

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



**“EVALUACIÓN DE LA ADHERENCIA DEL
BIOFILM SOBRE SALIVADERAS DENTALES DE
ACERO INOXIDABLE, CERÁMICA Y OPALINA”.**

TESIS DOCTORAL

ODONTÓLOGO: TERESA ADELA BUTLER

DIRECTOR: Dra. Zulema Casariego.

CODIRECTOR: Dra. Mónica Fernández Lorenzo de Mele.

Año: 2008

A mis dos grandes amores y compañeros:

mi esposo Alfredo y mi hijo Ricardo.

Deseo agradecer la colaboración recibida para este trabajo a:

La Directora de tesis Dra. Zulema Casariego quien me dedicó sus conocimientos y permanente y generosa cooperación.

A la Codirectora Dra. Mónica Fernandez Lorenzo de Mele, quien me brindó desinteresadamente su experiencia científica, su tiempo y amistad en forma incondicional.

Al Dr. Ricardo L. Macchi por su pródigo apoyo en los análisis estadísticos para poder elaborar los resultados de esta tesis.

A las autoridades de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de La Plata, quienes me infundieron ánimo en forma constante para lograr el objetivo propuesto.

A las autoridades del INIFTA por permitirme desarrollar la pasantía de doctorado en los laboratorios de esa Institución donde pude enriquecer mis conocimientos.

Al Ing. Francisco Ciccone y al Grupo Biomat de la Facultad Tecnológica Regional de La Plata por ofrecerme todos los servicios técnicos, que me permitieron iniciar el trabajo.

A la Ing. Liliana Garrido por su contribución con el análisis de Difracción de rayos X.

A la Lic. Carolina Díaz por haberme prestado sus servicios para el análisis de Microscopía de Fuerza Atómica.

A la Dra. Cecilia Cortizo por proporcionarme su ayuda y amistad.

A mi esposo Alfredo y mi hijo Ricardo, por caminar siempre a mi lado y brindarme una vez más su comprensión y cariño.

Es tan vana la esperanza de que se llegará
sin trabajo y sin molestia
a la posesión del saber y la experiencia,
cuya unión produce sabiduría,
como contar con una cosecha
donde no se ha sembrado ningún grano.

Benjamín Franklin.

ÍNDICE

1-INTRODUCCIÓN	1
1.1-Bacterias planctónicas y el biofilm	2
1.1.1-Biofilm. Etapas de formación.....	3
1.1.1.a) Primera etapa: transporte y adhesión reversible.	3
1.1.1.b) Segunda etapa: adhesión irreversible.....	5
1.1.1.c) Tercera etapa: propagación y crecimiento del biofilm.....	7
1.1.1.d) Cuarta etapa: maduración y desprendimiento.....	8
1.1.2- Composición del biofilm.....	9
1.1.3-Comunicación y genética en la formación del biofilm	10
1.2- Biofilm de la cavidad bucal.	11
1.2.1-Placa supragingival.	11
1.3- Equipos odontológicos. Tipos de sustratos y microorganismos asociados a la formación del biofilm.	12
1.3.1- Especies de microorganismos más frecuentes hallados en el biofilm de las cañerías internas de los equipos odontológicos.....	14
1.3.2-Cañerías de los equipos odontológicos, jeringas triples y turbinas.....	15
1.3.3- Salivaderas dentales.	16
1.3.3.a) Salivaderas de acero inoxidable.	17
1.3.3.b) Salivaderas de cerámica.	18
1.3.3.c) Salivaderas de vidrio opal (opalina).	18
1.4- Problemáticas de la contaminación de los equipos odontológicos en la ciudad de La Plata	19
2- OBJETIVOS.	21
2.1- General.	21
2.2- Particulares.	21
3- MATERIALES Y MÉTODOS.	22
3.1- Selección, preparación y análisis de los sustratos.	22
3.1.1-Selección de las salivaderas.	22
3.1.2- Preparación y análisis de la superficie de los sustratos.	23
3.1.2.a) Preparación de los sustratos.....	23
3.1.2.b) Análisis de la superficie.	23
3.1.3- Análisis de la rugosidad por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	24
3.1.4- Análisis de la composición de los sustratos.	25
3.1.4.a) Análisis EDAX.....	25
3.1.4.b) Análisis químico.	32
3.1.4.c) Análisis de la composición de la cerámica por Difracción de rayos X (DRX)	34
3.2- Análisis de las distintas fuentes de contaminación de las salivaderas.	36
3.2.1- Análisis microbiológico de microorganismos planctónicos.....	38
3.2.1.a) Análisis microbiológico del agua de ingreso a los equipos odontológicos.	39
3.2.1.b) Análisis microbiológico del agua de egreso a las salivaderas.....	41
3.2.1.c) Análisis microbiológico de la saliva de los pacientes.....	41
3.2.2- Composición y preparación de los medios de cultivo.....	42
3.2.2.a) Medio de cultivo líquido Mac Conkey.....	42
3.2.2.b) Medio de cultivo Agar sangre.....	43
3.2.2.c) Medio de cultivo Agar Melitado de Saboreaud.....	43
3.2.2.d) Medio de cultivo Agar Mitis Salivarius.....	44
3.2.2.e) Telurito de potasio.....	44
3.2.2.f) Composición de la saliva artificial NAF.....	44

3.2.2.g) <i>Técnica de siembra en anaerobiosis.</i>	45
3.3- Conteo de UFC/ml y UFC/cm² de los microorganismos planctónicos y sésiles. ...	46
3.3.1- Conteo de UFC/ml de las bacterias planctónicas provenientes del agua de ingreso de los equipos odontológicos.	47
3.3.2- Conteo de UFC/ml de las bacterias planctónicas provenientes del agua de egreso hacia las salivaderas dentales.	47
3.3.3- Conteo de UFC/ml de los hongos planctónicos provenientes del agua de egreso de salida hacia las salivaderas dentales.	47
3.3.4- Conteo de UFC/ml de las bacterias planctónicas provenientes de la saliva de los pacientes.	48
3.3.5- Conteo de UFC/cm ² de las bacterias sésiles provenientes de las muestras de las cañerías metálicas con salida hacia las salivaderas dentales.	48
3.3.6- Conteo de las UFC/cm ² de los hongos sésiles provenientes de las muestras de las cañerías metálicas con salida hacia las salivaderas dentales.	48
3.3.7- Conteo de UFC/cm ² de las bacterias sésiles provenientes de los cortes de acero inoxidable, cerámica y opalina.	49
3.3.8- Conteo de UFC/cm ² de los hongos sésiles provenientes de los cortes de acero inoxidable, cerámica y opalina.	49
3.4-Técnicas microscópicas para la observación de microorganismos planctónicos y sésiles.	49
3.4.1- Pretratamiento para la observación por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).	49
3.4.2- Pretratamiento para la observación por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) de microorganismos planctónicos.	50
3.4.2.a) <i>Secado de las muestras mediante técnica de punto crítico.</i>	51
3.4.3- Pretratamiento de los biofilms para su observación a través de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).	51
3.4.4-Técnica de observación y conteo de microorganismos sésiles por Microscopía por epifluorescencia.	51
3.5- Análisis microbiológico de los biofilms formados sobre cortes colocados sobre salivaderas dentales	52
3.5.1- Análisis de las bacterias provenientes de los biofilms formados sobre los cortes de las salivaderas dentales luego de 24 horas de exposición.	52
3.5.2-Análisis de las bacterias provenientes de los biofilms formados sobre los cortes de las salivaderas dentales luego de 64 horas de exposición.	54
3.5.3- Análisis de los hongos provenientes de los biofilms formados sobre los cortes de las salivaderas dentales luego de 24 horas de exposición.	54
3.5.4-Análisis de los hongos provenientes de los biofilms formados sobre los cortes de las salivaderas dentales luego de 64 horas de exposición.	55
3.6- Análisis microbiológico del biofilm formado sobre las cañerías anexas a las salivaderas dentales.	55
3.6.1-Análisis de las bacterias provenientes del biofilm formado en el interior de las cañerías metálicas con salida hacia las salivaderas dentales luego de 24 horas de exposición.	56
3.6.2- Análisis de los hongos provenientes del biofilm formado en el interior de las cañerías metálicas con salida hacia las salivaderas dentales luego de 24 horas de exposición.	56
3.7-Técnicas de coloración.	57
3.7.1- Coloración de Gram Kopellof.	57
3.7.2- Coloración de Gueguen.	59

3.7.3- Coloración con naranja de acridina.....	59
3.8- Pruebas estadísticas.	60
3.8.1- Análisis de varianza (ANOVA).	60
4- RESULTADOS.	62
4.1- Análisis de la rugosidad de los materiales.	62
4.1.1- Análisis de la rugosidad de los materiales mediante el uso de un rugosímetro.	63
4.1.1.a) <i>Rugosidad de los cortes de salivadera de acero inoxidable.</i>	63
4.1.1.b) <i>Rugosidad de los cortes de salivadera de cerámica.</i>	64
4.1.1.c) <i>Rugosidad de los cortes de salivaderas de opalina.</i>	65
4.1.2- Análisis de la rugosidad del acero inoxidable por Microscopía de Fuerza Atómica. 66	
4.1.3- Observaciones microscópicas de las muestras a través de MEB.	67
4.1.4- Análisis de las características físicas.....	68
4.2- Análisis de los microorganismos planctónicos.	68
4.2.1- Análisis de las bacterias planctónicas.	69
4.2.1.a) <i>Análisis de la influencia de la fuente del agua de ingreso al equipo odontológico.</i>	69
4.2.1.b) <i>Análisis del agua de egreso hacia las salivaderas</i>	71
4.2.2- Análisis de los hongos planctónicos.....	73
4.2.2.a) <i>Análisis de la influencia del agua de ingreso a los equipos odontológicos.</i>	73
4.2.2.b) <i>Análisis del agua de egreso hacia las salivaderas dentales.</i>	74
4.2.3- Análisis de las bacterias planctónicas provenientes de la saliva de pacientes sin enfermedad periodontal en los consultorios de Z1 y Z2.	76
4.3-Análisis de microorganismos sésiles.	80
4.3.1- Análisis de las UFC/cm ² de bacterias sésiles provenientes del interior de las cañerías metálicas con salida hacia las salivaderas.	80
4.3.2- Análisis de las UFC/cm ² de los hongos sésiles provenientes del interior de las cañerías metálicas con salida hacia las salivaderas.	81
4.3.3- Análisis de las UFC/cm ² de las bacterias sésiles provenientes de los cortes de las salivaderas dentales.	84
4.3.3.a) <i>Análisis de las UFC/cm² de las bacterias sésiles provenientes de los cortes de acero inoxidable de salivaderas dentales con períodos de exposición de 24 y 64 horas.</i>	85
4.3.3.b) <i>Análisis de las UFC/cm² de las bacterias sésiles provenientes de los cortes de cerámica de salivaderas dentales con períodos de exposición de 24 y 64 horas.</i>	89
4.3.3.c) <i>Análisis de las UFC/cm² de las bacterias sésiles provenientes de los cortes de opalina de salivaderas dentales con períodos de exposición de 24 y 64 horas.</i>	94
4.3.3.d) <i>Análisis comparativo de los valores medios de las UFC/cm² de las bacterias adheridas sobre los tres materiales.</i>	98
4.3.4- Análisis de las UFC/cm ² de los hongos sésiles provenientes de los cortes de las salivaderas dentales.	99
4.3.4.a) <i>Análisis de las UFC/cm² de los hongos sésiles provenientes de los cortes de acero inoxidable de las salivaderas dentales con períodos de exposición de 24 y 64 horas.</i> ... 99	
4.3.4.b) <i>Análisis de las UFC/cm² de los hongos sésiles provenientes de los cortes de cerámica de las salivaderas dentales con períodos de exposición de 24 y 64 horas.</i> .. 102	
4.3.4.c) <i>Análisis de las UFC/cm² de los hongos sésiles provenientes de los cortes de opalina de las salivaderas dentales con períodos de exposición de 24 y 64 horas.</i> ... 105	
4.3.4.d) <i>Análisis comparativo de los valores medios de las UFC/cm² de los hongos adheridos sobre los tres materiales.</i>	107
5- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.	109
5.1-Análisis estadístico de la rugosidad superficial de los materiales.	109

5.1.1-Valores mínimos, medios, máximos y Prueba t para la Ra de los cortes de acero inoxidable.	109
5.1.2-Valores mínimos, medios y máximos y Prueba t para la Ra de los cortes de opalina.	111
5.1.3- Valores mínimos, medios y máximos y Prueba t para la Ra de los cortes de cerámica	112
5.1.4-Análisis comparativo de los valores medios de la Ra de los cortes de acero inoxidable, cerámica y opalina.	113
5.2-Análisis estadístico de los microorganismos planctónicos.	114
5.2.1-Análisis estadístico descriptivo de los valores medios de las UFC/ml de las bacterias planctónicas del agua de ingreso y agua de egreso.	114
5.2.2-Análisis estadístico descriptivo de los valores mínimos, medios, máximos y desviación estándar de las UFC/ml de los hongos planctónicos del agua de ingreso y agua de egreso.	116
5.2.3- Análisis estadístico descriptivo de las UFC/ml de saliva de los pacientes sin enfermedad periodontal.	118
5.3- Análisis estadístico de los microorganismos sésiles.	119
5.3.1.- Análisis de Variancia de las UFC de los microorganismos sésiles enumerados en el interior de las cañerías metálicas con salida hacia las salivaderas dentales.	119
5.3.1.a) <i>Análisis estadístico de las bacterias sésiles.</i>	119
5.3.1.b) <i>Análisis estadístico de los hongos sésiles.</i>	121
5.3.2- Análisis de Variancia de los microorganismos sésiles adheridos sobre los cortes de acero inoxidable, cerámica y opalina de las salivaderas dentales, luego de 24 y 64 horas de exposición.	122
5.3.2.a) <i>Análisis estadístico de las bacterias sésiles.</i>	122
5.3.2.a.i) <i>Análisis cualitativo de valores mínimos, medios y máximos (bacterias adheridas a los cortes).</i>	123
5.3.2.a.ii) <i>Análisis de Variancia (bacterias adheridas a los cortes).</i>	128
5.3.2.a.iii) <i>Análisis estadístico multifactorial (bacterias adheridas a los cortes).</i>	129
5.3.2.b) <i>Análisis estadístico de hongos sésiles.</i>	130
5.3.2.b.i) <i>Análisis cualitativo de valores mínimos, medios y máximos (hongos adheridos a los cortes).</i>	130
5.3.2.b.ii) <i>Análisis de Variancia (hongos adheridos a cortes).</i>	136
5.3.2.b.iii) <i>Análisis estadístico multifactorial (hongos adheridos a cortes).</i>	137
6- DISCUSIÓN.	139
6.1-Contaminación del agua que atraviesa los equipos odontológicos.	139
6.2- Biofilms en los dispositivos de los equipos odontológicos.	143
6.3- Importancia clínica y recomendaciones de Bioseguridad.	146
7- CONCLUSIONES.	149
8- APÉNDICE I	152
8.1-Biopelícula de la cavidad oral.	152
8.1.1- Película adquirida y adhesión primaria.	152
8.1.2- Colonización secundaria.	153
8.1.3- Formación y población biológica de la placa subgingival.	154
9- APÉNDICE II	156
10- BIBLIOGRAFÍA.	169

INTRODUCCIÓN

1-INTRODUCCIÓN.

Los equipos odontológicos reciben agua corriente a través de cañerías domiciliarias, siendo transportada desde los tanques de reserva primaria o fuentes de abastecimiento hasta las cañerías o canillas de los mismos. Por este motivo, dependiendo de la fuente, el agua puede estar contaminada en menor o mayor medida con diversos gérmenes. Consecuentemente, desde su ingreso a través de las cañerías de entrada al equipo, hasta su salida a las salivaderas, jeringas triples, turbinas, etc., el agua puede conducir organismos tales como: hongos, bacterias, parásitos, etc. Se ha observado que ciertos microorganismos suspendidos en el agua corriente (microorganismos planctónicos), se adhieren sobre las cañerías y dispositivos y pueden dar lugar a la formación de una película biológica o biofilm sobre los diferentes sustratos (Shanon *et al.*, 2000). Entre los factores más importantes que influyen en la susceptibilidad de la adherencia microbiana podemos mencionar: la temperatura, la naturaleza del material, el diámetro que poseen los ductos de agua en relación al volumen del líquido que debe transportar la velocidad del flujo de agua, los períodos de reposo a los que son sometidas las unidades dentales y las partículas que se desprenden de las cañerías (Shanon *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001). Por otra parte, la carga microbiana de la saliva y los desprendimientos de la placa dental durante los tratamientos, constituyen fuentes adicionales de contaminación que pueden inducir a la formación de biopelículas (Walker *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2005).

Durante el acto operatorio, los profesionales odontólogos, auxiliares o pacientes, pueden inhalar o tomar contacto con los gérmenes planctónicos a través de las microgotas que quedan suspendidas en el aire con los microorganismos sésiles (que se hayan adheridos a las superficies). Esta exposición a los gérmenes puede dar lugar a infecciones (Williams *et al.*, 1996; Wirthlin *et al.*, 2003).

En consecuencia, los biofilms formados en los distintos elementos que conforman el equipo odontológico, así como los microorganismos planctónicos, constituyen fuentes de contagio de infecciones que es importante controlar, en relación con la bioseguridad de los profesionales y pacientes. Debido a la importancia de los procesos de contaminación que se producen en los equipos mencionados, diferentes entidades tales como Association Dental Administration (ADA), Food and Drug Administration (FDA) y la National Sanitary Foundation (NSF) en E.E.U.U. y la Asociación de Bioquímicos en la Argentina, están recomendando medidas de control. Entre dichas normas podemos citar el uso de agentes antimicrobianos y de filtros en las salidas de agua corriente (ADA, 1999; Mayo *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2001; Walker *et al.*, 2003, Yabune *et al.*, 2005).

De acuerdo a las consideraciones previas, el análisis de los procesos de formación de biofilms en los equipos odontológicos es de suma importancia y debe realizarse teniendo en cuenta las diversas fuentes de bacterias y hongos que probablemente dan origen a dichas biopelículas.

1.1-Bacterias planctónicas y el biofilm.

Las bacterias planctónicas como ya se mencionó, son aquellas que se encuentran libres, flotando en un medio líquido. Se estima que sólo el 1 % de las bacterias de los conductos de agua corriente se encuentran en estado planctónico y el resto forman biopelículas o biofilms (Costerton *et al.*; 1999; Názar, 2007). Los biofilms se originan cuando las bacterias planctónicas perciben una superficie, se adhieren a ella, y luego envían señales químicas para coordinar su diferenciación genética y dan origen a colonias estructuradas incluyendo el desarrollo de una cubierta protectora de polisacáridos (Davies *et al.*, 1998; Kolenbrander, 2000).

La interfase sólido líquido entre la superficie de dispositivos y cañerías odontológicas proporciona un entorno ideal para la fijación y crecimiento de diversos gérmenes.

1.1.1-Biofilm. Etapas de formación.

El biofilm puede definirse como una comunidad de microorganismos que se encuentran embebidos en una matriz polimérica que les permite unirse entre sí y al sustrato sólido. Dichos microorganismos muestran un fenotipo alterado en cuanto al grado de multiplicación celular o a la expresión de sus genes (Daeschel *et al.*, 1998; Názar, 2007). El biofilm cumple un ciclo vital, en el cual las interacciones que realiza con el medio ambiente son de fundamental importancia (Yang *et al.*, 2000; Piciooreanu *et al.*, 2001). La formación del mismo se puede dividir en 4 etapas como se grafica en las **Figuras 1.1-1.4.**

1.1.1.a) Primera etapa: transporte y adhesión reversible.

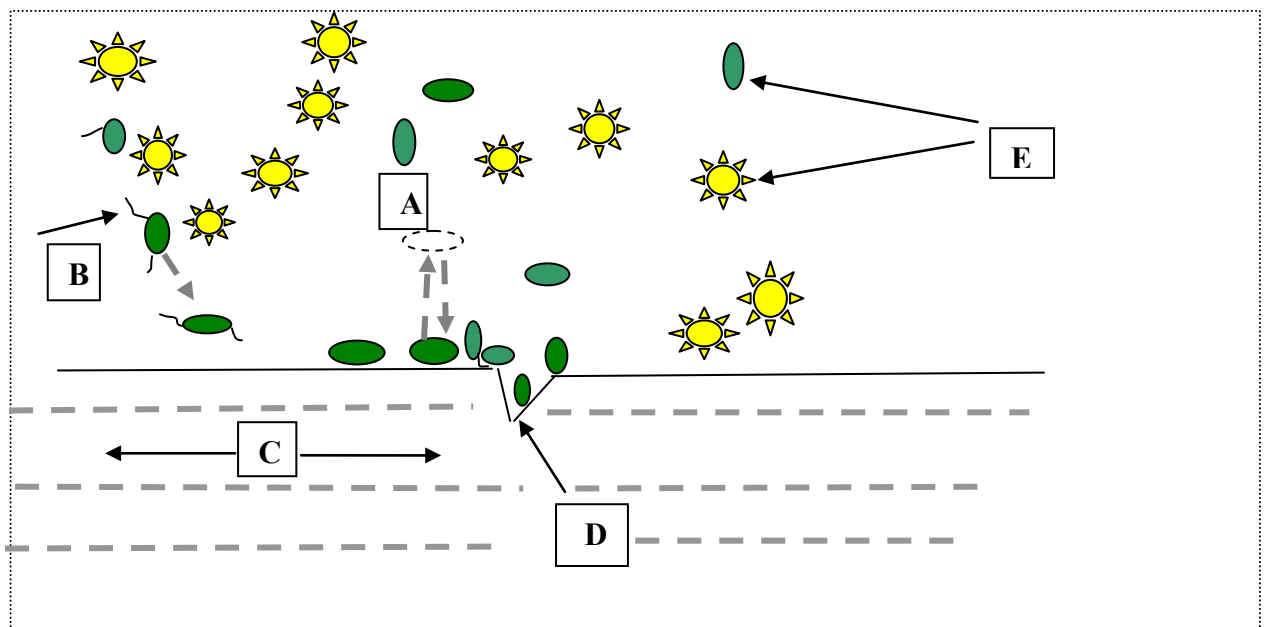


Figura 1.1- Primera etapa: Transporte y adhesión reversible. **A:** bacterias planctónicas con adhesión reversible al sustrato, **B:** elementos de motilidad y adhesión bacterianos (flagelos), **C:** sustrato sólido, **D:** irregularidades del sustrato (rugosidades, porosidad, herrumbre), **E:** diferentes especies bacterianas planctónicas.

Como se representa en la **Figura 1.1**, en esta primera etapa se produce el transporte de las bacterias planctónicas pioneras (**Figura 1.1.E**) al sustrato sólido (**Figura 1.1.C**). El sustrato sólido se halla modificado por la adsorción de moléculas que constituyen una película condicionante que favorece la adhesión de bacterias. El proceso de adhesión bacteriana inicialmente es reversible (**Figura 1.1.A**). Los elementos de motilidad (**Figura 1.1.B**) ayudan a las bacterias a alcanzar la superficie y contrarrestar las repulsiones hidrofóbicas. Una vez que las células toman contacto con la superficie pueden o bien desplazarse sobre ella, o producirse la adhesión secundaria o irreversible. Las irregularidades del sustrato (**Figura 1.1.D**) pueden afectar el proceso de adhesión (Costerton *et al.*, 1999).

Se considera que para que exista una interacción entre la membrana del microorganismo y el sustrato debe haber una distancia máxima de 50 nm (Moller *et al.*, 1998; Purevdorj-Gage *et al.*, 2004; Ábalos, 2005; Witehead *et al.*, 2005). Cuando la bacteria se acerca a la superficie, se produce una atracción debido a las fuerzas de Van der Waals asociadas a un efecto de atracción entre átomos o moléculas (Yamamoto *et al.*, 1998). Cuando a causa de la densidad de la carga superficial que tienen las bacterias en su pared celular, aparece una fuerza de repulsión deben intervenir otros factores para lograr el acercamiento. En algunos casos, la acción de las dos cargas negativas es neutralizada aumentando la concentración de hidrogeniones en la interfaz (Moller *et al.*, 1998; Purevdorj-Gage *et al.*, 2004; Witehead *et al.*, 2005). Un ejemplo se presenta en la placa bacteriana supragingival, el efecto repulsivo de las cargas negativas de los *Streptococcus mutans* y el esmalte dentario, es neutralizado por los hidrogeniones salivales (Singleton *et al.*, 1997).

1.1.1.b) Segunda etapa: adhesión irreversible.

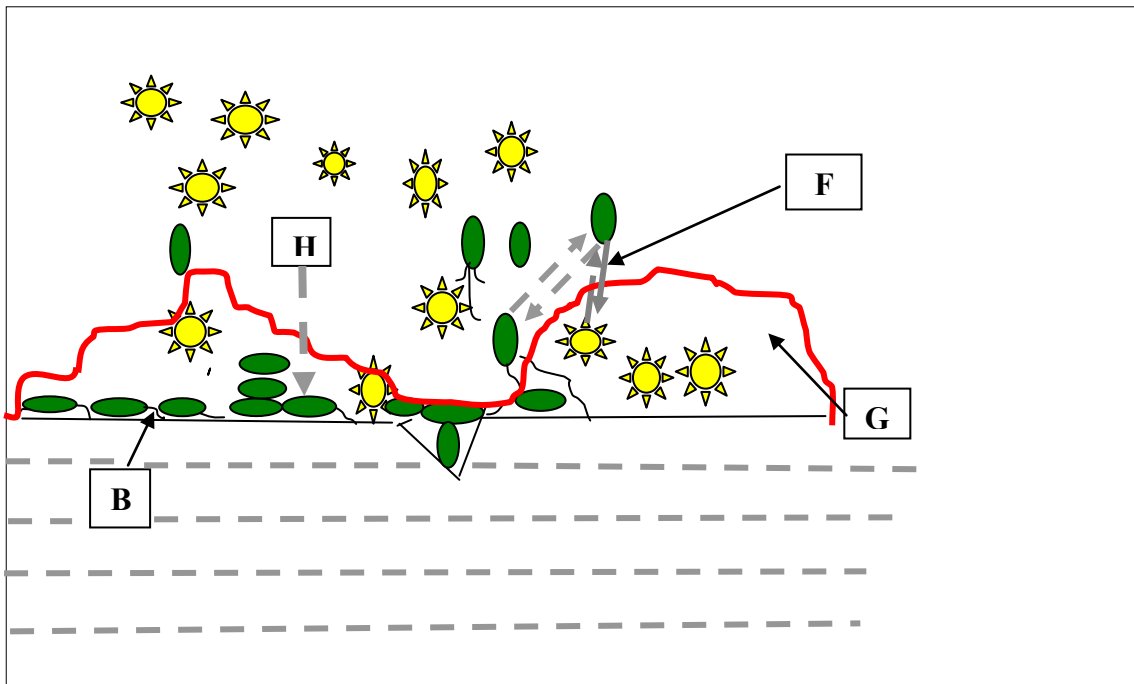


Figura 1.2- Segunda etapa: adhesión irreversible. **B:** flagelos y fimbrias. **F:** comunicación (quórum sensing), **G:** matriz polimérica, **H:** adhesión irreversible.

El transporte de los organismos se lleva a cabo por diferentes mecanismos fluidodinámicos y por la actividad propia de la bacteria (uso de flagelos) (Trulear *et al.*, 1982; Costerton *et al.*, 2000; Purevdorj- Gage *et al.*, 2004; Ábalos, 2005).

La adhesión de las bacterias del biofilm a los diferentes sustratos depende, además de los ya mencionados previamente, de factores físicos, químicos, eléctricos y biológicos específicos (elementos propios de las bacterias tales como: flagelos, fimbrias, curli, etc.) (Trulear *et al.*, 1982; Hsu *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1995; Jonas *et al.*, 2007). Cuando los organismos perciben la superficie sólida comienzan a utilizar elementos de locomoción y adhesión tales como: fimbrias, pilis o flagelos y los curli (**Figura 1.2.B**). Las fimbrias son finos filamentos de proteínas que se distribuyen sobre la superficie de la célula. Se asemejan a delgados pelos que contribuyen en la adherencia bacteriana sobre los sustratos sólidos o a otras células, y son esenciales en los mecanismos de virulencia (Austin *et al.*,

1998). Las fimbrias son prolongaciones que primero deben superar la barrera de repulsión electrostática inicial que existe entre la bacteria y el sustrato antes de dar lugar a la adhesión (Jones *et al.*, 1995). Los flagelos también son prolongaciones celulares con estructura algo más compleja que las fimbrias, de origen proteico, que permiten la motilidad y la adherencia celular. Los pilis, son apéndices celulares ligeramente mayores que las fimbrias que participan en la transferencia de material genético entre las bacterias mediante el mecanismo de conjugación (Bos *et al.*, 1995). Este mecanismo de adhesión lo poseen cierto tipo de bacterias Gram negativas como *Pseudomona aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteric*, que lo realizan por medio de fimbrias más complejas o adhesinas denominadas tipo IV. Los curli son delgados filamentos también de origen proteico, que forman verdaderas redes para entrelazar las bacterias entre sí, lo cual les permite realizar una adhesión de tipo irreversible sobre la superficie sólida (Characklis *et al.*, 1983; Costerton *et al.*, 2000). En la adhesión irreversible (**Figura 1.2.H**) también participan finas fibrillas de la matriz polimérica (**Figura 1.2.G**). Las características físicoquímicas superficiales de los sustratos (composición, rugosidad, hidrofobicidad) también juegan un papel muy importante en el mecanismo de la adhesión (Zobel, 1943). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que dichas características se modifican debido a la formación de películas condicionantes constituídas por sustancias orgánicas, muchas veces excretadas por las bacterias pioneras (Guerrero *et al.*, 2001; Serrano-Granger *et al.*, 2005). Otros factores que favorecen la adhesión son: la velocidad del flujo, la temperatura del agua, la concentración de los nutrientes, etc. (Costerton *et al.*, 1995; Bradshaw *et al.*, 1996; Boulange *et al.*, 1997; Shanon *et al.*, 2000; Purevdorj-Gage *et al.*, 2004).

1.1.1.c) Tercera etapa: propagación y crecimiento del biofilm.

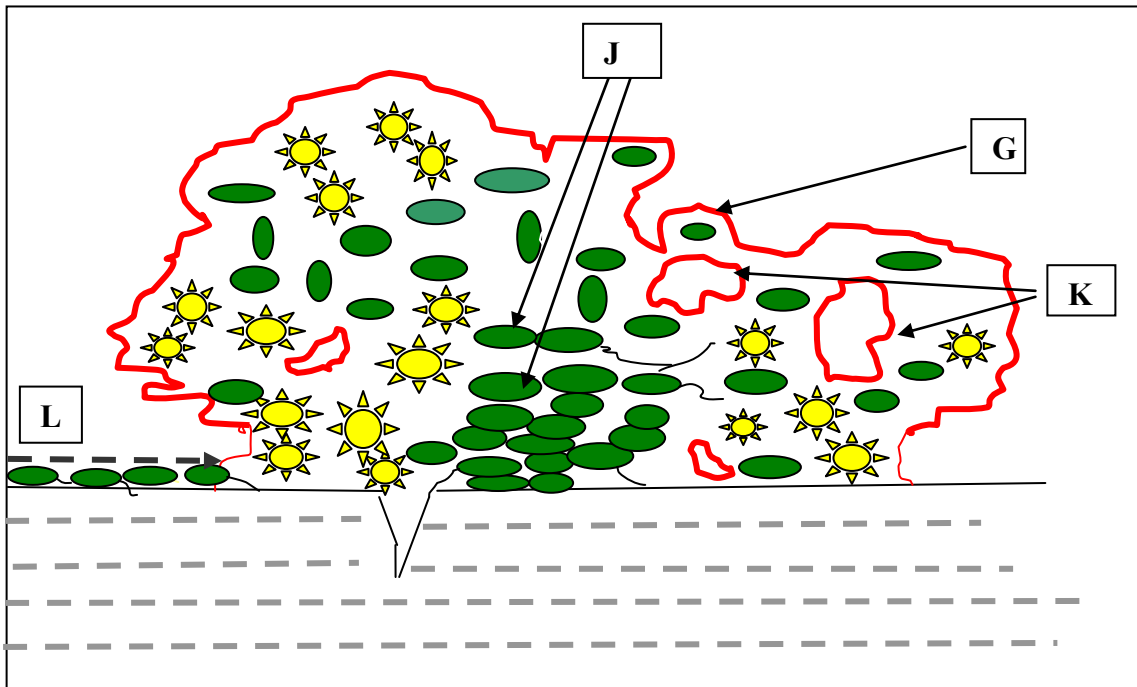


Figura 1.3- Tercera etapa: propagación y crecimiento del biofilm. **G:** matriz polimérica, **J:** crecimiento y reproducción, **K:** poros o canales, **L:** desplazamiento bacteriano o *swarming* sobre la superficie.

Esta es la etapa de expansión (“*spreading*”), crecimiento y reproducción bacteriana. Una vez que las células pioneras se hallan adheridas comienzan a movilizarse sobre la superficie y se van extendiendo utilizando todo tipo de movimientos grupales como *swarming* o *gliding* (**Figura 1.3.L**) (Ariza Barrera *et al.*, 1999; Daniels *et al.*, 2004). El fenómeno de *swarming* (**Figura 1.3.L**) se caracteriza por la formación de una biopelícula que se extiende a partir de pequeñas colonias por el movimiento y la reproducción de las bacterias. La motilidad está facilitada por bacterias diferenciadas más largas que se unen para desplazarse formando pequeñas balsas (**Figura 1.3.L**) (Hernández *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1994; Ariza Barrera *et al.*, 1999; Kolenbrander *et al.*, 2000; Recht *et al.*, 2001).

El *gliding* es otro fenómeno de deslizamiento bacteriano que sucede sin la presencia de elementos especializados. En algunos casos la velocidad de dicho desplazamiento es de 10 $\mu\text{m}/\text{seg}$. Para que ello ocurra deben existir ciertos factores tales como secreción de polisacáridos y surfactantes (Hernández *et al.*, 1993; Lewandowsky *et al.*, 1994).

Finalizada la expansión o “*spreading*” sobre la superficie, la producción masiva de exopolisacáridos (**Figura 1.3.G**) les permite adherirse irreversiblemente y constituir una estructura tridimensional donde se reproducen (**Figura 1.3.J**) y adhieren otras bacterias (Dagostino *et al.*, 1991; Stoodley *et al.*, 2002; Rasita *et al.*, 2003). También se congregan otras especies bacterianas formando consorcios mediante asociaciones específicas (Moller *et al.*, 1998). Dichos consorcios muestran una arquitectura particular que contiene poros y canales para favorecer la circulación de nutrientes dentro de la matriz polimérica (**Figura 1.3.K**) (Zhang *et al.*, 1994; Camesano *et al.*, 2000; Branda *et al.*, 2005).

1.1.1.d) Cuarta etapa: maduración y desprendimiento.

