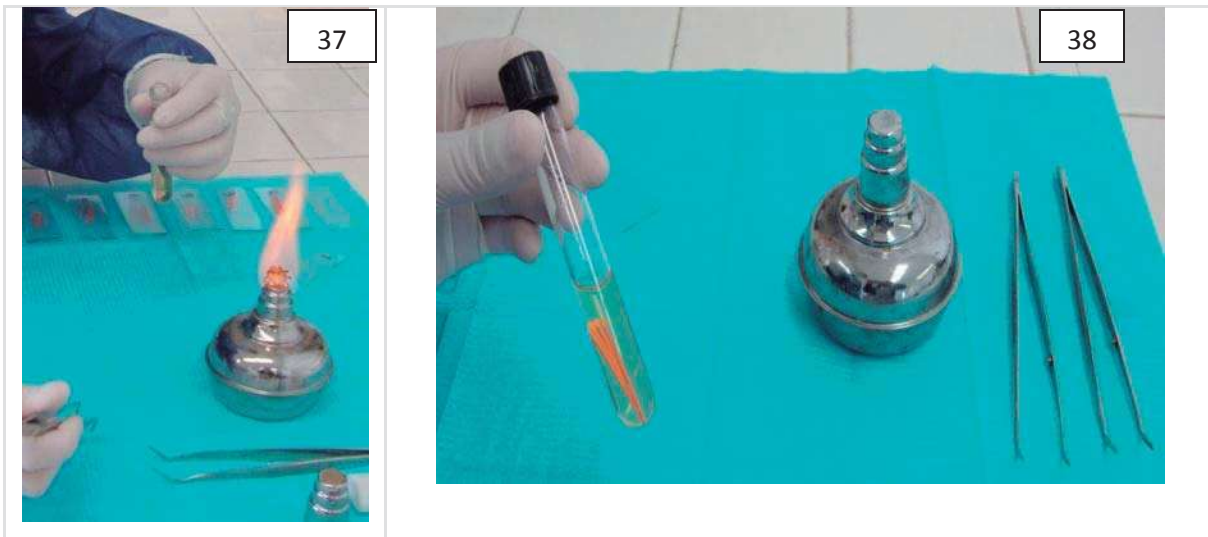
Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

gutapercha en 2 portaobjetos por cada grupo (Figuras 33 y 34), posteriormente se depositaron los dos portaobjetos con las cuatro puntas sobre cada una de las mesas de trabajo de los 10 residentes de la clínica de Endodoncia del Centro Universitario de Estudios de Posgrado e Investigación (C.U.E.P.I.), dejando los conos expuestos al medio ambiente de la clínica por 30 minutos (Figuras 35 y 36).



Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

Posteriormente por medio de una lámpara de alcohol se mantuvo un espacio estéril para colocar los conos de gutapercha en sus correspondientes 10 tubos con 4mL de BHI (Figuras 37 y 38).



Figuras 37 y 38. Colocación de los conos de gutapercha en los tubos preparados con BHI.

A continuación los tubos de ensayo fueron transportados a la Facultad de QFB, UMSNH, para ser incubados a 37°C por 24h (Figuras 39 y 40).



Figuras 39 y 40. Tubos de ensayo colocados en la incubadora de la Facultad de QFB.

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

7.4.2.2 ETAPA II. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES BACTERIANAS CAPACES DE CONTAMINAR LOS CONOS DE GUTAPERCHA.

La etapa II se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de QFB-UMSNH en coordinación con el Q.F.B. Ricardo Giovanni Soria Herrera y la Q.F.B. Karla Gabriela Domínguez González, responsables del cepario-colección y personal docente de la facultad de QFB-UMSNH.

Una vez incubados los tubos, se verificó la turbidimetría de los caldos BHI (Figura 41) en comparación con el nefelómetro de McFarland (0.5, 1, 2).

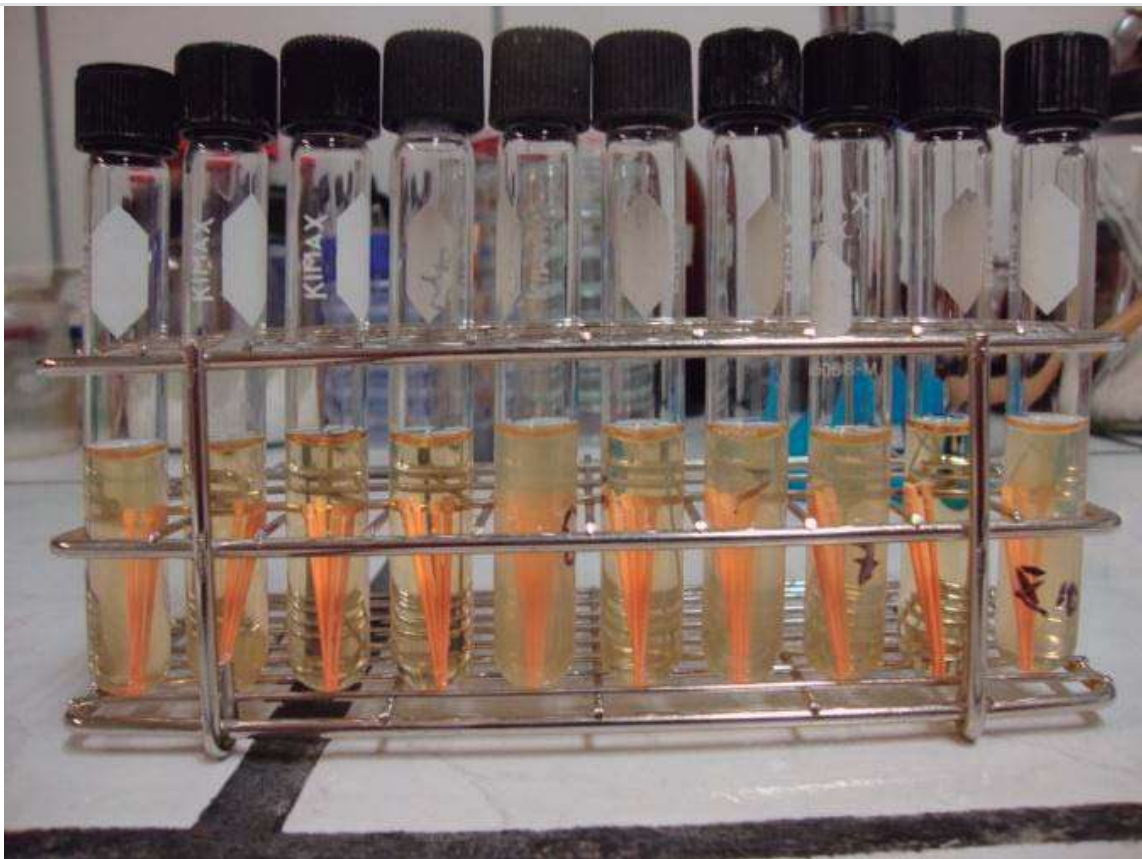


Figura 41. Tubos de ensayo luego de haber sido incubados por 24h, nótese la turbidez de algunos de los 10 tubos.

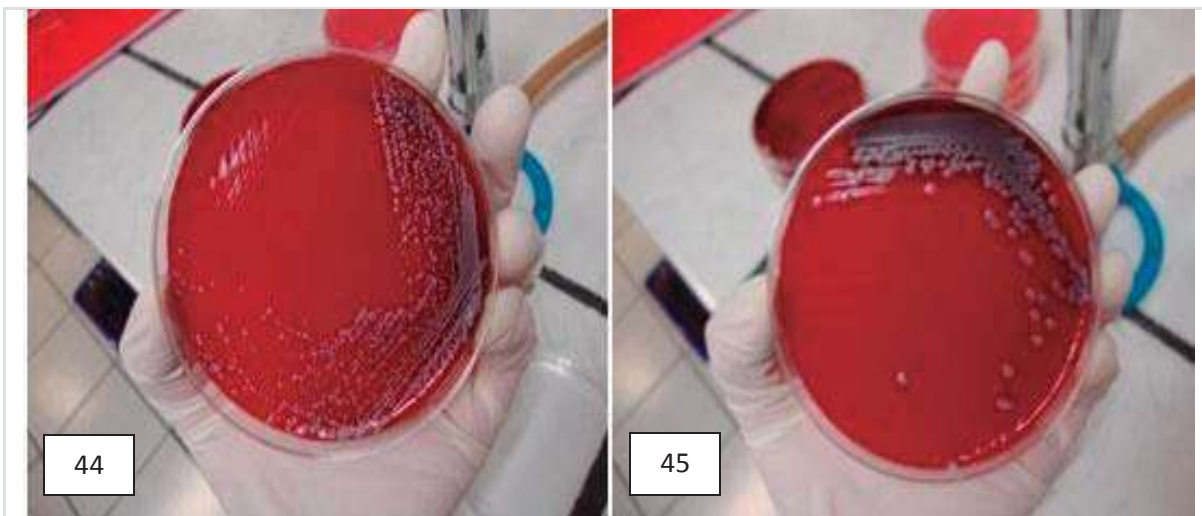
Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

Se tomaron muestras de los 10 tubos de ensayo que contenían las puntas de gutapercha y se cultivaron en 10 placas con medio Gelosa Sangre de Borrego (SB) y 10 placas con Gelosa Sal y Manitol (SM), mediante estría continua y se dejaron incubar a 37°C por 24h (Figuras 42 y 43).



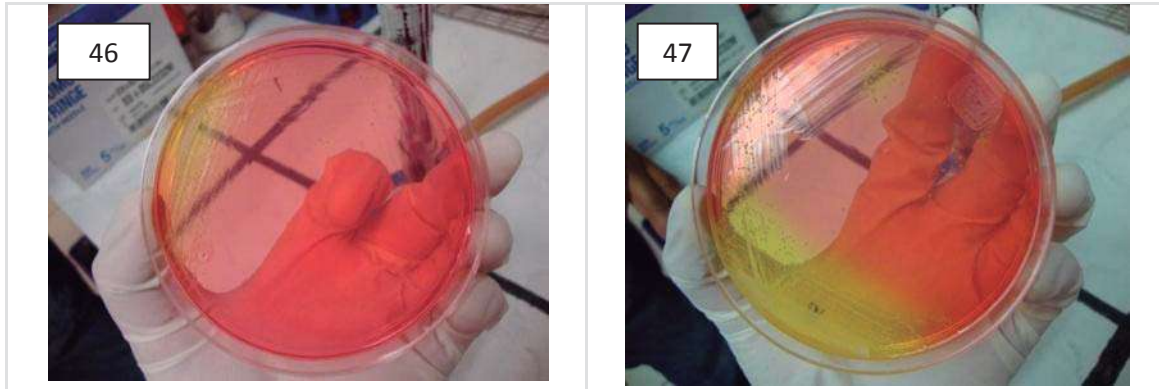
Figuras 42 y 43. Cultivo en placas SB y SM mediante estría continua e incubación.

Se tomaron fotografías de las placas SB (Figuras 44 y 45), SM (Figuras 46 y 47) en las cuales existía crecimiento microbiano (Anexos Figuras 107-118).



Figuras 44 y 45 fotografías de algunas de las placas agar sangre de borrego que mostraron crecimiento bacteriano positivo luego de las 24h de incubación.

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

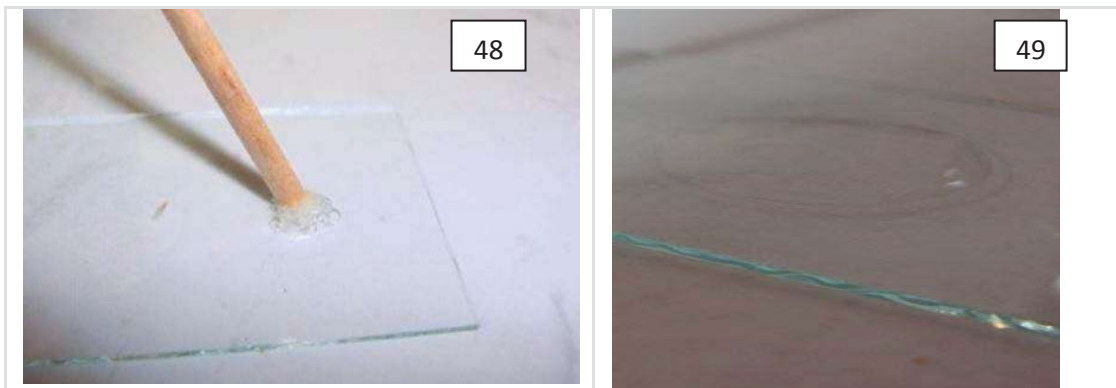


Figuras 46 y 47 fotografías de algunas placas agar sal manitol que mostraron crecimiento bacteriano positivo luego de las 24h de incubación.

Se descartaron las placas SM: III, IV, VII, VIII, y IX, y las placas SB: IV y VIII, ya que en ellas no hubo crecimiento de microorganismos.

De acuerdo a la capacidad de degradar los compuestos SM, o en su defecto SB, se anotó en la bitácora, la presencia de 2 cepas distintas en las placas Gelosa SM I y V, así como en la placa Gelosa SB X, se les dio el nombre de C1 (colonia 1) y C2 respectivamente, de igual forma para clasificarlos se antepuso el número de cepa y los componentes de la Gelosa (SB o SM), siendo: I SM C1, I SM C2, V SM C1, V SM C2, X SB C1, X SB C2.

Se dio inicio a las pruebas bioquímicas para identificar género y especie de los microorganismos encontrados, comenzando con la prueba de catalasa mediante el método de portaobjetos (Figuras 48 y 49), para descartar cepas del género *Streptococcus*. Esta prueba se realizó en un portaobjetos limpio, agregando una gota de peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) al 30% sobre una colonia pura (18-24h) de microorganismos.



Figuras 48 y 49 Prueba de catalasa positiva y negativa respectivamente.

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

Se realizaron tinciones de Gram a las diversas cepas aisladas con el objetivo de observar sus características morfológicas mediante microscopía óptica (Figuras 50 y 51. Anexos Figuras 119-127).

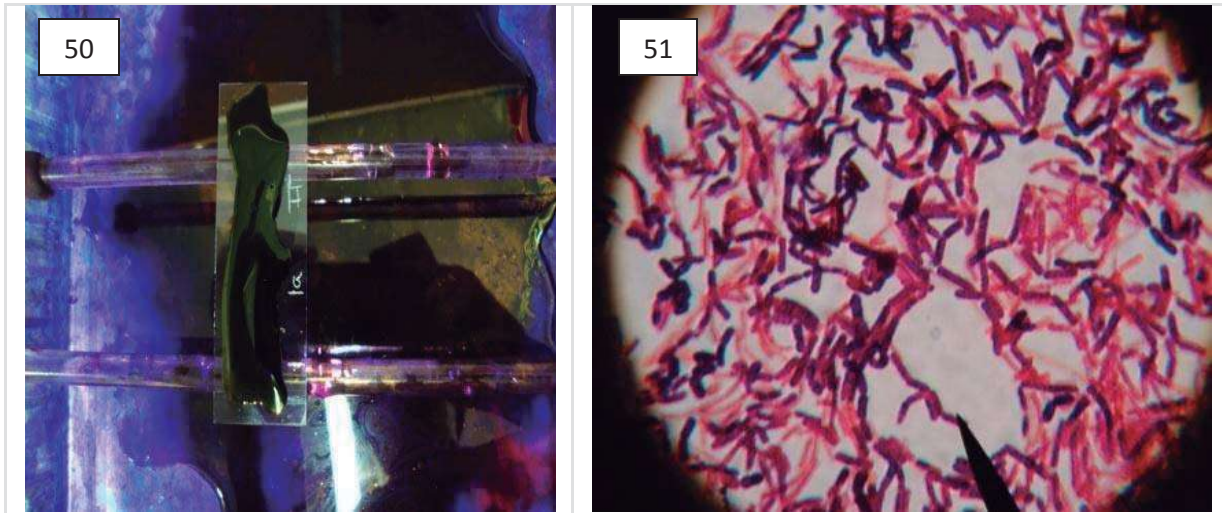
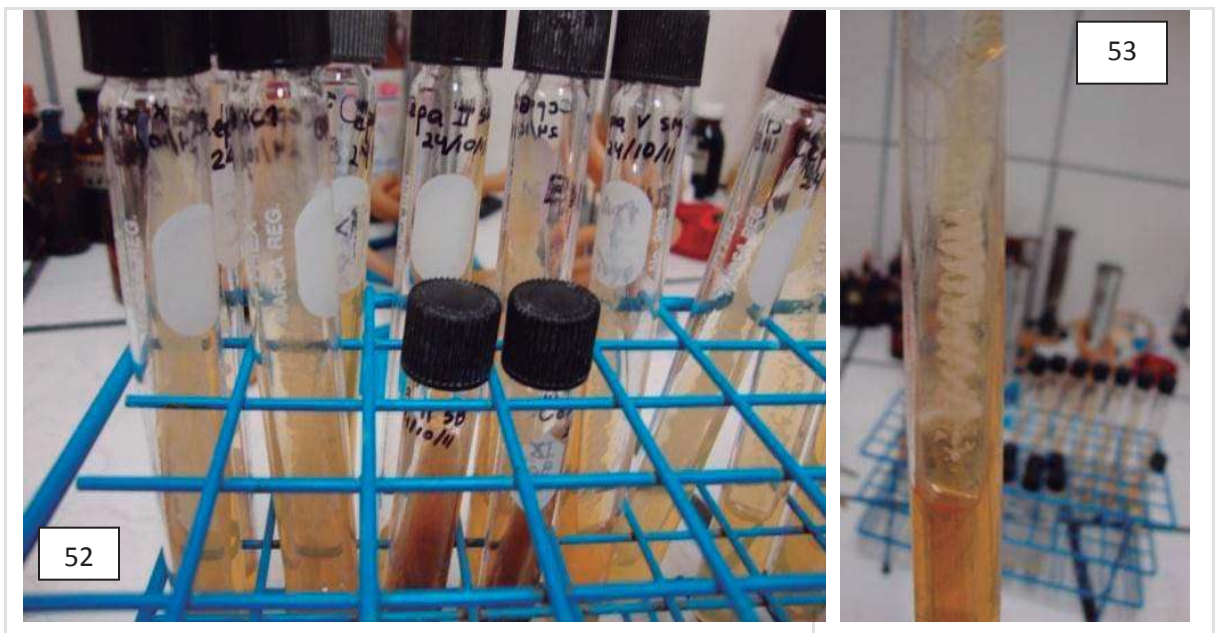


Figura 50. Tinción de Gram. Figura 51. Bacterias observadas bajo microscopía óptica.