Cuando el biofilm ha madurado, algunas de sus células o grupos de las mismas se desprenden (**Figura 1.4.M**) y pueden colonizar nuevas superficies (**Figura 1.4.N**) (Lewandowsky *et al.*, 1994; Stoodley *et al.*, 2002; Serrano-Granger *et al.*, 2005). El desprendimiento puede producirse como un proceso biológicamente programado o por causas mecánicas tales como la erosión. Se habla de ésta, cuando el biofilm es desprendido por colisión de partículas o fricción con el líquido circundante (Kölbels-Boelke *et al.*, 1988).

Consecuentemente, un biofilm puede desarrollarse a partir de células planctónicas o a partir de células o porciones de biopelículas desprendidas de otro biofilm manteniendo total o parcialmente las propiedades de la biopelícula de la cual procede (Yang *et al.*, 2000; Purevdorj-Gage *et al.*, 2004).

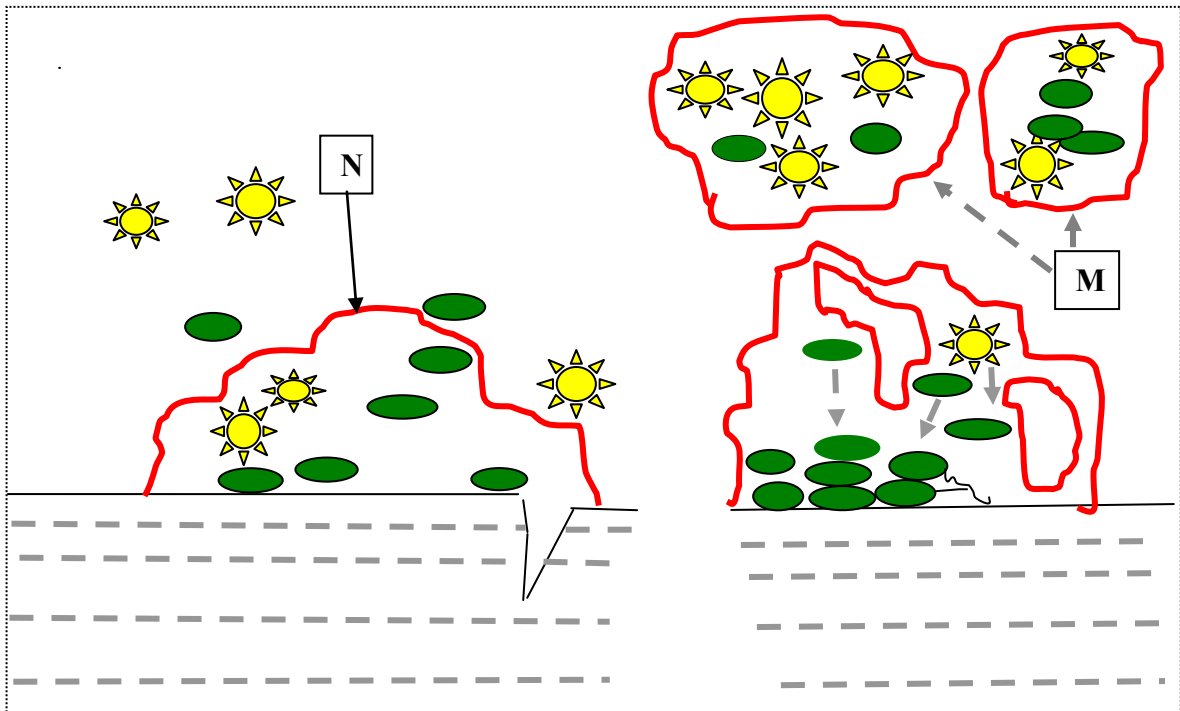


Figura 1.4- Cuarta etapa: Maduración y desprendimiento de bacterias y porciones de biofilms. **M:** porciones de biofilms desprendidos, **N:** Algunas bacterias forman un nuevo biofilm en otro sitio.

1.1.2- Composición del biofilm.

El biofilm está compuesto por bacterias que representan entre un 15% y un 20 % del volumen, y el resto está constituido por una matriz de glicocálix (**Figura 1.3.G**) que contiene material celular e inorgánico (Zhang *et al.*, 1994; Branda *et al.*, 2005).

Los polisacáridos producidos por las mismas bacterias (polímeros extracelulares o exopolisacáridos) son sustancias que tienen cargas neutras o polianiónicas y que, eventualmente pueden actuar como nutrientes para distintas especies de bacterias cuando escasean los mismos. Los consorcios se organizan en forma de microcolonias que se van superponiendo de forma tal que dejan espacios intersticiales huecos, que constituyen canales de agua. Estos permiten el flujo de líquido y cumplen la función de un sistema circulatorio primitivo de transporte y difusión de nutrientes y oxígeno a las bacterias que se hallan en los estratos más profundos. También son un mecanismo de desecho metabólico (Kölbel- Boelke *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 1994; Costerton *et al.*, 1995). Por otra parte cabe

mencionar que en la estructura tridimensional del biofilm existen ambientes con diferentes concentraciones de nutrientes, oxígeno y pH, lo que permite la proliferación de bacterias anaerobias. En los biofilms aeróbicos las zonas más externas son metabólicamente más activas que las zonas profundas (Moller *et al.*, 1998).

La estructura y composición del biofilm, por lo tanto, depende de un gran número de variables tales como las características del sustrato, de los microorganismos y de las características del medio ambiente (Vieira *et al.*, 1993; Párasek *et al.*, 2000; Lasa, 2006).

1.1.3-Comunicación y genética en la formación del biofilm.

Una vez que las bacterias se hallan adheridas al sustrato, comienzan a comunicarse entre sí y entre las diferentes especies. Para ello, utilizan una serie de señales químicas coordinadas, que les permiten interactuar entre célula y célula. Esta comunicación denominada *quórum sensing* (**Figura 1.2. F**), se realiza a través de pequeñas moléculas mensajeras (Párasek *et al.*, 2000). Estas señales químicas, les posibilitan detectar la presencia de microorganismos vecinos, determinar la población existente y responder a eventuales cambios ambientales (Davies *et al.*, 1998; Daniels *et al.*, 2004; Davey *et al.*, 2006). Cada bacteria que se fija a la superficie produce moléculas a modo de señal, por lo cual, a mayor número de bacterias unidas, aumenta la concentración local de esta señal. Posteriormente, en el interior de las bacterias, se inducen diferentes expresiones químicas, y de esta manera, se produce la diferenciación de las bacterias constituyentes del biofilm (Moller *et al.*, 1998; Loo *et al.*, 2000). Las bacterias Gram positivas, utilizan generalmente oligopéptidos modificados como señal y las bacterias Gram negativas se comunican mayoritariamente mediante las acil-homoserina-lactonas (Ashwell *et al.*, 1982; Párasek *et al.*, 2000; Názar, 2007). Los microorganismos también poseen un receptor que puede detectar específicamente al autoinductor correspondiente. Por otra parte, cuando éste queda unido al receptor, se activa la transcripción de determinados genes, incluyendo aquellos

utilizados para la síntesis del inductor (Bos *et al.*, 1995; Davies *et al.*, 1998). Después que en el medio se acumula una suficiente cantidad del autoinductor, éste activa un receptor específico (Gibbons *et al.*, 1983; Haverstein *et al.*, 1996; Blehert *et al.*, 2003).

1.2- Biofilm de la cavidad bucal.

Como se mencionó previamente, la cavidad oral de los pacientes es una fuente de contaminación microbiana. El biofilm oral es considerado como un prototipo o ejemplo de convivencia microbiana. Las bacterias que se encuentran en la saliva son planctónicas, por hallarse suspendidas en un medio líquido, mientras que las bacterias adheridas a las superficies duras (diente, implantes, reconstrucciones, prótesis, etc.) forman una película gelatinosa adherente (biofilm) conocida como “placa dental”. La misma es el principal agente etiológico de la caries dental y de las enfermedades periodontales (Serrano-Granger *et al.*, 2005; Barrancos Mooney *et al.*, 2006). Las bacterias orales de la placa dental constituyen una colonización mixta producida sobre los tejidos dentarios: esmalte y cemento. Tal asociación deriva de la coagregación de bacterias orales que se reconocen y comunican entre sí. En estudios realizados sobre el biofilm oral, se han descubierto genes bacterianos que definen su desarrollo y que son diferentes a los hallados en la vida planctónica. Por su ubicación o tejidos que cubren se distinguen dos tipos de placa: la supragingival y la subgingival (Cadwell *et al.*, 1997).

1.2.1-Placa supragingival.

La placa dental es definida como una entidad bacteriana proliferante que se adhiere firmemente a las superficies dentarias y que por su actividad enzimática y metabólica actúa como agente etiológico de la caries dental (Marcantoni, 1999). La cavidad bucal constituye un sistema heterogéneo y complejo, en el cual los elementos anatomofisiológicos son determinantes para el desarrollo del biofilm. En ella las fosas, fisuras, elementos protéticos,

crevice gingival y saliva, actúan en forma directa o indirecta en la retención de los microorganismos orales. Los mismos se adhieren a las superficies, mucosas y las piezas dentarias mediante los diferentes mecanismos de adherencia descritos. En contacto con determinados nutrientes estos microorganismos se relacionan con la película adquirida que cubre las piezas dentarias a través de una matriz de polisacáridos. Como consecuencia de estas situaciones, desarrollan un sistema heterogéneo sobre el que crecen, se reproducen y generan ácidos, como producto del metabolismo de los hidratos de carbono, pudiendo dar origen a las diferentes patologías dentarias (Loesche, 1988; Marcantoni *et al.*, 2000; Guilarte *et al.*, 2004; Bing-Yang *et al.*, 2005).

La ampliación de la temática de los biofilms de la cavidad bucal y de los microorganismos que los constituyen se encuentra en el **Apéndice I**.

1.3- Equipos odontológicos. Tipos de sustratos y microorganismos asociados a la formación del biofilm.

Desde hace varias décadas es preocupante para diversos investigadores y entidades de la Salud (ADA, FDA, etc.) el problema que presenta la formación del biofilm en las tuberías internas de las unidades dentales (ADA, 1999). El medio acuático que circula por éstas es un reservorio de microorganismos planctónicos, metabolitos orgánicos, minerales del agua y de partículas que se desprenden de las cañerías que pueden dar origen a la formación de un biofilm. Las sustancias orgánicas son adsorbidas por las superficies formando la capa condicionante, que sufre permanentes modificaciones debido a los diferentes factores ambientales. Los microorganismos que más colonizan las unidades dentales son en general los hongos y protozoarios flotantes (Shanon *et al.*, 2000; Szymanska, 2005a). El desprendimiento de microorganismos de las paredes lisas y estrechas de los ductos metálicos, puede inducir la colonización de otras regiones (turbinas, jeringas triples, salivaderas, etc). Así, frente a un flujo o turbulencia intensa, se podría

liberar mayor cantidad de porciones de biofilm, y, tal como se explicó previamente, podrían desprenderse de la superficie de las cañerías para iniciar su ciclo vital en otro sitio (Yamamoto *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2000). Además, el nivel de estrés ambiental puede favorecer este desprendimiento. El estrés ambiental, está referido a los cambios genéticos de adaptación que sufren ciertas bacterias, debido a las variaciones del medio ambiente (por ejemplo, cuando hay agregado de un biocida como hipoclorito de sodio), en algunos casos modificando sus fenotipos (Vieira *et al.*, 1993; Stoodley *et al.*, 1998; Loo *et al.*, 2000; Linton *et al.*, 2001; Sanchez Rodríguez, 2005).

Otro de los factores ambientales que juega un papel muy importante en las variaciones de la composición del biofilm es la suciedad. Se entiende por tal, a la formación de depósitos provenientes de distintas fuentes, por ejemplo de la superficie de los equipos, disminuyendo significativamente la calidad de su funcionamiento y su vida útil (Williams *et al.*, 1993). Las formas de suciedad relacionadas con la formación de la biopelícula en los equipos odontológicos son: la suciedad biológica, la particulada y por precipitación. Se entiende por suciedad biológica, la adherencia de los microorganismos y la elaboración de productos metabólicos a partir de estos. Estos sedimentos pueden depositarse en los distintos componentes del equipo dental como cañerías, jeringas triples, turbinas y salivaderas. Las porciones de biofilm desprendidos, los fluidos orgánicos de la cavidad bucal, que contienen microorganismos en suspensión y las partículas de placa dental de los pacientes pueden adsorberse o depositarse sobre las paredes de dichos dispositivos (Characklis, 1985; Pankhurst *et al.*, 1993; Monteiro de Souza-Gugelmin *et al.*, 2003; Szymanska, 2005a).

La suciedad por corrosión biológica se produce como consecuencia de la corrosión inducida por los microorganismos (Characklis, 1985; Gaylarde, 1990; Videla *et al.*, 1992; Ferrari *et al.*, 1995). Suciedad particulada es la acumulación de partículas sólidas muy

divididas que serían arrastradas por la corriente o se desprenden de las cañerías. La suciedad por precipitación, consiste en la precipitación de sustancias previamente disueltas en el medio líquido sobre la superficie sólida (Characklis, 1983; Williams *et al.*, 1996).

Debido a las diversas fuentes de contaminación que confluyen sobre las salivaderas las mismas constituyen un dispositivo de particular interés para el análisis de las condiciones de bioseguridad. Sin embargo, existen escasos estudios con referencia al grado de contaminación de las mismas.

1.3.1- Especies de microorganismos más frecuentes hallados en el biofilm de las cañerías internas de los equipos odontológicos.

Son diversas las especies bacterianas halladas en las biopelículas formadas y en el agua que circula por las cañerías internas de los equipos odontológicos. Entre los ejemplos más conocidos de microorganismos productores de enfermedad que se han citado en otros países se encuentran: *Aeromonas* spp., *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) *Mycobacterium* spp., *Vibrio* spp., *Campilobacter* spp., *Salmonella* spp., *Staphilococcus aureus* (*S.aureus*) y *Pseudomonas* spp. En el caso caso de la *P. spp.* (Amow *et al.*, 1985; Armon *et al.*, 1997; Benson *et al.*, 1998; O'Toole *et al.*, 1998; Cucarella *et al.*, 2001) los flagelos son los elementos morfológicos que permiten la adhesión y movilidad de estas bacterias sobre la superficie metálica de las cañerías, y su incorporación a los consorcios bacterianos ya formados. Su presencia en los ecosistemas acuáticos, induce a que cambien las características del medio ambiente y en esas condiciones podría congregarse otro morfotipo bacteriano oportunista (Gaylarde *et al.*, 1990; Merino *et al.*, 2001). Esas bacterias planctónicas pueden ser transportadas por el agua de las tuberías hasta las salivaderas dentales pudiendo permanecer en el ambiente durante varios días, ya que son resistentes a los agentes antimicrobianos utilizados habitualmente.

La *L. pneumophila* es una bacteria que fue hallada en España en el 68% de los equipos odontológicos. En algunos casos reportados (Stuot *et al.*, 1997; Barbeau, 2000), la

población excedió las 1000 UFC/ml. Al ser su hábitat de preferencia el medio acuático y poder desarrollarse a temperaturas que oscilan entre los 30° C y los 40° C, podemos decir que los ductos odontológicos son medios ideales para su desarrollo. La importancia de su detección radica que es la causante de un 90 % de los casos de neumonías que requieren hospitalización (Wadowsky *et al.*, 1995).

Las bacterias del género *Mycobacterium* spp. (*M. spp.*) también son peligrosas en los ambientes de salud. El *M. tuberculosis* se transmite generalmente por vía inhalatoria, pudiendo quedar suspendida en el ambiente por períodos de 90 días. Otra especie de fácil adhesión a las diferentes superficies sólidas es el *M. smegmatics*. Esta es una de las 60 especies de *Mycobacterium*, que puede actuar como germen oportunista de los medios hídricos. Otras variedades de este género que fueron encontradas en las unidades dentales son *M. fluorescens*, *M. simiae*, *M. gordoneae* (Recht *et al.*, 2001).

El género *Vibrio* spp. (*V. spp.*) ha sido hallado en diversas regiones del mundo en napas de agua corriente contaminadas por desechos orgánicos, pudiendo de esta manera transmitirse a las líneas de agua dentales. El *V. cholerae*, es la especie causante de cólera, provocando intensas diarreas sobre todo en niños de entre 1 y 5 años de edad, provocando 120.000 muertes al año en el mundo (Faruque *et al.*, 1998).

1.3.2-Cañerías de los equipos odontológicos, jeringas triples y turbinas.

La mayoría de los equipos odontológicos, tal como se mencionó previamente, poseen en su interior un circuito de cañerías generalmente metálicas que actúan como conductoras del agua corriente hacia diferentes dispositivos que poseen las unidades dentales. El estrecho diámetro de las mismas y las curvaturas y los ángulos que describen favorecen la retención de sedimentos y la formación del biofilm (Shanon *et al.*, 2000). El sistema de agua de dichas unidades dentales puede ser el origen de muchas infecciones, ya que por esta vía puede circular una gran variedad de microorganismos planctónicos. La

FDA en E.E.U.U. ha establecido que la carga máxima de bacterias aeróbicas, mesófilas y heterótrofas en el agua de los aerosoles del equipo dental (jeringas triples y turbinas) para los procedimientos no quirúrgicos puede ser de 200 UFC/ml (Unidades formadoras de colonias por mililitro), mientras que el Código Alimentario Argentino, establece que la cantidad de bacterias mesófilas Gram positivas aerobias no debe exceder las 500 UFC/ml (Código Alimentario Argentino, 2007).

Es importante considerar que el agua del equipo dental puede ser ingerida (al cargar los vasos para enjuagues) o inhalada por el paciente, en forma directa o de aerosol, a través de las jeringas triples o turbinas. Por ese motivo se ha vinculado la presencia de flora nasal oportunista no habitual, en profesionales y personal auxiliar de odontología, asociado a la contaminación del sistema de agua antes mencionado. Además se ha demostrado que ciertos dispositivos utilizados en la cavidad bucal del paciente (turbinas, eyectores de saliva y jeringas triples), fueron contaminados por la flora presente en la cavidad bucal de los pacientes (Williams *et al.*, 1993; Charland *et al.*, 1994; Wirthlin *et al.*, 2003; Butler *et al.*, 2005). Por estas razones la ADA indica que aquellos consultorios que no establezcan medidas para el control de la calidad del agua podrían tener conteos microbianos que alcancen 1.000.000 de UFC/ ml en ciertos sitios tal como las cañerías de los equipos dentales.

1.3.3- Salivaderas dentales.

De acuerdo a lo descripto previamente, debido a su conexión con diversas fuentes de contaminación las salivaderas dentales pueden ser verdaderos hábitats de consorcios bacterianos que pueden ser portadores de infecciones durante la atención odontológica. Tal como se ha visto, la naturaleza y características superficiales del sustrato cumplen un rol fundamental en la formación de un biofilm. Por lo tanto, en el caso de las salivaderas, entre los principales elementos se encuentran la composición y estructura superficial de los

materiales de confección de las mismas, que puede caracterizarse a través de la altura de la rugosidad (Ra). Podemos definir a esta última como a la altura promedio del conjunto de irregularidades que forman el relieve de una superficie, definida convencionalmente dentro de los límites de la zona, en la que se no consideran ni errores de forma ni ondulaciones (Instituto Argentino de Racionalización de Materiales, 1964; Hinojosa *et al.*, 2001; Witehead *et al.*, 2004). Normalmente, la acumulación bacteriana comienza por las zonas más irregulares del sustrato, asociadas frecuentemente a los elementos y a los métodos de higiene utilizados.

Otro factor a tener en cuenta es el formato de las salivaderas dentales. Las esféricas permiten un mayor arrastre de partículas por el flujo y baja retención de fluidos contaminados, debido a que no presentan marcadas angulaciones. Las de uso más frecuente en los consultorios odontológicos de nuestro país son salivaderas esféricas de: a) acero inoxidable b) cerámica y c) opalina.

1.3.3.a) Salivaderas de acero inoxidable.

Las salivaderas de acero inoxidable responden a un formato universal en cuanto a su forma y tamaño: son esféricas de aproximadamente 30 cm de diámetro. El acero inoxidable contiene cromo, níquel y molibdeno. Estos elementos le ofrecen brillo y resistencia a la corrosión, sobre todo en superficies expuestas a la humedad como son las salivaderas dentales. El cromo le confiere resistencia a la corrosión localizada que deteriora el material y favorece la adhesión microbiana. Los aceros austeníticos aconsejados para salivaderas dentales y para instrumental médico y odontológico, presentan la superficie más lisa que la superficie de los aceros ferríticos (Benedetti *et al.*, 2000; Kazemi Reza *et al.*, 2000; Irvin *et al.*, 2001; De Mello *et al.*, 2006; Wozniak *et al.*, 2006).

1.3.3.b) Salivaderas de cerámica.

Con el transcurso del tiempo, esta clase de salivaderas ha sido modificada en cuanto a su formato y tamaño. En la actualidad se confeccionan con el formato universal antes mencionado para las de acero inoxidable. La cerámica de confección para esta clase de lavabos, contiene como elemento base la arcilla blanca. La estructura de la cerámica utilizada para la confección de salivaderas dentales le confiere mayor porosidad al sustrato (Bernal *et al.*, 2003). Otra particularidad de este tipo de materiales es la resistencia al agrietamiento o resquebrajamiento, como consecuencia de su cocción a altas temperaturas. Como estos materiales durante su cocción van sufriendo contracciones o variaciones en su superficie, pueden predisponer la adhesión de las bacterias con mayor facilidad. Para ofrecerles brillo y disminuir la rugosidad se las somete a un baño de esmalte de titanio (Rondón *et al.*, 1997; Bernal *et al.* 2003).

1.3.3.c) Salivaderas de vidrio opal (opalina).

En la actualidad este tipo de salivaderas también responden al formato universal. El vidrio común es una estructura sólida formada por diversos silicatos. Este material, resulta de la unión de sílice con dos o más óxidos metálicos. Los materiales vítreos en general, se caracterizan por no hallarse en estado sólido o líquido, sino que adoptan un estado vítreo. El mismo se forma por el endurecimiento de sílice luego de fundirla. Estos son menos porosos que las cerámicas. En el caso del vidrio opal, a la mezcla de silicio, bario y fósforo, se le adiciona una mezcla de borosilicato durante su cocción, que le confiere opacidad, lo cual le permite reducir su rugosidad. Posteriormente, para darle brillo y color blanco se lo somete a un baño de óxido de titanio (Meléndez-Martínez *et al.*, 2005).

1.4- Problemáticas de la contaminación de los equipos odontológicos en la ciudad de La Plata.

En la ciudad de La Plata los consultorios odontológicos pueden recibir agua potable desde distintas fuentes primarias. Las medidas de higiene tomadas por los profesionales en sus consultorios no son uniformes, como así tampoco el diseño y composición de los dispositivos que conforman el equipo odontológico (Butler *et al.*, 2002).

Tal como se ha descripto, tanto las fuentes de agua potable, el diseño y materiales constituyentes de las unidades dentales, así como la salud bucal del conjunto de pacientes atendidos, son factores muy importantes a la hora de evaluar el grado de contaminación microbiana de los elementos (salivaderas, turbinas, eyectores de saliva, jeringas triples, etc), con los que interactúan el paciente, los profesionales y el personal auxiliar de la odontología. Otro de los problemas de particular importancia derivados de la formación del biofilm en las salivaderas dentales es la contaminación ambiental. La misma podría ser causada por los deshechos que se eliminan desde la salivadera hacia el sistema cloacal provenientes del enjuague y de los pacientes y cuando son higienizadas (Butler *et al.*, 2006).

Debido a su importancia en lo que respecta a la bioseguridad de profesionales y pacientes el objetivo de este trabajo es evaluar la contaminación de los equipos odontológicos que trabajan con el agua de red en la ciudad de La Plata. Siendo las salivaderas un elemento donde confluyen tanto el agua que atraviesa el equipo odontológico como la saliva de los pacientes, se ha analizado particularmente la formación de biopelículas sobre este dispositivo. Con este propósito se han evaluado los diversos factores que podrían contribuir a dicho proceso entre ellos: la influencia a) de la carga de microorganismos proveniente de la fuente de agua potable, b) del biofilm formado sobre las cañerías de los equipos odontológicos, c) de la carga microbiana presente en la saliva de los pacientes, d)

de las características físico químicas de las salvaderas y e) del período de exposición del material en los servicios de limpieza.

OBJETIVOS

2- OBJETIVOS.

2.1- General.

Estudiar comparativamente la contaminación microbiológica de salivaderas dentales de tres materiales diferentes (acero inoxidable, cerámica y opalina).

2.2- Particulares.

1- Evaluar la influencia sobre la formación de biofilms en las salivaderas dentales de los siguientes factores:

a- La composición y rugosidad de las salivaderas.

b- La carga microbiana del agua corriente que provee los equipos dentales de 59 consultorios de dos regiones diferentes (Z1 y Z2) de la ciudad de La Plata.

c- La contaminación del agua durante su recorrido por el equipo odontológico.

d- La carga micorbiana proveniente de la cavidad bucal de 50 pacientes sin enfermedad periodontal en atención odontológica en los consultorios evaluados.

e- El período que transcurre durante los servicios de limpieza de las salivaderas.

2- Analizar estadísticamente los resultados a fin de determinar los factores que influyen significativamente sobre la contaminación de las salivaderas.

3- Evaluar la importancia clínica de los resultados obtenidos y elaborar recomendaciones de bioseguridad.

MATERIALES Y MÉTODOS

3- MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1- Selección, preparación y análisis de los sustratos.

Con el objeto de estudiar la adherencia de los microorganismos se seleccionaron, prepararon y analizaron sustratos provenientes de salivaderas dentales de distinta composición. Se seleccionaron salivaderas en desuso de tres materiales diferentes, provenientes de consultorios de La Plata. Se cortaron trozos que fueron utilizados para los ensayos tal como se describe en la sección siguiente.

3.1.1-Selección de las salivaderas.

Se seleccionaron 6 salivaderas dentales en desuso, 2 de acero inoxidable, 2 de cerámica y 2 de opalina. Los criterios de inclusión considerados fueron: que el período de uso de las salivaderas dentales haya sido entre 5 y 10 años, que pertenecieran a equipos odontológicos provistos con agua corriente, que las salivaderas dentales tuvieran un desagüe central, que la salida de agua corriente fuera metálica y que todas se hallaran en condiciones de higiene semejantes. Se excluyeron las salivaderas dentales que hubieran pertenecido a consultorios odontológicos con escasa afluencia de pacientes.

Para realizar los diferentes estudios físicos y químicos las salivaderas dentales se sometieron a los siguientes procedimientos:

Se limpiaron con papel de lija al agua extrafina, tratando de no alterar las características físicas de los materiales. Luego se lavaron con agua corriente, para posteriormente realizar los cortes. Se seleccionaron para ello dos zonas. La primera correspondió a los bordes externos (poco expuestos al fluido salival y al flujo de agua corriente), usando esta como muestras control. La segunda correspondió a paredes internas cercanas a las rejillas de desagüe que tenían otras características superficiales (expuestas al flujo de agua corriente y al fluido salival), y sometidas a procesos de limpieza más frecuentes y profundos.

3.1.2- Preparación y análisis de la superficie de los sustratos.

Se realizó un análisis de la rugosidad de cada uno de los materiales con el propósito de relacionar esta característica física de los sustratos inorgánicos con la posible adhesión de microorganismos sobre los mismos. Para ello se llevaron a cabo los siguientes pasos:

3.1.2.a) Preparación de los sustratos.

Se realizaron cortes de cada uno de los materiales (acero inoxidable, cerámica y opalina) en las dos zonas indicadas previamente: bordes externos y paredes internas cercanas a las rejillas de desagüe de las salivaderas dentales. Las dimensiones de los cortes fueron 1 cm² de base, por no más de 0,5 cm de altura. Para realizar los cortes se utilizaron piedras de diamante y cortadora eléctrica marca Rems, perteneciente a la Facultad Regional Tecnológica de la Universidad Regional de La Plata (URTULP). Dichos sustratos fueron lavados con un equipo de ultrasonido marca Philips de 40 W durante 10 minutos, para la eliminación de las impurezas producidas por los cortes. Posteriormente se secaron con papel absorbente descartable, manteniéndose en frascos de vidrio con tapones de algodón estériles hasta su análisis.

3.1.2.b) Análisis de la superficie.

Se analizó la rugosidad de cada uno de los cortes con un rugosímetro marca Hommel Tester T 1000, perteneciente al Servicio de Investigación BIOMAT, de la Universidad Regional de La Plata. Dicho equipo registra la rugosidad con una precisión de 0.01 µm.

El parámetro utilizado para cuantificar la rugosidad fue el parámetro propio de la distribución estadística de alturas del perfil o superficie bajo análisis, la altura de la rugosidad (Ra), medida en µm. Ra es el promedio aritmético de los valores absolutos de todas las ordenadas dentro de la carrera de medición total (lm) luego del filtrado de desviaciones de formas y la mayor parte de la ondulación.

L: longitud del muestreo (medida en mm) y x: corresponde a las medidas a partir de la línea central (en μm).

La fórmula utilizada para el cálculo de Ra:

$$Ra = \frac{1}{L} \int_0^L |y(x)| dx$$

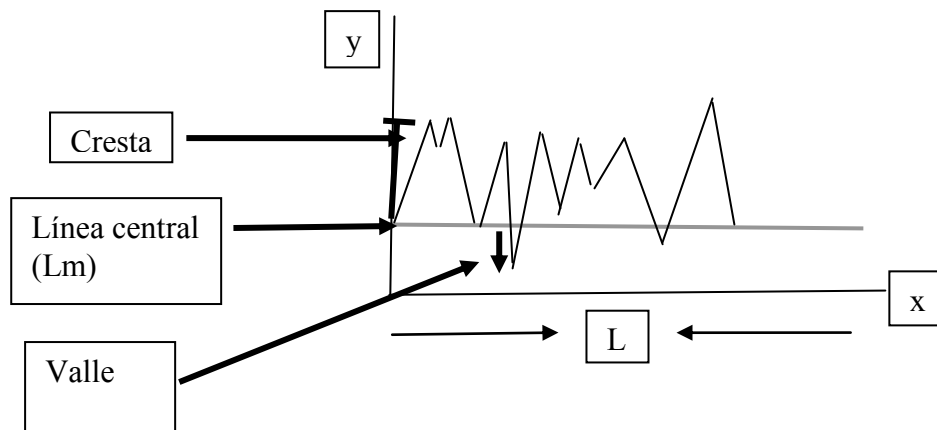


Figura 3.1- Rugosidad promedio. L: distancia de la muestra analizada, Lm: línea media, x. medidas a partir de la línea

Se tomaron además microfotografías con un Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) marca Philips modelo 500, con detector de membrana ultrafina, perteneciente al Servicio de Microscopía Electrónica del CINDECA (Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas) y en el caso del acero inoxidable, también se utilizó el microscopio de AFM del INIFTA (Instituto de Investigaciones Físicoquímicas y Aplicadas).

3.1.3- Análisis de la rugosidad por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Para el análisis de la rugosidad del acero inoxidable fue utilizado un microscopio de Fuerza Atómica marca AFM Nanoscope III a Digital Instruments, perteneciente al Departamento de Microscopía del INIFTA. Se midió un área de $75 \times 75 \mu\text{m}^2$. Los demás materiales no

podieron ser analizados debido a que el espesor de los cortes superaba al máximo admitido por el equipo.

3.1.4- Análisis de la composición de los sustratos.

Se realizó el análisis de la composición química de los sustratos con el fin de comprobar la influencia de la misma sobre la adherencia de las bacterias. Para el estudio de la composición química de las muestras de las salivaderas dentales se realizaron los pasos siguientes. Se obtuvieron 16 cortes de cada tipo de salivaderas dentales, 8 cortes pertenecieron a bordes externos y 8 cortes correspondieron a las paredes internas cercanas a las rejillas de desagüe. Cada uno de ellos fue lavado por ultrasonido (consultar ítem 3.2.2.a) y secado con papel absorbente a temperatura ambiente.

3.1.4.a) Análisis EDAX.

Se analizó la composición química semicuantitativa de cada uno de los materiales mediante EDAX (Energy Disperse X ray Análisis), (ver ítem 3.2.2.b). En este caso se analizó la composición superficial del material hasta una profundidad aproximada de 1µm los resultados de la composición de los sustratos se detallan en las **Tablas 3.1 y 3.2**, y en las **Figuras 3.2-3.4**.

Tabla 3.1-Composición del acero inoxidable obtenida por análisis EDAX.

Componentes	Peso en % (Wt)	
	corte 1	corte 2
Hierro	72,45	74,02
Cromo	14,12	14,40
Oxígeno	7,58	7,03
Silicio	3,30	2,53
Aluminio	1,48	1,21
Sodio	1,06	0,81
Total	100	100

Corte 1: corresponde a un corte de acero inoxidable del borde externo de una salivadera.

Corte 2: corresponde a un corte de acero inoxidable de la pared interna próxima al desagüe de una salivadera.

Como se observa en la **Tabla 3.1** y en las **Figuras 3.2.a** y **3.2.b** el hierro fue el elemento predominante en ambos cortes de salivadera dental de acero inoxidable, encontrándose en orden decreciente de % cromo > oxígeno > silicio > aluminio > sodio, ellos corresponden a un tipo de acero inoxidable ferrítico.

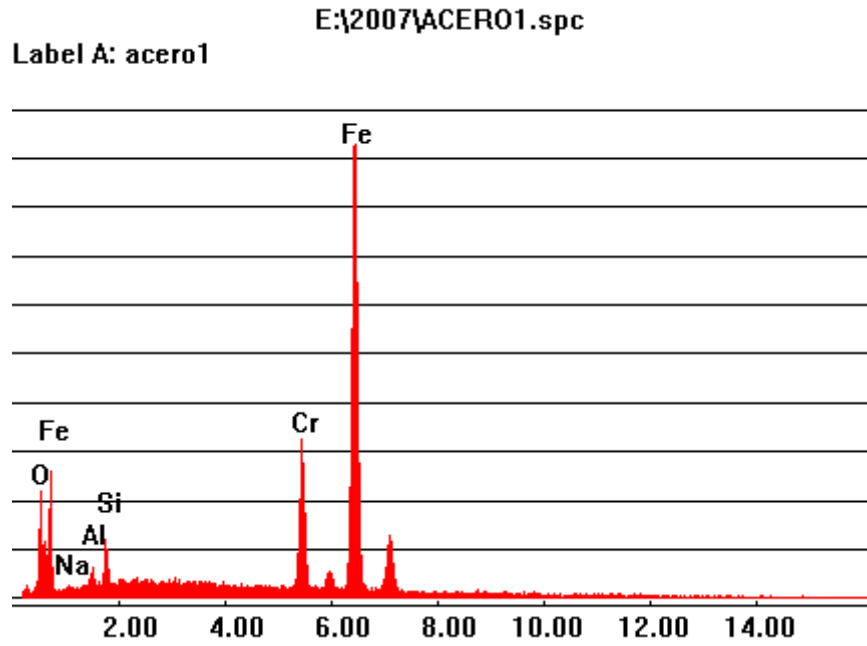


Figura 3.2.a- Análisis EDAX de la composición de un corte de acero inoxidable del borde externo de una salivadera dental. Los elementos encontrados fueron: Fe: hierro, Cr: cromo, O: oxígeno, Si: silicio, Al: aluminio y Na: sodio.

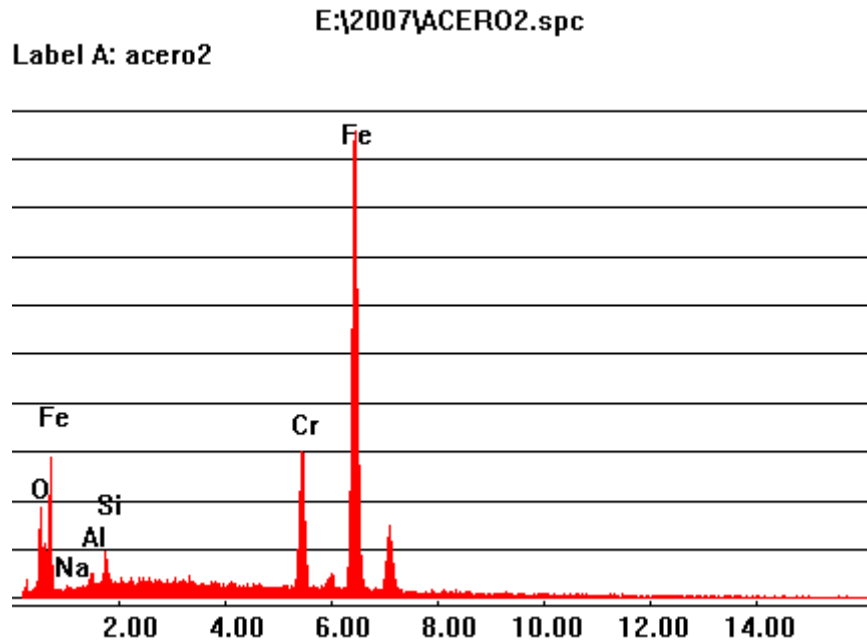


Figura 3.2.b- Análisis EDAX de la composición de un corte de acero inoxidable de la pared interna próxima al desagüe de una salivadera dental. Los elementos registrados fueron: Fe: hierro, Cr: cromo, O: oxígeno, Si: silicio, Al: aluminio y Na: sodio.

Tabla 3.2 Composición de la cerámica obtenida por análisis EDAX.

Componentes	Peso en % (Wt)	Peso en % (Wt)
	corte 1	corte 2
Silicio	64,85	73,31
Oxígeno	16,23	16,39
Aluminio	7,77	3,91
Calcio	4,99	2,26
Sodio	3,57	1,91
Potasio	2,59	1,22
Total	100	100

Corte 1: corresponde a un corte de cerámica del borde externo de una salivadera dental.

Corte 2: corresponde a un corte de cerámica de la pared interna próxima al desagüe de una salivadera.

Tal como muestra la **Tabla 3.2** y las **Figuras 3.3.a y 3.3.b** los resultados de la composición de la cerámica obtenidos por sistema EDAX fueron en orden creciente de % potasio < sodio < calcio < aluminio < oxígeno < silicio.

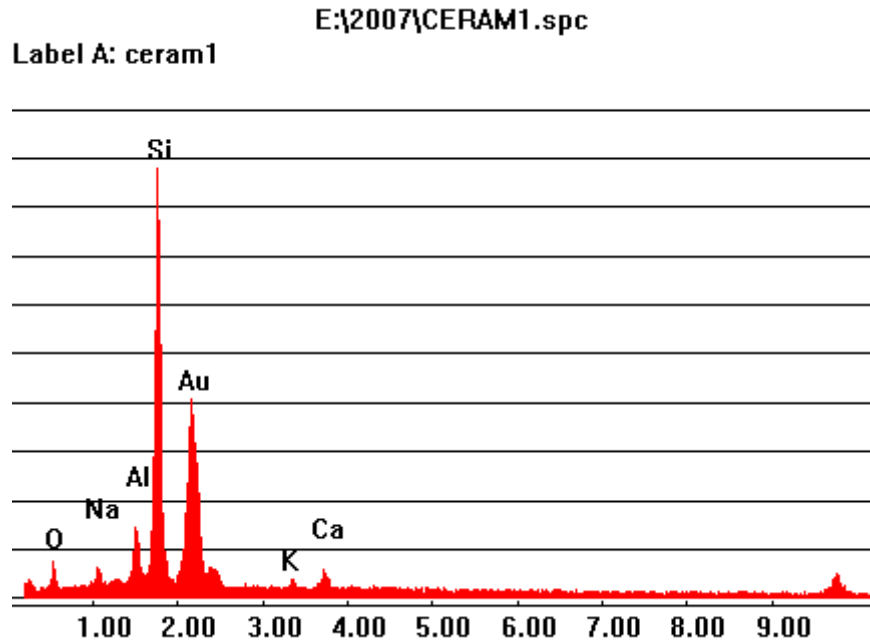


Figura 3.3.a- Análisis EDAX de la composición de un corte de cerámica, del borde externo de una salivadera dental. Los elementos registrados fueron: (Si: silicio, O: oxígeno, Al: aluminio, Ca: calcio, Na: sodio, K: potasio).

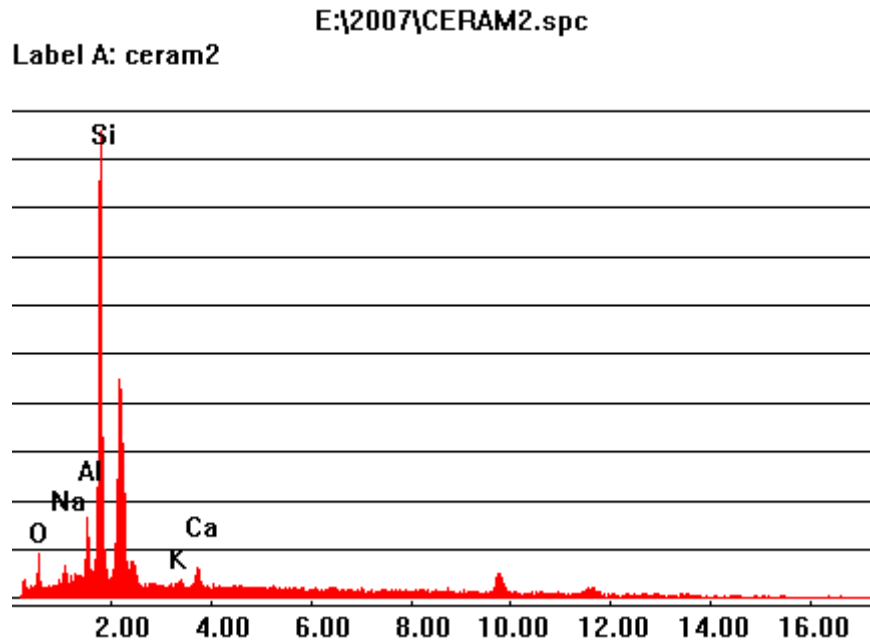


Figura 3.3.b- Análisis EDAX de la composición de un corte de cerámica de la pared interna próxima al desagüe de una salivadera dental. Los elementos registrados fueron: (Si: silicio, O: oxígeno, Al: aluminio, Ca: calcio, Na: sodio, K: potasio).

Tabla 3.3- Composición de la opalina obtenido por sistema EDAX.

Componentes	Peso en % (Wt)	Peso en % (Wt)
	corte 1	corte 2
Silicio	46,47	46,15
Oxígeno	21,80	23,59
Carbono	10,42	11,29
Nitrógeno	6,54	4,83
Calcio	5,36	5,45
Sodio	5,33	4,32
Aluminio	2,41	2,78
Magnesio	1,67	1,58

Corte 1: corresponde a un corte de opalina del borde externo de una salivadera.

Corte 2: corresponde a un corte de opalina de la pared interna próxima al desagüe de una salivadera.

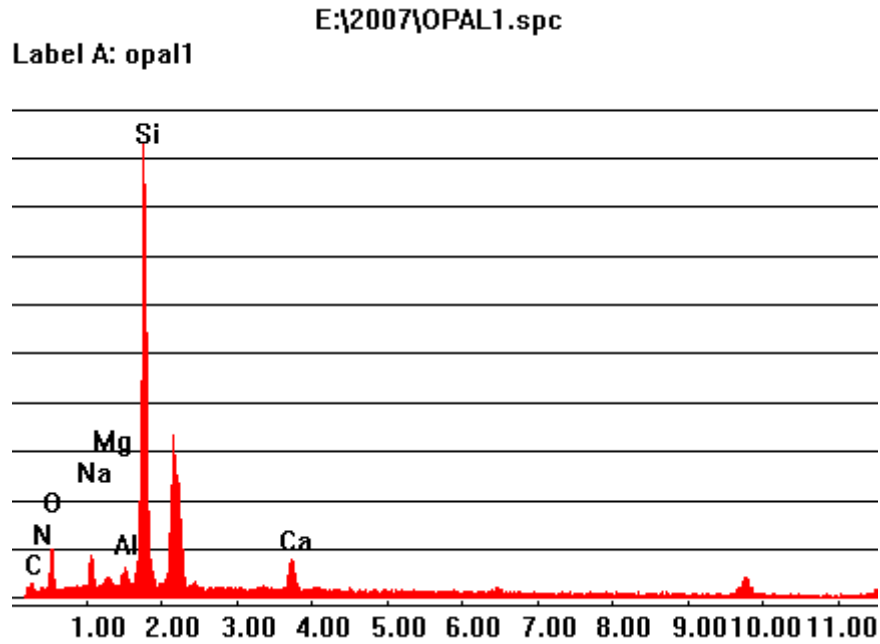


Figura 3.4.a-Análisis EDAX de la composición de un corte de opalina del borde externo de una salivadera dental. Los elementos registrados fueron: (Si: silicio, O: oxígeno, C: carbono, N: nitrógeno, Ca: calcio, Na: sodio, Al: aluminio, Mg: magnesio)

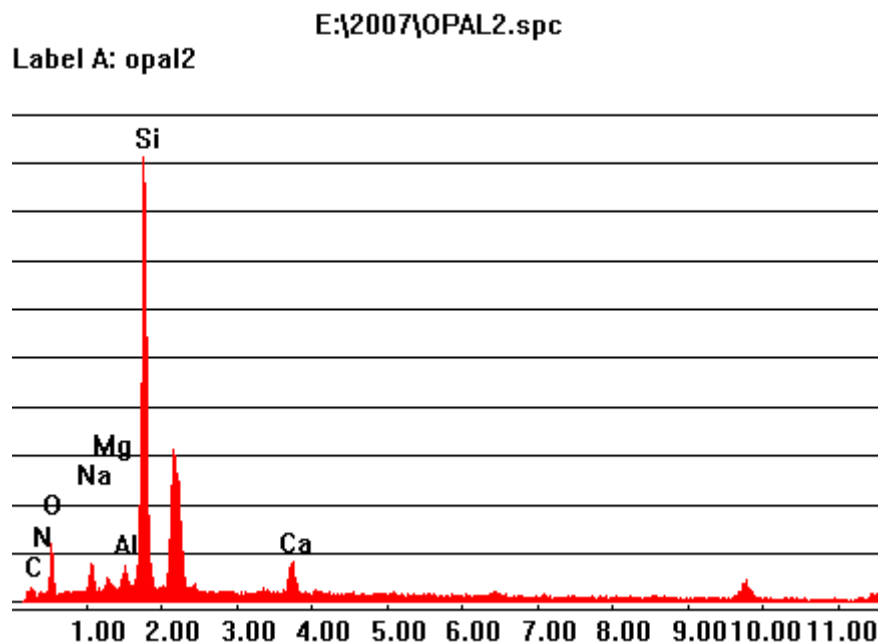


Figura 3.4.b-Análisis EDAX de la composición de un corte de opalina de la pared interna de una salivadera dental. (Si: silicio, O: oxígeno, C: carbono, N: nitrógeno, Ca: calcio, Na: sodio, Al: Aluminio, Mg: magnesio).

Los resultados obtenidos por EDAX de la composición de la opalina en ambos cortes de las salivaderas dentales se muestran en la **Tabla 3.3** y en las **Figuras 3.4.a** y **3.4.b**. Se observa el siguiente orden decreciente de % silicio > oxígeno > carbono > nitrógeno > calcio > sodio > aluminio > magnesio.

3.1.4.b) Análisis químico.

Posteriormente se realizó un estudio cuantitativo de la composición del acero inoxidable y la opalina disolviendo los sustratos en soluciones ácidas. En el caso del acero inoxidable se realizó la disolución de 4 gramos del material, por acción del calor y ácido nítrico al 3%. Se empleó una campana con tiraje exterior para la eliminación de los gases tóxicos. Posteriormente se realizó el análisis químico de la solución. Este método permitió comprobar que el acero utilizado para este trabajo era acero del tipo ferrítico coincidiendo con la determinación realizada por EDAX, los elementos analizados se indican en la **Tabla 3.4**.

Tabla 3.4- Componentes del acero inoxidable.

Elementos	Porcentajes obtenidos
Carbono	0,13 %
Silicio	0,89 %
Cromo	16,20 %
Manganeso	0,39 %
Nitrógeno	0,34 %
Molibdeno	0,005 %
Hierro	65,00 %
Otros materiales	17,10 %

Para el estudio de los componentes de la opalina (o vidrio opal), se utilizó el método de disolución por acción del ácido sulfúrico al 2%, bajo campana con tiraje al exterior. Posteriormente se realizó el análisis químico de dicha solución a través del mismo, se encontró que los elementos constituyentes del vidrio opal utilizado para este trabajo eran los indicados en la **Tabla 3.5**.

Sin embargo, por este método, no pudo llevarse a cabo el análisis de la cerámica debido a que la misma posee una capa de esmalte que resulta difícil de separar del elemento base. Por ese motivo, fue sometida únicamente al estudio semi- cuantitativo EDAX descrito anteriormente.

Tabla 3.5- Componentes de la opalina obtenida a través de análisis químico

Elementos	Porcentajes obtenidos
Silicio	48,34 %
Boro silicato de calcio	20,00 %
Otros materiales	31,66 %

El resultado del análisis de los componentes mediante soluciones ácidas para el acero inoxidable mostró resultados similares a los obtenidos mediante EDAX. Las diferencias observadas se deben a que el análisis EDAX se lleva a cabo solo a nivel superficial (1µm de profundidad), mientras que el análisis químico contempla la composición del material masivo. En el caso de la opalina el silicio es el elemento base del material. El calcio fue hallado bajo la forma de borosilicato y por ese motivo se detectó en proporción mayor en el análisis químico que e el análisis EDAX.

3.1.4.c) Análisis de la composición de la cerámica por Difracción de rayos X (DRX)

Fueron analizados los componentes de la cerámica en su fase vítrea mediante un sistema de difracción de rayos X, utilizando un equipo Philips 3020 con radiación K α del cobre (Cu) y filtro de níquel (Ni) a 40 mV-20mA.

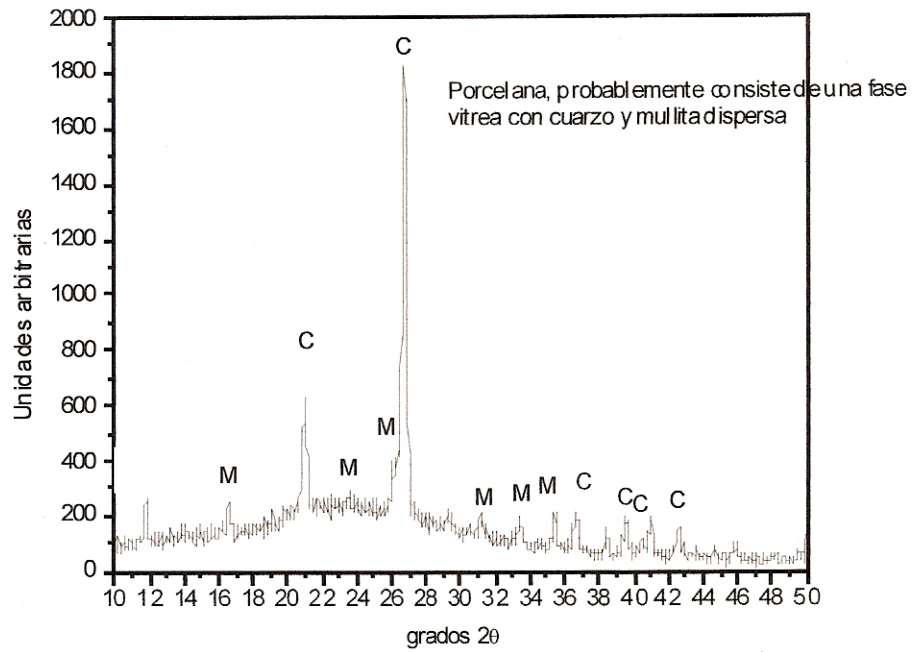


Figura 3.5- Registro de la fase vítrea de la cerámica de una salivadera dental.

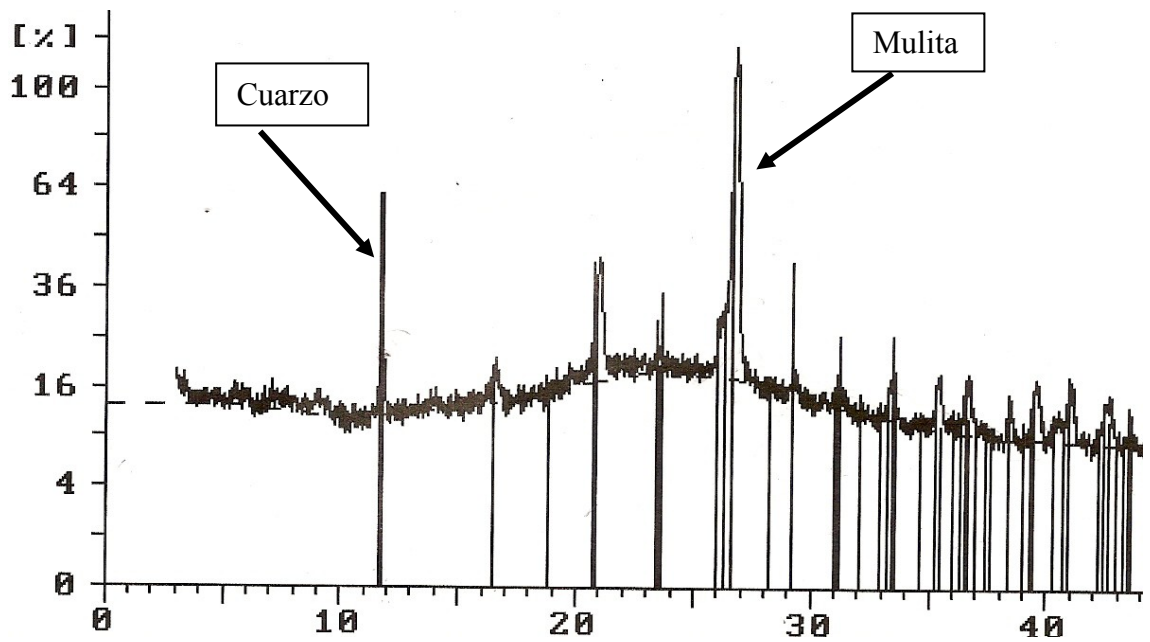


Figura 3.6- Análisis de los elementos de la cerámica por difracción de rayos X.

El difractograma de la **Figura 3.5** muestra la composición de la muestra que contiene básicamente una fase vítrea y dos compuestos: mullita (M) y cuarzo (C), cuyos picos en el

diagrama fueron identificados comparándolos con los espectros de DRX para los materiales puros.

En la **Figura 3.6** se representa el porcentaje de los elementos básicos de la cerámica perteneciente a las salivaderas dentales en estudio, siendo los mismos: mulita y cuarzo. Fue hallado hierro bajo la forma de carbonato de hierro $((Fe_6(OH)_{12}(CO)_3))$ y calcio bajo la forma de sulfato de calcio y agua $(CaSO_4 + H_2O)$.

3.2- Análisis de las distintas fuentes de contaminación de las salivaderas.

Se realizó el análisis microbiológico en distintos sitios del equipo odontológico para evaluar el grado de contaminación. Se analizó la carga microbiana tomando muestras del agua de ingreso al equipo, **Figura 3.7 (a)**, así como del agua de egreso de las salivaderas, **Figura 3.7 (b)**, debido a las posibles modificaciones producidas durante el recorrido por el equipo. Debe tenerse en cuenta que las características del agua corriente pueden variar de acuerdo a la fuente primaria (Z1 y Z2) y depender de diversos factores como el tratamiento de potabilización, del material de las cañerías, del transporte domiciliario, de los equipos odontológicos, etc. Por otra parte la carga microbiana puede variar en el interior del equipo de acuerdo a las condiciones de las cañerías y mangueras del medio **Figura 3.8- (c, f, h)**. La otra fuente de contaminación analizada fue la saliva de los pacientes atendidos en los consultorios.

Por otra parte, se analizaron los biofilms formados en las cañerías metálicas **Figuras 3.7 y 3.8 (c)** de salida del agua hacia las salivaderas dentales y se evaluó la adhesión de los microorganismos sobre cortes de salivaderas colocados sobre salivaderas similares en la zona próxima al desagüe y en los bordes externos (**Figuras 3.7 y 3.8 e y d**).

Se describe a continuación la metodología de análisis de las bacterias planctónicas y de los biofilms. En la **Figura 3.9** se muestra con más detalle los puntos de salida de agua

corriente (a), la salida de agua hacia las salivaderas (b) y los puntos de donde se obtuvieron los cortes de los bordes externos de las salivaderas (d) y zona cercana al desagüe (e). En la Figura 3.8 se muestran además otros componentes del equipo odontológico (mangueras (h), eyector de saliva (f), jeringa triple (g)).

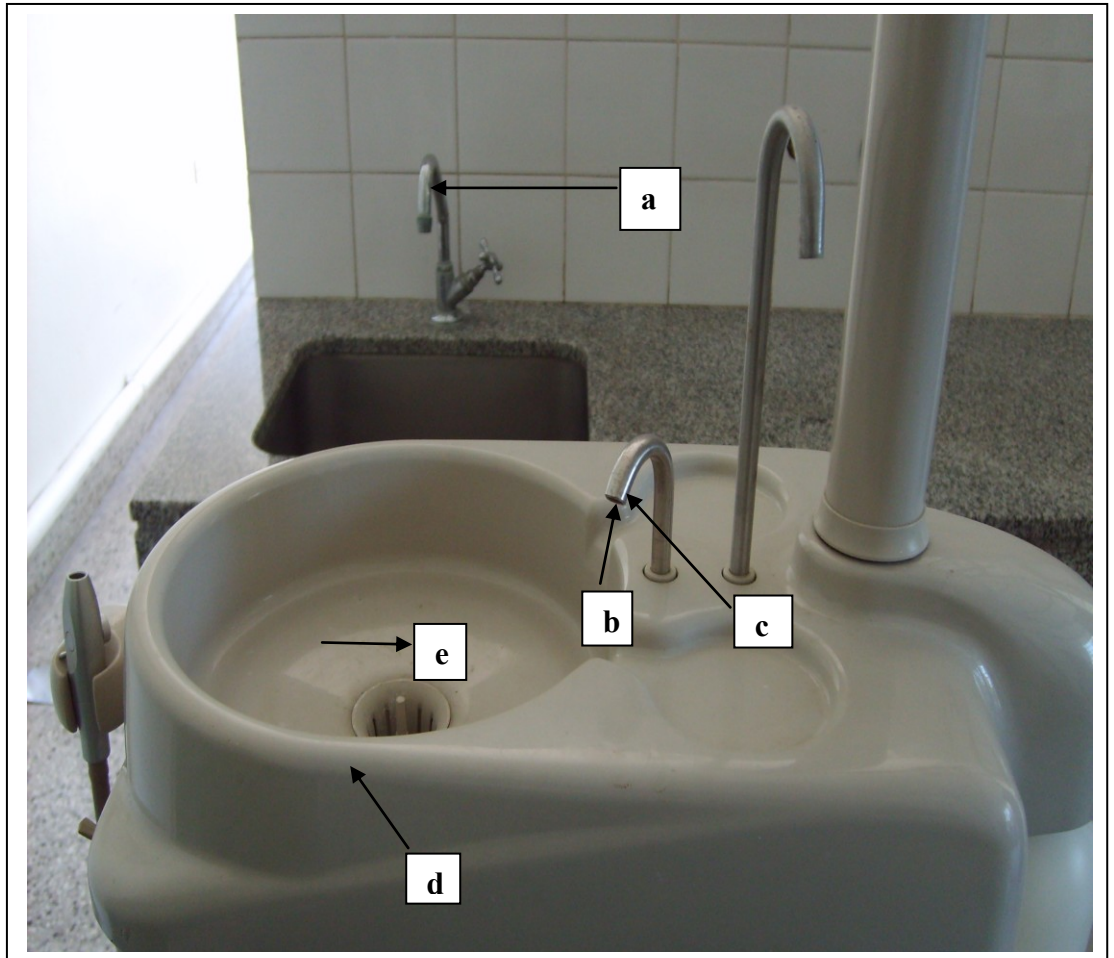


Figura 3.7- Fotografía de una salivadera y anexos perteneciente al Hospital Escuela de la Facultad de Odontología de La Plata (F.O.L.P.), de la Universidad Nacional de La Plata U.N.L.P. (Atención de las autoridades de la mencionada Institución para la realización de esta tesis).

Sitios de extracción de las muestras, **a**: canilla del consultorio con agua de ingreso a los equipos odontológicos, **b**: canilla por donde circula el agua de egreso hacia las salivaderas, **c**: cañería metálica, **d**: borde externo de la salivadera dental, **e**: pared interna próxima al desagüe de la salivadera.

3.2.1- Análisis microbiológico de microorganismos planctónicos.

Como se mencionó previamente se analizaron las bacterias planctónicas pertenecientes a:

a) agua de ingreso al equipo odontológico, b) agua de egreso hacia las salivaderas y c) a la saliva de los pacientes.

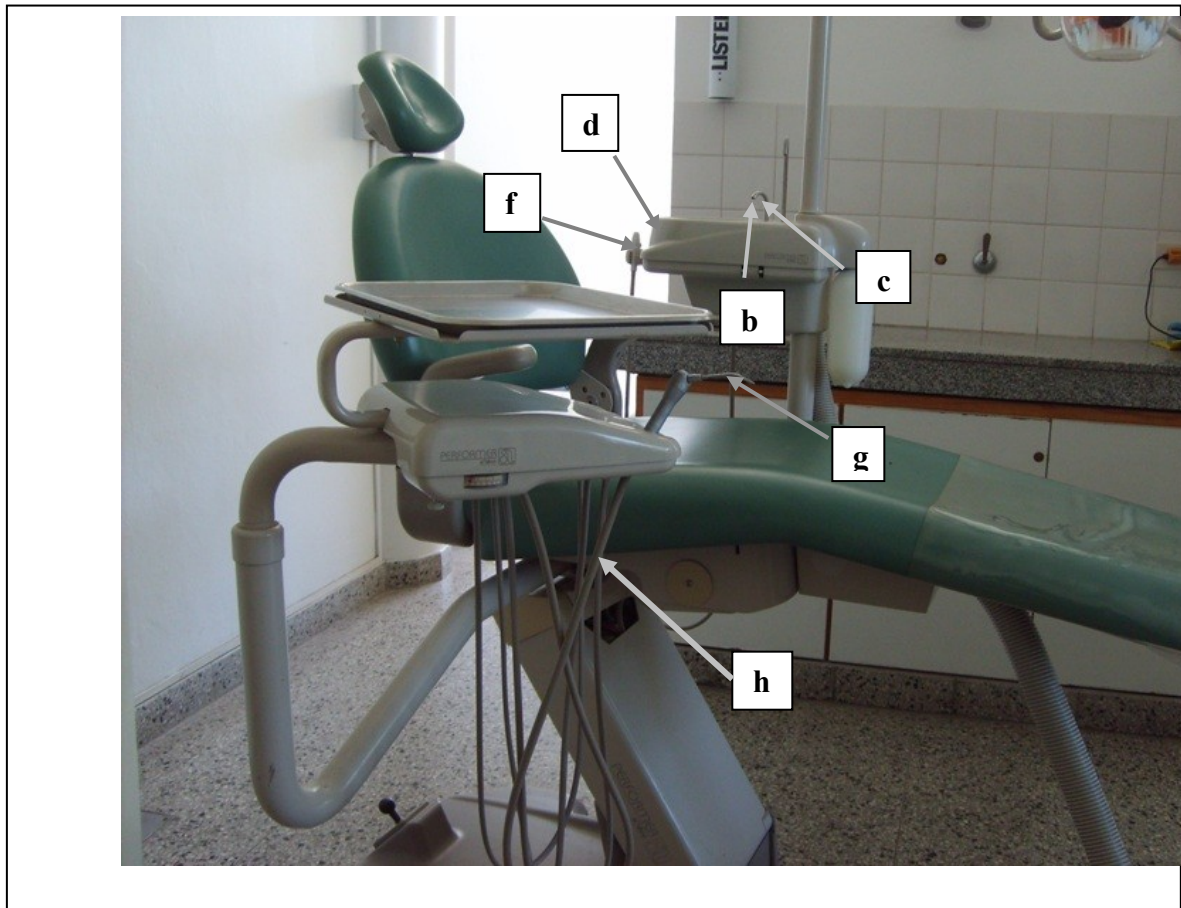


Figura 3.8- Fotografía de un consultorio odontológico donde se indican los conductos y otros anexos por donde circula y egresa el agua corriente hacia las salivaderas: **b:** salida de la cañería donde se realizó el raspado para la obtención de las muestras, **c:** cañería metálica por donde egresa el agua hacia las salivaderas, **d:** borde externo de la salivadera, **f:** eyector de saliva, **g:** jeringa triple, **h:** mangueras por donde circula el aire y agua del equipo dental. (Atención de las autoridades de la F.O.L.P. para la realización del trabajo).

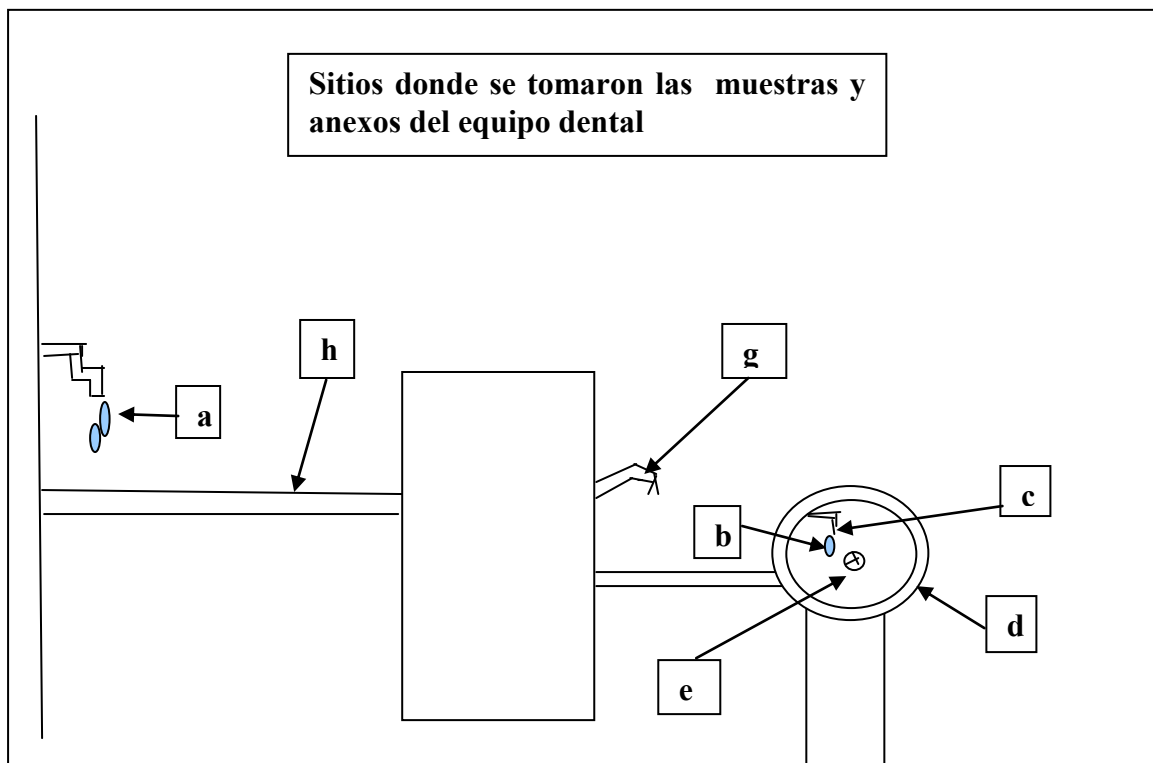


Fig. 3.9- Diferentes sitios de obtención de material para el análisis de microorganismos planctónicos y sésiles; **a:** canilla de agua de ingreso a los equipos odontológicos (toma de muestra de microorganismos planctónicos), **b:** agua que egresa por la canilla de la salivadera (toma de muestra de microorganismos planctónicos), **c:** cañería metálica con salida hacia la salivadera (toma de muestra de microorganismos sésiles), **d:** borde externo de la salivadera (toma de muestra de microorganismos sésiles), **e:** pared interna próxima al desagüe (toma de muestra de microorganismos sésiles), **g:** jeringa triple, **h:** cañerías y/o mangueras del equipo dental.

3.2.1.a) Análisis microbiológico del agua de ingreso a los equipos odontológicos.

Se trabajó con muestras del agua corriente que ingresaba a 29 consultorios odontológicos pertenecientes al radio comprendido entre las calles 14 y 27, 51 y 66, de la ciudad de La Plata (Z1). Estos consultorios reciben agua corriente potable de la cisterna perteneciente al Parque Saavedra de la ciudad de La Plata.

Otro grupo de muestras correspondió a 30 consultorios ubicados entre las calles 1 y 13, 44 y 60, de la ciudad de La Plata (Z2). Los mismos, poseen como fuente de abastecimiento agua corriente potable del tanque central de Punta Lara de la ciudad de La Plata.

Para realizar dicho estudio, de cada uno de los consultorios se recolectaron muestras de 100 ml del agua que fluía desde las canillas (como muestra la **Figura 3.9.a**). Se utilizaron frascos estériles con tapones de goma descartando el primer chorro para evitar la presencia de bacterias acumuladas en las cercanías y en las canillas. Antes de tomar cada una de las muestras se flamearon los bordes de los frascos y de las canillas con un mechero Bunsen, para evitar contaminaciones ambientales extrañas al agua a analizar. Se sembró en los siguientes medios de cultivo: i) Agar líquido Mac Conckey para la observación de enterobacterias, ii) en medio sólido Agar sangre al 5%, para la observación de bacterias planctónicas hemolíticas y iii) en medio sólido Agar Melitado de Saboreaud para la observación de hongos planctónicos.

i- Se inoculó 1 ml de cada muestra en medio de cultivo líquido Agar Mac Conckey (ver ítem 3.2.2. a). Las siembras se realizaron por dilución, en tubos de ensayo con campanitas Durham. Dichas campanitas son pequeños tubos de vidrio que se colocan dentro de los tubos de ensayo para observar la producción de gas generado por las bacterias. Las siembras se incubaron a 37° C durante una semana, en condiciones de aerobiosis. Se realizaron controles periódicos de pureza mediante plaqueos en medio líquido, y observaciones microscópicas con tinciones de Gram (ver ítem 3.7.1).