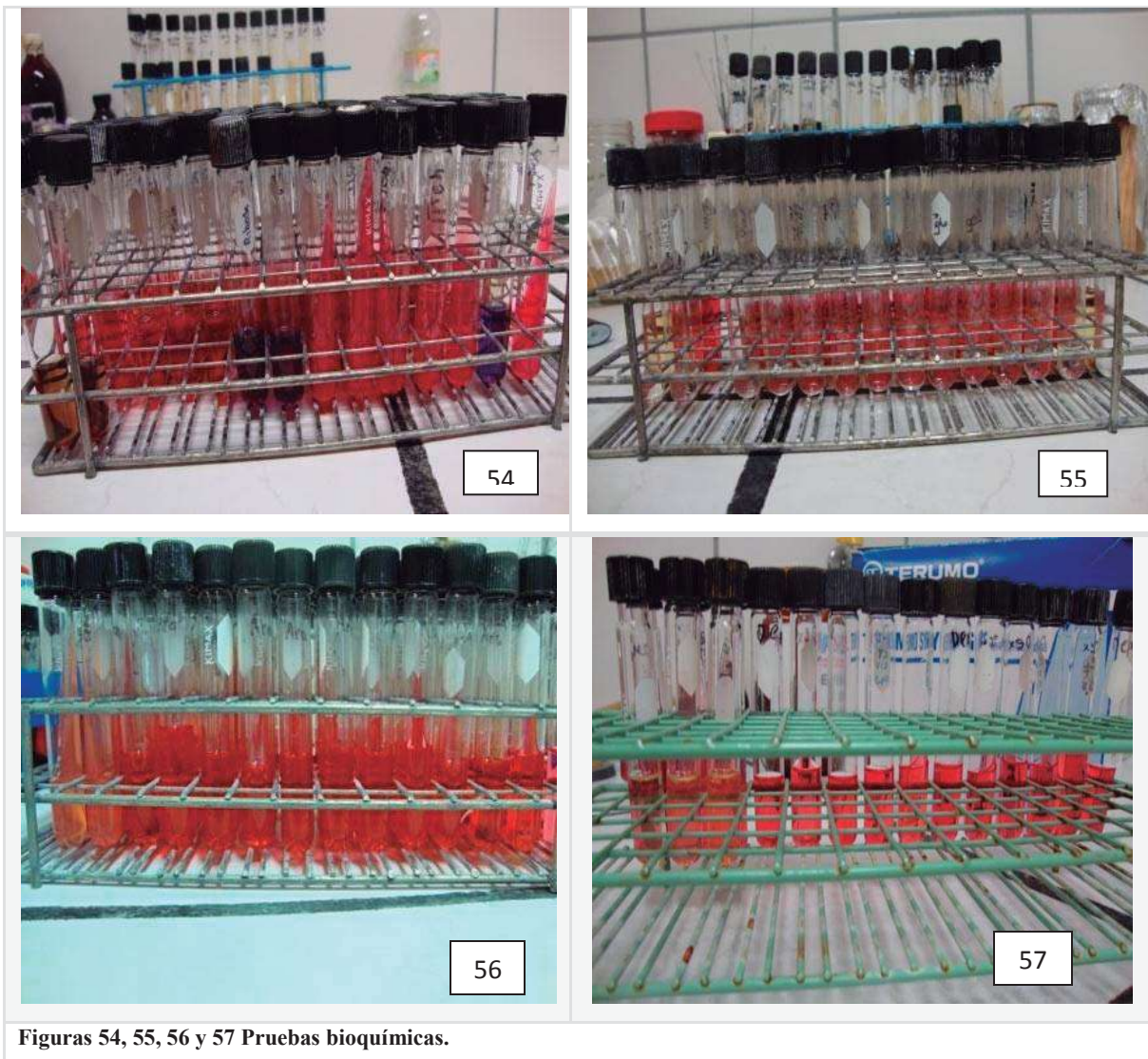
Se realizó una resiembra de las cepas contenidas en las placas Gelosa SM y SB en tubos de ensayo con Gelosa Soya Trypticaseina y Gelosa SB con la finalidad de mantener la viabilidad de las bacterias, dejándose incubar por 24h/37°C (Figuras 52 y 53).



Figuras 52 y 53. Resiembra de las cepas.

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

Luego de 24h, se tomaron muestras de los tubos con Gelosa Soya Trypticaseina y Gelosa SB, para realizar pruebas bioquímicas con los siguientes azúcares: **Manitol, arginina, manosa, sacarosa, glucosa, xilosa, treholosa, maltosa, lactosa, fructuosa, arabinosa** (Figuras 54, 55, 56, 57), dejándose incubar para obtener los resultados. Se sembraron las cepas en tubos de Gelosa Soya Trypticaseina para seguir disponiendo de, cepas jóvenes.

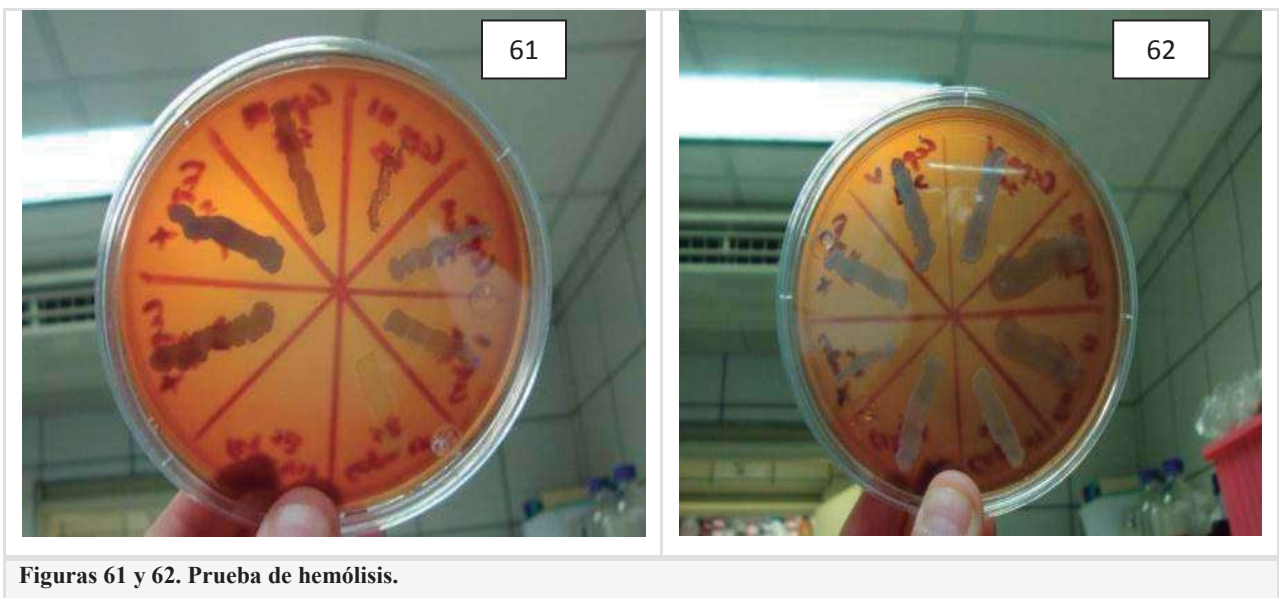
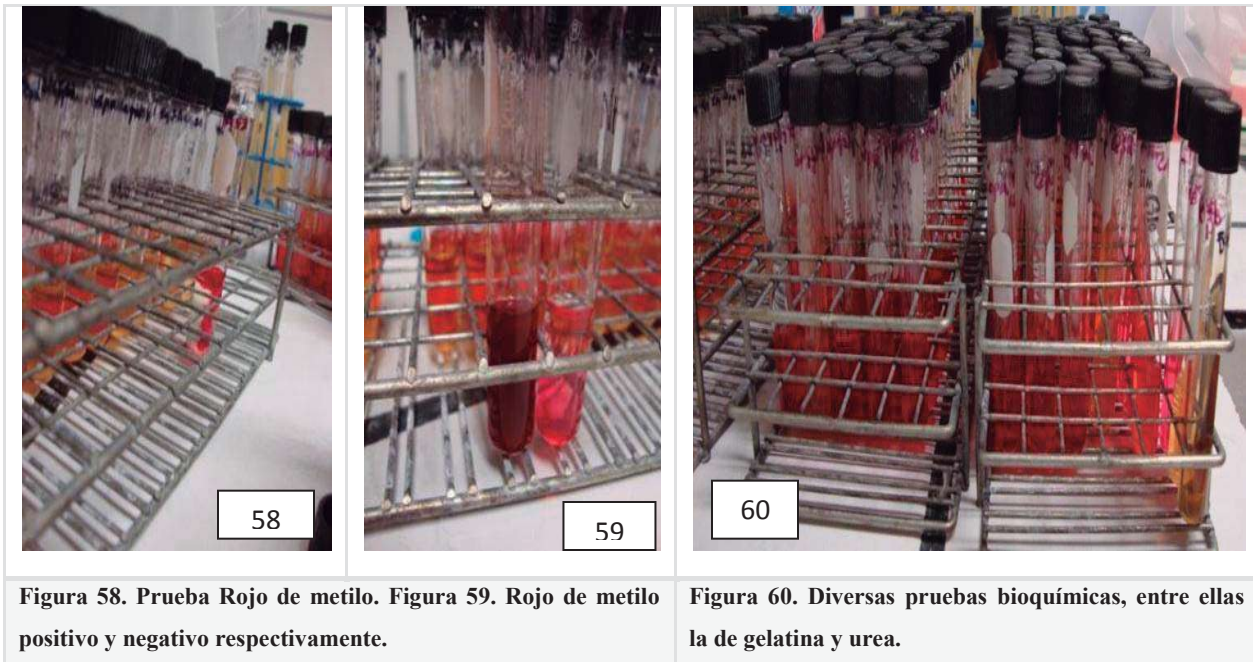


Figuras 54, 55, 56 y 57 Pruebas bioquímicas.

Además, se realizaron las siguientes pruebas: **Urea, nitratos, rojo de metilo** (Figuras 58 y 59) **gelatina y hemolisis** (Figura 60). Para esta última prueba, se utilizaron dos placas de Gelosa SB, las cuales fueron divididas en 8 celdas, en estas celdas se inocularon las

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

diversas cepas disponibles y se dejaron incubar para determinar cuáles de ellas eran capaces de degradar la sangre de cordero (Figuras 61 y 62).

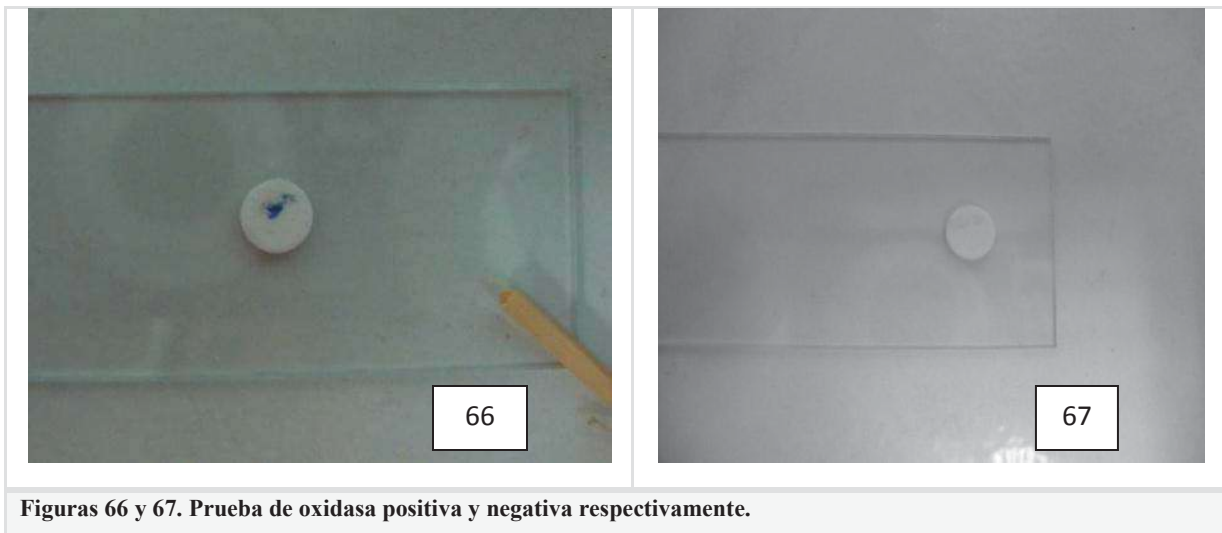


Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

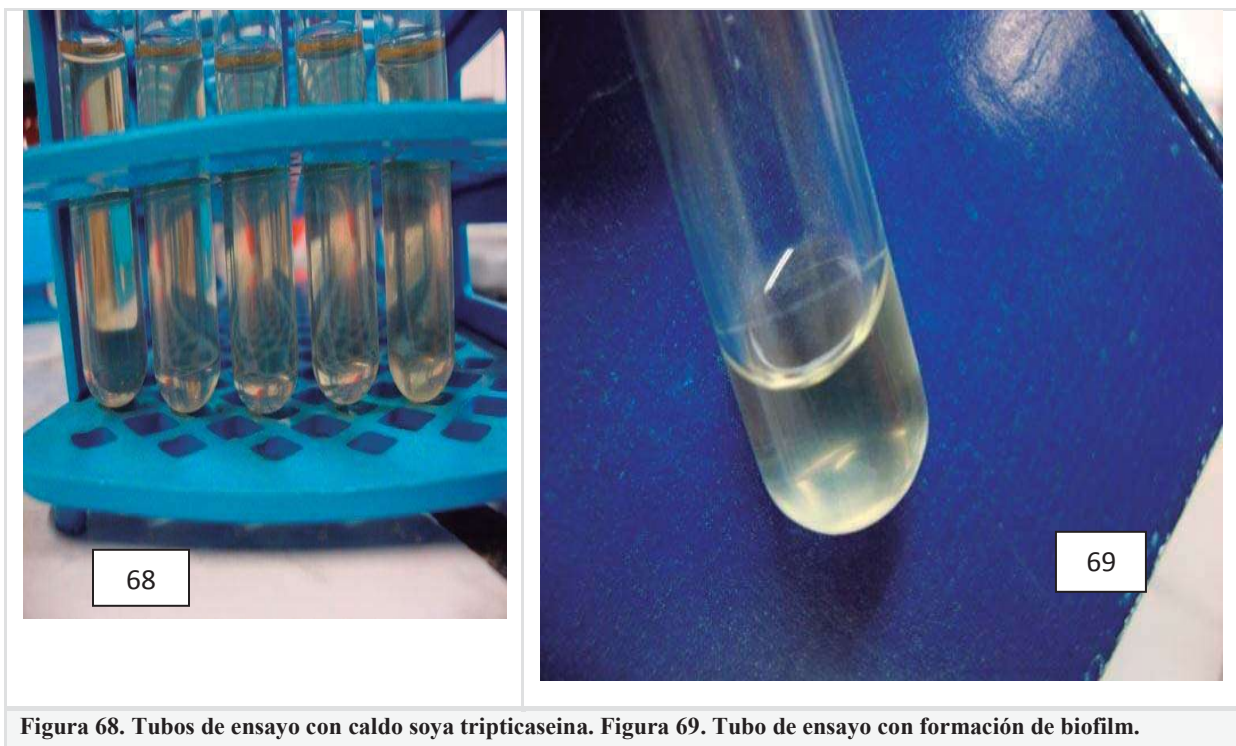
Se verificó la sensibilidad de las diversas cepas aisladas a los antibióticos: Novobiocina (NB) y Polimixina B (PB), en esta prueba, se usaron nueve placas de Gelosa Mueller Hinton (MH) divididas en cuatro celdas (Figura 63), colocando los discos de dichos antibióticos sobre las diversas celdas, directamente sobre las cepas y se dejaron incubar. De igual manera se realizó la prueba de sensibilidad a la Optoquina (P) en placas de Gelosa SB dividida en dos celdas (Figuras 64 y 65).



Se realizó la prueba de oxidasa (Figuras 66 y 67).



Posteriormente se realizó una prueba en medio CST (Caldo Soya Trypticaseina), para verificar si alguna de las cepas de microorganismos aislados de los conos de gutapercha, tenían la capacidad de producir biofilm (Figuras 68 y 69).



Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

7.4.2.3 ETAPA III: DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A SOLUCIONES QUÍMICAS DESINFECTANTES EN BACTERIAS AISLADAS DE LOS CONOS DE GUTAPERCHA.

Nuevamente se sembraron las cepas de las muestras SM y SB en tubos con Gelosa Soya Tripticaseina, dejándose incubar (24h/37°C).