Se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml), teniendo en cuenta los valores establecidos por el Código Alimentario Argentino.

i.i- Se inoculó 1 ml de las muestras anteriormente mencionadas en Agar Sangre al 5% (consultar ítem 3.2.2.b). Se sembraron por estría con espátula de Drigalsky, en cápsulas de Petri conteniendo medio de cultivo Agar sangre y se incubaron a

37° C durante 48 horas en condiciones de aerobiosis. Se realizaron plaqueos para controles periódicos de pureza y observaciones por microscopía óptica con tinción de Gram (consultar ítem 3.7.1)

Se realizó el conteo de UFC/ml teniendo en cuenta las consideraciones mencionadas previamente.

i.i.i- Se realizaron las siembras para la observación de hongos planctónicos inoculando 1 ml de la muestra mencionada en ítem *a*, en medio de cultivo sólido Agar Melitado de Saboreaud. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 1 semana. Posteriormente, se realizó la observación macroscópica de los cultivos para el reconocimiento de las colonias y la coloración de Gueguen (ítem 3.7.2) para su observación y recuento de las UFC/ml en microscopio óptico.

3.2.1.b) Análisis microbiológico del agua de egreso a las salivaderas.

Se procedió de la misma forma que en el ítem 3.2.1.a, tomando las muestras del agua de egreso (**Figura 3.7.b y 3.9.b**). Los procedimientos que se llevaron a cabo para su análisis microbiológico y microscópico fueron los mismos que los correspondientes al ítem *a*.

3.2.1.c) Análisis microbiológico de la saliva de los pacientes.

Para realizar este estudio se utilizaron muestras de saliva de pacientes sin enfermedad periodontal, asistidos odontológicamente en los consultorios pertenecientes a las regiones descriptas anteriormente (Z1 y Z2).

Se obtuvieron 50 muestras en total, correspondiendo 25 muestras a pacientes asistidos en los consultorios de Z1 y las otras 25 muestras a pacientes asistidos en los consultorios de Z2. El volumen de cada una de las muestras fue de 2 ml. Las mismas se recolectaron en tubos de ensayo con tapones de algodón estériles, flameando previamente las bocas de cada uno de los tubos. Se inoculó 1 ml de cada una de las muestras en Agar Mitis Salivarius sólido, para observar el desarrollo de los estreptococos orales Gram positivos.

Las siembras se realizaron por estría con ansa y fueron incubadas a 37° C durante 48 horas en condiciones de anaerobiosis **Figura 3.10** (ítem 3.2.2.g). Se realizaron controles periódicos de pureza mediante plaques en medio sólido y observaciones por Microscopía Electrónica de Transmisión (ítem 3.4.1). El conteo de UFC/ml se realizó utilizando un microscopio óptico Olympus modelo BX 51, placa de Frost y la coloración de Gram.

3.2.2- Composición y preparación de los medios de cultivo.

Los medios de cultivo utilizados fueron: a) Agar líquido Mac Conckey para aislamiento de entero-bacterias b) Agar sangre, para bacterias hemolíticas c) Agar Melitado de Saboreaud, para hongos. Para los microorganismos anaerobios provenientes de la saliva de los pacientes sin enfermedad periodontal, se utilizó jarra de anaerobiosis y medio de cultivo sólido Agar Mitis Salivarius para aislar estreptococos orales.

3.2.2.a) Medio de cultivo líquido Mac Conckey.

El medio de cultivo sólido Agar Mac Conckey marca Merck es específico para aislamiento de enterobacterias. Sus componentes por litro son:

Taurocolato de sodio	5 g
Lactosa	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Peptona	20 g
Agua destilada	1000 ml
Bacto Rojo Neutro	10 ml

Preparación: A 1 litro de agua destilada se agregan 5 g de taurocolato de sodio, 10 g de lactosa, 5 g de cloruro de sodio y 20 g de peptona. Se calienta hasta que hierva y se disuelvan completamente los componentes. Se filtra con papel de filtro. La reacción se ajusta a un pH de 7,4 e inmediatamente se añaden 10 ml de una solución acuosa de bacto rojo neutro al 1 %. Se distribuye el medio en tubos de ensayo con tubitos Durham de fermentación cada uno. Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C. El medio

se conserva en la heladera (Rey Millares, 1960).

3.2.2.b) Medio de cultivo Agar sangre.

El medio Agar sangre al 5 % se emplea para el cultivo de bacterias Gram positivas (+) y Gram negativas (-). Se utilizó un medio de cultivo sólido marca Merck, cuyos componentes por litro son:

Cloruro de sodio	6 g
Agar nutritivo	10 g
Agua destilada	900 cm ³
Sangre de carnero al 5%	c.s.

Preparación: Se mezclan los ingredientes y se disuelven completamente sin que hierva el medio. Se esteriliza en autoclave, a 120 °C, durante 15 minutos y se deja enfriar hasta 52 ° C. En esas condiciones se añade la sangre de carnero al 5%, se mezcla por agitación y se vierte en cápsulas de Petri. Se deja solidificar por enfriamiento y se conservan en heladera hasta no más de 15 días (Rey Millares, 1960).

3.2.2.c) Medio de cultivo Agar Melitado de Saboreaud.

El medio de cultivo Agar Melitado de Saboreaud marca Merck es específico para la siembra y desarrollo de los hongos. Los componentes para 1 litro son los siguientes:

Peptona	20 g
Agar	20 g
Miel de abejas	80 g
Agua destilada	1.000 cm ³

Preparación: En un frasco Erlenmeyer se mezclan y calientan 20 g de peptona y 20 g de agar en 1 litro de agua destilada. Antes de que la mezcla entre en hervor, se le añaden 80 g de miel de abejas se disuelven bien todos los componentes. Se deja entibiar y se esteriliza en autoclave a 120 °C durante 15 minutos. Se conserva en la heladera (Rey Millares, 1960).

3.2.2.d) Medio de cultivo Agar Mitis Salivarius.

El medio de cultivo sólido y líquido Agar Mitis Salivarius marca Britania es específico para el cultivo de los estreptococos orales, pero con el agregado de telurito de potasio y el uso de la jarra de anaerobiosis permite el desarrollo del *Streptococcus mutans*, siendo esta la especie más difícil de cultivar. Sus componentes por litro son:

Agar	20 g
Dextrosa	0,68 g
Fosfato dipotásico	2,42 g
Proteasa peptona	2,5 g
Azul Tripán	0,0375 g
Cristal violeta	0,0004 g

Preparación: Se disuelven todos los ingredientes del medio en 1 litro de agua destilada. Se mezclan bien y se colocan a baño de María, se deja entibiar el preparado y se le adiciona 2 ml de telurito de potasio (ítem 3.2.2.e), se esteriliza en autoclave a 120 °C y se conserva en la heladera (van Ruyven *et al.*; 2000).

3.2.2.e) Telurito de potasio

El telurito de potasio es un inhibidor de difteroides. Para la preparación de la solución que se agrega al Agar Mitis Salivarius se disuelve 1 g de telurito de potasio en 100 ml de agua destilada y se conserva en la heladera.

3.2.2.f) Composición de la saliva artificial NAF

Se utilizó saliva marca NAF para el transporte y para mantener la viabilidad de los microorganismos sésiles obtenidos a partir de los cortes de los tres materiales de las salvaderas dentales. Los elementos que la componen para 100 ml son los siguientes:

Hidroxipropil- metil- celulosa	1 g
Solución xilitol al 70%	1,3 g
Cloruro de potasio	0,1 g
Cloruro de sodio	0,1 g
Fluoruro de sodio	0,2 mg (2ppm)
Cloruro de magnesio	5 mg

Sulfato de potasio	40 mg
Cloruro de calcio	15 mg
Excipientes c.s.p.	100 ml

El pH se ajusta a 7 (según Hara *et al.*, 2007).

3.2.2.g) Técnica de siembra en anaerobiosis.

Para realizar las siembras por anaerobiosis se utilizaron jarras específicas para tal fin. La jarra de anaerobiosis marca Oxoid utilizada consta de un soporte para placas incluido en una cubeta transparente hermética (**Figura 3.10**). Las placas de Petri con Agar Mitis Salivarius y las siembras se colocaron en el interior de la jarra sobre el soporte, junto con un sobre comercial abierto. Dicho sobre, marca Oxoid, contiene una pastilla de borohidrato sódico y otra de bicarbonato sódico y ácido cítrico, más un catalizador de paladio, de forma de crear una atmósfera de anaerobiosis. Se agregó agua al sobre, provocando la reacción del bicarbonato sódico, ácido cítrico y borohidrato sódico. Esta reacción permitió la reducción de oxígeno y la liberación de hidrógeno. Para confirmar la anaerobiosis en el interior de la jarra, se colocó un papel indicador que contenía azul de metileno. El papel viró al blanco indicando que se habían creado las condiciones de anaerobiosis.



Fig.3.10- Jarra de anaerobiosis (la flecha verde indica el sobre con el catalizador, la flecha negra señala las cápsulas de Petri con los cultivos y la flecha roja muestra el manómetro que mide la presión).

3.3- Conteo de UFC/ml y UFC/cm² de los microorganismos planctónicos y sésiles.

Tal como se describió previamente en este trabajo se realizaron conteos de UFC/ml de microorganismos planctónicos (bacterias y hongos) provenientes del agua de ingreso a los equipos odontológicos, agua de egreso hacia las salivaderas dentales correspondientes a las Z1 y Z2 y de la saliva de los pacientes asistidos en los consultorios de ambas zonas. También se realizó el conteo de microorganismos sésiles adheridos a las cañerías metálicas con salida hacia las salivaderas dentales de Z1 y Z2, y del biofilm formado “in-vitro” sobre los cortes de las salivaderas dentales de acero inoxidable, cerámica y opalina colocados en los consultorios seleccionados de Z1 y Z2, con períodos de exposición de 24 h y 64 horas.

Los métodos empleados y cálculos realizados en cada caso se describen a continuación.

3.3.1- Conteo de UFC/ml de las bacterias planctónicas provenientes del agua de ingreso de los equipos odontológicos.

La determinación del número de las UFC/ml de bacterias hemolíticas Gram positivas y Gram negativas se realizó sobre placas de Agar sangre al 5% incubadas a 37°C durante 48 horas, utilizando un microscopio óptico. Para ello se colocó una placa de Frost (de celuloide, cuadrículada), debajo de la cápsula de Petri con los respectivos cultivos. En todos los casos fueron contados como mínimo 15 campos (N). Una vez contadas las UFC/ml se aplicó la siguiente fórmula:

$$[\text{UFC/ml} = Y \cdot 4 \cdot 28 \cdot 10]$$

Y: Número promedio de bacterias contadas sobre cuadrados de 0,25 cm²; 28: número de cuadrados incluidos en 1 cm² total que delimita la placa de Frost; 4: número de cuadrados de 0,25 cm² incluidos en los cuadrados de 1 cm²; 10: corresponde a la dilución realizada durante la siembra.

3.3.2- Conteo de UFC/ml de las bacterias planctónicas provenientes del agua de egreso hacia las salivaderas dentales.

Para obtener el número de UFC/ml de bacterias planctónicas del agua de egreso hacia las salivaderas dentales se aplicó el mismo método explicado en el ítem 3.3.1.

3.3.3- Conteo de UFC/ml de los hongos planctónicos provenientes del agua de egreso de salida hacia las salivaderas dentales.

Se utilizaron placas con medio de cultivo Agar Melitado de Saboreaud y la placa de Frost, se enumeraron los hongos que se hallaron dentro de los cuadrados más grandes (1 cm²). Se consideraron como mínimo 15 campos. La fórmula aplicada fue la siguiente:

$$\text{N}^\circ \text{ de UFC/ml} = Y \cdot 1 \cdot 28 \cdot 10$$

Y: número promedio de hongos contados en 1 cm².

1: corresponde a la medida de los cuadrados más grandes de 1 cm², sobre los que se realizó el conteo.

28: números de cuadrados incluidos en la cúpula de Petri.

10: corresponde a la dilución realizada.

3.3.4- Conteo de UFC/ml de las bacterias planctónicas provenientes de la saliva de los pacientes.

Para el conteo de la unidades formadoras de colonias de las bacterias planctónicas de saliva (de los pacientes sin enfermedad periodontal seleccionados en los consultorios de Z1 y Z2) se utilizaron las siembras en medio sólido de Agar Mitis Salivarius, la placa de Frost y el microscopio óptico. El conteo de los estreptococos orales se realizó de igual forma que el explicado en el ítem 3.3.1.

3.3.5- Conteo de UFC/cm² de las bacterias sésiles provenientes de las muestras de las cañerías metálicas con salida hacia las salivaderas dentales.

En este caso el número de colonias formadas está referida a la superficie de 0,4 cm² de donde provinieron las bacterias sésiles siendo la fórmula aplicada la siguiente:

$$UFC = Y \cdot 10 \cdot 28$$

Y: número promedio de bacterias contadas los cultivos con Agar sangre al 5 %.

28: número de cuadrados de 1 cm² que hay dentro de la cápsula de Petri.

10: corresponde a la dilución realizada.

Las UFC obtenidas aplicando la fórmula mencionada corresponde a un área de raspado de superficie de 0,4 cm².

3.3.6- Conteo de las UFC/cm² de los hongos sésiles provenientes de las muestras de las cañerías metálicas con salida hacia las salivaderas dentales.

Fue utilizado el mismo procedimiento y la misma fórmula que en el ítem 3.3.5, utilizando el medio de cultivo Agar Melitado de Saboreaud.

3.3.7- Conteo de UFC/cm² de las bacterias sésiles provenientes de los cortes de acero inoxidable, cerámica y opalina.

El conteo de las bacterias sésiles observadas sobre los cortes de acero inoxidable, cerámica y opalina de las salivaderas dentales se realizó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/cm}^2 = Y \cdot 4 \cdot 28 \cdot 10$$

Y: número promedio UFC/cm² de las bacterias contadas en el medio Agar sangre al 5 % y Agar Mitis Salivarius sobre cuadrados de 0,25 cm², 28: número de cuadrados totales, de 1 cm² que delimita la placa de Frost, 4: número de cuadrados de 0,25 cm² que están incluidos en los cuadrados de 1 cm², 10: corresponde a las diluciones realizadas durante la siembra.

3.3.8- Conteo de UFC/cm² de los hongos sésiles provenientes de los cortes de acero inoxidable, cerámica y opalina.

El conteo de los hongos sésiles observados sobre los cortes de acero inoxidable, cerámica y opalina de las salivaderas dentales se realizó aplicando la siguiente fórmula:

$$N = X \cdot 1 \cdot 28 \cdot 10$$

X: número promedio de UFC/cm² de los hongos contados en el medio de Agar Melitado de Saboreaud sobre cuadrados de 1 cm², 1: cuadrados de 1 cm² de la placa de Frost, 28: número de cuadrados totales, 10: corresponde a las diluciones realizadas durante la siembra.

3.4-Técnicas microscópicas para la observación de microorganismos planctónicos y sésiles.

3.4.1- Pretratamiento para la observación por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).

La observación de las bacterias planctónicas provenientes de las muestras de agua corriente de ingreso a los equipos odontológicos, de egreso de las salivaderas dentales y de

la saliva de los pacientes de Z1 y Z2 (**Figuras 3.7 y 3.9**) a través de MET se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito a continuación:

El volumen de las muestras de agua de ingreso y egreso fue de 100 ml, y el de la saliva de los pacientes fue de 2 ml. Se centrifugó 1 ml de cada una de las muestras en una centrífuga marca Preovac a 1200 r.p.m y los precipitados obtenidos se fijaron con glutaraldehído al 2% durante 2 horas, y posteriormente con tetróxido de osmio al 1%, como segundo fijador, durante una hora. Seguidamente las muestras se deshidrataron con alcohol etílico en escala creciente de concentración, hasta llegar al alcohol etílico 100%. Posteriormente cada una de ellas fue colocada en un taco y embebida en resina epoxi. De cada muestra se obtuvieron 10 cortes de 90 µm de cada uno utilizando un micrótomo. Los mismos fueron tratados con acetato de uranilo y citrato de plomo para transformarlos en conductores. Las muestras se colocaron en soportes metálicos para ser observadas en MET marca JEM EX II (JEOL), perteneciente al Servicio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

3.4.2- Pretratamiento para la observación por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) de microorganismos planctónicos.

Para la observación de las bacterias planctónicas provenientes del agua de ingreso a los consultorios odontológicos y de agua de egreso de las salivaderas dentales (**Figuras 3.8 y 3.9**) por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) se llevaron a cabo los pasos descriptos a continuación:

Se tomaron muestras de 100 ml de agua corriente de ingreso a los equipos odontológicos y 100 ml de agua de egreso de las salivaderas dentales, de las Z1 y Z2. Se colocó 1 ml de cada una de las muestras en un filtro de membrana de colodión de 1 cm de diámetro. A cada una de las muestras se le inoculó 1 ml de glutaraldehído diluido al 2% como fijador, durante 30 minutos, repitiendo la operación tres veces consecutivas. Posteriormente se deshidrataron las muestras de cada uno de los filtros utilizando alcohol etílico en

concentraciones crecientes, tal como se explicó en el ítem anterior, dejándolo actuar durante 5 minutos. La operación se repitió tres veces consecutivas, con cada una de las concentraciones. Los filtros fueron colocados en tubos Ependorf estériles, para ser sometidos al secado por el sistema de punto crítico.

3.4.2.a) Secado de las muestras mediante técnica de punto crítico.

El secado de las muestras por la técnica de punto crítico consiste en reemplazar bajo presión la acetona de las muestras por dióxido de carbono, y luego someterlo a una temperatura más allá de la temperatura crítica del dióxido de carbono, con el fin de eliminarlo como vapor. Esta técnica evita que se produzca la deformación de la interfase líquido-vapor, y que las tensiones superficiales ocasionen deformaciones en las células. Los mismos fueron transportados en los tubos Ependorf para realizar la observación en MEB marca Philips 500 perteneciente al Servicio de Microscopía Electrónica del CINDECA.

3.4.3- Pretratamiento de los biofilms para su observación a través de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

La fijación, deshidratación y secado por punto crítico de las muestras, fue realizado tal como se explica en los ítems 3.4.2 y 3.4.2.a. En el caso de las muestras de cerámica y opalina las mismas fueron cubiertas por un delgado baño de oro para transformarlas en conductoras.

3.4.4-Técnica de observación y conteo de microorganismos sésiles por Microscopía por epifluorescencia.

Para el análisis microbiológico del consorcio proveniente de los biofilms formados sobre los cortes de cerámica, acero inoxidable y opalina, se utilizó un microscopio óptico Olympus con sistema de epifluorescencia, perteneciente al INIFTA (Instituto de Investigación en Física, Química, Técnica y Aplicada). Se reflejó con una lámpara de mercurio, filtro selectivo y espejo dicróico DM500, con método de excitación B. La unidad

de los espejos corresponde a la serie U-MNB2-DM500, (U: universal, M: unidad de espejo, N: anchura de banda).

Una vez obtenido el material del biofilm de los cortes de acero inoxidable, cerámica y opalina, se procedió a la tinción con naranja de acridina al 0.01%. Para ello, los cortes se cubrieron con el colorante durante 5 minutos. Luego se lavaron con agua destilada, se secaron a temperatura ambiente y se observaron bajo la luz azul con un sistema de epifluorescencia OLYMPUS TH3, utilizando un aumento de 40 X. Los ensayos se repitieron tres veces.

3.5- Análisis microbiológico de los biofilms formados sobre cortes colocados sobre salivaderas dentales.

Con el propósito de realizar un estudio “in vitro” de los biofilms formados a partir de la saliva y del agua corriente de egreso de las cañerías metálicas de las salivaderas se utilizaron cortes de salivaderas de los tres materiales. Para ello se llevaron a cabo los pasos que se describen a continuación:

Se obtuvieron 118 cortes en total de las paredes internas próximas al desagüe de salivaderas dentales de los tres materiales. De los cuales, 40 cortes correspondieron al acero inoxidable, 40 cortes a la cerámica y 38 cortes a la opalina, utilizando 20 de acero inoxidable y cerámica respectivamente y 19 de opalina, para cada cada zona. Los sustratos de cada material fueron colocados sobre las paredes internas próximas al desagüe de las salivaderas dentales del mismo material.

3.5.1- Análisis de las bacterias provenientes de los biofilms formados sobre los cortes de las salivaderas dentales luego de 24 horas de exposición.

Los cortes fueron pegados en las salivaderas con compuesto para modelar, para que no fueran arrastrados por el agua corriente. Se hizo salivar a los pacientes en atención

odontológica durante las prestaciones. Los mismos se enjuagaron la cavidad bucal únicamente con agua corriente.

Se higienizaron las salivaderas dentales entre paciente y paciente dejando correr el agua corriente a través de los tubos metálicos durante 1 minuto. Los cortes fueron retirados al día siguiente, luego de 24 horas de exposición, antes de la atención del consultorio. Posteriormente fueron transportados en frascos de vidrio con saliva NAF (ítem 3.2.2.f) tapados con tapones de algodón estéril. El material biológico se procesó dentro de las 24 horas de obtenidas las muestras.

Los 59 cortes de cada zona fueron raspados con un ansa para obtener la muestra del material adherido en cada corte. Luego se diluyó la misma en 10 ml de medio de cultivo Agar Mitis salivarius líquido. Posteriormente se inoculó 1 ml en cápsulas de Petri con medio sólido de Agar Mitis Salivarius (de acuerdo al ítem 3.2.2 .d). Las placas de Petri se colocaron en el interior de la jarra de anaerobiosis (ver ítem 3.2.2.g y **Figura 3.10**) y la misma se llevó a la estufa de cultivo a 37° C durante 24 horas.

Otra parte del material obtenido a partir de las 59 muestras mencionadas anteriormente fue diluido en 10 ml de agua estéril. Se inoculó 1 ml de dicha dilución en medio de cultivo líquido Agar Mac Conckey (como fue explicado en el ítem 3.2.2.a). Posteriormente se observó la posible fermentación producida en el interior de los tubos Durham y el viraje de color del medio de cultivo. También se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias de los microorganismos sésiles utilizando un microscopio óptico con sistema de epifluorescencia (consultar ítem 3.4.4) y la coloración de naranja de acridina (ver ítem 3.7.3). También se realizó Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), como ya se explicó en el ítem.3.4.1.

3.5.2-Análisis de las bacterias provenientes de los biofilms formados sobre los cortes de las salivaderas dentales luego de 64 horas de exposición.

Para el estudio de las bacterias halladas en el biofilm formado sobre los cortes de salivaderas dentales de los tres materiales se procedió en forma similar a la descrita en el ítem 3.5.1 pero aumentando el período de exposición de los cortes a 64 horas (un fin de semana estando los equipos odontológicos en reposo). Las muestras fueron retiradas en las mismas condiciones que en el ítem anterior, durante las primeras horas de la tarde del día lunes, antes de la atención de pacientes en el consultorio.

El análisis microbiológico, las observaciones microscópicas y la interpretación de los resultados se realizaron con los mismos procedimientos que fueron explicados en el ítem 3.5.1.

3.5.3- Análisis de los hongos provenientes de los biofilms formados sobre los cortes de las salivaderas dentales luego de 24 horas de exposición.

Al igual que en el caso del ítem 3.5.1, los cortes fueron pegados en las salivaderas con compuesto para modelar. Se hizo salivar a los pacientes en atención odontológica durante las prestaciones. Los mismos se enjuagaron la cavidad bucal únicamente con agua corriente.

Se higienizaron las salivaderas dentales entre paciente y paciente dejando correr el agua corriente a través de los tubos metálicos durante 1 minuto. Los cortes fueron retirados al día siguiente, luego de 24 horas de exposición, antes de la atención del consultorio. Posteriormente fueron transportados en frascos de vidrio con saliva NAF (ítem 3.2.2.f) tapados con tapones de algodón estéril. El material biológico se procesó dentro de las 24 horas de obtenidas las muestras.

Los 59 cortes de cada zona fueron raspados con un ansa para obtener la muestra del material adherido. Luego se diluyó la misma en 10 ml de medio de agua estéril. Posteriormente se inoculó 1 ml en cápsulas de Petri con medio sólido de Agar Melitado

de Saboreaud (de acuerdo al ítem 3.2.2.c). Las placas de Petri se incubaron a temperatura ambiente durante 7 días.

Posteriormente se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias de los hongos sésiles utilizando un microscopio óptico con sistema de epifluorescencia (consultar ítem 3.4.4) y la coloración de naranja de acridina (ver ítem 3.7.3). También se realizó Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), como ya se explicó en el ítem 3.4.1.

3.5.4-Análisis de los hongos provenientes de los biofilms formados sobre los cortes de las salivaderas dentales luego de 64 horas de exposición.

Para el estudio de los hongos hallados en el biofilm formado sobre los cortes de salivaderas dentales de los tres materiales se procedió en forma similar a la descrita en el ítem 3.5.3 pero aumentando el período de exposición de los cortes a 64 horas (un fin de semana estando los equipos odontológicos en reposo). Las muestras fueron retiradas en las mismas condiciones que en el ítem anterior, durante las primeras horas de la tarde del día lunes, antes de la atención de pacientes en el consultorio.

El análisis microbiológico, las observaciones microscópicas y la interpretación de los resultados se realizaron con los mismos procedimientos que fueron explicados en el ítem 3.5.3.

3.6- Análisis microbiológico del biofilm formado sobre las cañerías anexas a las salivaderas dentales.

Debido a la heterogeneidad del biofilm en este análisis fueron utilizados los medios de a) Agar Melitado de Saboreaud sólido y b) Agar Mac Conckey líquido, c) Agar sangre al 5 %.

Se utilizó también microscopía de epifluorescencia para realizar la enumeración de las bacterias.

3.6.1-Análisis de las bacterias provenientes del biofilm formado en el interior de las cañerías metálicas con salida hacia las salivaderas dentales luego de 24 horas de exposición.

Se seleccionaron 58 tubos metálicos anexos a las salivaderas dentales correspondiendo 28 a Z1 y 30 a Z2.

Las muestras fueron obtenidas raspando un área de aproximadamente 0,40 cm² en el interior de los caños, con un ansa estéril. El material se colocó en frascos de vidrio con 1 ml de saliva artificial NAF estéril (ítem 3.2.2.f) para su transporte. El mismo se procesó dentro de las 24 horas de obtenidas las muestras. Para realizar las siembras, se inoculó 1 ml del material en tubos de ensayo los cuales contenían 9 ml de agar líquido Mac Conckey, incubadas a 37° C durante 48 horas en condiciones de aerobiosis. Los procedimientos microbiológicos y de conteo utilizados para este análisis fueron los mismos que los explicados en el ítem 3.2.1.a.

Otras 58 muestras obtenidas como se explicó anteriormente se inocularon en medio Agar sangre al 5 % incubadas en forma semejante al caso anterior. Los procedimientos microbiológicos y de conteo utilizados para este análisis fueron los mismos que los explicados en el ítem 3.2.1.a.

3.6.2- Análisis de los hongos provenientes del biofilm formado en el interior de las cañerías metálicas con salida hacia las salivaderas dentales luego de 24 horas de exposición.

Las muestras fueron tomadas de igual manera que en ítem 3.6.1. Se inoculó 1ml de las muestras en 9 ml de medio de cultivo sólido Agar de Saboreaud (como fue explicado en el ítem 3.2.2.c). Las siembras se realizaron por estría en placas de Petri, con espátula de Drigalsky. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante una semana. Se efectuaron controles periódicos de pureza, mediante plaqueos. Se realizó el conteo de UFC/ml utilizando microscopio óptico y la coloración de Gueguen (consultar ítem 3.7.2).

3.7-Técnicas de coloración.

En este trabajo se utilizaron colorantes de primera marca para aplicar las técnicas de coloración para microscopía óptica: Gram Kopellof (ítem 3.7.1) y Gueguen (ítem 3.7.2) y técnicas de coloración para microscopía óptica con sistema de epifluorescencia (naranja de acridina (ítem 3.7.3).

3.7.1- Coloración de Gram Kopellof.

Esta técnica de coloración se realizó para poder observar las bacterias Gram positivas y Gram negativas, según la coloración que toman después del teñido. Las bacterias Gram positivas (+) toman un color violáceo, debido a la acción del colorante primario violeta de Genciana. Las bacterias Gram negativas (-) toman un color rojo, por la acción del colorante secundario fucsina básica. Esta característica se asocia a los componentes químicos de la pared celular de las estructuras bacterianas. Las bacterias Gram positivas adquieren color violeta debido a que en su pared celular poseen gran cantidad de mureína, teniendo esta sustancia química afinidad con el cristal violeta. En el caso de las bacterias Gram negativas, poseen estructura muy diferente en su pared celular, por lo tanto solo poseen afinidad con el colorante secundario de la técnica de coloración de Gram Kopelloff. Se utilizó: 1) el colorante de Violeta de Genciana marca Merck, 2) una solución débil de lugol, 3) alcohol 70° como decolorante y 4) solución de fucsina fenicada.

1-Solución hidroalcohólica de Violeta de Genciana.

Violeta de Genciana	1g
Alcohol etílico 96°	10 ml
Agua destilada	100 ml

2- Solución débil de lugol.

Iodo	1 g
Ioduro de potasio	2 g
Agua destilada	100 ml

3- Decolorante: alcohol 70 °.

4- Solución de fucsina fenicada.

Fucsina básica	1g
Ácido fénico cristalizado	2 g
Alcohol etílico 96°	10 ml
Agua destilada	100 ml

Preparación de las soluciones.

a) Solución de violeta de Genciana: Se coloca en un mortero 1 g de polvo de violeta de Genciana y se tritura bien. Se mezcla con 10 ml de alcohol etílico 96 ° hasta disolver mezclando las soluciones. Luego se le adicionan 100 ml de agua destilada y se termina de disolver. Se envasa en frasco esmerilado y conserva a temperatura ambiente.

b) Solución de Lugol: se pesa 1g de Iodo metálico y 2 g de ioduro de potasio colocando en un Erlenmeyer conteniendo 100 ml de agua destilada, se agita y una vez disuelto se filtra. Se envasa en frasco de vidrio esmerilado y conserva a temperatura ambiente.

c) Solución de fucsina básica: se coloca en el mortero 1 g de fucsina básica y se tritura bien, se agregan 10 ml de alcohol etílico 96° y se mezclan. En un Erlenmeyer se mezclan 100 ml de agua destilada y 2 g de ácido fénico cristalizado, se une a la preparación anterior y se filtran luego con un papel de filtro. Se envasa en frascos de vidrio transparentes que se conservan a temperatura ambiente.

Procedimiento: Los pasos previos a la coloración fueron los siguientes: toma de material con el ansa, extendido sobre el portaobjeto, y fijación del mismo a la llama de un mechero. Posteriormente se mezclan en un tubo de ensayo 30 gotas de violeta de Genciana con 10 gotas de bicarbonato de sodio, se homogeneiza la mezcla y se cubre el preparado durante 2 minutos. Después de verter la preparación anterior, se coloca lugol como mordiente. Posteriormente, se decolora con alcohol de 70° y se lava con agua destilada. Se cubre el preparado con el colorante secundario fucsina básica durante 1 minuto. Se lava nuevamente con agua destilada, se seca con papel de filtro y se observa (Rey Millares, 1960).

3.7.2- Coloración de Gueguen.

Esta coloración se utilizó para poder realizar la identificación de los diferentes tipos de hongos ambientales. Fue utilizado el colorante de Gueguen marca Merck los componentes para 100 ml de agua fueron los siguientes:

Ácido láctico	100 g
Sudán III	0,10 g
Azul Cotton	0,10 g
Solución Iodoalcohólica	10 a 30 gotas.

Preparación: se disuelven los polvos de Sudán III y Azul Cotton en el ácido láctico, una vez que se halla bien homogeneizado se le agregan entre 10 a 30 gotas de solución Iodoalcohólica. Se filtra con papel de filtro, se envasa en un frasco preferentemente esmerilado para evitar el contacto con la luz y se guarda a temperatura ambiente en armario cerrado.

Procedimiento: Para los pasos previos a la coloración se procedió de la misma manera que en el caso de la coloración de Gram-Kopelloff. Posteriormente se cubrió el preparado con el colorante de Gueguen durante 2 minutos. Se lavó con agua destilada, se secó con papel de filtro y se observó (Rey Millares, 1960).

3.7.3- Coloración con naranja de acridina.

Esta técnica se utiliza para la identificación de bacterias vivas o muertas. Los componentes para 100 ml son los siguientes:

Polvo de naranja de acridina	0.03 g
Agua destilada	30ml

Preparación: Se disuelve el polvo del colorante de naranja de acridina en 30 ml de agua destilada, se homogeiniza. Previo a la coloración, se retiran 6 ml de la mezcla y se diluyen en 24 ml de agua destilada. Se envasa preferentemente en un frasco oscuro, para evitar el efecto de la luz sobre el colorante, y se conserva a temperatura ambiente.

Procedimiento: Se retiraron los cortes de acero inoxidable, cerámica y opalina con los biofilms crecidos a partir del agua de egreso de las salivaderas dentales y de la saliva de los pacientes. Se cubrieron las muestras con el colorante naranja de acridina con solución diluída durante 2 minutos. Se lavaron con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente, para luego ser observados por microscopía óptica con sistema de epifluorescencia (de acuerdo a Södeström *et al.*, 1997).

3.8- Pruebas estadísticas.

En este trabajo se aplicó el análisis del test de Student, de Varianza ANOVA, y las pruebas de comparaciones múltiples de medidas repetidas, cuando las diferencias eran significativas.

3.8.1- Análisis de varianza (ANOVA).

El ANOVA puede ser considerado como una manera de verificar si dos o más medidas muestrales fueron extraídas de una misma población o de poblaciones con el mismo valor esperado para una magnitud dada. En consecuencia, cuando estas medias muestrales no sean coincidentes habrá que suponer que provienen de poblaciones diferentes por el efecto causado por un factor en estudio.

El ANOVA es un método general, que se extiende a comparaciones múltiples y se puede demostrar que coincide con el de Student si se aplica a sólo dos muestras. Es decir el modelo de Student es un caso particular del ANOVA. Este modelo desarrollado por R. A. Fisher a principios de este siglo, tiene una distribución teórica esperada: la función F, tabulada por G. W. Snedecor. Los tests estadísticos a realizar se basan en comparar el valor muestral calculado con los datos medidos: F contra un valor crítico de tablas F_{α} . La idea básica del método es que las muestras son *normales, independientes y aleatorias*; y se supone que todas tienen la misma varianza, entonces, para que provengan de una misma

población se necesita únicamente que las medias muestrales sean todas iguales. Ésta será la hipótesis nula H_0 que se usará en todos los modelos de ANOVA, junto con los cuatro supuestos mencionados.