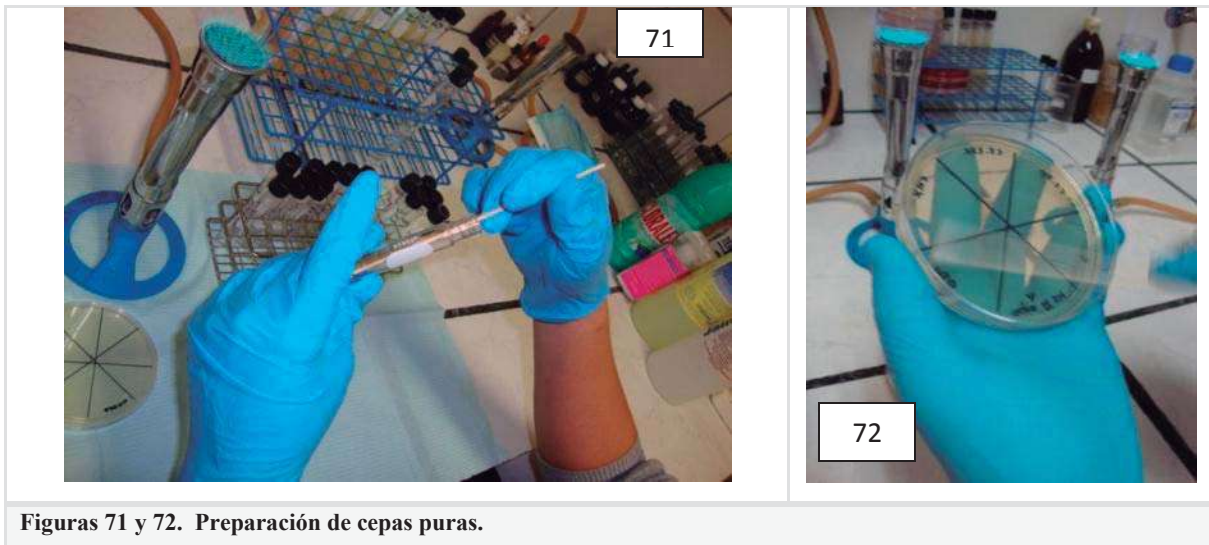
A continuación, se tomaron con asa estéril colonias de cada una de las cepas aisladas y se colocaron en tubos de ensayo con agua bidestilada estéril (una cepa por tubo), saturando dichos tubos de ensayo de acuerdo al tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland, con el fin de que todas las muestras mantuvieran el mismo grado de saturación de microorganismos (Figura 70).



Figura 70. Nefelómetro de Mc.Farland 0.5

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

Tomando muestras de los tubos saturados con microorganismos según el 0.5 del nefelómetro de McFarland, se estriaron placas con Gelosa MH, (cada placa contenía una sola cepa de microorganismo), las placas previamente habían sido divididas en 6 celdas, cada celda recibiría una de las diversas soluciones químicas desinfectantes propuestas para este estudio experimental (Figuras 71 y 72).



Se prepararon las soluciones químicas desinfectantes a las concentraciones establecidas para este estudio, a partir de las soluciones puras (Figuras 73, 74, 75 y 76), para establecer la concentración correcta, se utilizó una pipeta graduada (Figura 77), y se utilizó como diluyente agua bidestilada estéril (Figura 78), que también fue utilizada como sustancia control durante los ensayos de sensibilidad.



Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

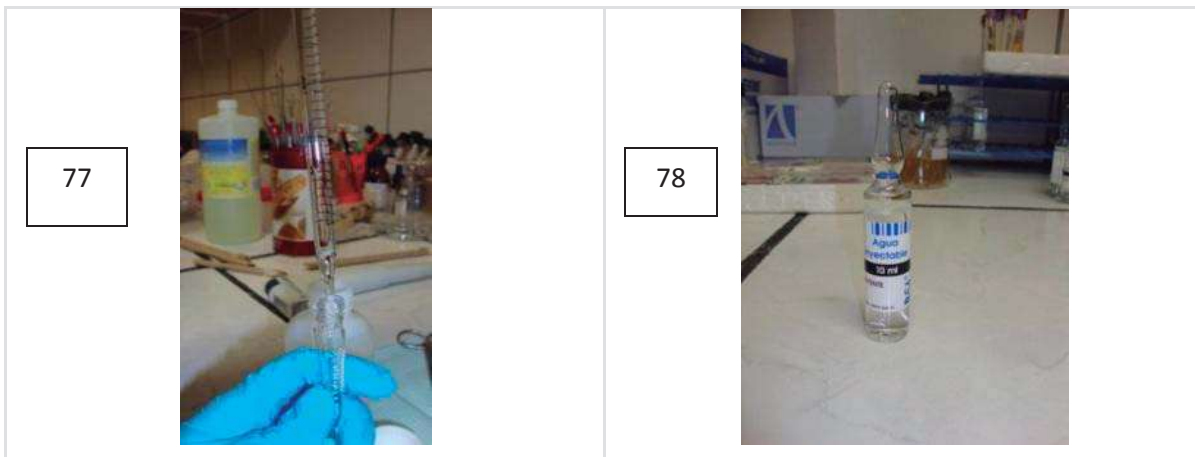
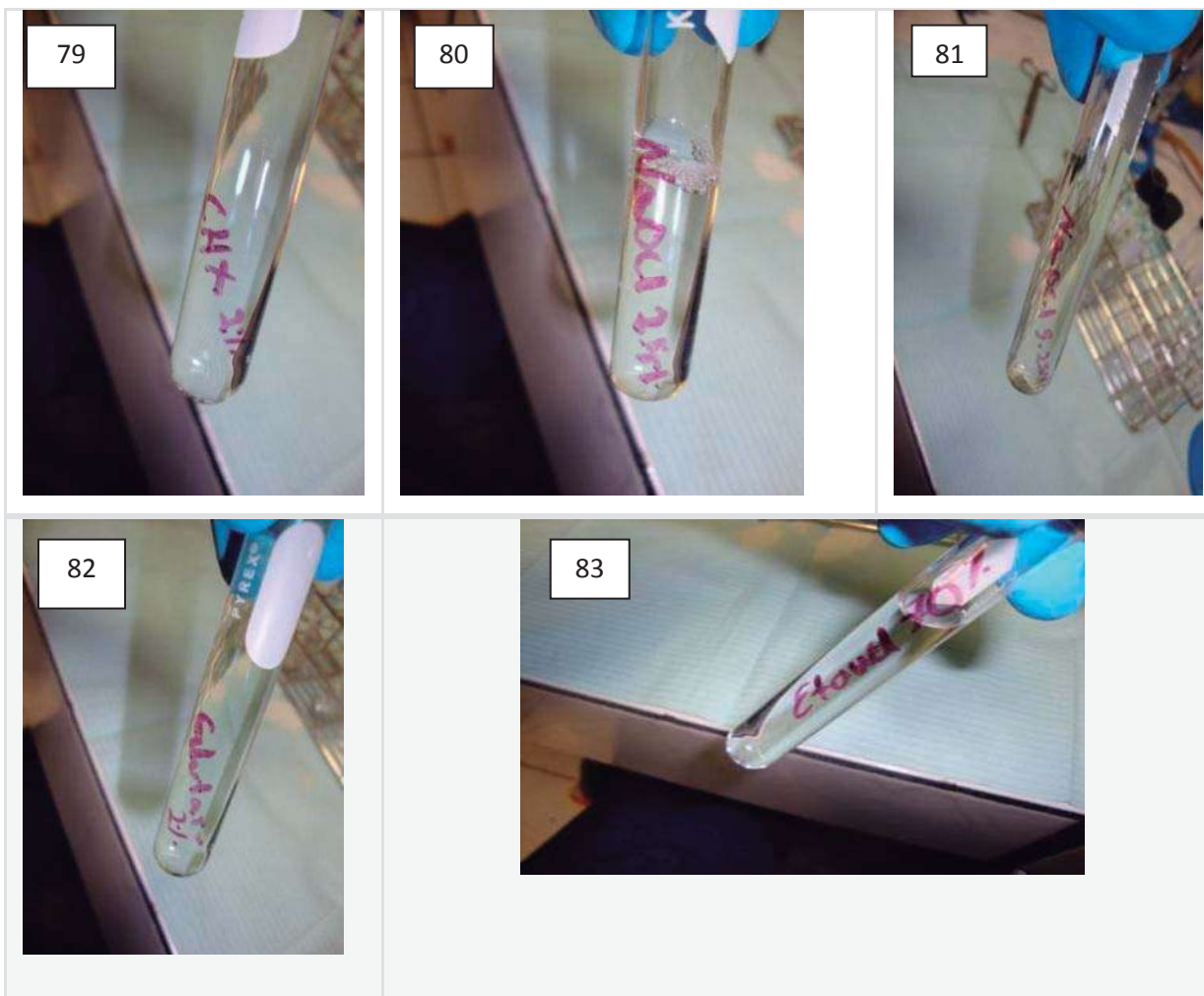


Figura 77. Pipeta graduada.

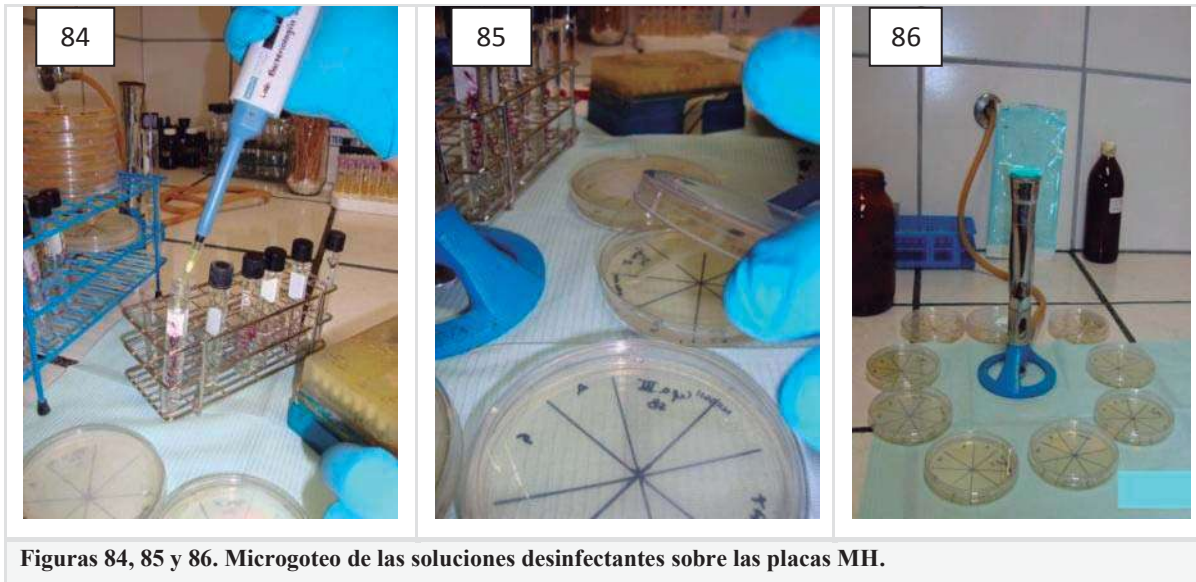
Figura 78. Agua bidestilada estéril.



Figuras 79, 80, 81, 82 y 83. Soluciones desinfectantes a las concentraciones establecidas para este estudio.

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

A continuación, con una micropipeta y puntas amarillas, se tomaron 10 μ L de cada una de las soluciones y se depositaron en la celda correspondiente anotada en la placa Gelosa MH (cada placa contenía una cepa pura bacteriana), cambiando de punta cada vez que se tomaba una sustancia distinta, una vez que todas las soluciones fueron debidamente colocadas en las placas, estas últimas se dejaron secando cerca de la flama del mechero de Fisher, y posteriormente fueron incubadas a 37°C por 24h (Figuras 84, 85 y 86).



Finalmente a las 24h de incubadas las placas Gelosa MH, se midieron los halos de inhibición, creados por las soluciones desinfectantes, sobre los microorganismos analizados, aislados de los conos de gutapercha (Figura 87).

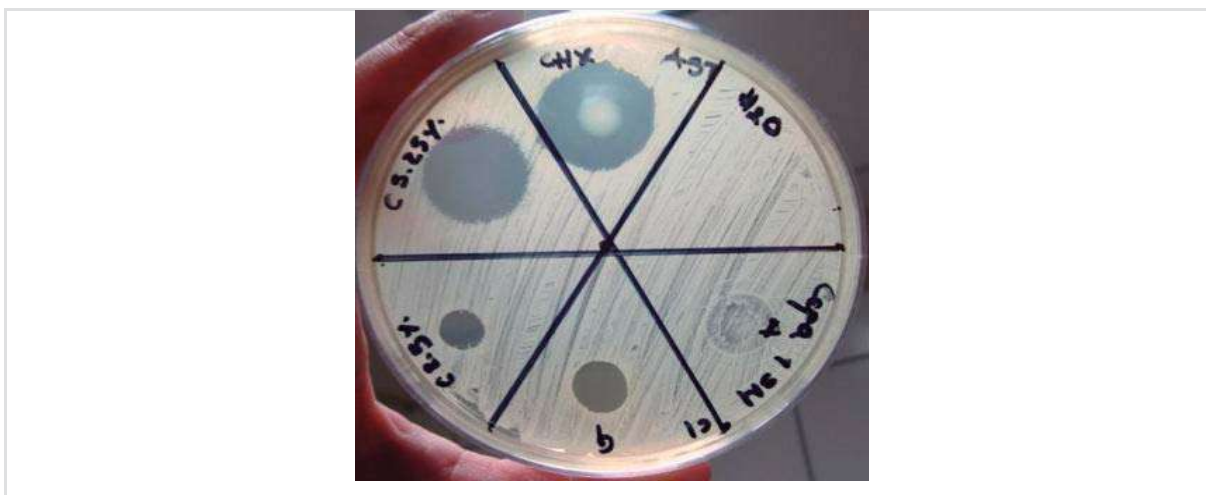


Figura 87. Halos de inhibición creados por las soluciones desinfectantes sobre las cepas bacterianas puras.

7.5. ANÁLISIS BIOESTADÍSTICO.

ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA.

Se calcularon los siguientes parámetros: media, desviación estándar, rango, suma, dato mínimo y dato máximo de cada uno de los diferentes grupos (diámetros del halo de inhibición creado por cada una de las cinco soluciones desinfectantes en las diferentes placas Agar Mueller Hinton que contenían cepas puras).

ESTADÍSTICA INFERENCIAL.

Se llevó a cabo la prueba estadística de Distribución de Fisher ó ANOVA por una vía por comparación de medias a IC del 95% a una $\alpha = 0.05$, para verificar si existía una diferencia significativa entre las seis soluciones analizadas en este estudio (incluyendo el grupo control), demostrándose que efectivamente había una diferencia significativa.

Se procedió a realizar la prueba estadística T de Student por comparación de medias a IC del 95%, bilateral a una $\alpha = 0.05$, para confrontar los resultados entre cada una de las soluciones desinfectantes de cada uno de los grupos. Para dichos cálculos se utilizó el paquete estadístico SPSS Versión 19.0.

8. RESULTADOS:

RESULTADOS DEL PRIMER ENSAYO MICROBIOLÓGICO

Los resultados del ensayo microbiológico realizado en el laboratorio de análisis clínicos de la Facultad de Veterinaria U.M.S.N.H. indicaron la ausencia de crecimiento bacteriano.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (Anexos Figuras 88-106).

Las imágenes obtenidas demostraron que la superficie estructural de los conos de gutapercha no es uniforme, presentándose grietas y fisuras de importancia sobre la superficie, con mayor índice de frecuencia en la punta de estos conos. Se obtuvo una imagen (Anexos Figura 103) donde puede observarse la presencia de cepas bacterianas en forma de cocos en la parte media del cono a una magnificación de 10000X.

RESULTADOS DEL SEGUNDO ENSAYO MICROBIOLÓGICO (Tablas 17-25).

Tabla 17. Resultados de la verificación de la turbidimetría de los caldos BHI en comparación con el Nefelómetro de McFarland (0.5, 1, 2).

TUBO	NEFELÓMETRO McFarland	CRECIMIENTO EN PLACA	
		SM	SB
I	1	+	+
II	0.5	-	+
III	0.5	+	+
IV	1	-	-
V	0.5	+	+
VI	0.5	+	+
VII	1	-	-
VIII	1	-	-
IX	0	-	+
X	1	+	+

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

CEPA	Tabla 18. Resultados de la prueba de catalasa.			
	MS		SB	
I	C1+	C2+	-	
II	+		-	
III	+		-	
V	C1+ (Manitol -)	C2+ (Manitol +)	-	
VI	+		-	
VII			-	
IX			++	
X	+		C1+ (Colonia amarilla)	C2+ (Colonia negra).

CEPA	Tabla 19. Resultados de la prueba de oxidasa.			
	MS		SB	
I	C1 -	C2 -		
II	-		-	
III	-		-	
V	C1 -	C2 -		
VI	-		-	
VII				
IX				
X	-		C1 +	C2 -

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

Tabla 20. Morfología de los microorganismos observados mediante microscopía óptica al realizar la tinción de Gram.

CEPA	DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA
I	Cocos Gram + en forma de tétradas perfectamente definidas. <i>Bacillus</i> Gram + pleomórficos. Cocos Gram+ dispuestos en sarcinas, tétradas y pares (presuntivo <i>Micrococcus</i>).
II SB	<i>Bacillus</i> Gram+ con gránulos metacromáticos, de tamaño grande (Presuntivo <i>Bacillus megaterium</i>).
II SM	Cocos Gram+ dispuestos en pares, tétradas y racimos.
III	Cocos Gram+ dispuestos en racimos.
V SM C1	Cocos Gram+ dispuestos en racimos, cadenas y tétradas.
V SM C2	Cocos Gram+ dispuestos en tétradas y sarcinas (<i>Micrococcus luteus</i>).
VI	Cocos Gram+ en conformación de racimos, tétradas y sarcinas.
VII	<i>Bacillus</i> Gram+ en conformación de pares, con puntos ligeramente lanceoladas (presuntivo neumococo).
IX SB C1	Cocos Gram+ lobulados en conformación de pares y puntas lanceoladas.
IX SB C2	Cocos Gram+ (sarcina verdadera).
X SM	Cocos Gram+, pequeños dispuestos en racimos.
X SB C1	<i>Bacillus</i> Gram-, grandes, dispuestos en forma individual, pares, algunos curvos.
X SB C2	Cocos Gram+, dispuestos en racimos.

Tabla 21. Resultados de las pruebas de hemólisis y optoquina.

CEPA	HEMÓLISIS/OPTOQUINA
I SM	β H
VII SM	Resistente optoquina.
IX SM	α H resistente a optoquina.

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

Tabla 22. Resultados del antibiograma con NB (Novobiocina) y PB (Polimixina B).

CEPA	Nb	Pb
I SM C1	R	S
I SM C2	R	S
II SB	S	S
II SM	S	R
III SB	R	S
III SB	R	S
V SM C1	R	S
V SM C2	R	S
VI SM	R	R
VI SM	R	S
X SB C1	R	S
X SB C2	R	R
X SM	S	S
X SM	S	S

R (resistente), S (susceptible).

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

Tabla 23. Resultados de las pruebas bioquímicas.										
Azúcares / Pruebas	CEPAS									
	I SM C1	I SM C2	II SB	II SM	III SB	V SM C1/C2	VI SM	X SM	X SB C1 (amarillo)	X SB C2
Bilis esculina									+	
Treholosa	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Glucosa	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+ en 50
Nitratos	-	+		-	+	-	+	+	+(Gralles -)	-
Manosa	-	-	+en 50	+ en 50	+ en 50		-	-	-	+
Sacarosa	+ en 50	-	+ en 50	+	-	-	+	-	-	-
Arginina									n/d	
Arabinosa	+ en 50	-	-	-	+ en 50	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Xilosa	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Urea	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactosa	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Fructuosa	+ en 50	-	+	+ en 50	+	-	+	+	-	+
Maltosa	+ en 50	-	+	+ en 50	+ en 50	-	-	-	+	-
Rojo de metilo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatina	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hemolisis	β H	β H	-	-	-	-	-	α H	-	-
Anti NB	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R
Anti PB	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

Tabla 24. Resultados de la determinación de género y especie.

CEPA	GÉNERO/ESPECIE
I SM C1	<i>Staphylococcus epidermidis.</i>
I SM C2	Se descarto esta muestra.
II SB	<i>Bacillus</i> spp. (Probable <i>megaterium</i>).
II SM	<i>Kocuria risofila.</i>
III SB	<i>Staphylococcus xylosum.</i>
V SM C1/C2	<i>Staphylococcus</i> spp.
VI SM	<i>Staphylococcus sciuri</i> Sb. <i>Rodentium.</i>
VII SB	<i>Streptococcus</i> spp.
IX SB	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
X SM	<i>Kocuria palustris.</i>
X SB C1	<i>Kocuria kristinae.</i>
X SB C2	<i>Staphylococcus</i> spp.

Tabla 25. Resultados de la prueba: caldo soya tripticaseina (verificación de la producción de Biofilm).

CEPAS +	PRODUCCIÓN DE BIOFILM
Cepa III SB.	++
Cepa VI SM.	++
Cepa X SB C2.	++
Cepa X SM	+++

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD, A SOLUCIONES QUÍMICAS DESINFECTANTES, EN BACTERIAS AISLADAS DE CONOS DE GUTAPERCHA (Tablas 14-22).

Tabla 26. CEPA I SM C1= *Staphilococcus epidermidis*.

SOLUCIONES	SUSCEPTIBILIDAD	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN
Alcohol Etilico 70%	R	0 mm
Glutaraldehído 2%	S	10 mm
Hipoclorito de Sodio 2.5%	S	8 mm
Hipoclorito de Sodio 5.25%	S intermedio	20 mm
Clorhexidina 2%	S	20 mm
Agua Bidestilada (control).	R	0 mm

Tabla 27. CEPA II SM= *Kocuria risofila*.

SOLUCIONES	SUSCEPTIBILIDAD	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN
Alcohol Etilico 70%	R	0 mm (colonias de 1 mm)
Glutaraldehído 2%	S intermedio	10 mm
Hipoclorito de Sodio 2.5%	S	8 mm
Hipoclorito de Sodio 5.25%	R	25 mm (colonias 1 mm)
Clorhexidina 2%	S	20 mm
Agua Bidestilada (control).	R	0 mm

Tabla 28. CEPA II SB= *Bacillus spp.* (posible *megaterium*).

SOLUCIONES	SUSCEPTIBILIDAD	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN
Alcohol Etilico 70%	R	0 mm (colonias de 2 mm)
Glutaraldehído 2%	S intermedio	15 mm
Hipoclorito de Sodio 2.5%	S	10 mm
Hipoclorito de Sodio 5.25%	S intermedio	20 mm
Clorhexidina 2%	S	20 mm
Agua Bidestilada (control).	R	0 mm

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

Tabla 29. CEPA III SB= *Staphilococcus xylosus*.

SOLUCIONES	SUSCEPTIBILIDAD	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN
Alcohol Etilico 70%	R	0 mm (colonias puntiformes)
Glutaraldehído 2%	S	10 mm
Hipoclorito de Sodio 2.5%	S	8 mm
Hipoclorito de Sodio 5.25%	S intermedio	20 mm
Clorhexidina 2%	S	20 mm
Agua Bidestilada (control).	R	0 mm

Tabla 30. CEPA V SM C1= *Staphilococcus spp.*

SOLUCIONES	SUSCEPTIBILIDAD	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN
Alcohol Etilico 70%	R	0 mm (colonias puntiformes)
Glutaraldehído 2%	S	10 mm
Hipoclorito de Sodio 2.5%	S	10 mm
Hipoclorito de Sodio 5.25%	S intermedio	20 mm
Clorhexidina 2%	S	20 mm
Agua Bidestilada (control).	R	0 mm

Tabla 31. CEPA VI SM= *Staphilococcus sciuri sb. Rodentium*.

SOLUCIONES	SUSCEPTIBILIDAD	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN
Alcohol Etilico 70%	R	0 mm (colonias puntiformes)
Glutaraldehído 2%	S	20 mm
Hipoclorito de Sodio 2.5%	R	10 mm (colonias puntiformes)
Hipoclorito de Sodio 5.25%	S intermedio	15 mm
Clorhexidina 2%	S	25 mm
Agua Bidestilada (control).	R	0 mm

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

Tabla 32. CEPA X SB C1= *Kocuria kristinae*.

SOLUCIONES	SUSCEPTIBILIDAD	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN
Alcohol Etilico 70%	R	0 mm (50%-colonias).
Glutaraldehído 2%	S	0 mm (95% inhibición).
Hipoclorito de Sodio 2.5%	R	0 mm (75% inhibición).
Hipoclorito de Sodio 5.25%	S intermedio	15 mm
Clorhexidina 2%	S	25 mm
Agua Bidestilada (control).	R	0 mm

Tabla 33. CEPA X SB C2= *Staphilococcus spp.*

SOLUCIONES	SUSCEPTIBILIDAD	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN
Alcohol Etilico 70%	R	0 mm (colonias puntiformes)
Glutaraldehído 2%	S	20 mm
Hipoclorito de Sodio 2.5%	R	0 mm
Hipoclorito de Sodio 5.25%	S intermedio	25 mm
Clorhexidina 2%	S	20 mm
Agua Bidestilada (control).	R	0 mm

Tabla 34. CEPA X SM= *Kocuria palustris*.

SOLUCIONES	SUSCEPTIBILIDAD	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN
Alcohol Etilico 70%	R	0 mm (colonias puntiformes)
Glutaraldehído 2%	S	15 mm
Hipoclorito de Sodio 2.5%	S	10 mm
Hipoclorito de Sodio 5.25%	S intermedio	25 mm
Clorhexidina 2%	S	20 mm
Agua Bidestilada (control).	R	0 mm

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

Tabla 35. Resultados de: Rango, Mínimo, Máximo, Significancia, DESVEST						
	N	Rango	Mínimo	Máximo	Significancia	Desviación Estándar
ETANOL 70%	18	.00	.00	.00	.0000	.00000
GLUTARALDEHÍDO 2%	18	20.00	.00	20.00	12.2222	5.99564
NaOCl 2.5%	18	10.00	.00	10.00	7.1111	4.01305
NaOCl 5.25%	18	10.00	15.00	25.00	20.5556	3.79198
CHX 2%	18	5.00	20.00	25.00	21.1111	2.13896
AGUA BIDEFILADA	18	.00	.00	.00	.0000	.00000
N válida (por lista)	18					

Los resultados de la prueba estadística de Distribución de Fisher, indicaron una $F = 135.96$, al compararla con la F crítica = 3.11, se observó una diferencia estadística ($P < 0.05$), lo cual indica que al menos una población (solución química) es distinta a otra, por lo tanto, se llevó a cabo la prueba estadística T Student para observar en que grupos existía la diferencia.

Tabla 36. Resultados de la prueba estadística T de Student.			
Confrontación	Valor T	Valor P	Significancia
GLUTARALDEHIDO 2% V.S. NaOCl 2.5%	3.497	0.003	S
GLUTARALDEHIDO 2% V.S. NaOCl 5.25%	-5.951	0.000	S
GLUTARALDEHIDO 2% VS CHX 2%	-5.575	0.000	S
NaOCl 2.5% V.S. NaOCl 5.25%	-10.513	0.000	S
NaOCl 2.5% V.S. CHX 2%	-11.729	0.000	S
NaOCl 5.25% V.S. CHX 2%	-0.416	0.682	NS
S = Datos estadísticamente significativo (Valores de $P < 0.05$). NS = Datos No Significativos (Valores de $P > 0.05$).			

Los resultados de la prueba estadística T de Student indicaron que existía una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre todos los grupos excepto entre NaOCl 5.25% y CHX 2%, lo cual indica que estas dos sustancias químicas tuvieron un comportamiento de desinfección similar entre ellas, pero, diferente al resto de los grupos.

9. DISCUSIÓN:

Uno de los objetivos primarios del tratamiento endodóntico es el eliminar o reducir significativamente a los microorganismos de los conductos radiculares mediante una apropiada preparación químico-mecánica. Sin embargo, se debe prevenir que los instrumentos y/o materiales que se están utilizando en el procedimiento, incluyendo los conos de gutapercha, no se contaminen, o provoquen a su vez, una infección cruzada.

Ya que los conos están compuestos químicamente por un alto contenido de Oxido de Zinc o Sulfato de Bario, diversos autores coinciden en que estos elementos le proporcionan a la gutapercha un efecto bacteriostático y propiedades antimicrobianas (Barlels 1941, Moorer y cols. 1982, Silva y cols. 1984, Weiger y cols. 1993). Más que esto, los conos de gutapercha han ido variando en su composición química a lo largo de los años y se les han añadido además, variadas mezclas de compuestos químicos para asegurar y potencializar sus efectos bacteriostáticos y antimicrobianos.

Algunos estudios mencionan que los conos con Hidróxido de Calcio $[Ca(OH)_2]$ y CHX puede producir una acción antimicrobiana sinérgica contra algunas levaduras y que si no son intencionalmente contaminados con bacterias, no es necesario su desinfección (Öztan y cols. 2006, Namazikhah y cols. 2000). Sin embargo, múltiples estudios contradicen esto. Higgins 1986, Podbielski y cols. 2000, Lui y cols. 2004, Chogle y cols. 2005, demuestran que los conos de gutapercha no inhiben el crecimiento bacteriano, y que algunas mezclas químicas adicionadas a la composición de estos conos ($[Ca(OH)_2]$, ZnO/CHX, ZnO/I-PVP, yodoformo) no son lo suficientemente potentes para erradicar un número moderado o cuantioso de patógenos.

Doolittle y cols. (1975) reportaron que los conos de gutapercha se encuentran estériles dentro del paquete sellado para su comercialización. Por otro lado Montgomery (1971) reportó que el 8% de los conos de un empaque nuevo mostraban crecimiento bacteriano, similarmente Gomes y col. (2005) reportaron que el 5.5% de los conos estaban contaminados. Los resultados de nuestro primer ensayo microbiológico arrojaron la ausencia de crecimiento bacteriano en conos extraídos de un empaque nuevo, sin embargo, una de las imágenes MEB muestra la presencia de una colonia bacteriana (cocos) (Anexos Figura 103).

Se han analizado además las especies bacterianas que son capaces de colonizar la gutapercha cuando es expuesta al medio ambiente. Nan-Shim y cols. (2007) encontraron células bacterianas vegetativas (*S. epidermidis*, *S. spp*, *S. caprae*, *S. capitis* y *S. xylosum*; lo cual es similar a los resultados obtenidos en el presente estudio donde también se encontró la presencia de estos y otros microorganismos *S. epidermidis*, *S. xylosum*, *S. spp*, *S. sciuri* *Sb. Rodentium*, *Bacilos spp*, *Kocuria risofila*, *Kocuria palustris*, *Kocuria kristinae*, *Streptococcus spp* y *S. pneumoniae*.

Los microorganismos son esenciales en el desarrollo de las enfermedades perirradiculares, (factor causal más frecuente asociado a fracaso endodóntico) (Shen y cols. 2009, Noiri y cols. 2002) (Anexos Figuras 128-140). Si las bacterias alcanzan el área extrarradicular (vía foramen apical o tubulillos dentinarios) pueden formar biofilm. La periodontitis es la manifestación clínica de una reacción inmune frente a los microorganismos que se encuentran creciendo en forma de biofilm dentro del sistema de conductos radiculares (Costerton y cols. 1995, Nair y cols. 2004, Nair y cols. 2006). El biofilm es una comunidad bacteriana que se adhiere a una superficie y forma estructuras heterogéneas tridimensionales; constituye una modalidad de crecimiento que permite a las bacterias sobrevivir a un medio ambiente hostil. Las células bacterianas del biofilm liberan antígenos que estimulan la producción de anticuerpos, los cuales pueden no ser efectivos neutralizándolas (Shib y cols. 2010).

Takemura y cols. 2004 sugieren que las bacterias anaerobias facultativas Gram + tienen la capacidad de colonizar y formar matrices extracelulares sobre los conos de gutapercha, e informan que se ha reportado la participación del biofilm bacteriano asociado a la presencia de periodontitis refractaria periapical por sobreobturación con puntas de gutapercha.

Existen reportes que demuestran que los microorganismos que crecen dentro de un biofilm pueden llegar a ser 2-1,000 veces más resistentes que las formas planctónicas correspondientes (Svensater y cols. 2004).

En el presente estudio, cuatro de las doce cepas aisladas tuvieron la capacidad de producir biofilm (*S. xylosum*, *S. sciuri* Sb. *Rodentium*, *Kocuria palustris*, *S. spp.* Anexos Figuras 141-144).

Sabemos que la superficie estructural de los conos de gutapercha no es uniforme y presenta varios surcos y fisuras que predominan en la punta de este material (Anexos: Figuras 88-106), zonas donde es viable que este tipo de bacterias formadoras de biofilm se establezcan y proliferen; si estos conos no son desinfectados y el especialista provoca una sobreobturación, se puede inducir una inoculación accidental de estas bacterias en el área perirradicular, ocasionando a corto o largo plazo el fracaso del tratamiento endodóntico.

Por estas y otras razones hay estudios que avalan la importancia de realizar una descontaminación de los conos. Múltiples autores se han dado a la tarea de estudiar las soluciones desinfectantes de uso común en el consultorio endodóntico para ver cuáles de estas sustancias son las más eficaces en la sanitización de los conos de gutapercha (Nan-Shim, Lanzagorta, Nurban Özalp, Cardoso, da Motta, Frank, Siqueira, Senia, Harald, Figueiredo, etc.). Sin embargo, la mayoría de estos estudios utilizan conos de gutapercha contaminados experimentalmente con bacterias de difícil erradicación, y concluyen en su mayoría que la mejor sustancia desinfectante es el NaOCl, seguido en índice de frecuencia por la CHX. Esto es similar a lo encontrado en el presente estudio, en el que se aislaron cepas bacterianas de los conos de gutapercha expuestos al medio ambiente de la clínica y

luego de ser identificados su género y especie se aislaron cepas puras de cada uno de ellos, depositando directamente sobre dichas cepas diferentes soluciones desinfectantes NaOCl 5.25 (media 20.55, desvest 3.79), NaOCl 2.5% (media 7.11, desvest 4.01), CHX 2% (media 21.11, desvest 2.13), Glutaraldehído 2% (media 12.22, desvest 5.99), Etanol 70% (media 0, desvest 0), arrojando los resultados que no hay diferencia estadísticamente significativa ($P=0.682$) entre el uso de NaOCl 5.25% y CHX 2% siendo estas sustancias las que causaron halos de mayor diámetro de inhibición sobre las cepas bacterianas. De acuerdo a nuestros resultados se rechazó la hipótesis de trabajo ($H_T: G1 > G2 = G3 = G4 = G5$) y por lo tanto, aceptamos la siguiente $H_A: G1 = G3 > G4 > G2 > G5$.

Sin embargo, a pesar de que no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre CHX 2% y NaOCl 5.25%, el uso del NaOCl como solución desinfectante para las puntas de gutapercha es puesto a consideración, ya que los halos que se formaron con esta sustancia mostraron bordes irregulares, lo que es conocido como resistencia intermedia (Anexos Figuras 145-149). Desde el punto de vista científico, el concepto de resistencia no debería ser usado en referencia al uso de desinfectantes. La resistencia microbiana se encuentra mediada por la existencia de material genético que codifica unos mecanismos de defensa contra acciones antimicrobianas. Esto quiere decir que ante la presencia de una sustancia antimicrobiana se activan regiones del genoma bacteriano, o de plásmidos que se encuentren en el citoplasma celular, que inducen mecanismos bioquímicos accesorios o que producen proteínas que actúan específicamente en contra de las sustancias letales. Por este motivo, es mucho más correcto el término adaptación que no el de resistencia, si bien es cierto que algunos microorganismos pueden llegar a manifestar mecanismos de este tipo a baja concentración en presencia de algún desinfectante. Pero por norma general, más que de forma específica, se trata de sistemas de defensa antioxidativo, de protección de membrana o de control de la acidificación intracelular (Aase y cols. 2000, Lunden y cols. 2003, McDonell y cols. 1999).