Las comparaciones múltiples se basan en establecer cuál es la diferencia mínima de las medias aritméticas de los grupos que tiene una probabilidad (P) de producirse inferior a un valor crítico (5 %, $P < 0,05$ o 1 %, $P < 0,01$, por ejemplo) si la hipótesis nula es verdadera. Cuando la diferencia observada entre los grupos del experimento es mayor que esa mínima diferencia significativa, se rechaza la hipótesis de igualdad de media aritmética entre las poblaciones y se dirá que la diferencia es significativa.

El modelo de ANOVA encajado estudia una sola fuente de variación como factor de análisis, el cual se subdivide en subgrupos de tipo jerárquico para su análisis como fuentes de variación separadas. Es decir, fuentes o factores encajados dentro de una clasificación superior. El cálculo del modelo de ANOVA de dos factores se puede clasificar en dos casos básicos: el primero, *sin repetición*, es cuando hay un solo dato por cada combinación posible de los factores y el segundo, *con repetición*, cuando hay más de un dato para cada caso o combinación de factores posibles (Macchi, 2001; Azzimonti Renzo, 2003).

RESULTADOS

4- RESULTADOS.

De acuerdo a lo mencionado previamente la formación de biopelículas sobre sustratos sólidos se ve influenciada tanto por los microorganismos involucrados (bacterias y hongos) como por las características del sustrato (composición y rugosidad) y el tiempo de exposición de las muestras. Las variables a tener en cuenta son diversas, por lo que el estudio se llevó a cabo de acuerdo a los criterios descritos a continuación. Con respecto a los sustratos se evaluó tanto la rugosidad como la composición de los mismos. En relación con los microorganismos se analizaron tanto los planctónicos como los sésiles. En el primer caso se tuvieron en cuenta los lugares geográficos de la fuente de agua potable (Z1 y Z2) y el lugar de la toma de dicha muestra (agua de ingreso a los equipos odontológicos y agua de egreso hacia las salivaderas dentales). Por otra parte, los estudios se complementaron con la enumeración de los microorganismos planctónicos presentes en la saliva de los pacientes sin enfermedad periodontal, tratados en los consultorios que se analizaron. En el caso de los microorganismos sésiles se consideró tanto el lugar geográfico de la fuente de agua como el tipo de sustrato, su ubicación y el tiempo de exposición. La formación de biofilm se estudió en cortes de salivaderas de acero inoxidable, cerámica y opalina que se ubicaron cerca del desagüe central de las salivaderas con un período de exposición de 24 y 64 h después de la realizada la higiene de los equipos dentales. En la superficie de las cañerías con salida hacia las salivaderas se evaluó el biofilm luego de dejar de usar el equipo durante 24 horas.

En el ítem 5 se reporta el análisis estadístico de los resultados y su significación.

4.1- Análisis de la rugosidad de los materiales.

Debido a que la rugosidad de las muestras puede ser un factor importante que influye sobre el proceso de adherencia de microorganismos se determinó la rugosidad de las muestras de

las salivaderas. Se comparó también la diferencia de rugosidad de acuerdo a la región de la salivadera: borde externo (mínimo contacto con el agua y saliva de los pacientes), y la cara próxima al desagüe (máximo contacto con el agua y la saliva de los pacientes de cada material). Se consideró que estas regiones podrían tener distinta rugosidad a causa de la necesidad de limpieza más profunda en el caso de la zona próxima al desagüe debido a la mayor tendencia a la acumulación de depósito.

4.1.1- Análisis de la rugosidad de los materiales mediante el uso de un rugosímetro. Con la finalidad de comparar las rugosidades superficiales de los tres materiales estudiados se llevó a cabo el análisis de rugosidad de los sustratos mediante rugosímetro Hommel T 1000. La lectura fue realizada por medio de una punta analizadora que ofreció un resultado cuantitativo. Los valores obtenidos se muestran en las **Figuras 4.1- 4.4**, donde la longitud de recorrido corresponde a 4, 8 mm.

4.1.1.a) Rugosidad de los cortes de salivadera de acero inoxidable.

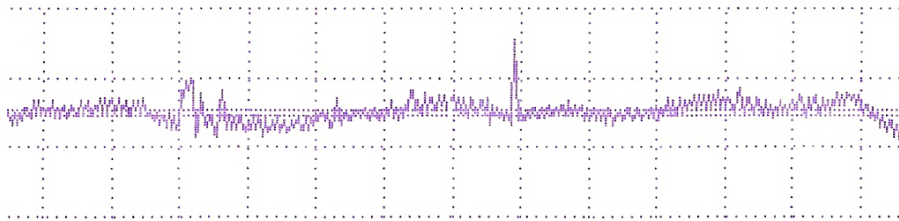


Figura 4.1.a- Registro de la rugosidad de un corte de la región de borde externo de una salivadera dental de acero inoxidable. La figura indica ondulaciones y una elevada cresta.

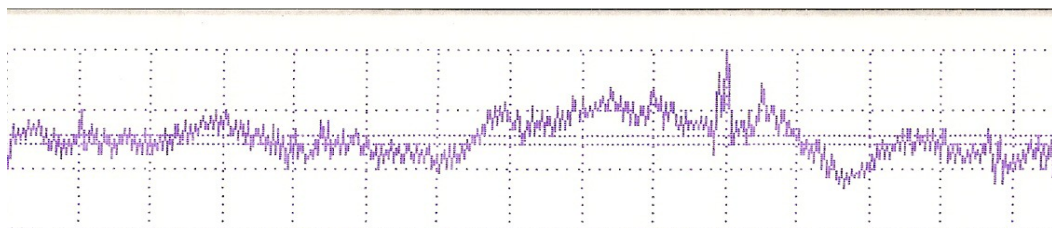


Figura 4.1.b- Registro de la rugosidad de un corte de la región próxima al desagüe de una salivadera dental de acero inoxidable. La figura muestra deformaciones de la superficie por la presencia de crestas y valles.

La **Figura 4.1.a** muestra menores ondulaciones y microrugosidad periódica en los bordes de la salivadera dental estudiada con respecto al corte cercano al desagüe (**Figura 4.1.b**). En este último caso se observan ondulaciones de hasta $2,04\ \mu\text{m}$ con importantes crestas y valles.

4.1.1.b) Rugosidad de los cortes de salivadera de cerámica.

En el caso del corte de cerámica cercano al borde los resultados obtenidos muestran baja rugosidad con ondulaciones periódicas de baja amplitud.

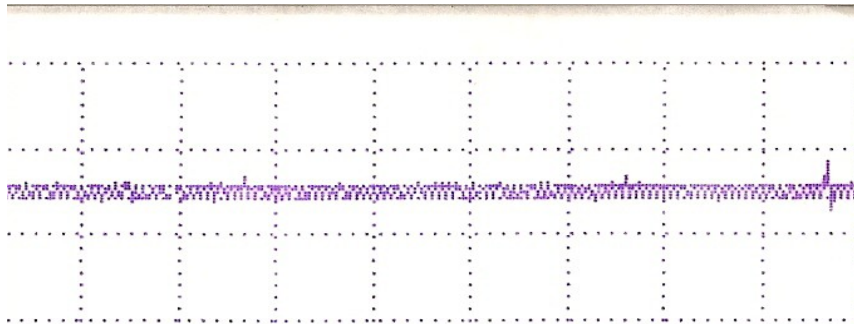


Figura 4.2.a- Registro de la rugosidad de un corte de la región de borde externo de una salivadera dental de cerámica.

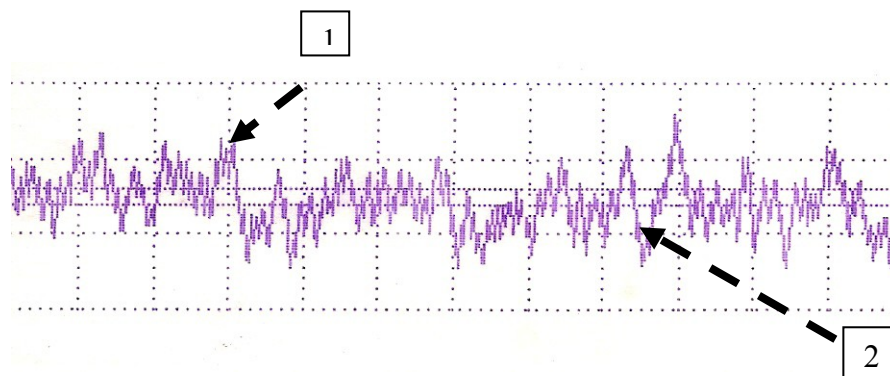


Figura 4.2.b- Registro de la rugosidad de un corte de la región próxima al desagüe de una salivadera dental de cerámica (las flechas señalan: 1: cresta, 2: valle).

Tal como muestran las **Figuras 4.2.a** y **4.2.b**, los resultados de la rugosidad de los cortes de cerámica varió notablemente con la ubicación, con marcado incremento tanto en el patrón periódico como en las irregularidades aperiódicas, en la región cercana al desagüe (**Figura 4.2.b**). Allí hay estrías aperiódicas de hasta $2,8\ \mu\text{m}$ y crestas de $3,8\ \mu\text{m}$.

4.1.1.c) Rugosidad de los cortes de salivaderas de opalina.

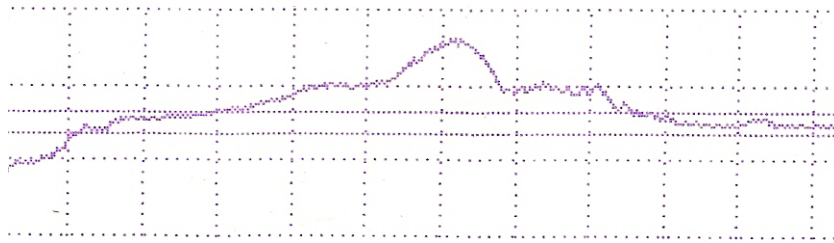


Figura 4.3.a- Registro de la rugosidad de un corte correspondiente a la región del borde externo de una salivadera dental de opalina.

Como muestran las **Figuras 4.3.a** y **4.3.b** el registro de la rugosidad correspondiente a los cortes de los bordes externos y zona próxima al desagüe de la salivadera de opalina en estudio, presenta una ondulación mayor de $5\ \mu\text{m}$ e irregularidades periódicas menores que la cerámica y el acero inoxidable.

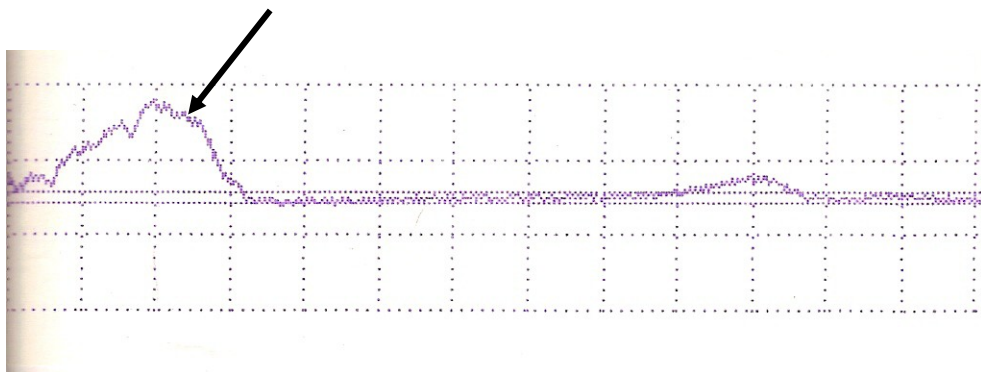


Figura 4.3.b- Registro de la rugosidad de un corte próximo al desagüe de una salivadera dental de opalina (la flecha muestra irregularidades del material).

4.1.2-Análisis de la rugosidad del acero inoxidable por Microscopía de Fuerza Atómica.

Debido a las restricciones del tamaño de las muestras que presentó el microscopio de Fuerza Atómica (AFM) únicamente la rugosidad del acero inoxidable pudo ser analizada a través del mismo. El lado del cuadrado que constituye el área (absisa) y la rugosidad correspondiente de medición (ordenada), están representados por los cuadrados celestes y solamente llegan hasta $75 \mu\text{m}$, debido a que el sistema no registra áreas mayores que $75 \times 75 \mu\text{m}^2$.

La **Figura 4.4** muestra valores ascendentes de rugosidad media superficial (RMS) que aún no han estabilizado para el área de $75 \times 75 \mu\text{m}^2$ analizada. Por ese motivo los valores registrados son menores que los indicados por el rugosímetro.

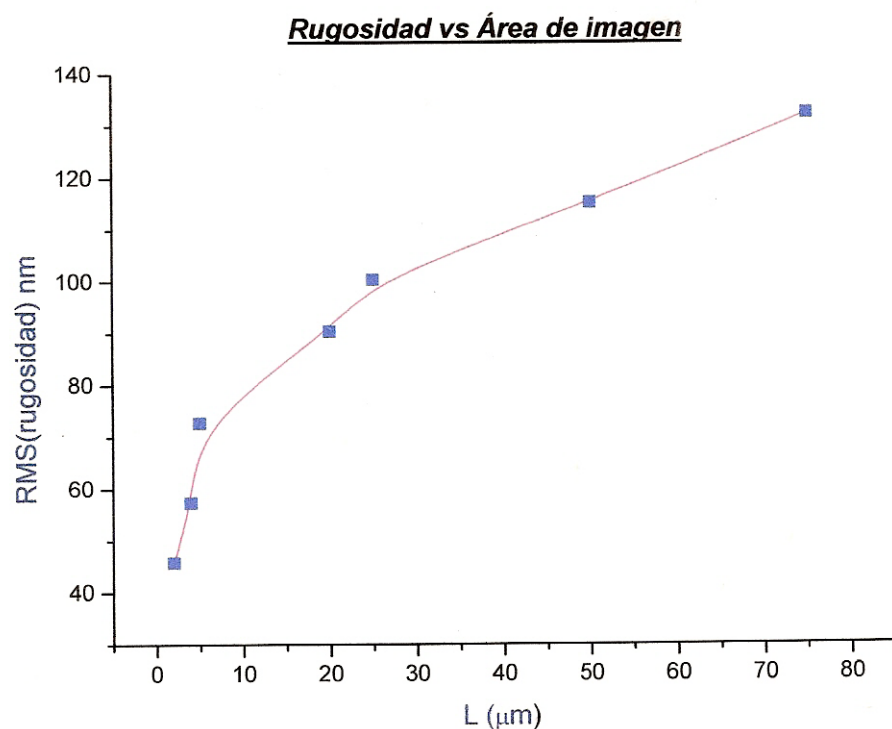


Figura 4.4.- Registro de la rugosidad del acero inoxidable por Microscopía de Fuerza Atómica (RMS): rugosidad media superficial, L: distancia o longitud (registrada en micrómetros).

4.1.3- Observaciones microscópicas de las muestras a través de MEB.

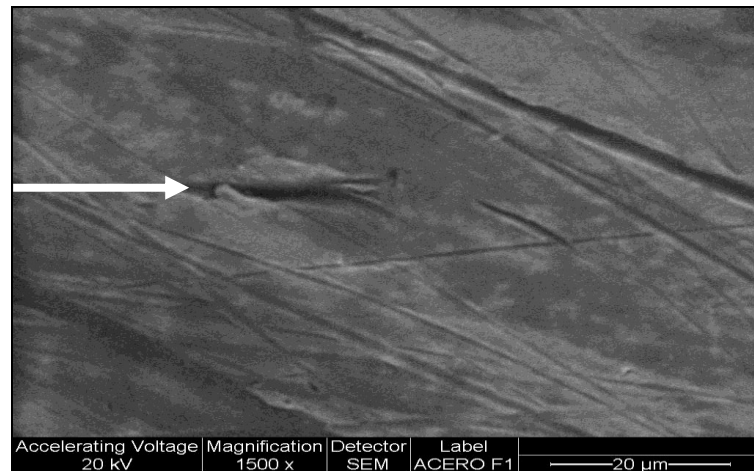


Figura 4.5- Microfotografía obtenida a través de MEB de un corte de la pared próxima al desagüe de una salivadera dental de acero inoxidable. La flecha blanca señala las irregularidades que pueden ser atribuibles al uso de los agentes de limpieza. Barra: 20 µm.

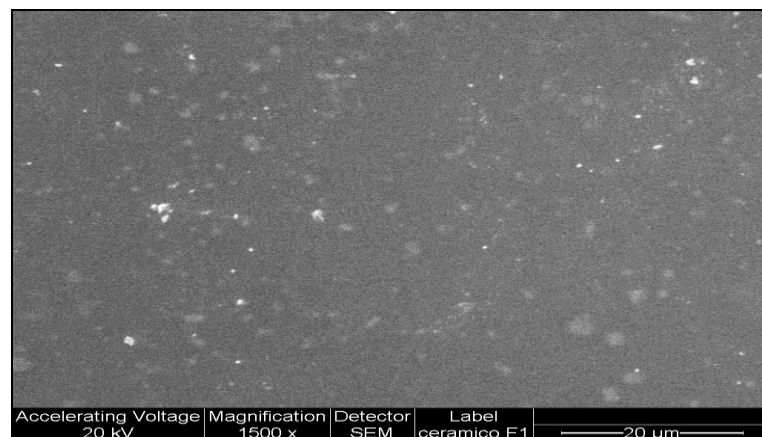


Figura 4.6- Microfotografía obtenida a través de MEB de un corte de la pared próxima al desagüe de una salivadera dental de cerámica. Los depósitos impiden ver la rugosidad superficial. Barra: 20 µm.

La observación de los materiales a través de MEB mostró que la opalina y el acero inoxidable presentan en ciertos puntos importantes irregularidades en la zona próxima al desagüe (**Figuras 4.5 y 4.7**) debido posiblemente al uso de sustancias abrasivas durante su limpieza. En la cerámica se observan depósitos superficiales que impiden distinguir la rugosidad superficial.

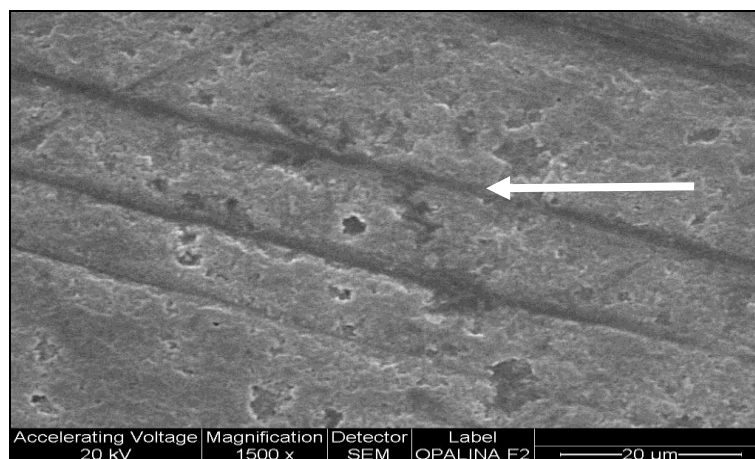


Figura 4.7- Microfotografía obtenida a través de MEB de un corte próximo al desagüe de una salivadera dental de opalina. La flecha blanca indica las irregularidades del material que pueden ser causadas por el uso de los elementos de limpieza. Barra: 20 μm .

4.1.4 - Análisis de las características físicas.

La **Tabla 4.6** muestra los valores de las propiedades físicas de la cerámica.

Tabla 4.6- Características de las muestras de cerámica analizadas.

Característica física	Valores hallados
Peso seco	9.57870 g/cm^3
Peso húmedo	4.59041 g/cm^3
Absorción agua	0.3%
Poros	0.6%
Densidad	2,324 g/cm^3

La determinación de la densidad, porosidad y absorción de agua se realizó siguiendo el método de la norma IRAM 12510.

4.2- Análisis de los microorganismos planctónicos.

Se analizó la presencia de hongos y bacterias planctónicas en el agua de ingreso a los equipos odontológicos, de egreso hacia las salivaderas dentales y de la saliva de los pacientes sin enfermedad periodontal asistidos en los consultorios de las regiones Z1 y Z2.

Los valores medios y la significación de las diferencias se analizarán en el ítem 5. En el **Apéndice II** se detallan los valores obtenidos y su error estándar.

4.2.1- Análisis de las bacterias planctónicas.

Para el análisis de las bacterias se utilizaron los siguientes medios de cultivo: Agar líquido Mac Conckey para detectar la presencia de enterobacterias (bacilos Gram negativos), medio Agar sangre al 5% para analizar los cocos aerobios hemolíticos Gram positivos y medio Agar Mitis Salivarius para la detección de los estreptococos orales.

4.2.1.a) Análisis de la influencia de la fuente del agua de ingreso al equipo odontológico.

Se analizó la carga microbiana (bacterias y hongos) del agua de ingreso a los equipos odontológicos desde la fuente de agua potable correspondiente (Z1 o Z2). Se tomaron muestras del agua de las canillas en 59 consultorios en total (29 de Z1 y 30 de Z2).

Los valores medios obtenidos de las UFC/ml de las bacterias planctónicas del agua de ingreso a los equipos odontológicos de cada uno de los consultorios se grafican en la

Figura 4.8.

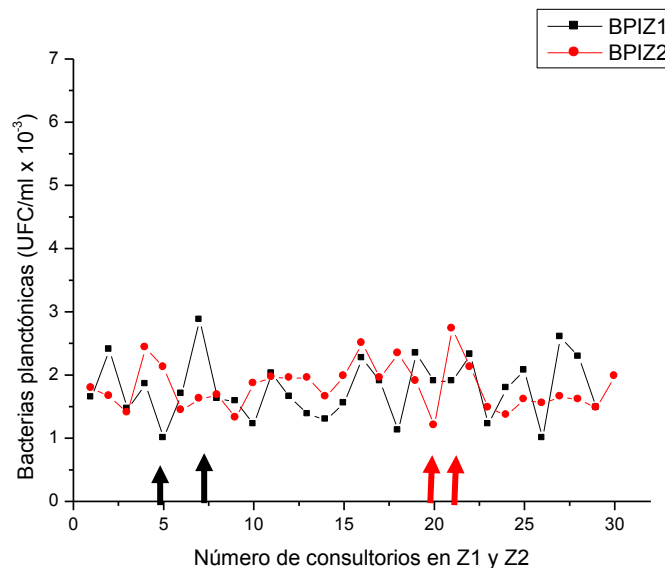


Figura 4.8- Valores medios de las UFC/ml de las bacterias planctónicas (BP) del agua de ingreso (I) de los equipos odontológicos de Z1 y Z2.

BPIZ1: color negro corresponde a las bacterias planctónicas del agua de ingreso en Z1.
BPIZ2: color rojo corresponde a las bacterias planctónicas del agua de ingreso en Z2. Las flechas indican valores mínimos y máximos en cada zona.

Dicha **Figura** muestra valores similares en ambas zonas aunque el agua provenga de diferentes fuentes. Sin embargo, el número de bacterias detectadas varía entre 1×10^3 UFC/ml (consultorio N° 5) y $2,87 \times 10^3$ (consultorio N° 7) UFC/ml en Z1 (flechas negras) y entre $1,2 \times 10^3$ UFC/ml (N° 20) y $2,73 \times 10^3$ UFC/ml (N°21) en Z2 (flechas rojas).

Es decir, la carga microbiana del agua que ingresa a algunos consultorios es más que el doble de la de otros. Esto indica que hay mayor contaminación desde la fuente a la canilla domiciliaria en algunos sitios.

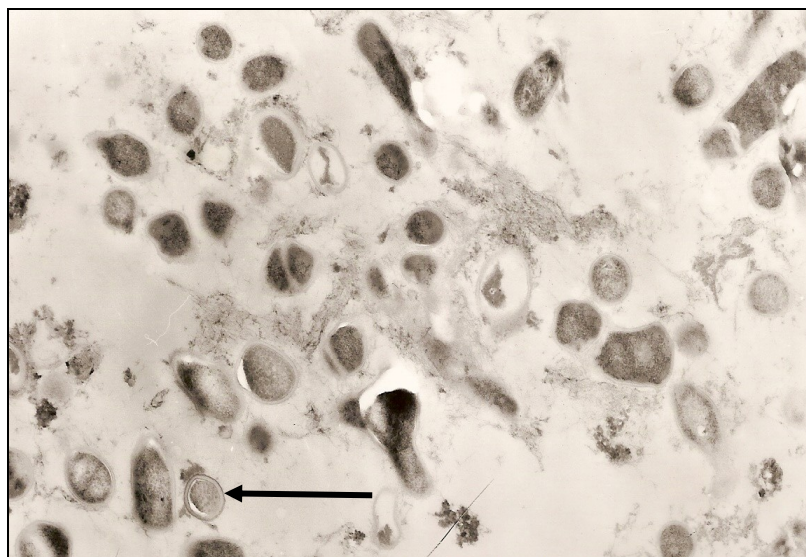


Figura 4.9- Microfotografía obtenida a través de MET de una muestra de 100 ml de agua de ingreso a un equipo odontológico de Z1 de la ciudad de La Plata, procesada según el ítem 3.4.1. La flecha negra indica una de las bacterias planctónicas. Magnificación 8000 X.

Tal como puede observarse la **Figura 4.9** en las muestras obtenidas de 100 ml de agua de ingreso analizadas a través de MET (ítem 3.4.1) se observan bacterias planctónicas junto a material particulado, posiblemente arrastrado por el flujo del agua corriente.

La muestra que señala la **Figura 4.10** puede observarse la microscopía obtenida a través de una muestra de agua de ingreso de los equipos odontológicos, inyectada sobre un filtro de colodion y fijada con glutaraldehído (ítem 3.4.2). En la misma se distinguen escasas bacterias planctónicas ya que la muestra procesada era de 1 ml.

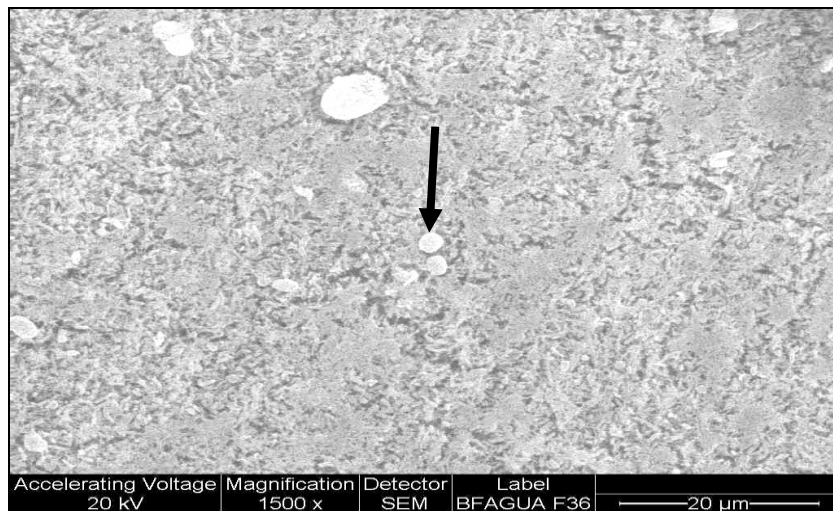


Figura 4.10-Microfotografía obtenida a través de MEB de una muestra de 1 ml de agua de ingreso a un equipo odontológico de Z2 de la ciudad de La Plata, procesada sobre un filtro de colodión según ítem 3.4.2. La flecha negra muestra la presencia de bacterias planctónicas. Barra: 20 µm.

4.2.1.b) Análisis del agua de egreso hacia las salivaderas.

Para el análisis de la carga bacteriana del agua de egreso con salida hacia las salivaderas se realizaron los mismos procedimientos que los explicados anteriormente para el agua de ingreso. En la **Figura 4.11** se grafican los valores obtenidos.

La Figura **4.11** muestra similitud en los valores registrados en ambas zonas (Z1 y Z2), aunque, debe notarse que existen consultorios con valores mucho más bajos. Como muestra la **Figura 4.11** puede notarse que el número de microorganismos varía entre $3,18 \times 10^3$ UFC/ml (consultorio N° 2) y $5,30 \times 10^3$ UFC/ml (consultorio N° 18) en Z1 (flechas negras) y entre $2,86 \times 10^3$ UFC/ml (consultorio N° 28) y $5,30 \times 10^3$ UFC/ml (consultorio N° 26) para Z2 (flechas rojas).

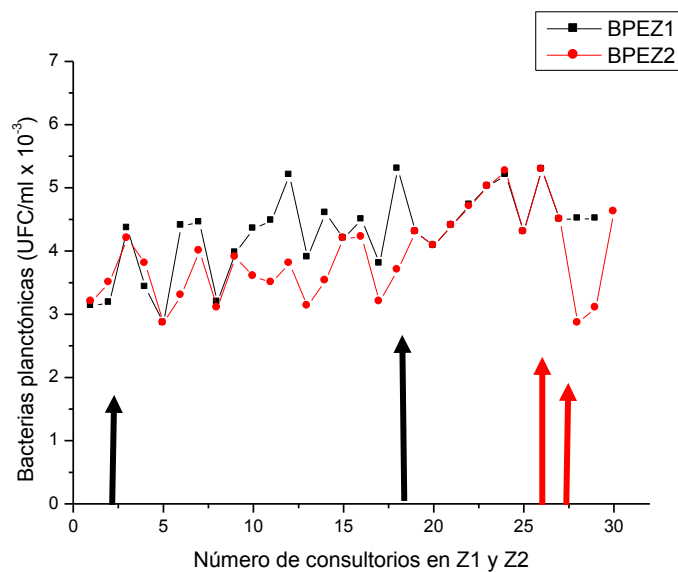


Figura 4.11- Valores medios de las UFC/ml de bacterias planctónicas (BP) del agua de egreso (E) a los equipos odontológicos de Z1 y Z2.

BPIZ1: color negro corresponde a las bacterias planctónicas del agua de egreso en Z1.

BPIZ2: color rojo corresponde a las bacterias planctónicas del agua de egreso en Z2.

Las flechas indican valores mínimos y máximos.

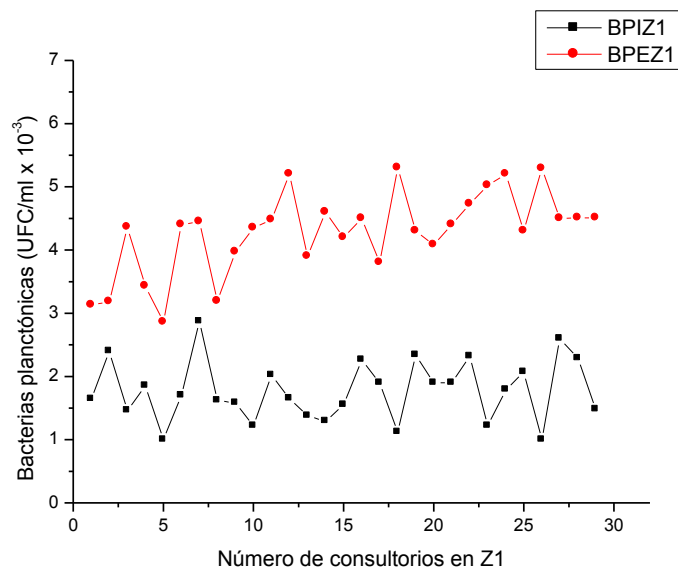


Figura 4.12- Comparación de los valores medios de las UFC/ml de bacterias planctónicas (BP) del agua de ingreso (I) y del agua de egreso (E) de los equipos odontológicos de Z1.

BPIZ1: color negro corresponde a las bacterias planctónicas del agua de ingreso en Z1.

BPEZ1: color rojo corresponde a las bacterias planctónicas del agua de egreso en Z1.

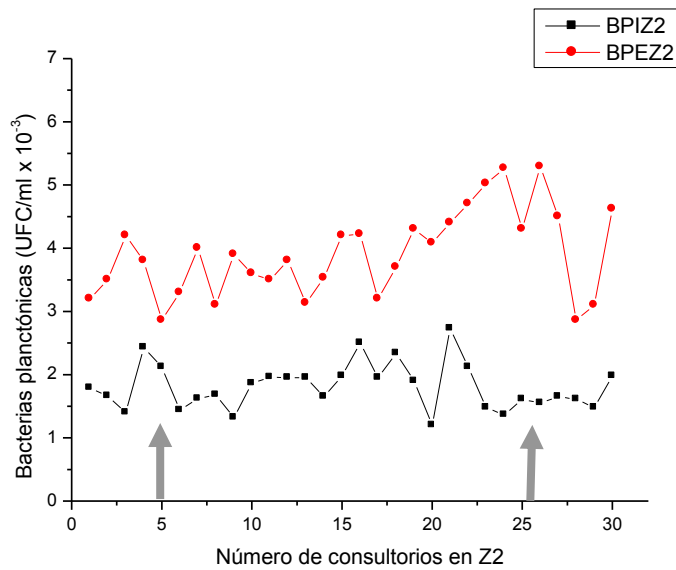


Figura 4.13- Comparación de los valores medios de las bacterias planctónicas (BP) del agua de ingreso (I) y del agua de egreso (E) a los equipos odontológicos de Z2.

BPAIZ2: color negro corresponde a las bacterias planctónicas del agua de ingreso en Z2.

BPAEZ2: color rojo corresponde a las bacterias planctónicas del agua de egreso en Z2.

La **Figura 4.13** muestra que la variación entre el agua de ingreso y egreso es más importante en algunos consultorios que en otros, (comparar consultorios 5 y 26).

Como puede observarse en las **Figuras 4.12** y **4.13** los resultados de las UFC/ml muestran el incremento en la contaminación al atravesar el equipo odontológico. El número de bacterias se triplica en muchos casos.

4.2.2.- Análisis de los hongos planctónicos.

Se analizó la presencia de hongos planctónicos en el agua de ingreso a los equipos dentales y en el agua de egreso hacia las salvaderas, utilizando el medio de cultivo sólido Agar Melitado de Saboreaud.

4.2.2.a) Análisis de la influencia del agua de ingreso a los equipos odontológicos.

En los cultivos realizados en agar sólido Melitado de Saboreaud no se observó la presencia de hongos planctónicos en ninguna de las dos regiones (Z1 y Z2) (**Figura 4.14**, línea azul).

4.2.2.b) Análisis del agua de egreso hacia las salivaderas dentales.

Los resultados obtenidos de los cultivos realizados en medio sólido Agar Melitado de Saboreaud mostraron desarrollo de grandes colonias de color verde y aspecto algodonoso y otras colonias de color blanco de aspecto brillante similares al género *Candida*. Los hongos planctónicos fueron hallados en el agua corriente después que esta hubiera atravesado las diferentes mangueras o cañerías hasta la salida hacia las salivaderas dentales. Los resultados que muestra la **Figura 4.14** de las UFC/ml de los hongos planctónicos de ambas regiones (Z1 y Z2) son similares para los distintos consultorios con menor variación que en el caso de las bacterias.

En la **Figura 4.14** podemos observar que los valores medios de las UFC/ml de hongos planctónicos presentes en el agua de egreso hacia las salivaderas fue similar en ambas regiones (Z1 y Z2), teniendo en cuenta que la fuente de agua era diferente.

La presencia de hongos planctónicos fue observada también por MEB (**Figura 4.15**). En dicha Figura es posible distinguir conidias en reproducción, en coincidencia con los datos de la **Figura 4.14**. En consecuencia cuando el agua atraviesa el interior de los equipos odontológicos modifica su carga microbiana incorporando otros microorganismos, en este caso hongos.

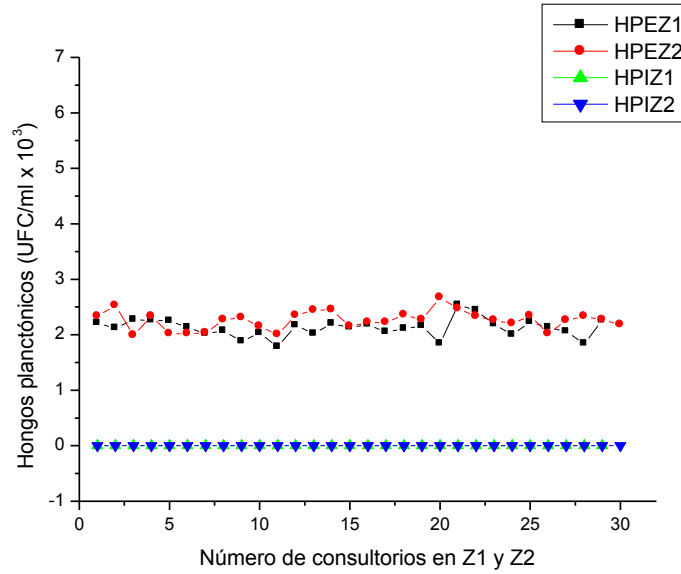


Figura 4.14- Valores medios de las UFC/ml de los hongos planctónicos (HP) del agua de ingreso, y egreso hacia las salivaderas de los consultorios de Z1.

HPEZ1: color negro corresponde a la presencia de hongos planctónicos en el agua de egreso en Z1.

HPEZ2: color rojo corresponde a la presencia de hongos planctónicos en el agua de egreso en Z2.

La línea (color azul) indica ausencia de hongos en el ingreso.



Figura 4.15- Microfotografía obtenida a través de MET de una muestra de agua de egreso (E) hacia la salivadera dental, de un consultorio odontológico de Z1 de la ciudad de La Plata. La flecha negra continua muestra la hifa de un hongo planctónico, la flecha negra discontinua señala conidias. Magnificación 8000 X.

4.2.3- Análisis de las bacterias planctónicas provenientes de la saliva de pacientes sin enfermedad periodontal en los consultorios de Z1 y Z2.

Como las bacterias planctónicas de la saliva de los pacientes podrían jugar un rol muy importante en la formación del biofilm que se adhiere sobre las salivaderas dentales de los tres materiales estudiados, se realizó un análisis cuantitativo de las UFC/ml de las mismas. Las muestras se tomaron de 50 pacientes de Z1 y Z2 sin enfermedad periodontal (25 de cada región). En la **Figura 4.16** puede observarse que la distribución de las concentraciones de microorganismos en la saliva de los pacientes fue similar en los pacientes de ambas zonas.

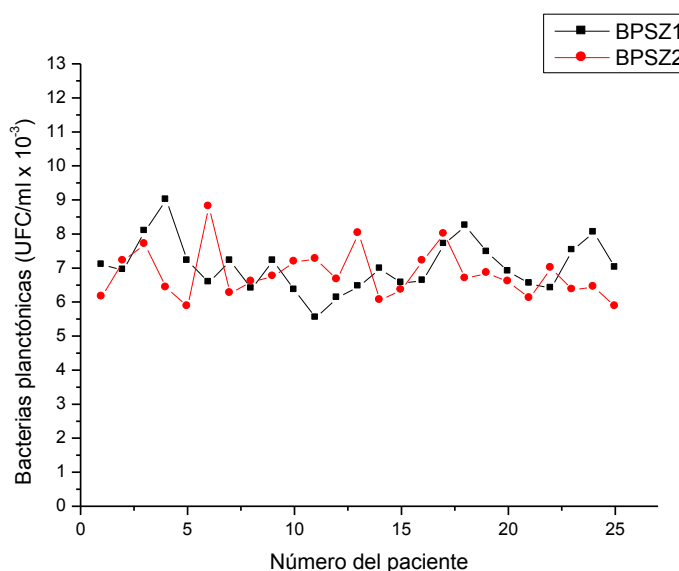


Figura 4.16- Valores medios de las UFC/ml de las bacterias planctónicas de la saliva de 25 pacientes de cada zona sin enfermedad periodontal asistidos en los consultorios de Z1. BPSZ1: color negro bacterias planctónicas provenientes de la saliva de los pacientes sin enfermedad periodontal de Z1. BPSZ2: color rojo bacterias planctónicas provenientes de la saliva de los pacientes sin enfermedad periodontal de Z2.

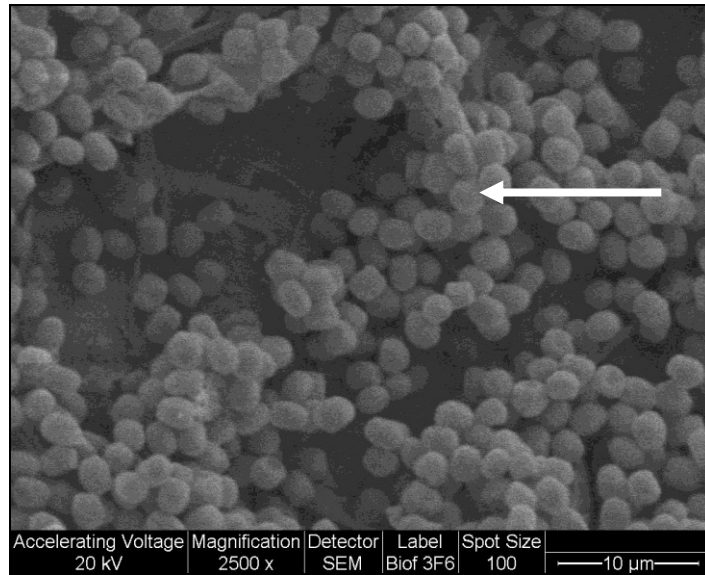


Figura 4.17- Microfotografía obtenida a través de MEB (de acuerdo al procedimiento descrito en el ítem 3.4.2) de una muestra de saliva de un paciente asistido en un consultorio odontológico de Z1 de la ciudad de La Plata sin enfermedad periodontal, procesada sobre un filtro de colodion (ítem 3.4.2). La flecha blanca indica la presencia de bacterias planctónicas probablemente estreptococos. Barra: 10 µm.

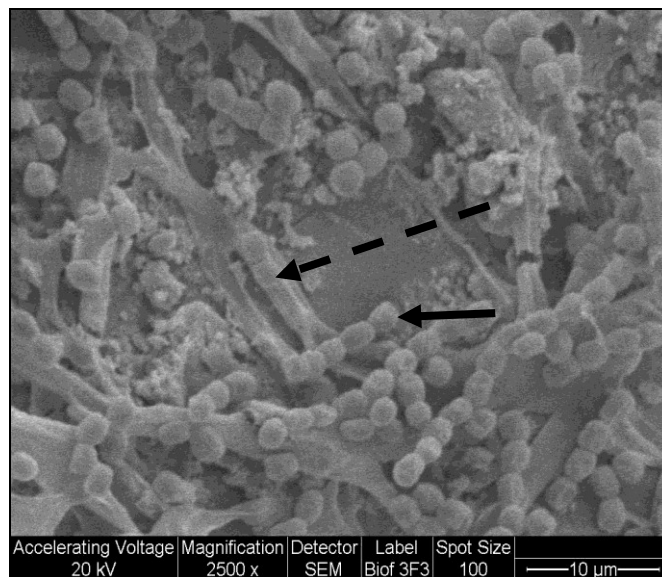


Figura 4.18- Microfotografía obtenida a través de MEB de una muestra de saliva de un paciente asistido en un consultorio odontológico de Z2 de la ciudad de La Plata sin enfermedad periodontal, procesada en un filtro de colodion (ítem 3.4.2). La flecha negra continua muestra bacterias planctónicas probablemente estreptococos, la flecha negra discontinua señala bacterias planctónicas similares a las filamentosas. Barra: 10 µm.

En la **Figura 4.18** puede notarse la abundante cantidad de bacterias (probablemente estreptococos) asociadas a bacterias planctónicas similares al tipo actinomices, en una muestra de saliva procesada sobre un filtro de membrana de colodion. En la **Figura 4.19** se muestra una cadena en detalle.

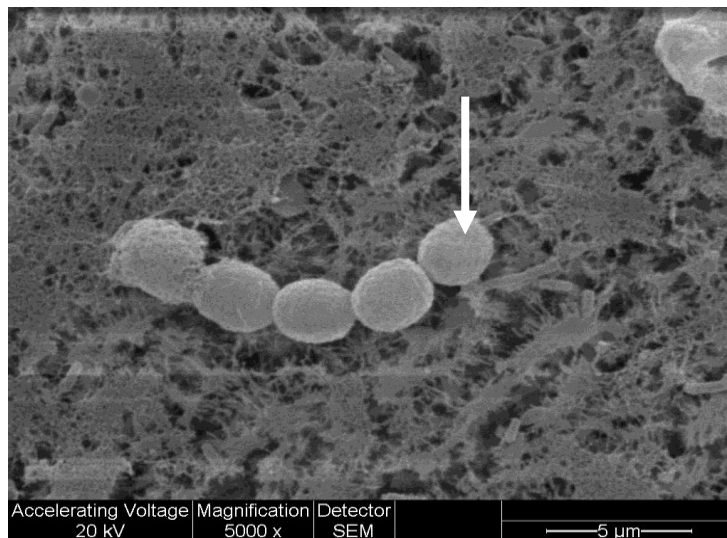


Figura 4.19-Microfotografía obtenida de una muestra de saliva de un paciente sin enfermedad periodontal a través de MEB, procesada sobre un filtro de colodion (ítem 3.4.2), asistido en un consultorio de Z1 de la ciudad de La Plata. La flecha blanca señala una cadena de cocos planctónicos. Barra: 5 μ m.

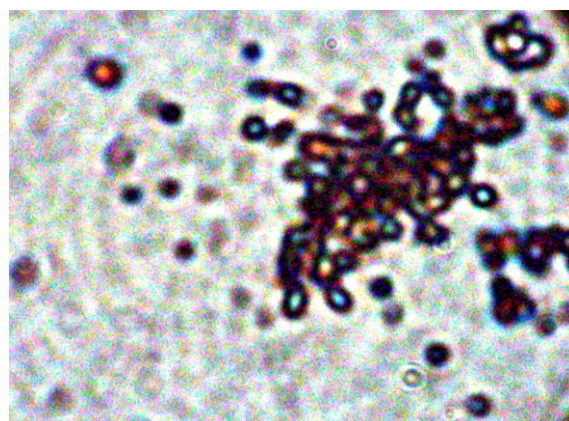


Figura 4.20- Microfotografía óptica de bacterias planctónicas presentes en una muestra de saliva de un paciente sin enfermedad periodontal, asistido en un consultorio de Z1 de la ciudad de La Plata, coloreadas con la tinción de Gram. Magnificación: 1000 X.

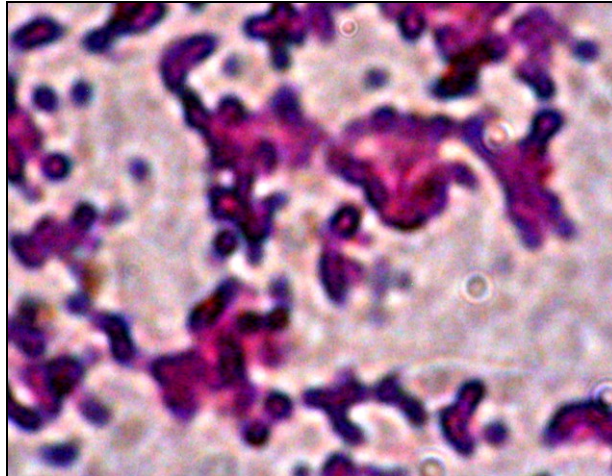


Figura 4.21- Microfotografía óptica de UFC/ml de bacterias planctónicas provenientes de una muestra de un paciente sin enfermedad periodontal asistido en un consultorio de Z2 de la ciudad de La Plata, teñida con la coloración de Gram. Magnificación: 1000 X.

Tal como muestran las **Figuras 4.20** y **4.21** las bacterias más observadas en las muestras coloreadas por la tinción de Gram son los estreptococos (Gram positivos).

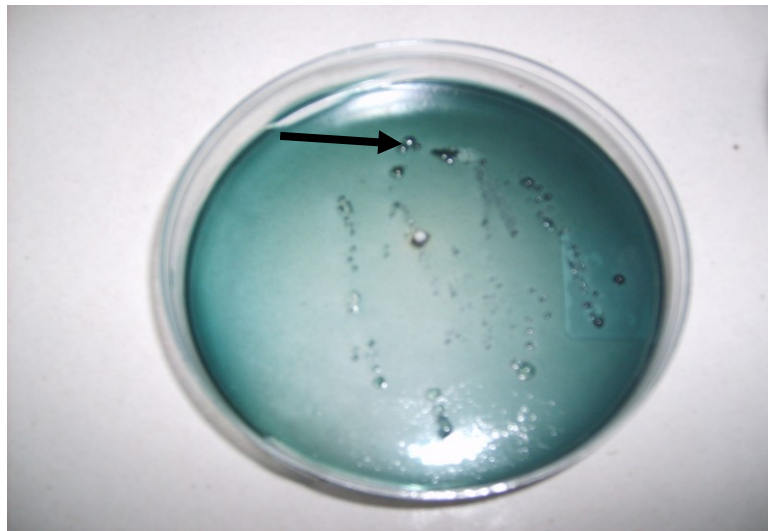


Figura 4.22- Fotografía del cultivo de una muestra de saliva de un paciente sin enfermedad periodontal en Agar Mitis Salivarius, asistido en un consultorio de Z2 en la ciudad de La Plata. La flecha negra muestra colonias elevadas de color celeste claro de cocos de la especie de *Streptococcus salivarius*.

Como indica la **Figura 4.22** en el conteo de UFC/ml de saliva sembrados en condiciones de anaerobiosis en Agar Mitis Salivarius, las bacterias planctónicas que se hallaron en mayor cantidad fueron de la especie *Streptococcus salivarius*.

4.3-Análisis de microorganismos sésiles.

Se analizaron los microorganismos sésiles (bacterias y hongos) presentes en el interior de las cañerías metálicas por donde circula el agua corriente de egreso hacia las salivaderas dentales. Por otra parte se expusieron y evaluaron cortes del mismo material de las salivaderas en la zona de desagüe de las mismas durante 24 y 64 horas. En ambos casos fueron analizados consultorios pertenecientes a Z1 y Z2 de la ciudad de La Plata. Los valores medios y el error estándar se detallan en las **Tablas II.10-II.25** del **Apéndice II**. El análisis estadístico de las medias y valores mínimos y máximos se realizará en el ítem 5.

4.3.1- Análisis de las UFC/cm² de bacterias sésiles provenientes del interior de las cañerías metálicas con salida hacia las salivaderas.

Se tomaron muestras de 58 cañerías en total (28 cañerías pertenecientes a Z1 y 30 cañerías de Z2). Entre las bacterias observadas en las siembras de agar sangre al 5% incubadas a 37° C durante 48 horas se identificaron cocos Gram positivos no hemolíticos. En los cultivos realizados en medio líquido agar Mac Conckey no fueron identificados bacilos Gram negativos del tipo enterobacterias. En la **Figura 4.23** se grafican los valores medios.

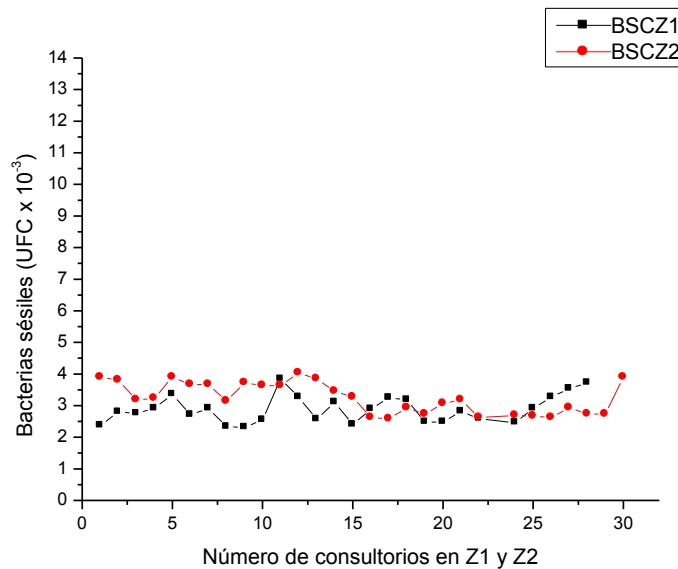


Figura 4.23- Valores medios de las UFC/cm² de las bacterias sésiles en el interior de las cañerías metálicas (C) de los consultorios de Z1 y Z2.

BSCZ1: color negro corresponde a bacterias adheridas a las cañerías metálicas, 24 horas después del cese de circulación del agua por los equipos dentales en Z1.

BSCZ2: color rojo corresponde a bacterias adheridas a las cañerías metálicas, 24 horas después del cese de la circulación de agua por los equipos dentales en Z2. Las UFC corresponden a un área de raspado de superficie de 0,4 cm².

Como muestra la **Figura 4.23** los valores medios de las UFC/ml enumeradas fueron similares en ambas regiones (Z1 y Z2).

4.3.2-Análisis de las UFC/cm² de los hongos sésiles provenientes del interior de las cañerías metálicas con salida hacia las salivaderas.

Se tomaron muestras de 30 cañerías de cada zona (Z1 y Z2) que se cultivaron en el medio sólido de Agar Saboreaud. Se observaron grandes colonias de hongos de color verde y de aspecto aterciopelado y otras colonias de color blanco de aspecto brillante similares a las de al género *Candida*. Los resultados son los que se muestran en la **Figura 4.24**.

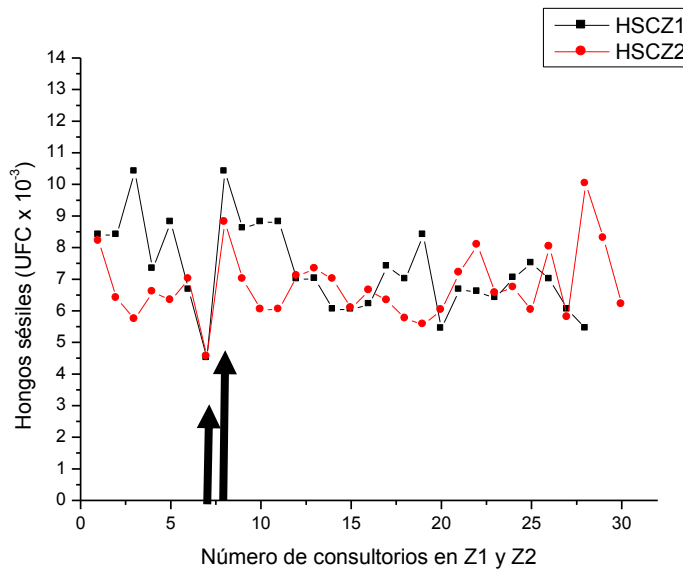


Figura 4.24- Resultado de los valores medios de los hongos sésiles en el interior de las cañerías metálicas de los consultorios de Z1 y Z2.

HSCZ1: color negro corresponde a los hongos sésiles adheridos a las cañerías metálicas con salida hacia las salivaderas, en los consultorios de Z1, 24 horas después del cese de circulación del agua corriente por los equipos.

HSCZ2: color rojo corresponde a los hongos sésiles adheridos a las cañerías metálicas con salida hacia las salivaderas, en los consultorios de Z2, 24 horas después del cese de la circulación de agua corriente por los equipos. Las UFC corresponden a un área de raspado de superficie de $0,4 \text{ cm}^2$.

Puede observarse que el número de hongos sésiles varía marcadamente de un consultorio a otro, entre $4 \times 10^3 \text{ UFC/cm}^2$ (consultorio N° 7) y $10 \times 10^3 \text{ UFC/cm}^2$ (consultorio N° 8) para Z2 (ver flechas de la **Figura 4.24**).

Tal como se observa en las **Figuras 4.25** y **4.26** la muestra procesada por MET permite identificar la composición del biofilm (bacterias, hongos y partículas adheridas) en el interior de las cañerías metálicas.

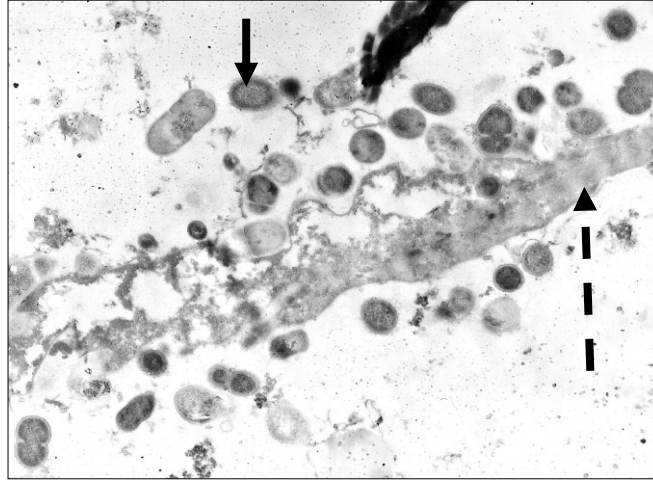


Figura 4.25-Microfotografía obtenida a través de MET de una muestra obtenida por raspado de una cañería metálica por donde circula agua que egresa hacia la salivadera de un consultorio odontológico de Z1 de la ciudad de La Plata., con un período de cese de circulación del agua corriente de 24 horas. La flecha negra continua señala una de las bacterias planctónicas, la flecha negra discontinua señala la hifa de un hongo planctónico. Magnificación: 8000 X.

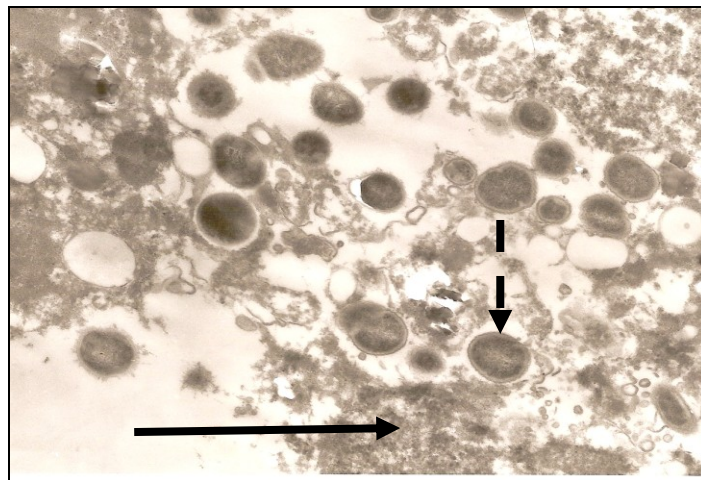


Figura 4.26- Microfotografía obtenida a través de MET de una muestra obtenida por raspado de una cañería metálica por donde circula el agua que egresa hacia la salivadera de un consultorio odontológico de Z2 de la ciudad de La Plata, con un período de cese de circulación del agua corriente de 24 horas. La flecha negra discontinua señala una bacteria sésil con la posible formación de polisacáridos extracelulares, la flecha negra continua indica la presencia de material particulado. Magnificación: 8000 X.

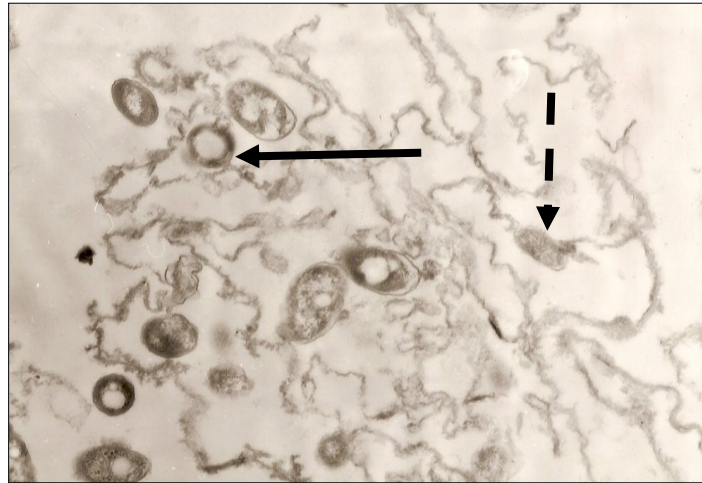


Figura 4.27-Microfotografía obtenida a través de MET de una muestra obtenida por raspado de una cañería metálica de un consultorio odontológico de Z2 de la ciudad de La Plata, con un período de cese de circulación del agua corriente de 24 horas. La flecha negra continua muestra las esporas de un hongo sésil y la flecha negra discontinua señala la presencia de material particulado adherido al interior de las cañerías metálicas por donde egresa el agua hacia las salivaderas. Magnificación: 8000 X.

En las **Figuras 4.26** y **4.27** se observa la presencia de material particulado entre las bacterias sésiles. También puede observarse la presencia de esporas de hongos que estaban adheridos a la superficie de las cañerías.

4.3.3-Análisis de las UFC/cm² de las bacterias sésiles provenientes de los cortes de las salivaderas dentales.

Se tomaron muestras sobre 118 cortes en total de paredes próximas al desagüe, de salivaderas de acero inoxidable, cerámica y opalina. Cada uno de los cortes de idéntico material que el de la salivadera, fue colocado sobre las paredes internas próximas a la rejilla de desagüe de las mismas, en los consultorios seleccionados en Z1 y Z2, de la ciudad de La Plata. Los cortes permanecieron expuestos durante períodos de 24 y 64 h. Los mismos estuvieron sometidos al flujo salival de los pacientes asistidos en cada uno de los consultorios, sin enfermedad periodontal, y a la salida de agua de egreso de las cañerías hacia las salivaderas.

4.3.3.a) Análisis de las UFC/cm² de las bacterias sésiles provenientes de los cortes de acero inoxidable de salivaderas dentales con períodos de exposición de 24 y 64 horas.

Se analizaron las UFC/cm² de bacterias sésiles adheridas a 40 cortes (10 para cada condición) de salivaderas dentales de acero inoxidable con períodos de exposición de 24 y 64 horas. En los cultivos realizados en medio sólido Agar Mitis Salivarius, incubados a 37°C durante 48 horas en condiciones de anaerobiosis se identificaron cocos de la especie *Streptococcus salivarius*. En los cultivos realizados en medio sólido Agar sangre al 5% incubados a 37°C durante 48 horas se observaron cocos Gram positivos no hemolíticos del mismo tipo que los mencionados anteriormente. Los resultados obtenidos de los valores medios de las UFC/cm² en el medio Agar Mitis Salivarius y Agar sangre al 5% son los que se muestran en las **Figuras 4.28.a y b.**

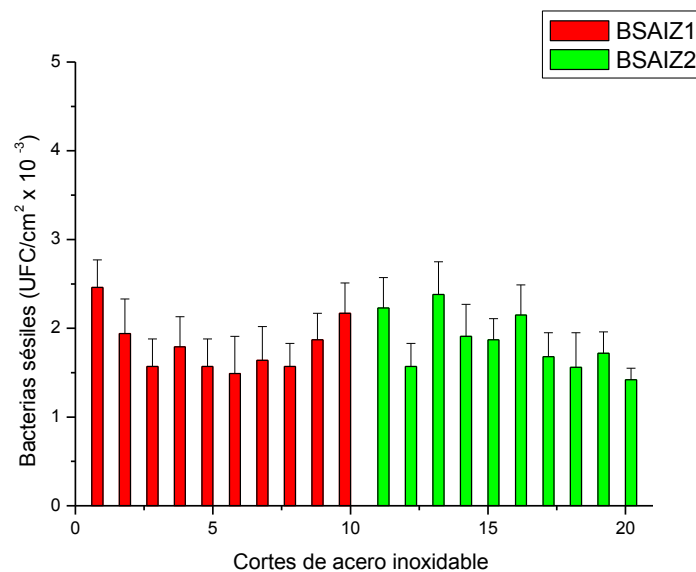


Figura 4.28.a-Valores medios y error estándar de las UFC/cm² de las bacterias sésiles (BS) encontradas sobre los cortes de acero inoxidable (AI) cercanos al desagüe de las salivaderas dentales de los consultorios de Z1 (rojo) y Z2 (verde), con 24 h de exposición.

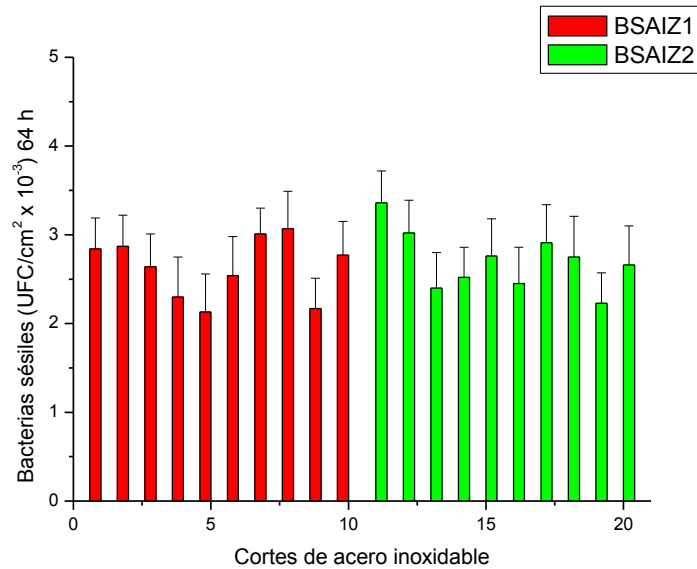


Figura 4.28.b- Valores medios y error estándar de las UFC/cm² de las bacterias sésiles (BS) encontradas sobre los cortes de acero inoxidable (AI) próximos al desagüe, de las salivaderas dentales de los consultorios de Z1 (rojo) y Z2 (verde), con 64 h de exposición.

Como se observa en las **Figuras 4.28.a** (24 h) y **4.28.b** (64 h) los números de las UFC/cm² de las bacterias sésiles adheridas en los cortes de acero inoxidable observadas en las zonas Z1 y Z2 fueron similares.

En la **Figura 4.28.c.** se comparan los resultados obtenidos a las 24 y 64 horas de exposición. Se observa un incremento del número de las UFC/cm² de bacterias sésiles en relación con el tiempo de exposición. La variación es más importante en algunos consultorios como el N° 8, (ver flecha).

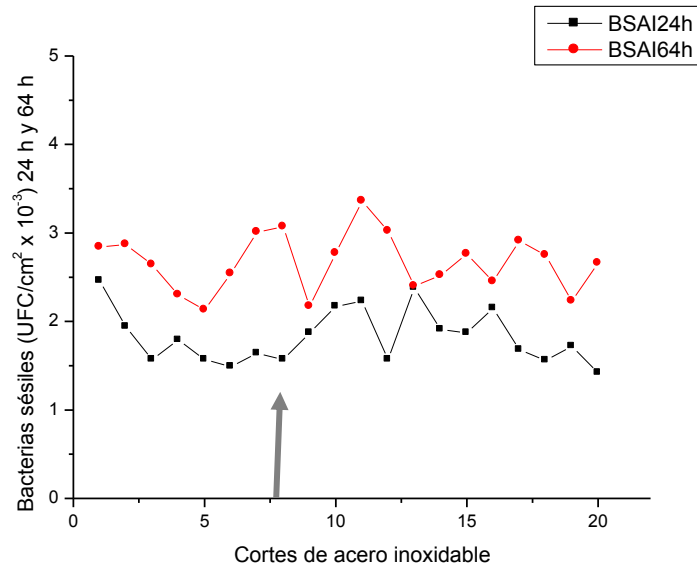


Figura 4.28.c- Comparación de los valores medios de las UFC/cm² de las bacterias sésiles (BS) observadas en los cortes próximos al desagüe de las salivaderas dentales de acero inoxidable (AI), colocados en los consultorios de Z1 y Z2, con un período de exposición de 24 y 64 h. (Negro: 24 h, rojo: 64 h)

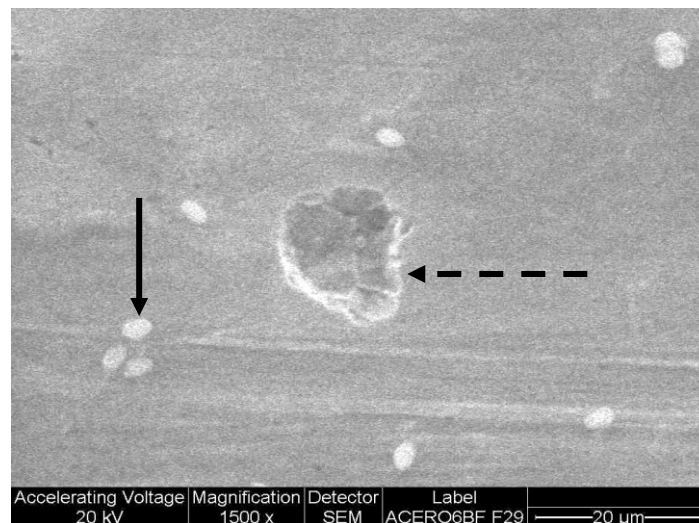


Figura 4.29- Microfotografía obtenida a través de MEB de un corte de la pared interna de una salivadera de acero inoxidable colocado en la zona próxima al desagüe de una salivadera de un consultorio odontológico de Z1 de la ciudad de La Plata, con un período de exposición de 24 h. La flecha negra continua señala bacterias sésiles sobre la superficie del material, la flecha negra discontinua muestra el ataque por picado del acero inoxidable. Barra: 20 μm.

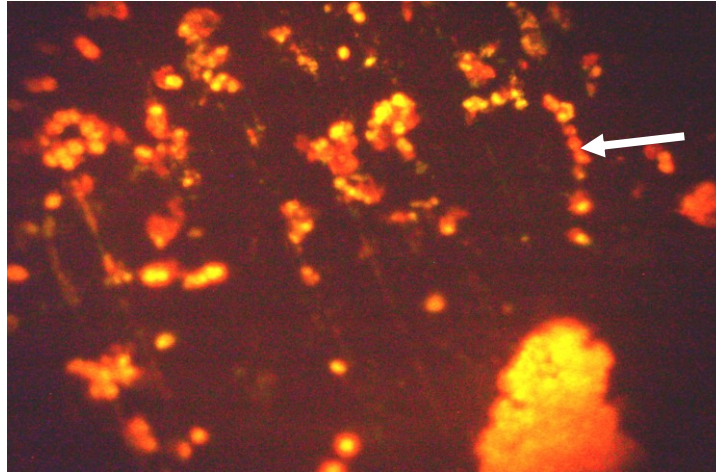


Figura 4.30- Microfotografía obtenida a través de microscopía de epifluorescencia del biofilm formado “in vitro” sobre un corte de acero inoxidable colocado próximo al desagüe de una salivadera del mismo material, en un consultorio de Z2 de la ciudad de La Plata, con un período de exposición de 64 h. La flecha blanca señala bacterias sésiles teñidas con naranja de acridina. Magnificación: 400 X.