Un estudio realizado por Short y cols. 2003 demostró que al realizar una desinfección rápida (1 min.) de los conos con NaOCl 2.5 y 5.25%, se formaban cristales de hipoclorito sobre su superficie, los cuáles podrían impedir una correcta obturación del espacio de los conductos radiculares, aunque también demostraron que una simple acción de enjuague de los conos en agua destilada, luego de ser desinfectados con NaOCl, es eficaz en la eliminación de estos cristales.

Se ha demostrado que el NaOCl es un fuerte agente oxidante que tiene el potencial de reducir la estabilidad química de la cadena de los polímeros y causar el deterioro de varios materiales (Arvidsson y cols. 2002, Yamauti y cols. 2003, Neagu y Bunia 2004, Yokoyama y cols. 2004). Entre estos materiales Valois y cols. en 2005 demostraron por medio del microscopio de fuerza atómica que el NaOCl 5.25% causa cambios estructurales en la elasticidad del cono de gutapercha cuando este es expuesto a la solución por 1 min. Por el

contrario Gomes y col. en 2007 concluyen mediante el uso de imágenes de microscopía electrónica de barrido que el uso de NaOCl al 5.25% no causa deterioro a las características superficiales de los conos de gutapercha cuando estos son sumergidos en periodos de tiempo de 1, 5, 10, 20 y 30 min. Aunque si mencionan que los conos sumergidos en CHX presentaban cierta acción antibacteriana residual.

10. CONCLUSIONES:

De acuerdo a los resultados se concluye lo siguiente:

- 1.- Los conos de gutapercha pueden ser colonizados por diversos microorganismos al quedar expuestos al medio ambiente de la clínica endodóntica.
- 2.- Varias especies bacterianas que colonizan los conos de gutapercha, son además capaces de formar biofilm.
- 3.- Es necesario, por lo anteriormente señalado, que el clínico desinfecte, siempre, los conos de gutapercha que utiliza para realizar la obturación del sistema de conductos radiculares.
- 4.- Tanto NaOCl 5.25%, como CHX 2% demostraron una mejor capacidad de inhibición bacteriana respecto a las otras soluciones sometidas a investigación en este estudio (NaOCl 2.5%, Glutaraldehído 70%, Etanol 70%).
- 5.- Aunque no hubo diferencia estadísticamente significativa ($P=0.682$) entre CHX 2% y NaOCl 5.25% respecto a su capacidad de inhibición bacteriana, durante la fase experimental de esta investigación, se observó que NaOCl 5.25% formaba halos de inhibición con bordes irregulares, concluyéndose que los microorganismos presentaban una resistencia intermedia a esta solución.

11. RECOMENDACIONES:

Es necesario realizar más estudios *in vitro* que permitan evaluar que solución es más efectiva en la desinfección de los conos de gutapercha NaOCl 5.25% o CHX 2%, corroborando si la resistencia intermedia que presentaron las bacterias a la solución de hipoclorito de sodio 5.25% puede resultar un dato de importancia que impida la correcta desinfección; así como también es importante analizar si alguna de estas sustancias puede inducir un daño en los conos de gutapercha, alterando sus propiedades físicas, químicas y/o estructurales.

12. BIBLIOGRAFÍA:

Aase G, Sundheim G, Langsrud S, Rorvik L. Occurrence of and possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology. 2000; 62: 57 -63.

Arvidsson A, Milleding P, Wennerberg A. The influence of a chemomechanical caries removal solution on the topography of dental ceramic materials. Biomaterials. 2002; 23: 3977-83.

Athanassiadis B, Abbott PV, Walsh LJ. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. Aus Dent J. 2007; 52(1): S64-82.

Attin T, Zirkel C, Pelz K. Antibacterial properties of electron beam-sterilized gutta-percha cones. J. Endodon. 2001; 27(3): 172-4.

Austin JH, Taylor HD. Behavior of hypochlorite and chloramines T solutions in contact with necrotic and normal tissue *In vivo*. J Exp Med. 1918; 27: 627-33.

Avila Galia C. Efecto bacteriostático “In Vitro” de los conos de gutapercha previamente contaminados con el anaerobio estricto *Bacteroides fragilis*. Informe científico. 2000; 10(2): 20-25.

Barbakow F, Lutz F, Toth L. Materials and technics in root canal treatment in Switzerland-a determination of their status. Schweiz Monatsschr Zahmed. 1995; 105: 126-71.

Barlels HA. Gutta-percha cones and bacteriostatics agents. J Dent Res. 1941; 20: 327-30.

Bodrumiu E, Alacanm T. Evaluation of antimicrobial and antifungal effects of yodoformo integrating gutta-percha. J Can Dent Assoc. 2006; 72(8): 733.

Boucher RMG, Potentiated 1, 5 pentanedial, a breakthrough in chemical sterilizing and disinfecting technology. Am J Hosp Pharm 1974; 31: 546-57

Canalda C, Pumarola S, Berasategui J. Actualización en endodoncia 2006. Archivos de Odontología. 2007; 23(3): 141 – 159.

Cardoso CL, Kotaka CR, Guilhermetti M, Hidalgo MM. Rapid sterilization of gutta-percha cones with glutaraldehyde. JOE. 1998; 24: 561-3.

Cardoso CL, Kotaka CR, Redmerski R, Guilhermetti M, Queiroz AF. Rapid decontamination of gutta-percha cones with sodium hypochlorite. JOE. 1999; 25(7): 498-501.

Cardoso CL, Redmerski R, Bitencourt NLR, Kotaka CR. Effectiveness of different chemical agents in rapid decontamination of gutta-percha cones. Braz J Microbiol 2000; 31: 67-71.

Chogle S, Mickel AK, Huffaker SK, Neibar B. An *in vitro* assessment of iodoform gutta-percha. J Endodon. 2005; 31: 314-16.

Coolidge ED. The diagnosis and treatment of conditions resulting from diseased dental pulps. J Nat Dent Assoc. 1919; 6: 337-49.

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE. Microbial biofilms. Rev Microbiol. 1995; 49: 711-45.

Da Motta PG, de Figueredo CB, Maltos SM. Efficacy of chemical sterilization and storage conditions of gutta-percha cones with sodium hypochlorite. IEJ. 2001; 34: 435-9.

Dakin HD. On the use of certain antiseptic substances in treatment of infected wounds. BMJ. 1915; 2: 318-20.

De Almeida GB, Vianna ME, Ujissato MC, Silva RVP, Zaia AA, Randi FCC, de Souza FFJ. Disinfection of gutta-percha cones with chlorhexidine and sodium hypochlorite. OOOOE. 2005; 100: 512-7.

Doolittle TP, Rubel RL, Fried I. The effectiveness of common office disinfection procedures for gutta-percha and silver points. NY State Dental Journal. 1975; 41: 409-14.

Estrela C, Estrela CR, Barbin EL. Mechanism of action of sodium Hypochlorite. Braz Dent J. 2002; 13: 113-17.

Frank RJ, Pelleu GB. Glutaraldehyde decontamination of gutta-percha cones. J Endodon. 1983; 9: 368-70.

Gill SR, Fouts DE, Archer GL. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. J Bacteriol. 2005; 187: 2426 –38.

Goldberg F. Materiales y técnicas de obturación endodóntica. Ed. Mundi SAIC y F. Buenos Aires. 1982. 194pp; 50-55.

Gomes BPF, Berber VB, Montagner F, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Residual effects and surface alterations in disinfected gutta-percha and resilon cones. J Endodon. 2007; 33: 948-51.

Gomes BPF, Carvalho SFC, Ferraz CCR. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium Hydroxide against *Enterococcus Faecalis* in bovine root dentine *in vitro*. IEJ. 2003; 36:267-75.

Gomes BPFA, Vianna ME, Ujissato C, de Paula V, Zaia AA, Randi CC, Souza FJ. Disinfection of gutta-percha cones with chlorhexidine and sodium hypochlorite. OOOOE. 2005; 100: 512-7.

Greenstein BD, Fitzpatrick FT, Adcock IM, Kendall MD, Wheeler MJ. Reappearance of the thymus in old rats after orchidectomy: inhibition of regeneration by testosterone. J Endocrinol. 1986; 110: 417-422.

Grossman LI. Root Canal Therapy. Lea & Febiger 1940; 4th Edition: 18-24.

Higgins J, Newton C. The use paraformaldehyde powder for sterile storage of gutta-percha cones. J Endodon. 1986; 12(6): 242-47.

Hoelscher AA, Bahcall JK, Maki JS. In vitro evaluation of the antimicrobial effects of a root canal sealer antibiotic combination against *Enterococcus faecalis*. J Endodon. 2006; 32: 145 - 147.

Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. OOOOE. 1965; 20(3): 940-9.

Lanzagorta RML, Guzmán AM, Gutverg RDS. Estudio comparativo del gluconato de clorhexidina e hipoclorito de sodio: una alternativa en la desinfección de conos de gutapercha. Endodoncia Actual. 2006; 1(3): 8-10.

Lui JN, Sae-Lim, Song KP, Chen NN. *In vitro* antimicrobial effect of chlorhexidine-impregnated gutta-percha points on *Enterococcus Faecalis*. IEJ. 2004; 37: 105-113.

Lunden J, Autio T, Markkula A, Hellstrom S, Korkeala H. Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. International Journal of Food Microbiology. 2003; 82: 265-272.

McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity action and resistance. Clin Microbiol Rev. 1999; 12: 147-79.

Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. Int Dent Jour. 2008; 58(6): 329-41.

Mondragón EJD, Varela OR, Ramírez SHU, Cueto AG, Meléndez RJL, Guerrero BC, Cruz MJM. Estudio descriptivo de la gutapercha PRODENT por medio de MEB y EDX *in vitro*. Revista ADM. 2002; 59(6): 211-215.

Montgomery S. Chemical decontamination of gutta-percha cones with polyvinylpyrrolidone-iodine. Oral Surg. 1971; 31: 254-56.

Moorer W, Genet J. Evidence for antimicrobial activity of endodontic gutta-percha cones. Oral Surg. 1982; 53(5): 503-7.

Murray PR, Kobayashi GS, Pfalter MA, Rosenthal KS. Medical microbiology, 2nd ed. St. Louis: Mosby; 1994.

Nair PNR. On the causes of resistant apical periodontitis: a review. IEJ. 2006; 39: 249-81.

Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. Crit Rev Oral Biol Med. 2004; 15: 348-81.

Namazikhah MS, Sullivan DM, Trnavsky GL. Gutta-percha: a look at the need for sterilization. J Calif Dent Assoc. 2000; 28(6): 427-32.

Nan-Shim P, Il-Young J, Kwang-Shik B, Seung-Ho B, Woo-Cheol L, Kee-Yeon K. Effects of short-term chemical disinfection of gutta-percha cones: Identification of affected microbes and alterations in surface texture and physical properties. JOE. 2007; 33(5): 594-98.

Neagu V, Bunia I. Acrylic weak base anion exchanges and their chemical stability in aggressive media. *Polymer degradation and stability*. 2004; 83: 133-8.

Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Takemura N, Ebisu S. Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. *J Endodon*. 2002; 28: 679–83.

Özalp N, Ökte Z, Özcelik B. The rapid sterilization of gutta-percha cones with sodium hypochlorite and glutaraldehyde. *JOE*. 2006. 32(12): 1202-4.

Öztan MD, Kiyani M, Gereker D. Antimicrobial effect *in vitro*, of gutta-percha points containing root canal medications against yeasts and *Enterococcus Faecalis*. *OOOOE*. 2006; 102: 410-16.

Podbielski A, Boeckh C, Haller B. Growth inhibitory activity of gutta-percha points containing root canal medications on common endodontic bacterial pathogens as determinate by an optimized quantitative *in vitro* assay. *J Endodon*. 2000; 26: 398-403.

Senia ES, Marraro RV, Mitchell JL, Lewis AG, Thomas L. Rapid sterilization of gutta-percha cones with 5.25% sodium hypochlorite. *JOE*. 1975; 1(4): 136-40.

Shen Y, QianW, Chung C, Olsen I, Haapasalo M. Evaluation of the effect of two chlorhexidina preparations on biofilm bacteria *in vitro*: a three-dimensional quantitative analysis. *J Endodon*. 2009; 35: 981-85.

Shib M, Lim YC, Kishen A. Immunogenic potential of *Enterococcus Faecalis* biofilm under simulated growth conditions. *J Endodon*. 2010; 36: 832-36.

Short RD, Dorn SO, Kuttler S. The crystallization of sodium hypochlorite on gutta-percha cones after the rapid sterilization technique: an SEM study. *J Endodon*. 2003; 29: 670-73.

Shur AC, Sedgley CM, Fenno JC. The antimicrobial efficacy of 'MPG' gutta-percha in vitro. *IEJ*. 2003; 36, 616-621.

Silva A. Antimicrobial action of previously contaminated gutta-percha cones. *Rev Odontol. Universidad Sao Paulo*. 1984; 8(1): 33-36.

Siqueira Jr. JF, Pereira da Silva CHF, Cerqueira MDO, Lopes HP, de Uzeda M. Effectiveness of four chemical solutions in eliminating *Bacillus subtilis* spores on gutta-percha cones. *Endod Dent Traumatol*. 1998; 14: 124-126.

Sirtes G, Waltino T, Schaetzle M, Zehnder M. The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity and antimicrobial efficacy. *J Endodon* 2005; 31 669-71.

Stabholz A, Friedmans S, Healing I, Sela MN. Efficiency of different chemical agents in decontamination of gutta-percha cones. *IEJ*. 1987; 20: 211-16.

Svensater G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. *Endod Topics*. 2004; 9:27-36.

Takemura N, Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Noguchi N, Ebisu S. Single species biofilm-forming ability of root canal isolates on gutta-percha points. *Eur J Oral Sci*. 2004; 112(6): 523-9.

Test ST, Lampert MB, Ossanna PJ. Generation of nitrogen-chlorine oxidants by human phagocytes. *J Clin Investig*. 1984; 74: 1341-49.

Toledo Vázquez LF. Evaluación clínica y microscópica de los conos de gutapercha de la serie 45-80 que se distribuyen en la ciudad de Guatemala. *Tribunal de la Facultad de Odontología de la Universidad de San Carlos de Guatemala*. 2006. 6-8.

Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

Tsukada G, Tanaka T, Torii M, Inoue K. Shear modulus and thermal properties of gutta-percha for root canal filling. *Journal of Oral Rehabilitation* 2004; 31: 1139-44.

Valois CRA, Silva LP, Azevedo RB. Effects of 2% chlorhexidine and 5.25% sodium hypochlorite on gutta-percha cones studied by atomic force microscopy. *IEJ*. 2005; 38: 425-429.

Walker A. A definite and dependable therapy for pulpless teeth. *J Am Dent Assoc*. 1936; 23: 1418-25.

Weiger R. Antibakterielle wirkung von guttaperchastiften auf verschiedene, endodontopathogene mikroorganismen. *Dtsch Zahnarzl*. 1993; 48: 658-60.

Yamauti M, Hashimoto M, Sano. Degradation of resin dentin bonds using NaOCl storage. *Dental Materials*. 2003; 19: 399-405.

Yokoyama K, Kancho K, Yabuta E, Asaoka K, Sakai J. Fracture of nickel-titanium superelastic alloy in sodium hypochlorite solution. *Materials science and engineering A*. 2004; 369: 43-8.

Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endodon*. 2006; 32: 389-98.

CONSULTAS EN INTERNET.

Laboratorios calier 24/10/2010 <http://www.calier.es/pdf/DESPADAC2.pdf>

Hospital José María Ramos Mejía 24/10/2010
<http://www.ramosmejia.org.ar/s/inf/recomend/desinf.htm>

Join the movement 24/10/2010 <http://www.quirofanoweb.netfirms.com/desinfectantes.htm>.

13. ANEXOS:

La encuesta constó de 5 preguntas descritas a continuación:

1.- ¿Desinfecta usted los conos de gutapercha que utiliza durante la obturación?

- a) Si
- b) No
- c) Ocasionalmente

2.- Aproximadamente ¿cuánto tiempo almacena los conos de gutapercha luego de abrir la envoltura?

- a) Un mes o menos
- b) De 1 a 6 meses.
- c) Más de 6 meses (aproximadamente cuanto tiempo).

3.- ¿Qué solución o método de desinfección para conos de gutapercha utiliza?

- a) Hipoclorito de Sodio
- b) Clorhexidina
- c) Otro, describa cual.

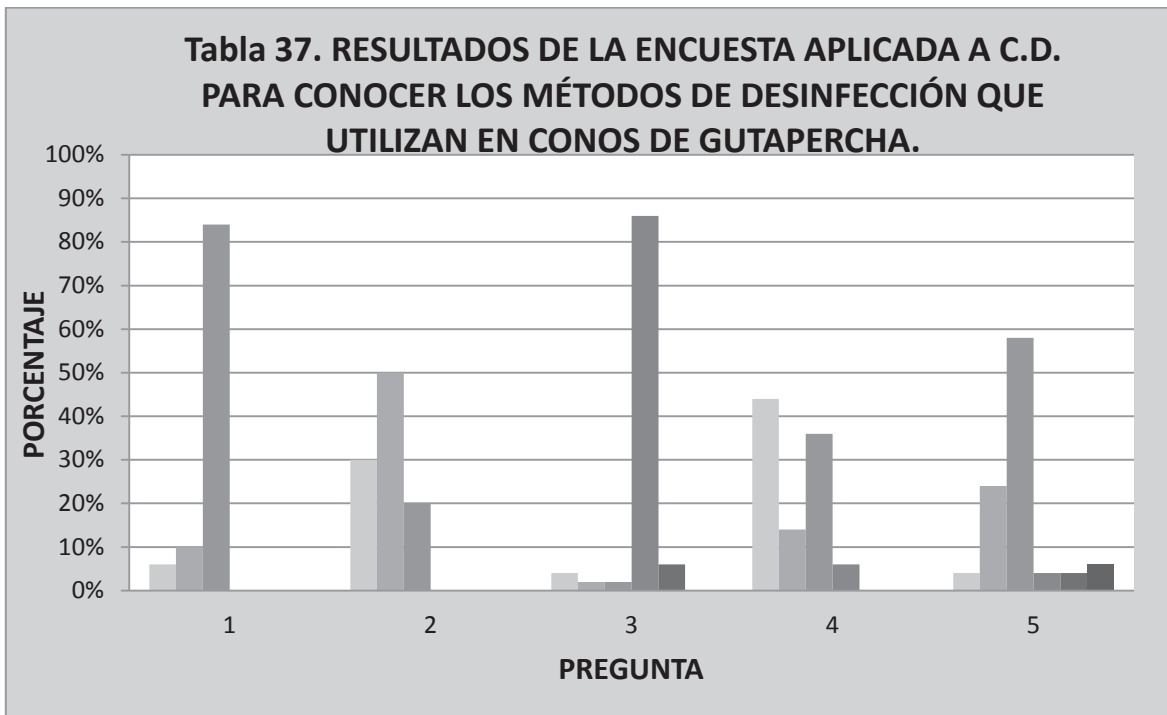
4.- ¿Cuánto tiempo deja sumergido el cono de gutapercha en la solución?

- a) 1 minuto
- b) 2 minutos
- c) 5 minutos o más (aproximadamente cuanto tiempo).

5.- ¿A qué concentración utiliza la solución desinfectante?

- a) 0.05%
- b) 2.5%

c) 5.25% (si ninguna de las anteriores se corresponde, anote cual es la concentración que utiliza).



Los resultados a la pregunta 1 (desinfecta los conos de gutapercha), demuestran que la mayoría de los C.D.E.E. y C.D. que realizan endodoncia de forma regular (82%), desinfectan los conos que serán utilizados para obturar el espacio del conducto radicular. Un 10% de la población sometida a la encuesta respondió que ocasionalmente realiza la desinfección de las puntas de gutapercha, y solo el 6% respondió que nunca desinfecta los conos que emplea para culminar el tratamiento endodóntico.

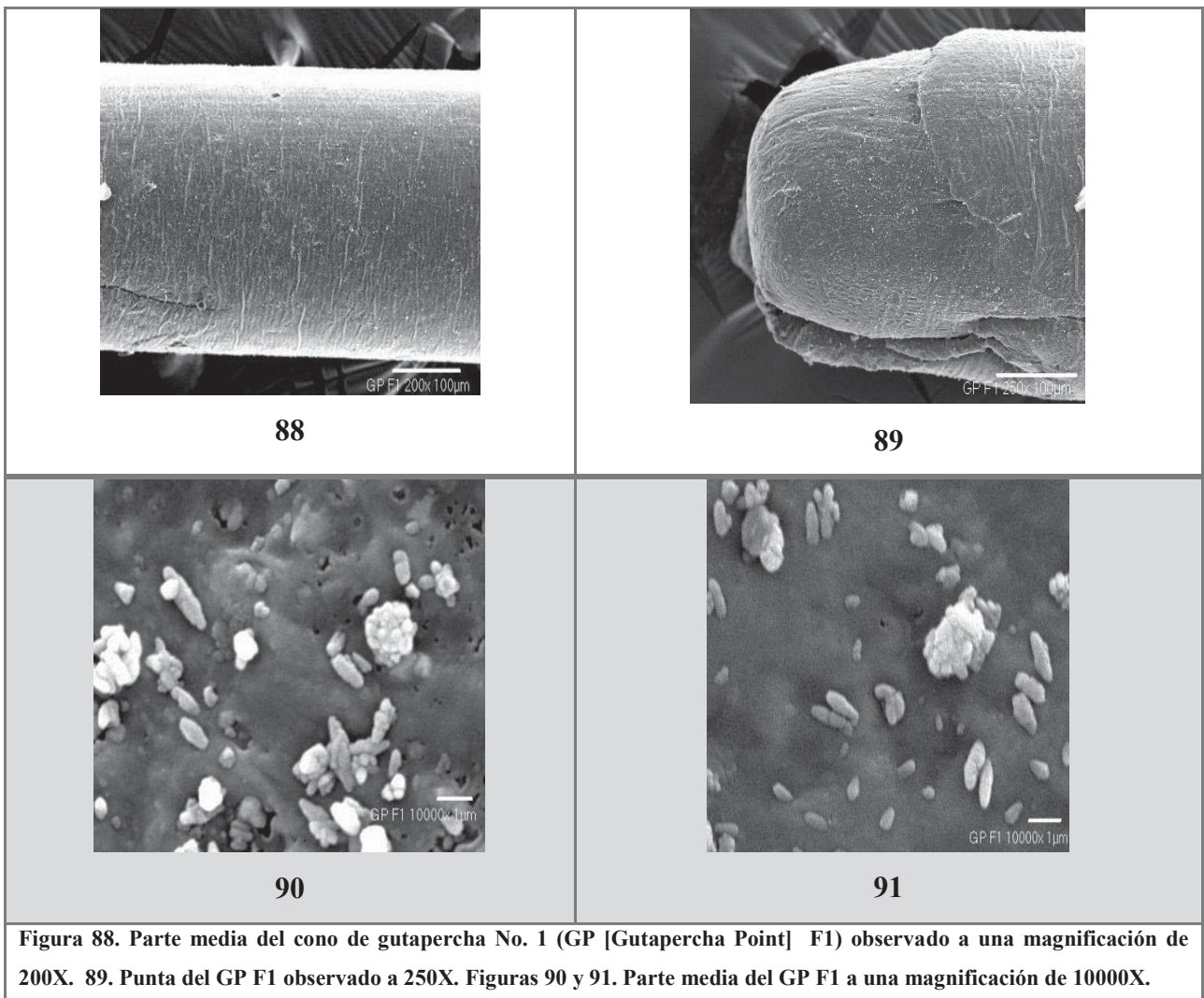
A la segunda pregunta (tiempo de almacenaje de los conos), el 50% de la población respondió que en promedio almacena las puntas de gutapercha de 1-6 meses luego de romper el selle hermético de las mismas. El periodo de almacenaje del 30% fue de 1 mes o menor a un mes, y un 20% de la población respondió que su periodo de almacenaje supera los 6 meses.

Los resultados de la pregunta 3 (solución desinfectante de elección), mostraron una mayor incidencia en el empleo del NaOCl (86%), mostrando una incidencia baja de aplicación para las soluciones: alcohol etílico (4%), CHX (2%) y glutaraldehído (2%). Un 6% de la población no utiliza ningún tipo de solución.

A la pregunta 4 (tiempo de sumersión del cono en la solución), los resultados arrojaron que el 44% de los sujetos sometidos a la encuesta sumerge los conos por 1 minuto, el 36% lo hace por 5 minutos, el 14% por 2 minutos, y el 6% a 0 minutos (población que no desinfecta sus conos de gutapercha).

Y por último, los resultados de la pregunta 5 (concentración de la solución desinfectante), demostraron que la concentración que mayormente eligen los C.D.E.E. y C.D. es el 5.25% (NaOCl) con un índice de frecuencia del 58%. Seguida por la concentración al 2.50% (NaOCl) con una incidencia del 24%. Y obteniéndose un 4% de frecuencia para las concentraciones de 0.5% (NaOCl), 2% (CHX), 70% (alcohol etílico). Un 6% de la población no respondió a esta pregunta (C.D.E.E. y C.D. que no realizan desinfección alguna de los conos de gutapercha).

IMÁGENES OBTENIDAS CON EL MICROSCÓPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO.



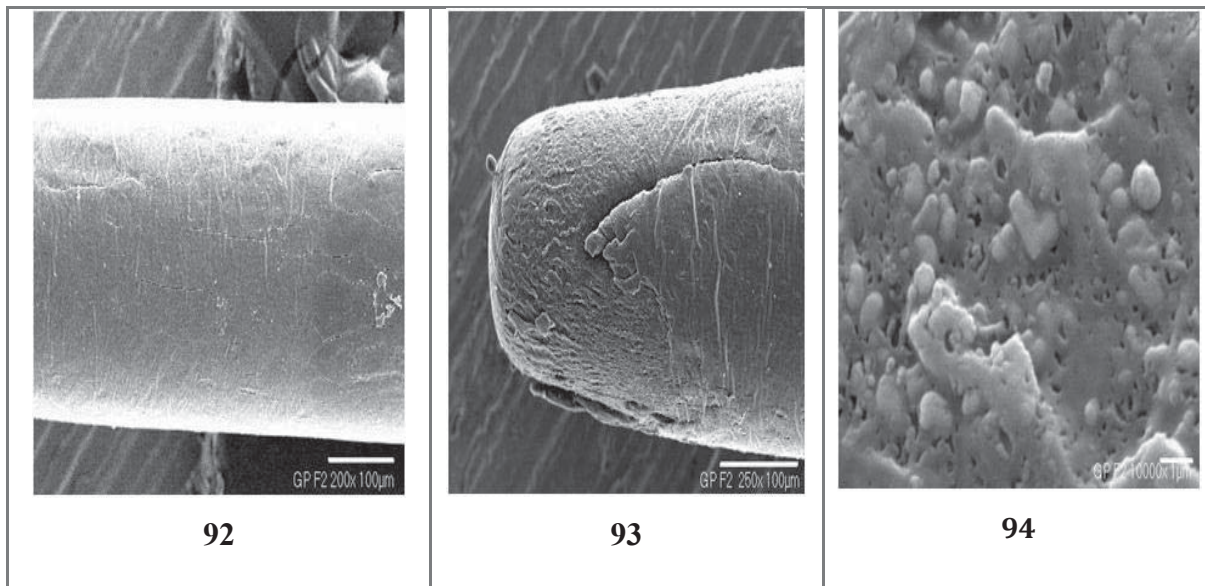


Figura 92. Parte media del GP F2 observado a 200X de magnificación. 93. Punta del GP F2 a una magnificación de 250X. 94. Parte media del GP F2 observado a 10000X de magnificación.

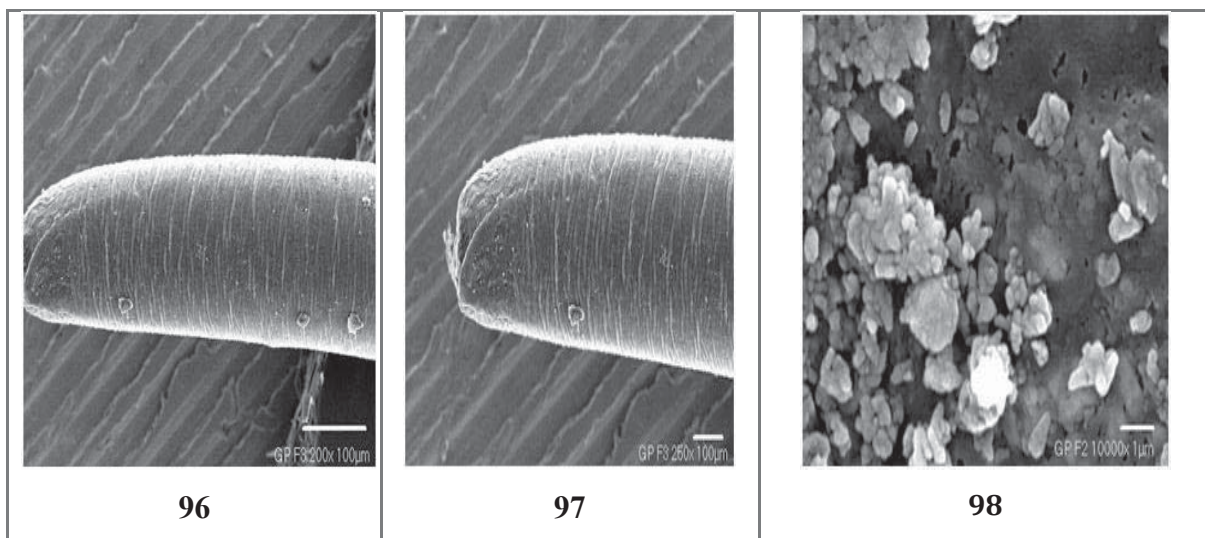
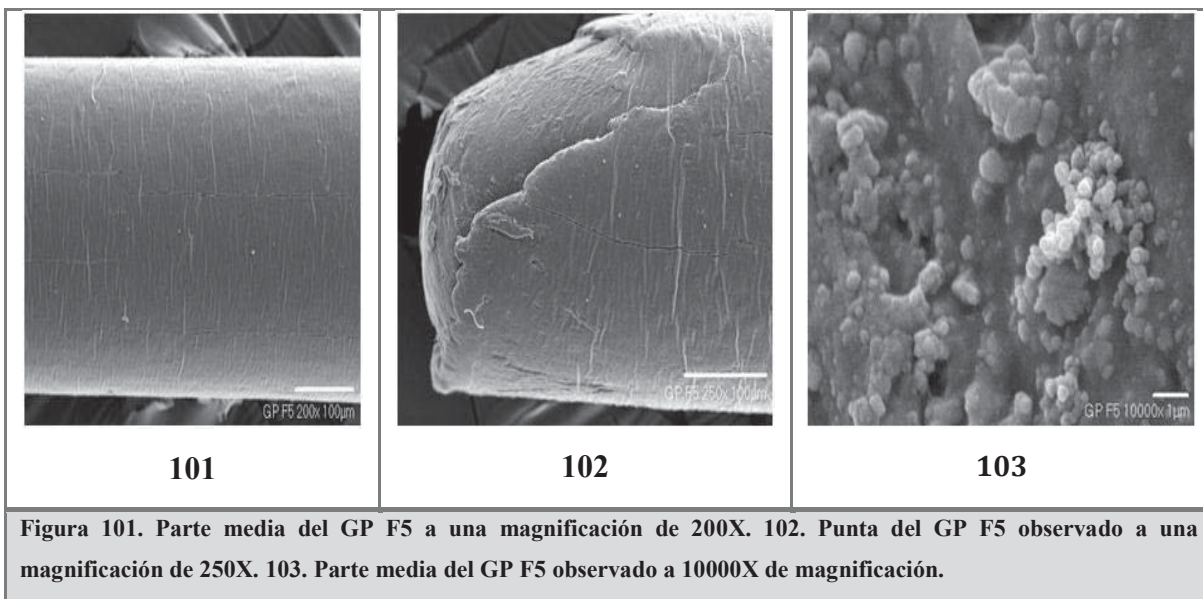
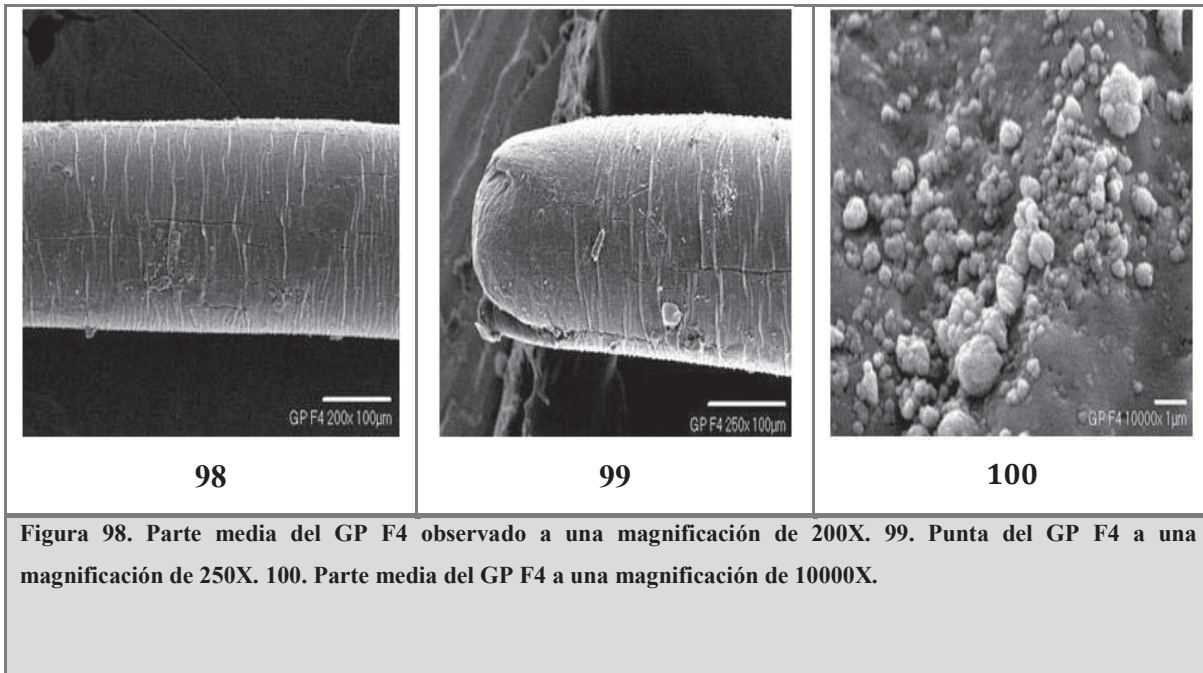
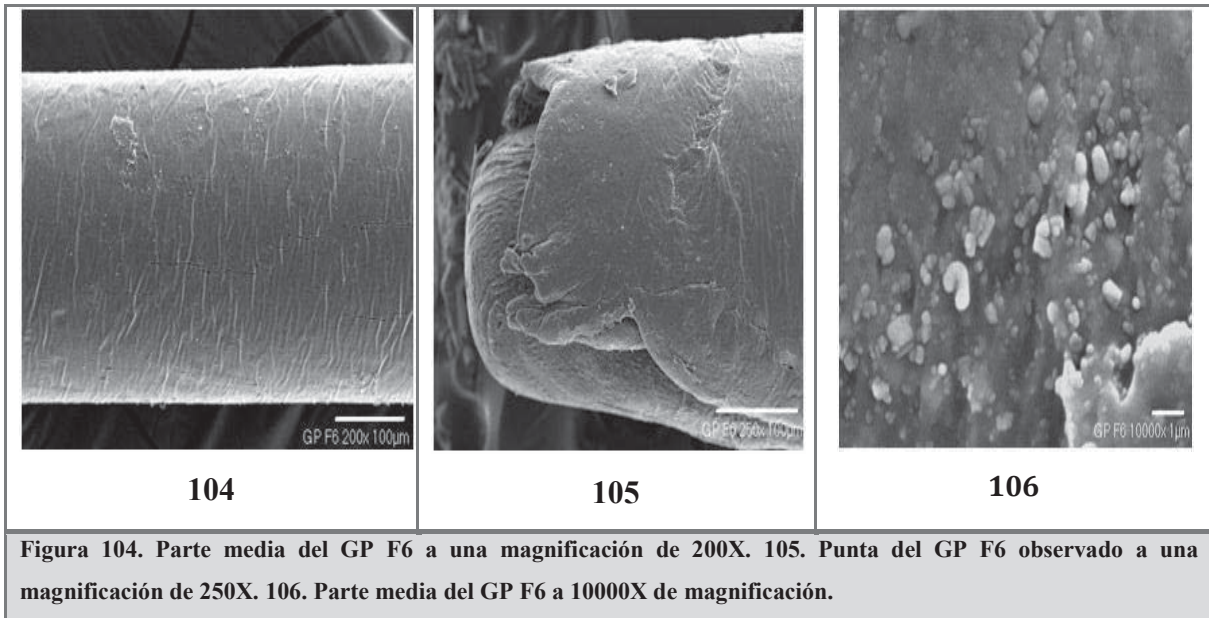