Como puede observarse en la **Figura 4.29**, la muestra obtenida de un corte de una salivadera de acero inoxidable observada a través de MEB, previamente deshidratada, fijada y secada con punto crítico, (ítem 3.4.2) presenta bacterias sésiles de forma cococida adheridas a la superficie del material después de 24 horas de exposición. Durante dicho período el equipo dental se mantuvo en reposo, con cese del flujo de agua.

En la **Figura 4.30**, puede observarse una muestra teñida con naranja de acridina y observada por microscopía de epifluorescencia. Al comparar con las **Figura 4.29** y **4.30** puede notarse un aumento en el número del mismo tipo de bacterias sésiles después de 64 horas de exposición (fin de semana), con cese del flujo de agua corriente.

4.3.3.b) Análisis de las UFC/cm² de las bacterias sésiles provenientes de los cortes de cerámica de salivaderas dentales con períodos de exposición de 24 y 64 horas.

Se analizaron las UFC/cm² de bacterias sésiles adheridas a 40 (10 para cada condición) cortes en total de salivaderas dentales de cerámica en diferentes períodos de exposición (24 y 64 h). En los cultivos realizados en Agar Mitis Salivarius incubados a 37°C durante 48 horas en condiciones de anaerobiosis se identificaron cocos de la especie *Streptococcus salivarius*. En los cultivos realizados en medio de Agar sangre al 5% en condiciones de aerobiosis se observaron bacilos Gram negativos no fermentativos. Los resultados de las UFC/cm² obtenidos en estos medios se muestran en las **Figuras 4.31.a** y **4.31.b**.

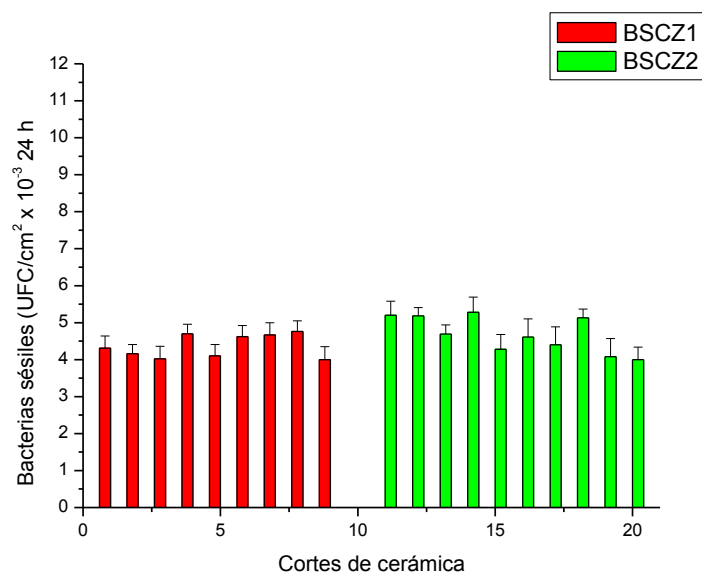


Figura 4.31.a- Valores medios y error estándar de las UFC/cm² de las bacterias sésiles (BS) encontradas sobre los cortes de cerámica (C) próximos al desagüe de las salivaderas dentales de los consultorios de Z1 (rojo) y Z2 (verde), con 24 h de exposición.

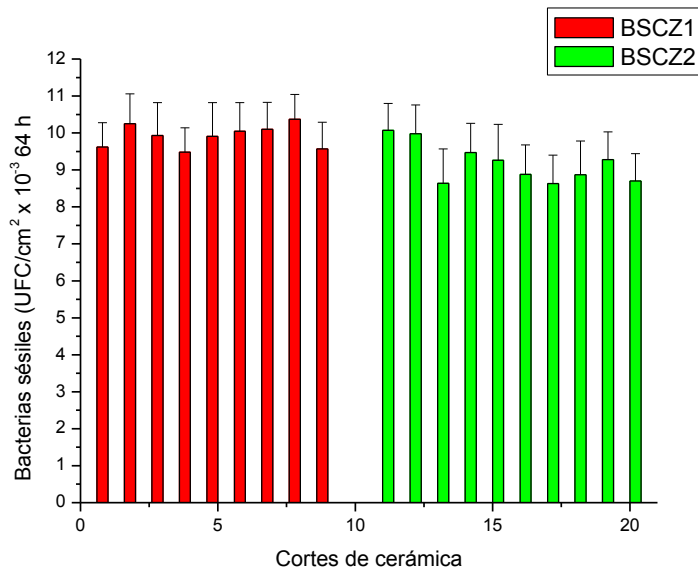


Figura 4.31.b-Valores medios y error estándar de las UFC/cm² de las bacterias sésiles (BS) encontradas sobre los cortes de cerámica (C) próximos al desagüe, de las salivaderas dentales de los consultorios de Z1 (rojo) y Z2 (verde), con 64 h de exposición.

Como se observa en las **Figuras 4.31.a** (24 h) y **4.31.b** (64 h) los valores medios de las UFC/cm² de las bacterias sésiles observadas sobre los cortes de cerámica próximos al desagüe de las salivaderas dentales correspondientes a Z1 son similares a Z2.

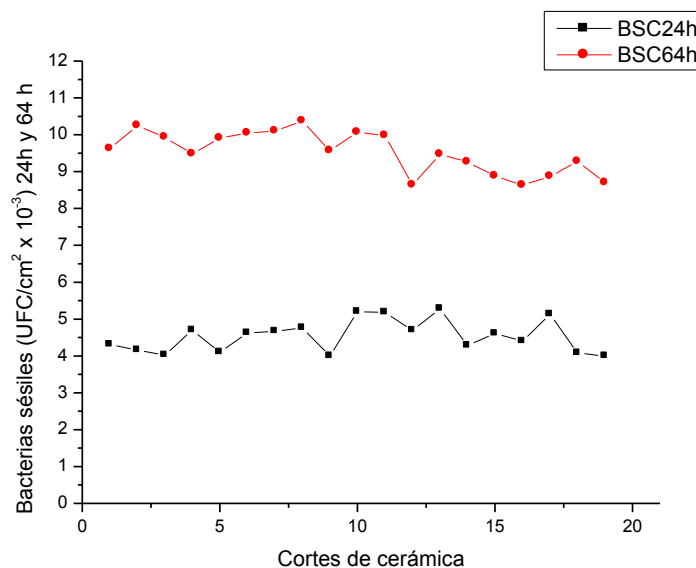


Figura 4.31-c Análisis comparativo de los valores medios de las UFC/cm² de las bacterias sésiles (BS) encontradas en los cortes próximos al desagüe de las salivaderas dentales de cerámica (C), colocados en los consultorios de Z1 y Z2, con un período de 24 y 64 h de exposición. (Negro: 24 h, rojo: 64 h)

El análisis comparativo (**Figura 4.31.c**) de los valores registrados de ambas regiones (Z1) y (Z2) presenta un aumento en las bacterias sésiles (BS) con el tiempo de exposición, detectándose un importante incremento de colonias de cocos Gram positivos.

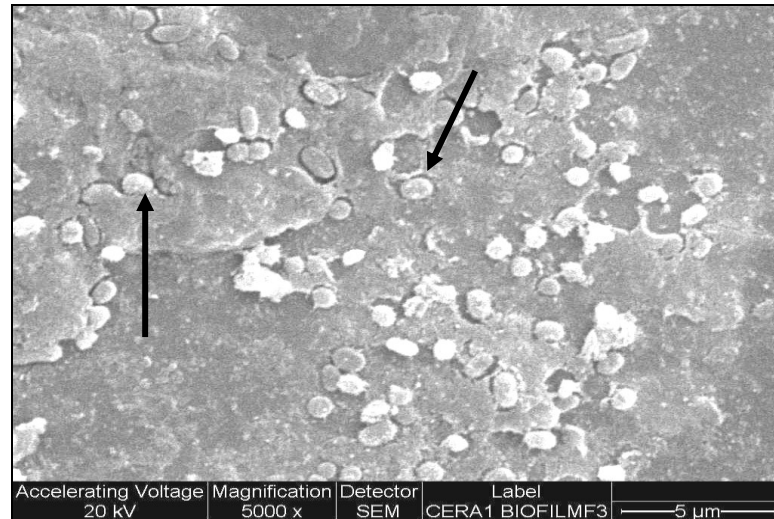


Figura 4.32- Microfotografía obtenida a través de MEB de las bacterias sésiles del biofilm adherido a un corte de cerámica colocado próximo al desagüe de una salivadera del mismo material, en un consultorio de Z1 de la ciudad de la Plata, con un período de exposición de 24 h. Las flechas negras indican bacterias sésiles sumergidas en material polimérico extracelular. Barra: 5 µm.

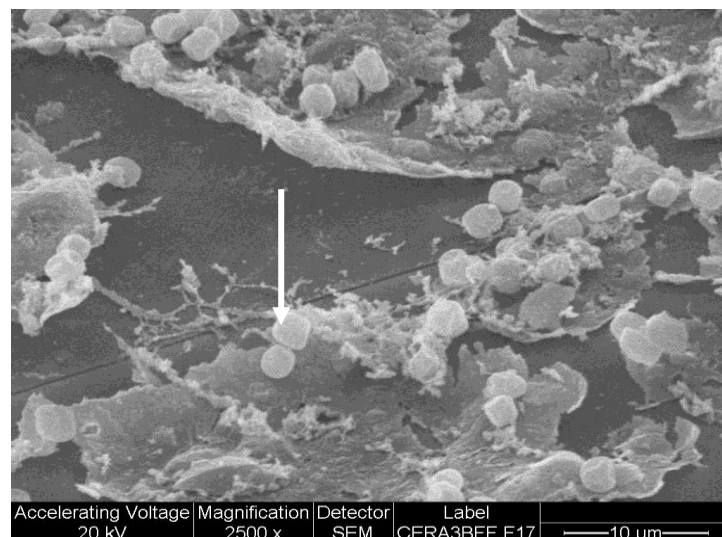


Figura 4.33- Microfotografía obtenida a través de MEB de las bacterias sésiles del biofilm adherido a un corte de cerámica colocado sobre de la pared interna próxima al desagüe de una salivadera del mismo material, colocado en un consultorio de Z2 de la ciudad de La Plata, con un período de exposición de 24 h. La flecha blanca señala bacterias sésiles inmersas en una matriz de material polimérico extracelulares. Barra: 10 µm.

Las **Figuras 4.32** y **4.33** corresponden a muestras expuestas 24 horas sobre cortes de cerámica. Se observa un importante número de bacterias cocoideas sumergidas en material polimérico extracelular. Luego de 64 horas de exposición (**Figura 4.34**) se pudieron distinguir bacterias filamentosas probablemente del tipo Actinomyces, posiblemente proveniente de la saliva de los pacientes. La escasa presencia de cocos en el agua de ingreso demuestra la influencia que ejerce la saliva de los pacientes en la contaminación bacteriana de las salivaderas.

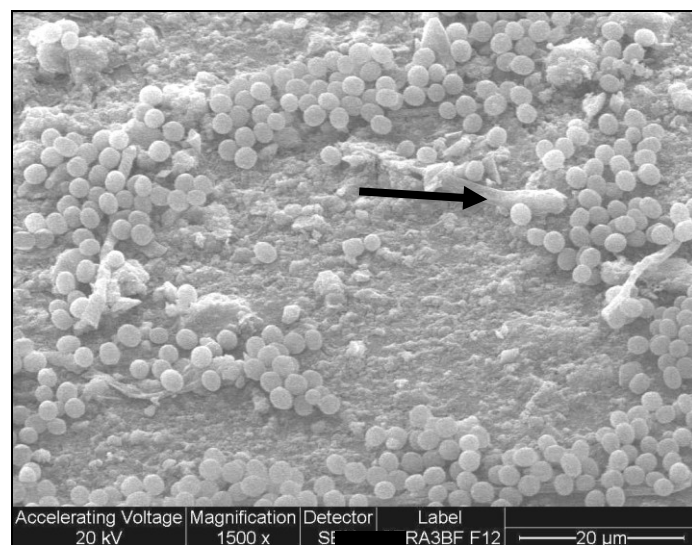


Figura 4.34- Microfotografía obtenida a través de MEB de las bacterias sésiles del biofilm adherido a un corte de cerámica colocado sobre la pared próxima al desagüe, de una salivadera del mismo material, colocado en un consultorio de Z2 de la ciudad de La Plata, con un período de exposición de 64 horas. La flecha negra continua indica la presencia de bacterias filamentosas. Barra: 20 µm.

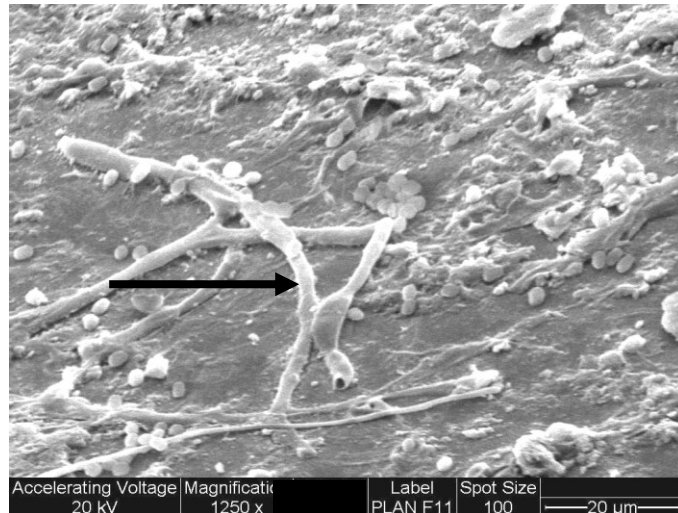


Figura 4.35- Microfotografía obtenida a través de MEB de las bacterias sésiles del biofilm formado sobre un corte de cerámica colocado próximo al desagüe de una salivadera del mismo material, en un consultorio de Z2 de la ciudad de La Plata, con un período de exposición de 64 h. La flecha negra señala la presencia de bacterias sésiles filamentosas asociadas a los cocos adheridos sobre el corte. Barra: 20 μm .

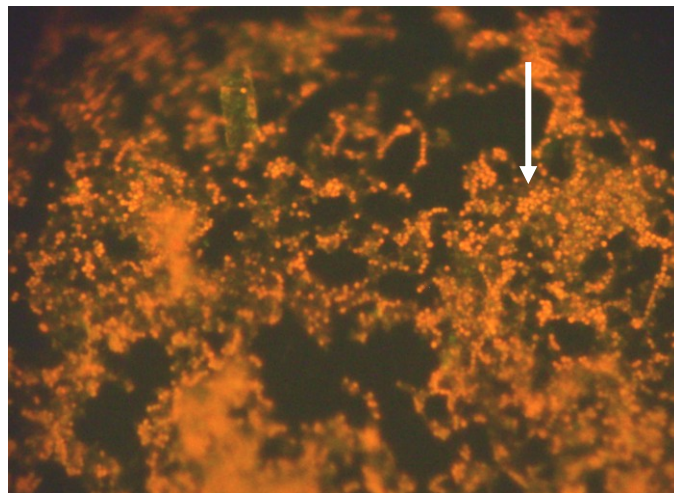


Figura 4.36- Microfotografía obtenida a través de microscopía de epifluorescencia del biofilm formado “in- vitro” sobre un corte de cerámica colocado próximo al desagüe de una salivadera del mismo material perteneciente a un consultorio de Z1 de la ciudad de La Plata, con un período de exposición de 64 h. La flecha blanca señala bacterias adheridas a la superficie del material, teñidas con naranja de acridina. Magnificación: 400 X.

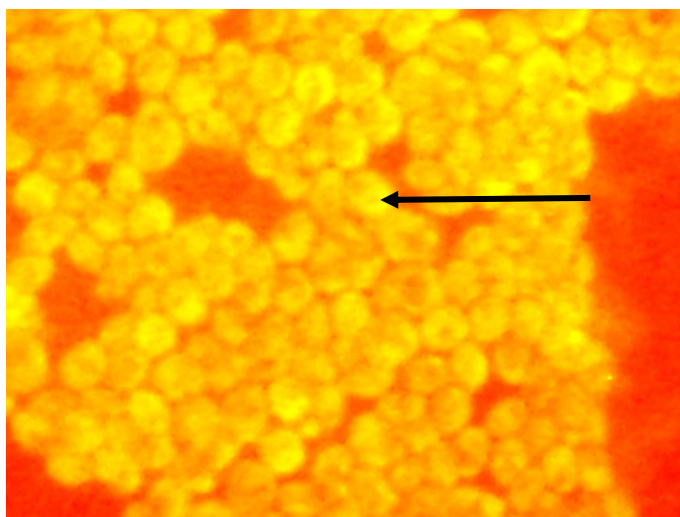


Figura 4.37- Microfotografía obtenida a través de microscopía de epifluorescencia del biofilm formado “in vitro” sobre un corte de cerámica colocado próximo al desagüe de una salivadera del mismo material perteneciente a un consultorio de Z2 de la ciudad de La Plata, con un período de exposición de 64 h. La flecha negra señala bacterias sésiles teñidas con naranja de acridina. Magnificación 1000 X.

La **Figura 4.35** muestra bacterias filamentosas similares a las reportadas por Piovano (1999). Las **Figuras 4.36** y **4.37** muestran mayor número de las bacterias adheridas sobre los cortes de cerámica en relación a los de acero inoxidable. Las mismas fueron observadas a través de microscopio óptico con epifluorescencia, teñidas con naranja de acridina, después de las 64 horas de exposición (un fin de semana) y del cese de agua corriente por el circuito de los equipos odontológicos.

4.3.3.c) Análisis de las UFC/cm² de las bacterias sésiles provenientes de los cortes de opalina de salivaderas dentales con períodos de exposición de 24 y 64 horas.

Se analizaron las UFC/cm² de bacterias sésiles adheridas a 38 cortes en total de salivaderas dentales de opalina con diferentes períodos de exposición (24 h y 64 h). Las bacterias halladas con mayor frecuencia fueron cocos Gram positivos de la especie *Streptococcus salivarius*.

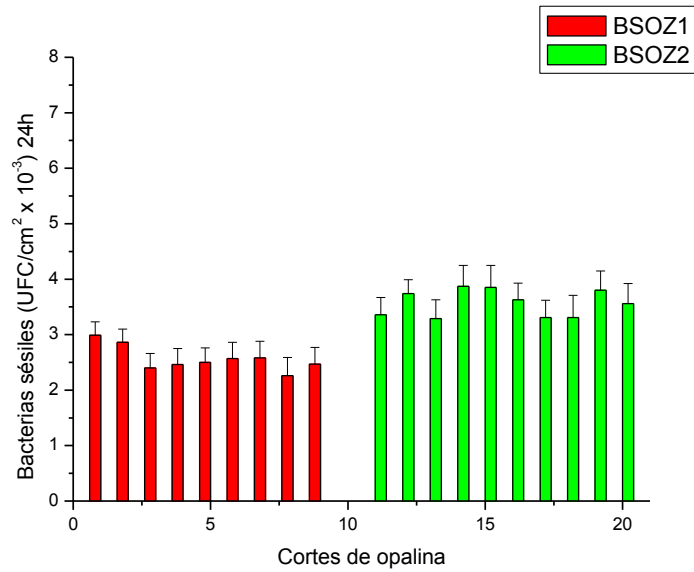


Figura 4.38.a- Valores medios y error estándar de las UFC/cm² de las bacterias sésiles (BS) encontradas sobre los cortes de opalina (O) próximos al desagüe de las salivaderas dentales de los consultorios de Z1 (rojo) y Z2 (verde), con 24 h de exposición.

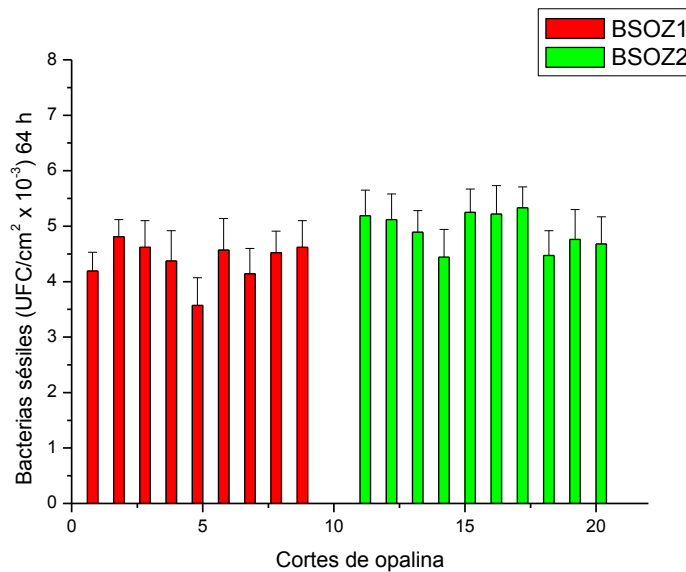


Figura 4.38.b- Valores medios y error estándar de las UFC/cm² de las bacterias sésiles (BS) encontradas sobre los cortes de opalina (O) próximos al desagüe de las salivaderas dentales de los consultorios de Z1 (rojo) y Z2 (verde), con 64 h de exposición.

Tal como muestran las **Figura 4.38.a** y **4.38.b** los valores medios de las UFC/cm² de las bacterias adheridas sobre los cortes de opalina ubicados próximos al desagüe de las

salivaderas, a las 24 y 64 horas de exposición, en ambas regiones (Z1 y Z2) fueron similares.

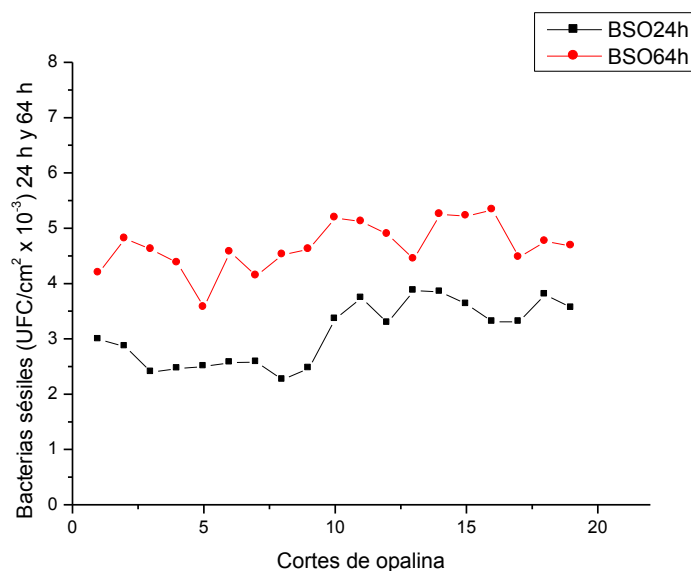


Figura 4.38.c- Análisis comparativo de los valores medios de las UFC/cm² de las bacterias sésiles (BS) encontradas en los cortes cercanos al desagüe de las salivaderas dentales de opalina (O), colocados en los consultorios de Z1 y Z2, con un período de 24 h y 64 h de exposición. (Negro: 24 h, rojo: 64 h)

El análisis comparativo de los valores de las UFC/cm² de las bacterias sésiles obtenidas de ambas regiones (Z1 y Z2) para 24 y 64 horas de exposición (**Figura 4.38.c**) muestra que el número de las bacterias se incrementó con el tiempo.

La **Figura 4.39** muestra en detalle de bacterias adheridas sobre los cortes de opalina de las salivaderas dentales que sobre los de acero inoxidable y cerámica, después de 64 horas de exposición.

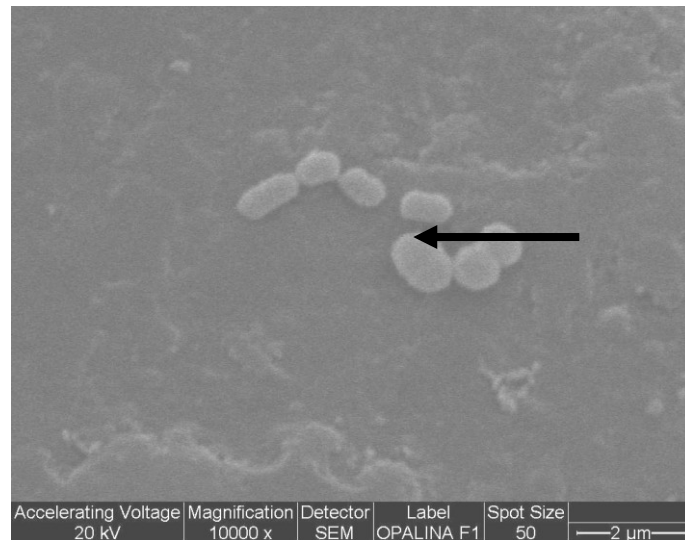


Figura 4.39- Microfotografía obtenida a través de MEB de bacterias sésiles provenientes del biofilm formado sobre un corte de opalina colocado próximo al desagüe de una salivadera de del mismo material, perteneciente a un consultorio odontológico de Z2 de ciudad de La Plata, con un período de exposición de 24 h. La flecha negra muestra bacterias adheridas sobre el material. Barra: 2 µm.

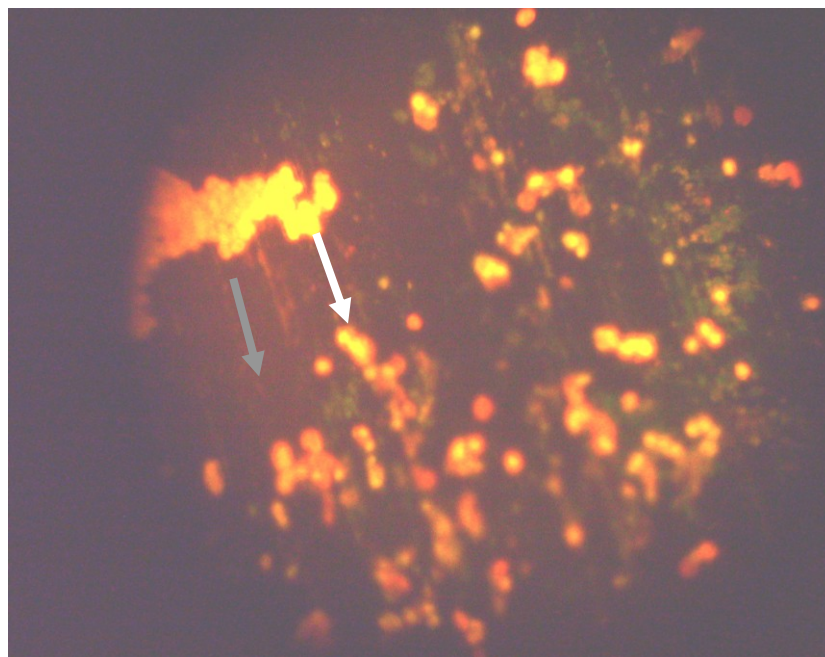


Figura 4.40- Microfotografía óptica por epifluorescencia de un biofilm formado “in vitro” sobre un corte de opalina colocado sobre una salivadera del mismo material perteneciente a un consultorio de Z2 de la ciudad de La Plata, con un período de exposición de 64 h. La flecha blanca señala la presencia de bacterias sésiles (cocos), la flecha gris muestra la dirección de las rayaduras que coincide con la orientación preferencial de algunas bacterias. Magnificación 400 X.

4.3.3.d) Análisis comparativo de los valores medios de las UFC/cm² de las bacterias adheridas sobre los tres materiales.

Se realizó un análisis comparativo de los valores medios de las UFC/cm² de las bacterias sésiles de cortes ubicados próximos al desagüe de las salivaderas de los tres materiales estudiados (acero inoxidable, cerámica y opalina) con 24 y 64 horas de exposición en Z1 y Z2.

Las Figuras 4.41.a y 4.41.b muestran la influencia del material de la salivadera en el número de bacterias adheridas. Los mayores valores de los microorganismos se obtuvieron para la cerámica, seguidos por la opalina y el acero inoxidable. La carga microbiana aumentó considerablemente al incrementar las horas, siendo el cambio mayor en el caso de la cerámica. (Figura 4.38.c).

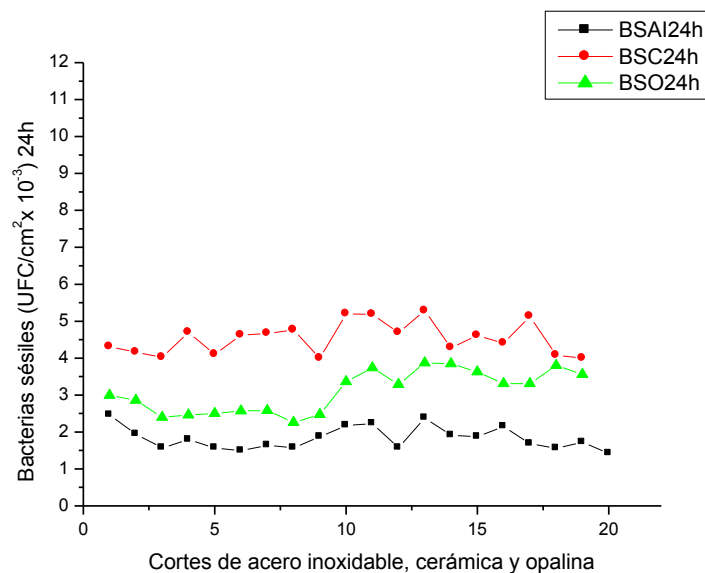


Figura 4.41.a-Análisis comparativo de los valores medios de las UFC/cm² de las bacterias sésiles (BS) encontradas en los cortes próximos al desagüe de las salivaderas de acero inoxidable, cerámica y opalina (AI, C, O) colocados en los consultorios de Z1 y Z2, con un período de exposición de 24 h. (Negro: acero inoxidable, verde opalina, rojo: cerámica).

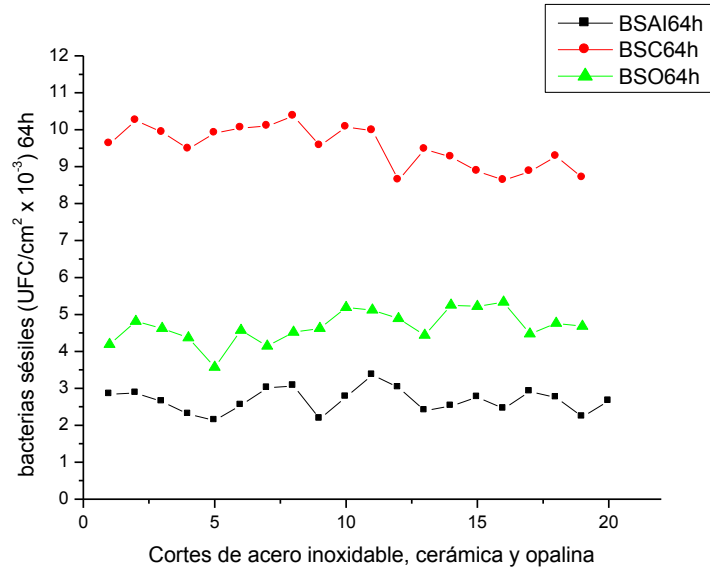


Figura 4.41.b- Análisis comparativo de los valores medios de las UFC/cm² de las bacterias sésiles (BS) encontradas en los cortes cercanos al desagüe de las salivaderas de acero inoxidable, cerámica y opalina (AI, C, O), colocados en los consultorios de Z1 y Z2, con un período de exposición de 64 h. (Negro: acero inoxidable, verde opalina, rojo: cerámica, h: horas de exposición).

4.3.4- Análisis de las UFC/cm² de los hongos sésiles provenientes de los cortes de las salivaderas dentales.

Se analizaron las colonias de los hongos sésiles adheridos sobre un total de 118 cortes próximos al desagüe de las salivaderas dentales de los tres materiales, colocados en los consultorios seleccionados en Z1 y Z2.

4.3.4.a) Análisis de las UFC/cm² de los hongos sésiles provenientes de los cortes de acero inoxidable de las salivaderas dentales con períodos de exposición de 24 y 64 horas.

Se analizaron las UFC/cm² de hongos sésiles adheridos a 40 cortes en total (10 para cada condición) de salivaderas dentales de acero inoxidable con diferentes períodos de exposición (24 y 64 h). Las muestras se obtuvieron a partir del biofilm formado sobre los cortes de las salivaderas por los microorganismos provenientes del agua corriente de egreso hacia las salivaderas dentales y de los pacientes sin enfermedad periodontal

asistidos en los consultorios seleccionados. En los cultivos realizados en Agar Melitado de Saboreaud se observaron colonias de hongos ambientales de color verde y aspecto algodonoso, y grandes colonias blancas de aspecto brillante, similares al género *Cándida*. Los resultados obtenidos son los que se muestran en las **Figuras 4.42.a** y **4.42.b**. Como se observa en las **Figura 4.42.a** y **4.42.b** los valores de las colonias de los hongos sésiles observados en los cortes de acero inoxidable con un período de exposición de 24 horas, son similares en ambas regiones (Z1 y Z2).

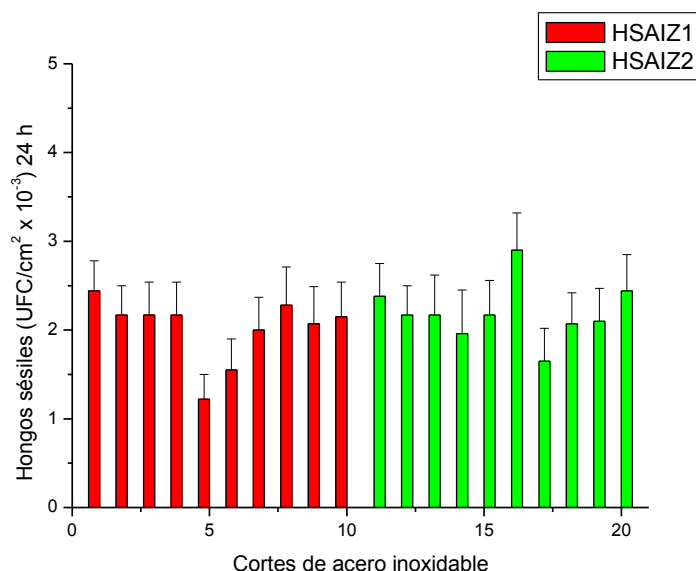


Figura 4.42.a- Valores medios y error estándar de las UFC/cm² de los hongos sésiles (HS) encontrados sobre los cortes de acero inoxidable (AI) próximos al desagüe de las salivaderas dentales de los consultorios de Z1 (rojo) y Z2 (verde), con 24 h de exposición.

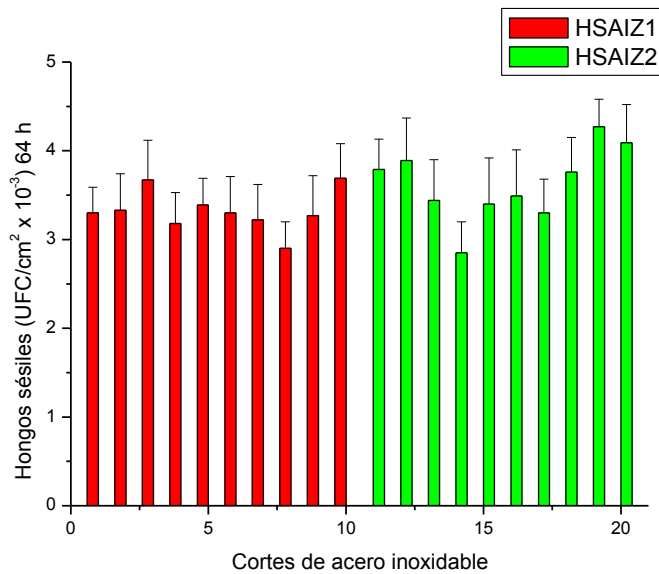


Figura 4.42.b- Valores medios y error estándar de las UFC/cm² de los hongos sésiles (HS) encontrados sobre los cortes de acero inoxidable (AI) próximos al desagüe de las salivaderas dentales de los consultorios de Z1 (rojo) y Z2 (verde), con 64 h de exposición.