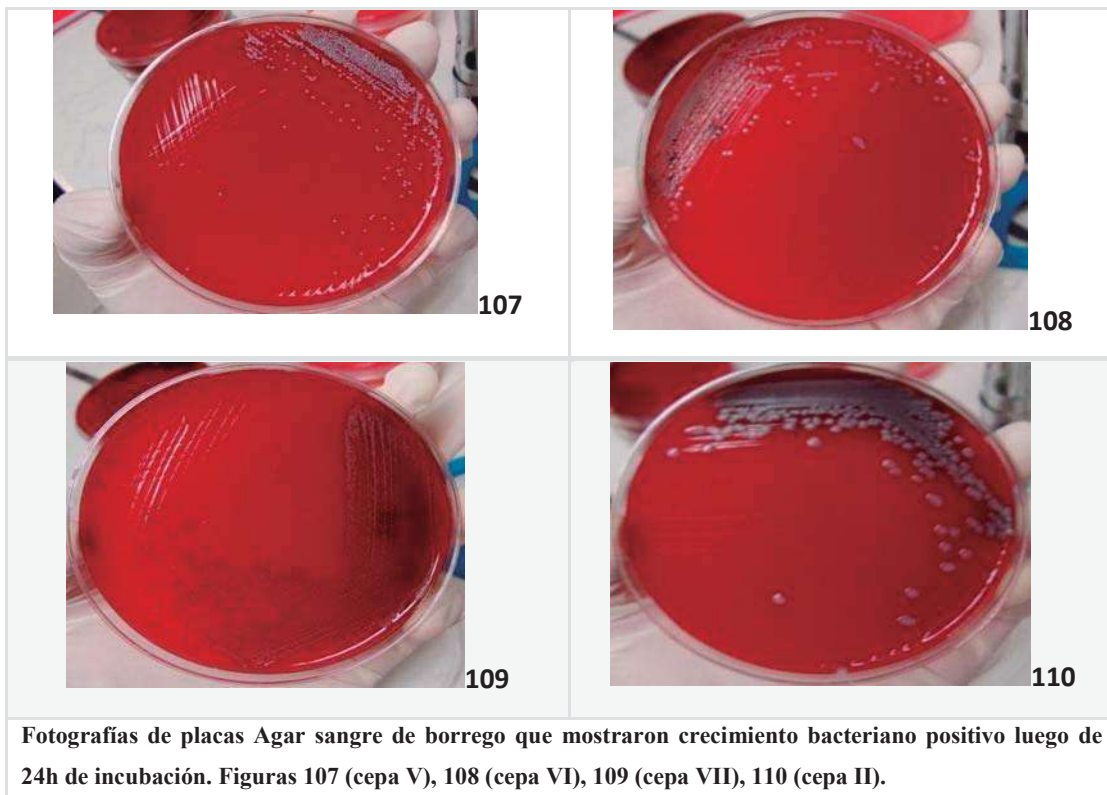
Figura 95. Parte media del GP F3 a una magnificación de 200X. 96. Punta del GP F3 observado a una magnificación de 250X. 97. Parte media del GP F3 a una magnificación de 10000X.



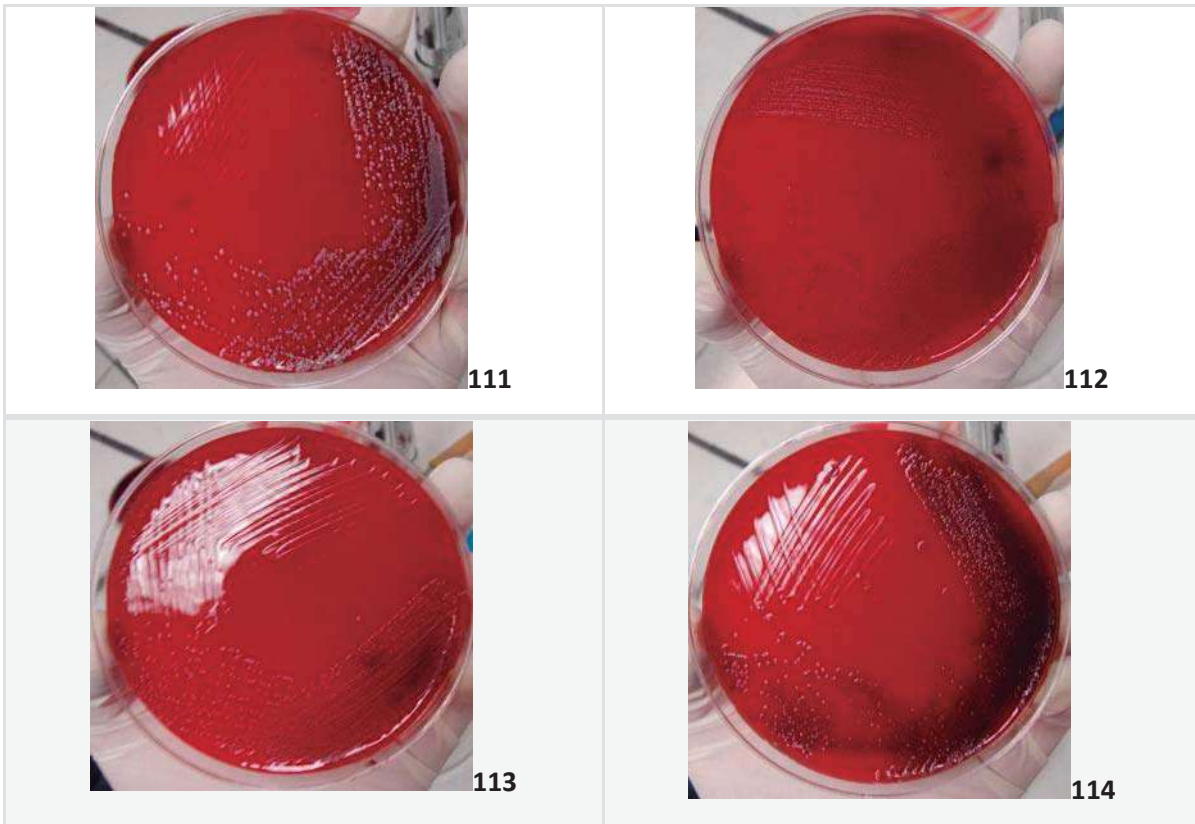
Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.



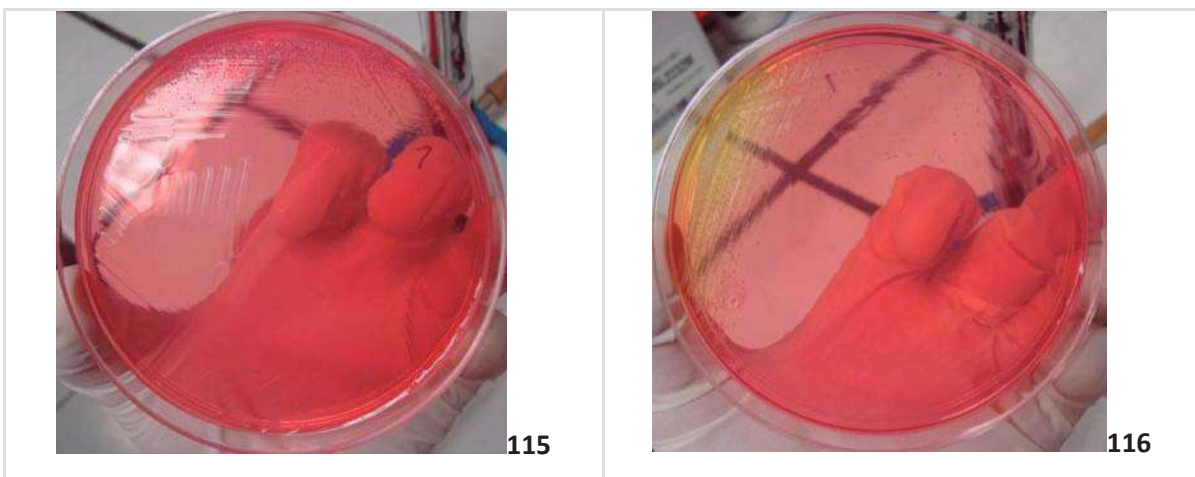
FOTOGRAFÍAS TOMADAS DURANTE LA ETAPA II. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES BACTERIANAS CAPACES DE CONTAMINAR LOS CONOS DE GUTAPERCHA.



Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.

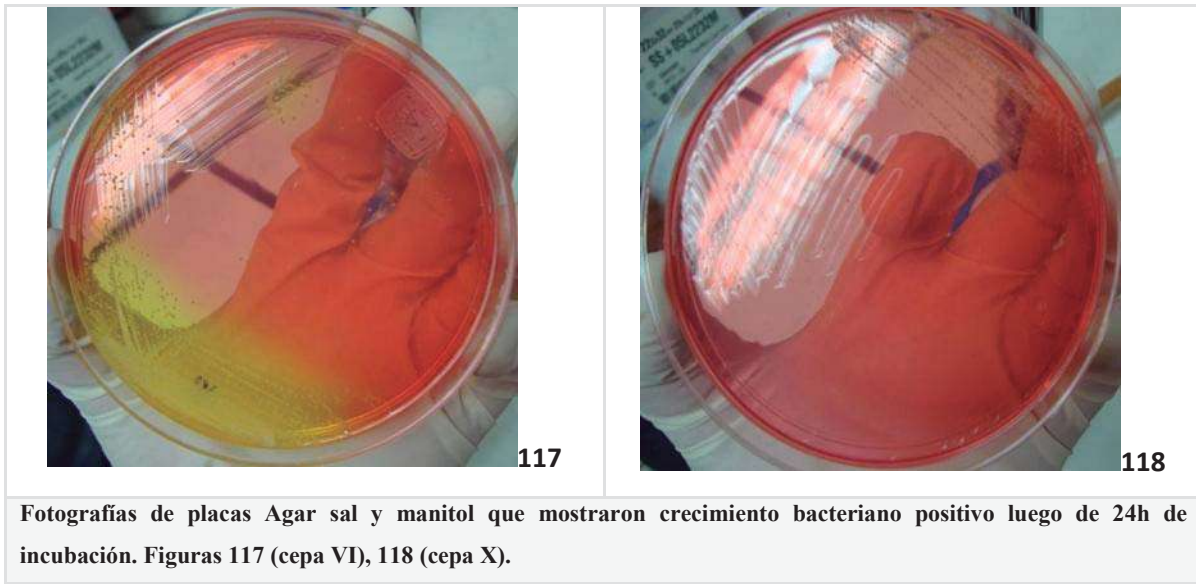


Fotografías de placas Agar sangre de borrego que mostraron crecimiento bacteriano positivo luego de 24h de incubación. Figuras 111 (cepa I), 112 (cepa IX), 113 (cepa III), 114 (cepa X).

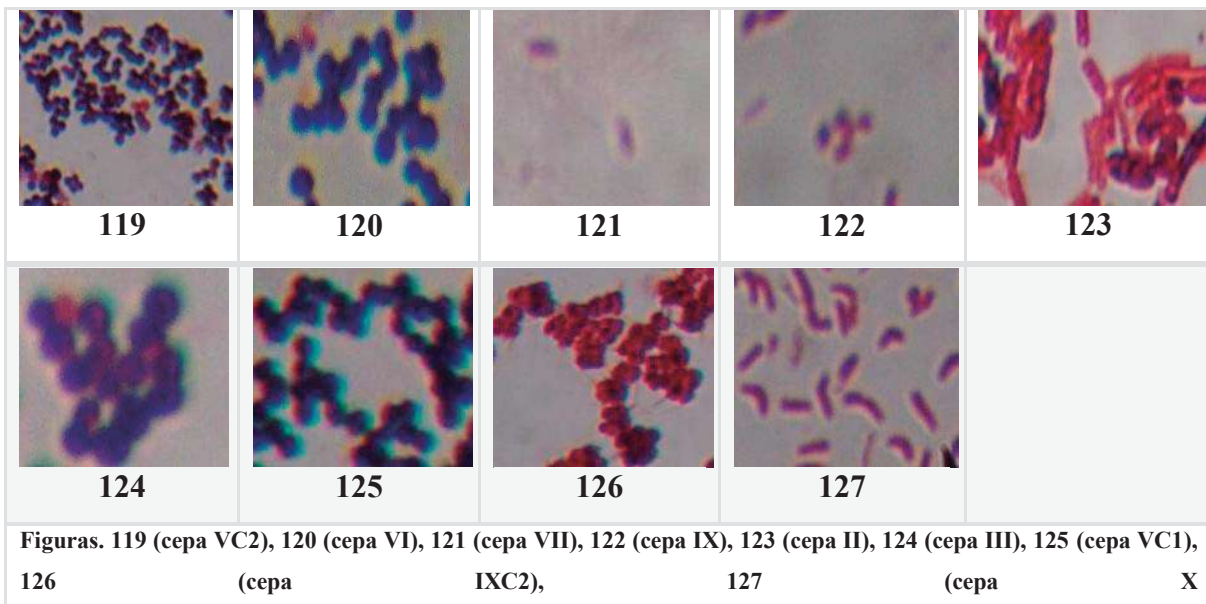


Fotografías de placas Agar sal y manitol que mostraron crecimiento bacteriano positivo luego de 24h de incubación. Figuras 115 (cepa V), 116 (cepa I).

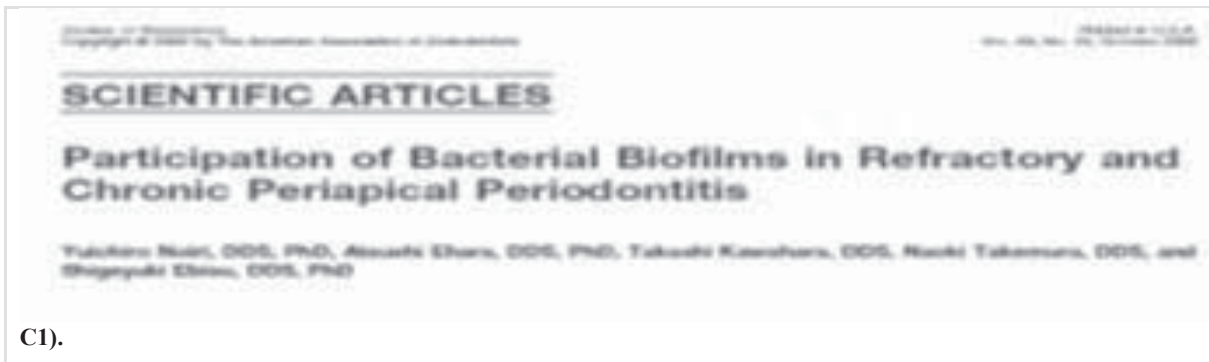
Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.



TINCIONES DE GRAM.



Determinación de la sensibilidad a soluciones desinfectantes, en bacterias aisladas de conos de gutapercha.



C1).

Figura 128. Journal of Endodontics publicado por Noiri y cols. En 2002, las imágenes que se muestran a continuación pertenecen a estos autores.

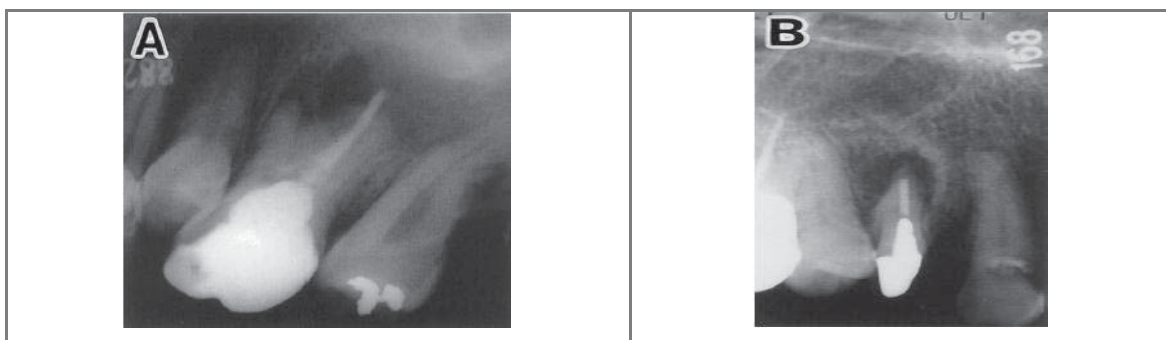


Figura 129. Radiografía de dos especímenes en el examen inicial. (A) El material de obturación (puntas de gutapercha) se observa fuera del conducto radicular palatino (muestra 1). (B) Una gran radiolucidez está presente (muestra 2).

Noiri y cols. 2002.

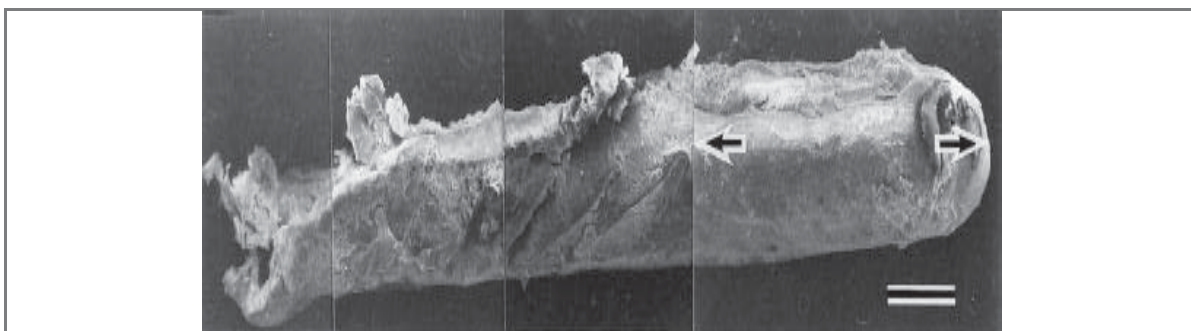


Figura 130. Imagen SEM (microscopía electrónica de escaneo) de un espécimen de gutapercha (muestra 1). El material extruido (flechas) es de aproximadamente 2mm (magnificación original X50; barras=500µm).

Noiri y cols. 2002.

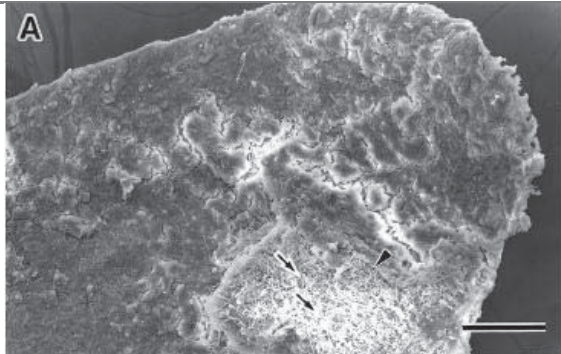


Figura 131. Imagen por SEM (Microscopía electrónica de escaneo) de una gutapercha extruida. (A) Células bacterianas agregadas sin una estructura cubierta por glicocalix (flechas). Otras áreas están cubiertas por una estructura de glicocalix (magnificación original X350; barra=50µm). Noiri y cols. 2002.

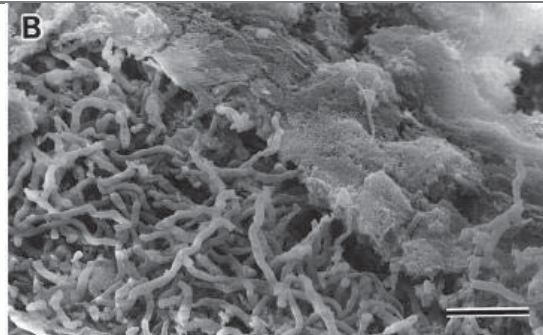


Figura 132. (B) Magnificación mayor del área señalizada por las flechas en la imagen (A). La estructura de glicocalix está presente en el área superior derecha pero no en el área inferior izquierda. Se observan filamentos de bacterias con forma de espiroquetas en el área inferior izquierda (magnificación original X350; barra=5µm). Noiri y cols. 2002.

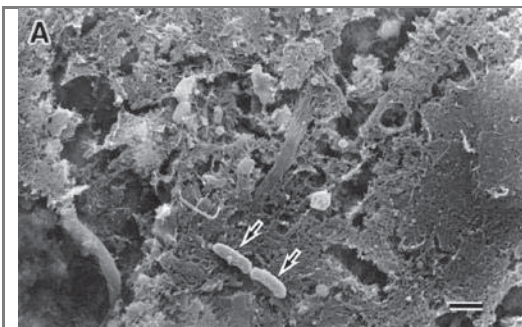


Figura 133. Imagen SEM del área sobreobturada de un espécimen de gutapercha. (A). Unos cuantos bastoncillos cortos (flechas) están localizados en la capa superficial de la estructura de glicocalix (magnificación original X7500; barra=1µm). Noiri y cols. 2002.

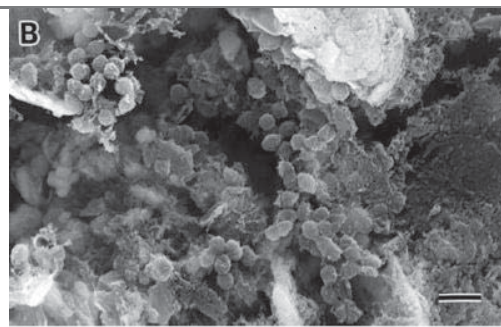


Figura 134. (B) Una colonia pequeña de cocos se observa en la grieta de la estructura de biofilm (magnificación original X10000 barra=1µm). Noiri y cols. 2002.

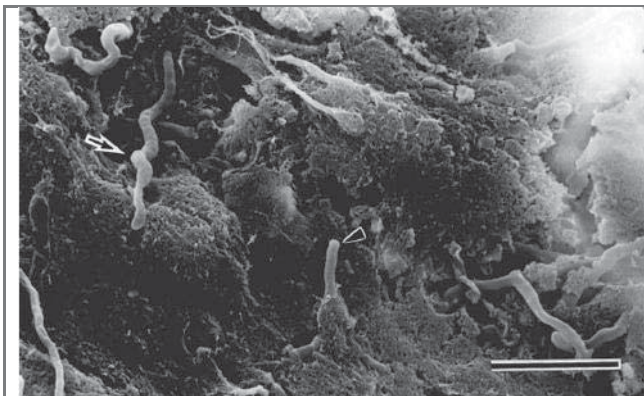


Figura 135. Imagen SEM del área sobreobturada de un espécimen de gutapercha. Bacterias con forma de espiroqueta (flecha) y filamentos (cabeza de flecha), las cuales se ha sugerido que son bacterias planctónicas, salen del biofilm (magnificación original X5000; barra=5 μ m). Noiri y cols. 2002.



Figura 136. Imagen SEM del área periapical de un diente extruido (muestra 2). Una reabsorción radicular externa (flecha) está presente rodeando el foramen periapical. PL= ligamento periodontal residual (magnificación original X35; barra=500 μ m). Noiri y cols. 2002.

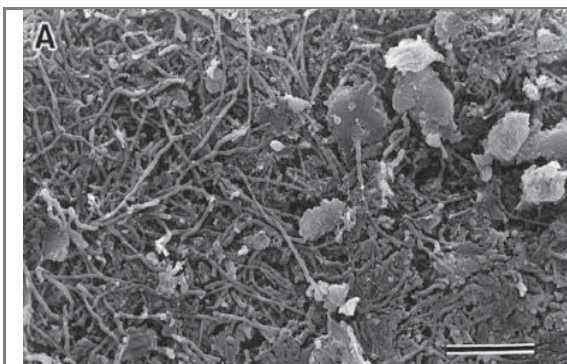


Figura 137. Imagen SEM de un ápice dentro del cuerpo de la lesión de un diente extraído. (A) Filamentos o largos bastoncillos colonizan y constituyen predominantemente la flora bacteriana mixta en la superficie periapical de la raíz (magnificación original X2000; barra=10 μ m). Noiri y cols. 2002.

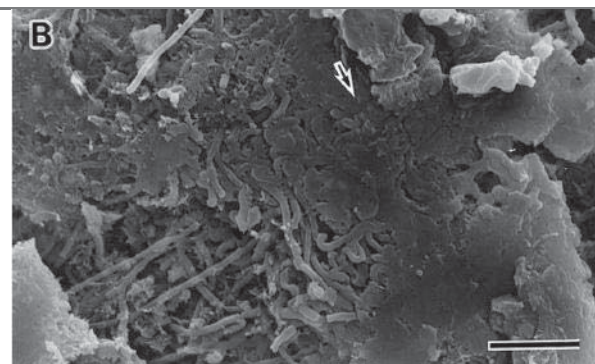
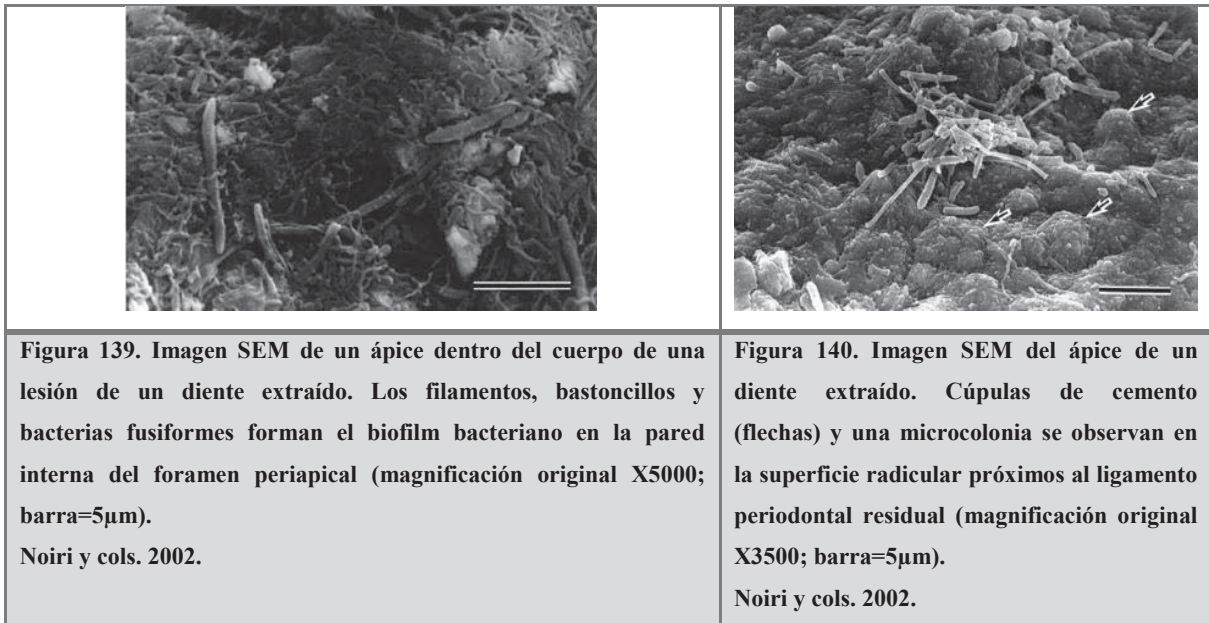
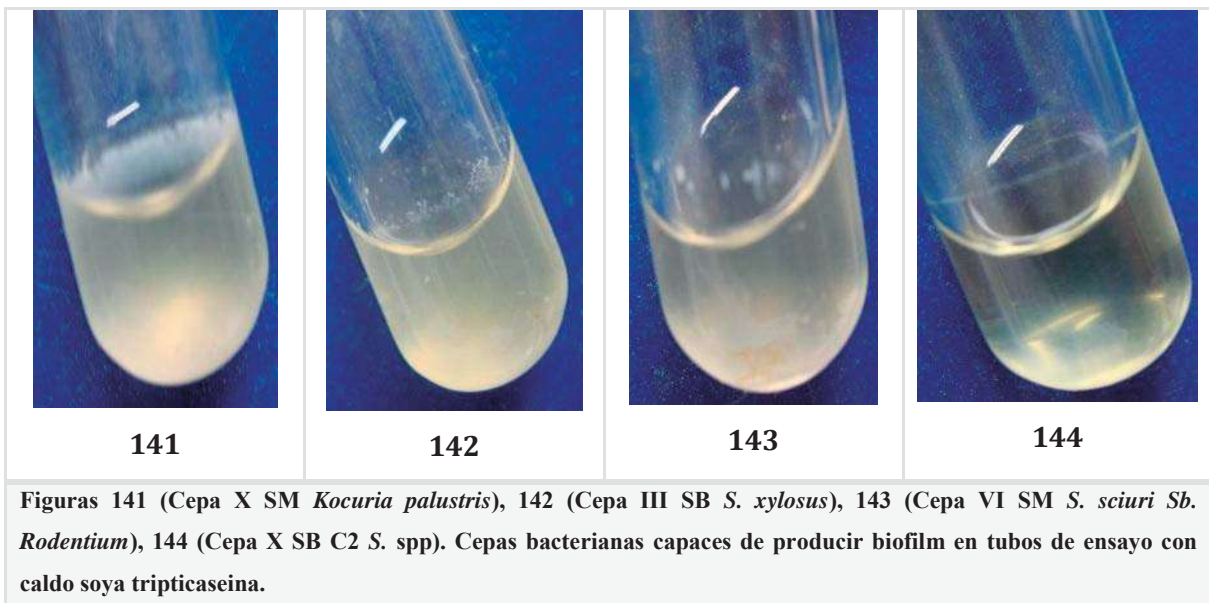
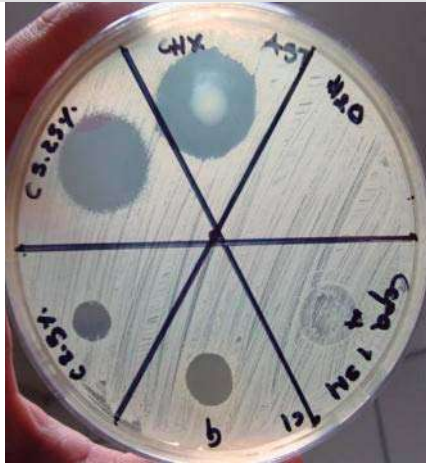


Figura 138. (B) Estructura de glicocalix maduro (flecha) y filamentos forman el biofilm (magnificación original X3500; barra=5 μ m). Noiri y cols. 2002.

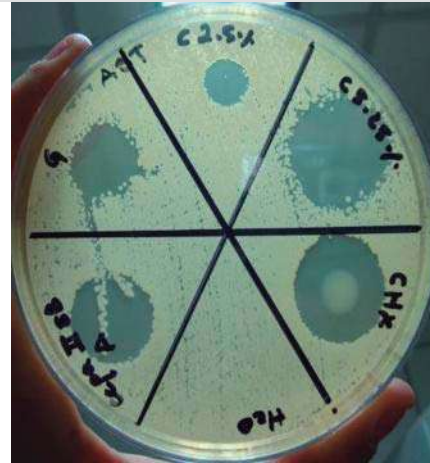


FOTOGRAFÍAS TOMADAS DURANTE LA ETAPA III: DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A SOLUCIONES QUÍMICAS DESINFECTANTES EN BACTERIAS AISLADAS DE LOS CONOS DE GUTAPERCHA.

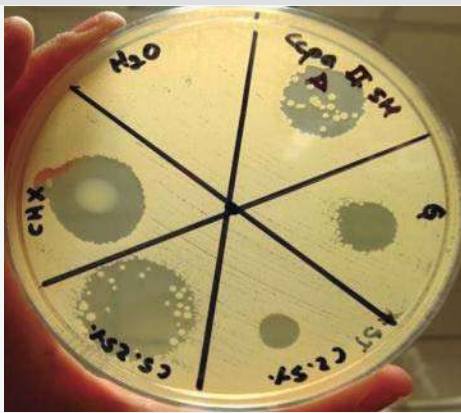




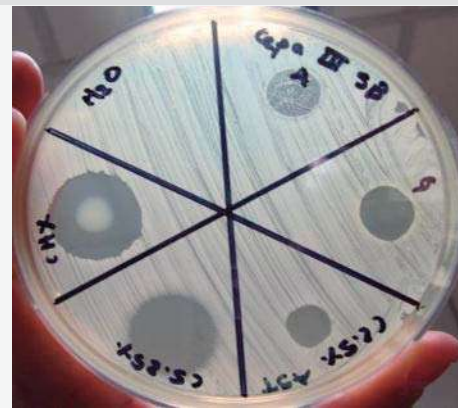
145



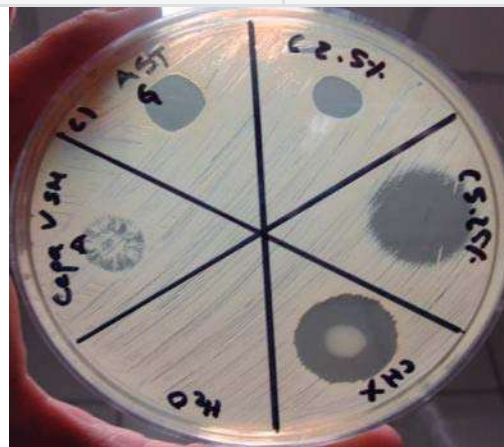
146



147



148



149

Figuras 145 (Cepa I SM C1 *S. epidermidis*), 146 (Cepa II SB *Bacillus* spp), 147 (Cepa II SM *Kocuria risofila*), 148 (Cepa III SB *S. xylosum*), 149 (Cepa V SM *S. spp*). Halos de inhibición creados por las soluciones desinfectantes sobre las cepas bacterianas puras. Nótese como los bordes de los halos creados por NaOCl 5.25% no son regulares, e incluso se distinguen algunas colonias bacterianas creciendo dentro de los mismos.