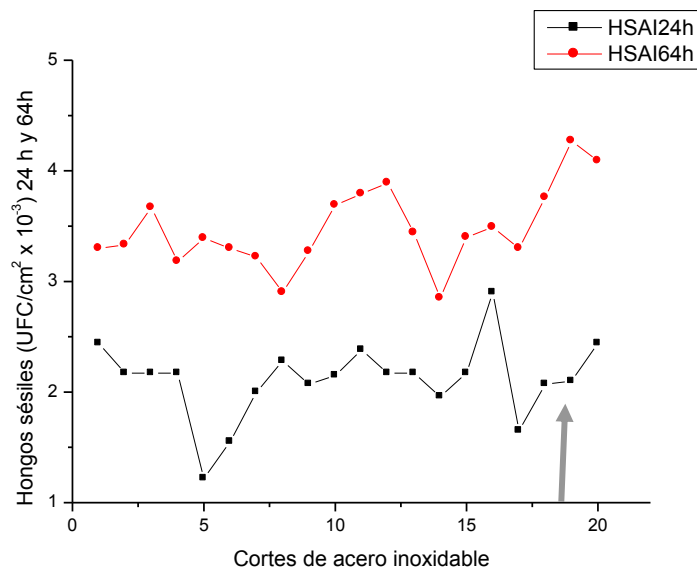


Figura 4.42.c- Análisis comparativo de los valores medios de las UFC/cm² de los hongos sésiles (HS) observados en los cortes próximos al desagüe de las salivaderas dentales de acero inoxidable (AI), colocados en los consultorios de Z1 y Z2, con períodos de 24 h y 64 h de exposición. (Negro: 24 h, rojo: 64 h)

En la **Figura 4.42.c** se observa el análisis comparativo de los valores de las medias de las UFC/cm² de los hongos sésiles adheridos en los cortes próximos al desagüe de las salivaderas de acero inoxidable muestran un incremento en relación al tiempo de exposición de las muestras. La variación es más importante en algunos consultorios como el N° 19 (flecha gris).

4.3.4.b) Análisis de las UFC/cm² de los hongos sésiles provenientes de los cortes de cerámica de las salivaderas dentales con períodos de exposición de 24 y 64 horas.

Se analizaron las UFC/cm² de hongos observados sobre 40 cortes (10 para cada condición) próximos al desagüe de salivaderas de cerámica. En los cultivos realizados en Agar de Saboreaud se observaron colonias de hongos ambientales de color verde y aspecto algodonoso, y grandes colonias blancas de aspecto brillante, similares al género *Candida*. Los resultados obtenidos son los que se muestran en las siguientes **Figuras 4.43.a** y **4.43.b**. Las mismas muestran que los valores de las UFC/cm² de los hongos sésiles encontrados en los cortes de cerámica cercanos al desagüe de las salivaderas dentales de Z1 y Z2 son similares.

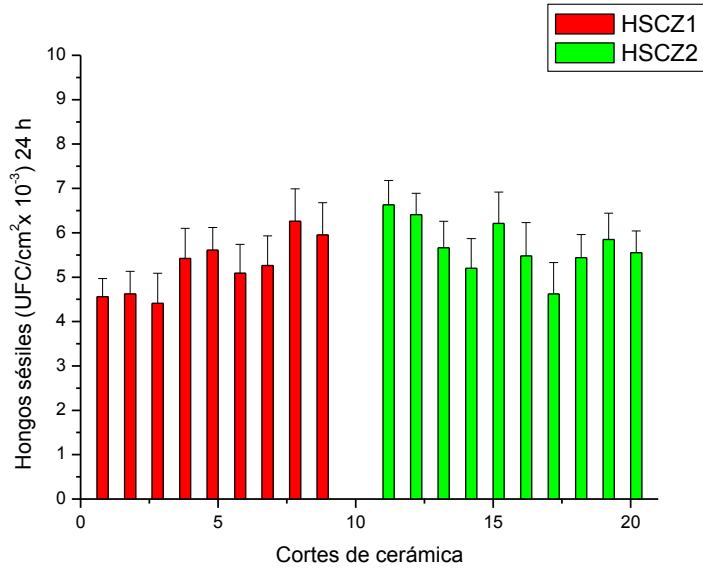


Figura 4.43.a- Valores medios y error estándar de las UFC/cm² de los hongos sésiles (HS) observados sobre los cortes de cerámica (C) cercanos al desagüe de las salivaderas dentales de los consultorios de Z1 (rojo) y Z2 (verde), con 24 h de exposición.

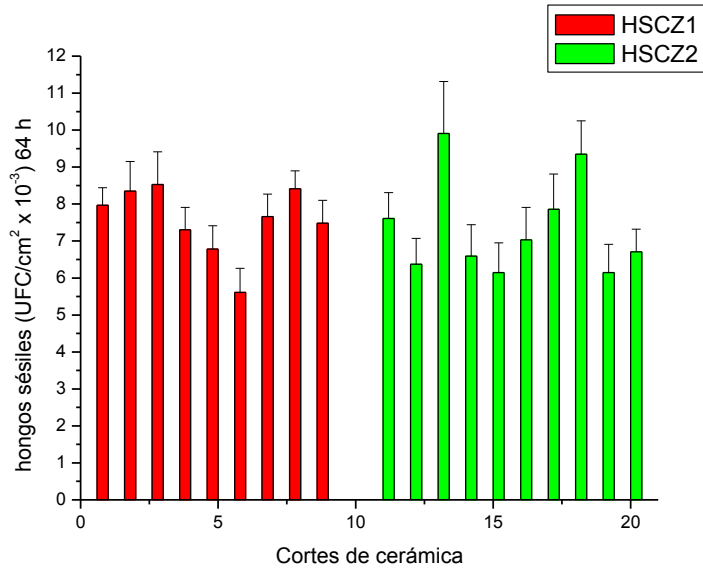


Figura 4.43.b- Valores medios y error estándar de las UFC/cm² de los hongos sésiles (HS) observados sobre los cortes de cerámica (C) cercanos al desagüe de las salivaderas dentales de los consultorios de Z1 (rojo) y Z2 (verde), con 64 h de exposición.

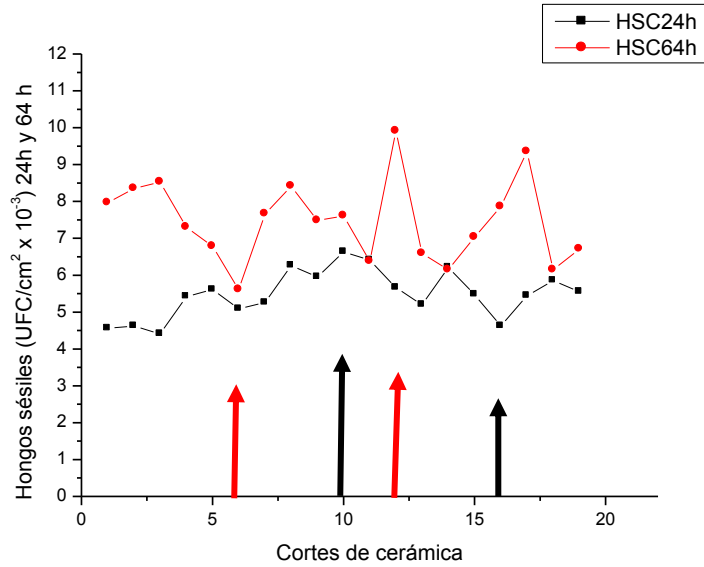


Figura 4.43.c- Análisis comparativo de los valores medios de las UFC/cm² de los hongos sésiles (HS) encontrados en los cortes cercanos al desagüe de las salivaderas dentales de cerámica (C), colocados en los consultorios de Z1 y Z2, con períodos de 24 h y 64 h de exposición. (Negro: 24 h, rojo: 64 h)

En la **Figura 4.43.c** se muestra un incremento de hongos sésiles en relación al tiempo de exposición. La variación es mucho más importante en algunos consultorios comparar N° 10 y 16 (flechas negras) y N° 6 y 12 (flechas rojas).



Figura 4.44- Fotografía de un cultivo en Agar Melitado de Saboreaud de hongos sésiles del género *Cándida* extraídos del biofilm adherido sobre un corte de cerámica, colocado próximo al desagüe de una salivadera dental del mismo material.

En la **Figura 4.44** se observa un cultivo de hongos sésiles, (Agar Melitado de Saboreaud incubado a temperatura ambiente en condiciones de aerobiosis), similares al género *Cándida*. El desarrollo de los mismos sobre los cortes de cerámica podría verse favorecido por la temperatura ambiente, el cese de la circulación de agua y el fluido salival depositado sobre el sustrato durante 64 horas.

4.3.4.c) Análisis de las UFC/cm² de los hongos sésiles provenientes de los cortes de opalina de las salivaderas dentales con períodos de exposición de 24 y 64 horas.

Se analizaron las UFC/cm² de hongos sésiles adheridas a 38 cortes en total de salivaderas dentales de opalina con diferentes períodos de exposición (24 y 64 h). Las muestras se obtuvieron a partir del biofilm formado sobre los cortes de las salivaderas por los microorganismos provenientes del agua corriente de egreso hacia las salivaderas dentales y de los pacientes sin enfermedad periodontal asistidos en los consultorios seleccionados, así como por los microorganismos ambientales. En los cultivos realizados en Agar Melitado de Saboreaud se observaron colonias de hongos ambientales de color verde y aspecto algodonoso, y grandes colonias blancas de aspecto brillante, similares al género *Cándida*. Los resultados obtenidos son los que se muestran en las **Figuras 4.45.a** y **4.45.b**. En la **Figura 4.45.a** se grafica el número de las UFC/cm² de los hongos sésiles encontrados en los cortes de opalina cercanos al desagüe de las salivaderas dentales. Puede notarse que los valores son similares para las regiones Z1 y Z2.

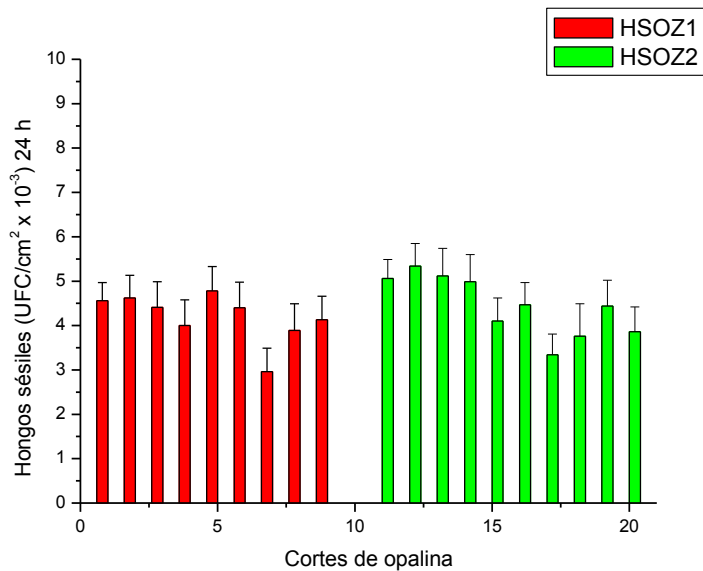


Figura 4.45.a- Valores medios y error estándar de las UFC/cm² de los hongos sésiles observados sobre los cortes de opalina (O) cercanos al desagüe de las salivaderas dentales de los consultorios de Z1 (rojo) y Z2 (verde), con 24 h de exposición.

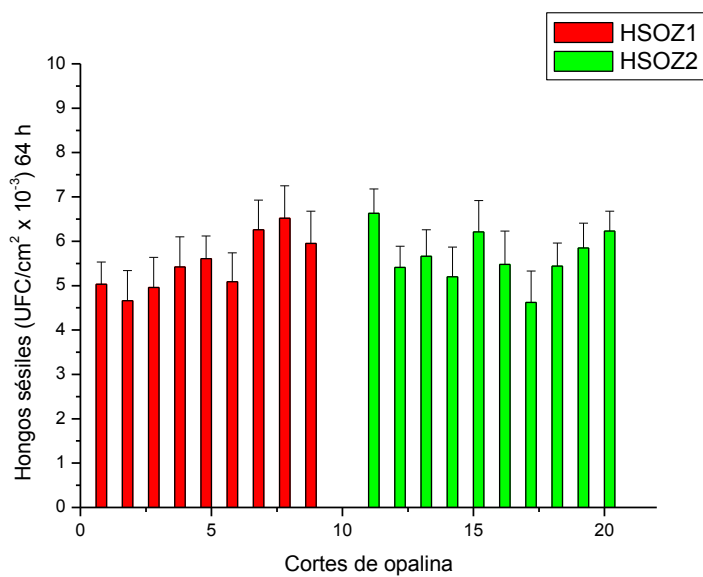


Figura 4.45.b- Valores medios y error estándar de los hongos sésiles (HS) encontrados sobre los cortes de opalina (O) cercanos al desagüe de las salivaderas dentales de los consultorios de Z1 (rojo) y Z2 (verde), con 64 h de exposición.

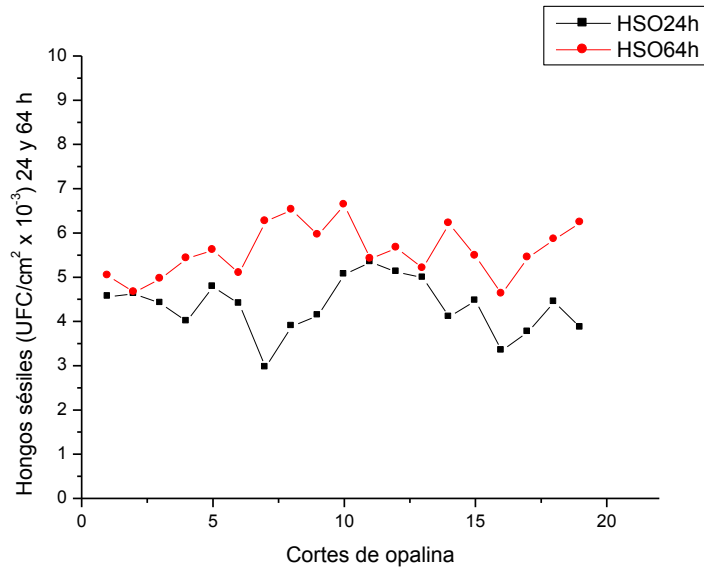


Figura 4.45.c- Comparación de los valores medios de las UFC/cm² de los hongos sésiles (HS) encontrados en los cortes cercanos al desagüe de las salivaderas dentales de opalina (O), colocados en los consultorios de Z1 y Z2, con períodos de 24 h y 64 h de exposición. (Negro: 24 h, rojo: 64 h)

El análisis comparativo (**Figura 4.45.c**) de los valores registrados en las **Figuras 4.45.a** y **4.45.b**, muestra un incremento importante del número de hongos sésiles en relación al tiempo de exposición en algunos consultorios como el N° 7, y en otros se mantiene constante.

4.3.4.d) Análisis comparativo de los valores medios de las UFC/cm² de los hongos adheridos sobre los tres materiales.

Tal como muestran las **Figuras 4.46.a** y **4.46.b**, los valores medios de hongos sésiles en los cortes de las salivaderas de los tres materiales analizados a las 24 y 64 horas, son en orden creciente: acero inoxidable < opalina < cerámica.

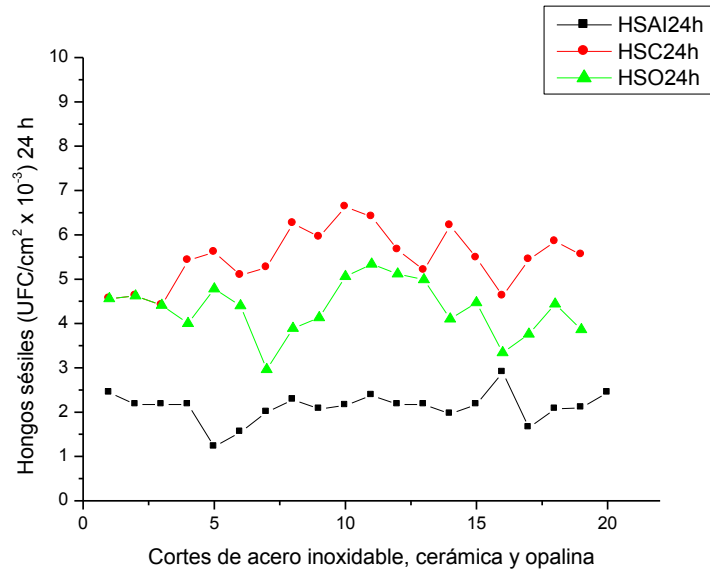


Figura 4.47.a- Comparación de los valores medios de las UFC/cm² de los hongos sésiles (HS) adheridos a los cortes cercanos al desagüe en cortes de todas las salivaderas de acero inoxidable (AI), cerámica (C) y opalina (O) colocados en consultorios de Z1 y Z2, con un período de exposición de 24 h. (Negro: acero inoxidable, verde: opalina, rojo: cerámica).

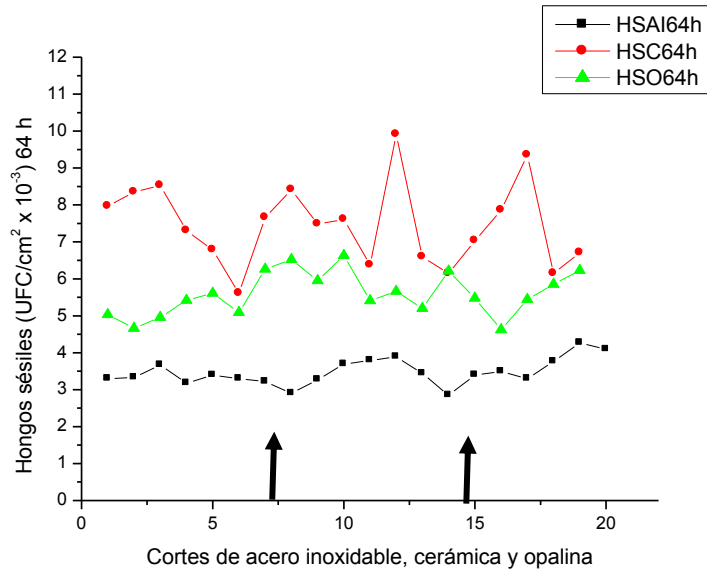


Figura 4.47.b. Análisis comparativo entre los valores medios de las UFC/cm² hongos sésiles (HS) adheridos a los cortes cercanos al desagüe en cortes de todas las salivaderas de acero inoxidable (AI), cerámica (C) y opalina (O) colocados en consultorios de Z1 y Z2, con un período de exposición de 64 h. (Negro: acero inoxidable, verde: opalina, rojo: cerámica).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

5- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

Se realizó el análisis estadístico de los siguientes resultados: UFC/ml de microorganismos planctónicos (bacterias y hongos) provenientes del agua corriente de ingreso hacia los equipos dentales, del agua de egreso con salida hacia las salivaderas y de la saliva de los pacientes sin enfermedad periodontal, asistidos en los consultorios seleccionados en Z1 y Z2. También fueron analizadas estadísticamente las muestras de los microorganismos sésiles (bacterias y hongos) adheridos sobre las cañerías metálicas con salida hacia las salivaderas, y los adheridos sobre los cortes de salivaderas de acero inoxidable, opalina y cerámica seleccionados en Z1 y Z2, en dos períodos de tiempo (24 h y 64 h) después del cese de circulación del agua. Se incluyen también los valores mínimos y máximos de cada situación particular, incluyendo los valores correspondientes a Ra, con el objeto de resaltar las diferencias existentes entre los distintos consultorios.

5.1-Análisis estadístico de la rugosidad superficial de los materiales.

Se realizó el análisis estadístico de los tres materiales estudiados (acero inoxidable, cerámica y opalina) de las salivaderas dentales de ambas regiones (Z1 y Z2) aplicando el test de Student (Prueba t) para los valores de la Ra (altura de la rugosidad superficial) en los bordes externos (B.E.) y paredes internas (P.I.).

5.1.1-Valores mínimos, medios, máximos y Prueba t para la Ra de los cortes de acero inoxidable.

Tabla 5.1- Valores mínimos, medios y máximos de la rugosidad registrados en las muestras del borde externo y de la pared interna próxima al desagüe de las salivaderas de acero inoxidable.

Ubicación	Valor Mn (μm)	Valor M (μm)	Desviación estándar	Valor Mx (μm)	N
Borde externo	0,18	0,19	0,008	0,20	3
Pared interna	0,20	0,22	0,016	0,24	3

N: corresponde al número de cortes. Borde externo: corresponde a los cortes del borde externo de las salivaderas, pared interna: corresponde a los cortes de la pared interna próxima al desagüe de las salivaderas dentales de acero inoxidable. Mn: valor mínimo, M: valor medio, Mx: valor máximo.

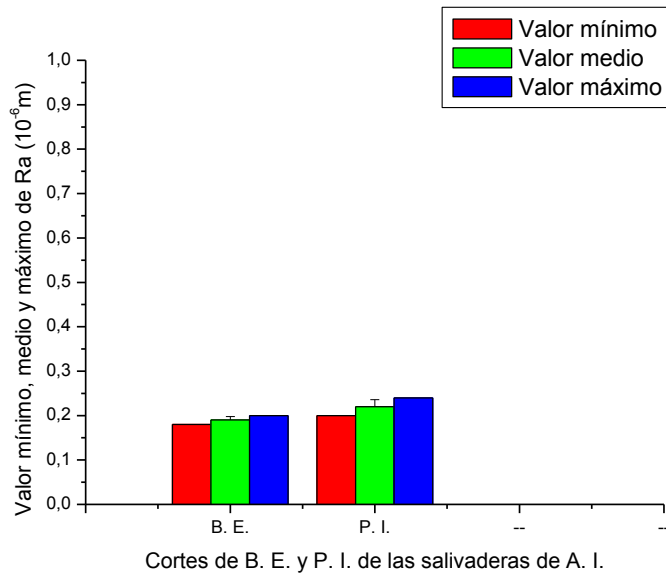


Figura 5.1.- Valores mínimos, medios y máximos de la Ra de los cortes de los bordes externos (B. E.) y de las paredes internas (P. I.) de las salivaderas de acero inoxidable. Color rojo: valor mínimo de la Ra, color verde: valor medio de la Ra, color azul: valor máximo de la Ra ($10^{-6} \text{ m} = 1 \mu\text{m}$).

Como se muestra en la **Figura 5.1** los valores medios de la altura de la rugosidad (Ra) en los cortes de las paredes internas de las salivaderas de acero inoxidable tienen un leve incremento con respecto a los valores de los bordes externos. Sin embargo no se halló una diferencia significativa ($P= 0,08$), considerando diferencia significativa cuando $P < 0,05$. Esto es debido probablemente a la menor influencia de los métodos de limpieza para este material. Los valores mínimos y máximos presentan diferencias ligeramente mayores en las paredes internas que en los bordes externos.

5.1.2-Valores mínimos, medios y máximos y Prueba t para la Ra de los cortes de opalina.

Tabla 5.2- Valores mínimo, medio y máximo de la rugosidad registrados en las muestras del borde externo y de la pared interna de las salivaderas dentales de opalina.

Ubicación	Valor Mn (μm)	Valor M (μm)	Desviación estándar	Valor Mx (μm)	N
Borde externo	0,25	0,29	0,032	0,33	3
Pared interna	0,40	0,43	0,023	0,45	3

N: cantidad de muestras, borde externo: corresponde al borde externo de los cortes de las salivaderas dentales, pared interna: corresponde a la pared interna próxima al desagüe de los cortes de salivaderas. Mn: valor mínimo, M: valor medio, Mx: valor máximo.

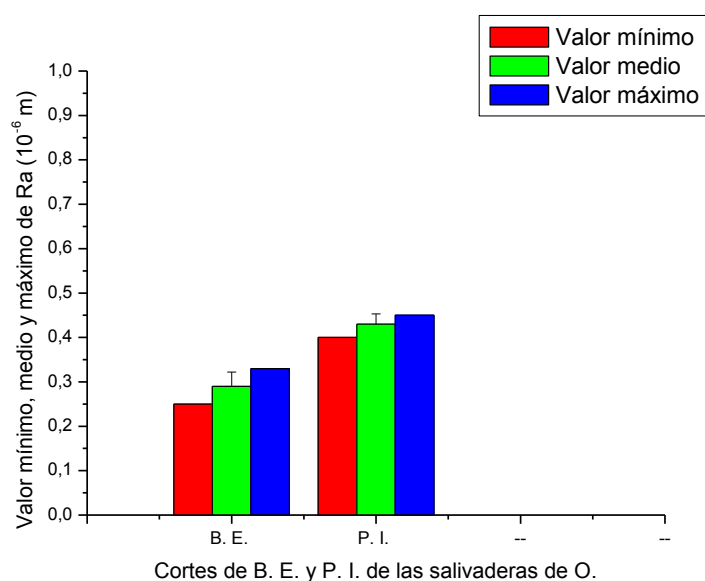


Figura 5.2- Valores mínimos, medios y máximos de la Ra de los cortes de los bordes externos (B.E) y las paredes internas (P.I.) de las salivaderas de opalina.

Color rojo: valor mínimo de la Ra, color verde: valor medio de la Ra, color azul: valor máximo de la Ra ($10^{-6} \text{ m} = 1 \mu\text{m}$).

Con respecto a los valores de la Ra obtenidos de los cortes de las paredes internas de las salivaderas de opalina (**Figura 5.2**) se encontraron mayores en los bordes externos.

Aplicando la prueba t se halló una diferencia significativa de $P=0,007$.

5.1.3- Valores mínimos, medios y máximos y Prueba t para la Ra de los cortes de cerámica.

Tabla 5.3- Valores mínimos, medios y máximos de la rugosidad registrados en las muestras del borde externo y de la pared interna de las salivaderas de cerámica.

Ubicación	Valor Mn (μm)	Valor M (μm)	Desviación estándar	Valor Mx (μm)	N
Borde externo	0,48	0,51	0,023	0,53	3
Pared interna	0,70	0,76	0,057	0,84	3

N: cantidad de muestras, borde externo: corresponde a los cortes de borde externo de las salivaderas, pared interna: corresponde a los cortes de la pared interna próxima al desagüe de las salivaderas. Mn: valor mínimo, M: valor medio, Mx: valor máximo.

Tal como muestra la **Figura 5.3** los valores de la Ra de los bordes externos de las salivaderas de cerámica son muy inferiores a los valores de las paredes internas, existiendo una diferencia estadísticamente significativa de $P=0,007$. Los valores mínimos y máximos de los bordes y las paredes internas presentan diferencias importantes dando cuenta de la influencia de los distintos métodos de limpieza

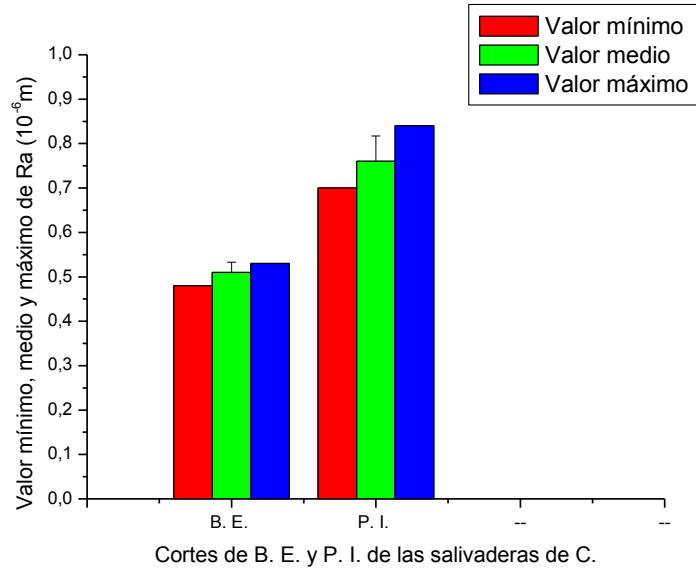


Figura 5.3- Valores mínimos, medios y máximos de la Ra de los cortes de los bordes externos (B.E) y las paredes internas (P.I) de las salivaderas de cerámica. Color rojo: valor mínimo de la Ra, color verde valor medio de la Ra, color azul: valor máximo de la Ra ($10^{-6} \text{ m} = 1 \mu\text{m}$).

5.1.4-Análisis comparativo de los valores medios de la Ra de los cortes de acero inoxidable, cerámica y opalina.

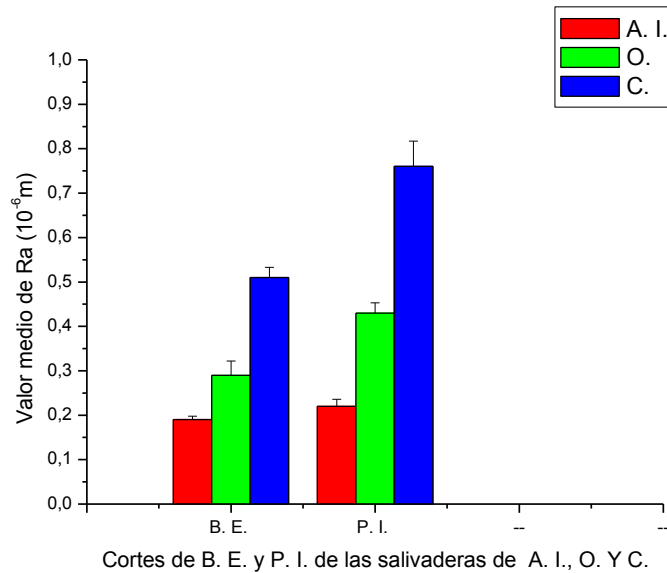


Figura 5.4- Valores medios de la Ra de los cortes de bordes externos (B.E) y paredes internas (P.I) de las salivaderas de acero inoxidable (A. I.), opalina (O) y cerámica (C). Color rojo: valor medio de Ra para el acero inoxidable (AI), color verde: valor medio de Ra para la opalina (O), color azul: valor medio de Ra para cerámica (C). Medida de Ra = 10^{-6} m ($1 \mu\text{m}$).

Haciendo un análisis comparativo de la Ra entre los tres materiales se observó (**Figura 5.4**) que el resultado fue en orden creciente el siguiente: acero inoxidable < opalina < cerámica, tanto en los bordes como en las paredes internas. Por otra parte, la cerámica es la que presenta los mayores valores de rugosidad y la mayor diferencia entre las paredes internas y los bordes externos, por lo que sería la más afectada por los procesos de limpieza. Por el contrario, el acero inoxidable sería el menos afectado.

5.2-Análisis estadístico de los microorganismos planctónicos.

Para el análisis estadístico de los resultados correspondientes a los microorganismos planctónicos presentes en agua de ingreso hacia los equipos odontológicos y de egreso hacia las salivaderas, se aplicó el análisis de Varianza de medidas repetidas en el factor de ubicación de la toma.

5.2.1-Análisis estadístico descriptivo de los valores medios de las UFC/ml de las bacterias planctónicas del agua de ingreso y agua de egreso.

La **Tabla 5.4** muestra el análisis descriptivo de los valores mínimos, medios y máximos de las UFC/ml de bacterias planctónicas encontradas en el agua de ingreso a los equipos y de egreso hacia las salivaderas. Para su mejor comparación en la **Figura 5.5** se muestran los valores medios de todos los consultorios de Z1 y todos los consultorios de Z2, pudiendo notarse que los valores correspondientes al agua de ingreso de ambas zonas son similares, lo mismo que en el agua de egreso. Sin embargo, el gráfico muestra la mayor contaminación en el agua de egreso.

Tabla 5.4- Análisis estadístico descriptivo de los valores mínimos, medios, máximos y desviación estándar de las UFC/ml de las bacterias planctónicas provenientes del agua de ingreso y agua de egreso de los consultorios de Z1 y Z2.

	Zona	Valor Mn UFC/ml	Valor M UFC/ml	Desviación estándar	Valor Mx UFC/ml	N
UFCBPI	Z1	1,00	1,76	0,48	2,87	29
UFCBPI	Z2	1,20	1,90	0,65	2,73	30
UFCBPE	Z1	2,86	4,29	0,64	5,30	29
UFCBPE	Z2	2,86	3,86	0,80	5,29	30

UFCBPI y UFCBPE: unidades formadoras de colonias por ml de bacterias planctónicas del agua de ingreso y del agua de egreso respectivamente, de ambas zonas (Z1 y Z2).

N: número total de muestras analizadas, Mn: valor mínimo, M: valor medio, Mx: valor máximo.

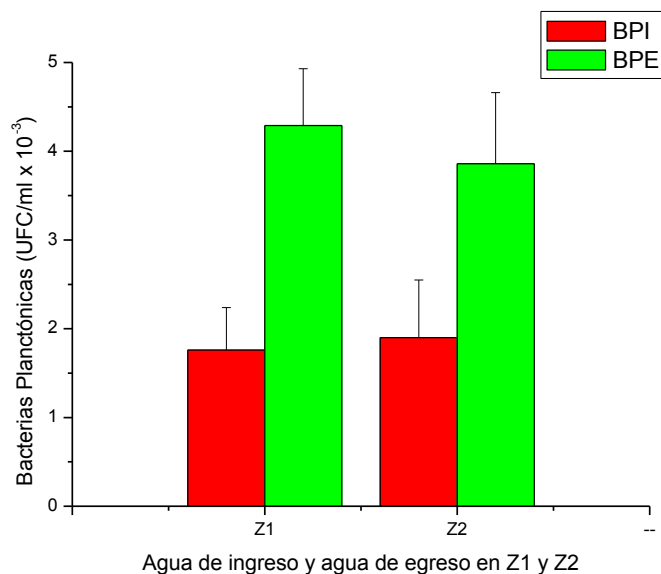


Figura 5.5- Valores medios y error estándar de las UFC/ml de las bacterias planctónicas en el agua de ingreso (UFCBPI) y del agua de egreso (UFCBPE) de todos los consultorios analizados en Z1 y Z2.

Color rojo: valor medio y error estándar de las UFC/ml de las bacterias planctónicas del agua de ingreso (UFCBPI) de Z1 y Z2.

Color verde: valor medio y error estándar de las UFC/ml de las bacterias planctónicas del agua de egreso (UFCBPE) de Z1 y Z2.

Tabla 5.5- Análisis de Variancia de los valores medios de las UFC/ml de las bacterias planctónicas totales de Z1 y Z2 del agua de ingreso y egreso de Z1 y Z 2 teniendo en cuenta el factor de ubicación de la toma (agua de ingreso y egreso)

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F	Significación.
UBIC	146,77	1	146,77	179,24	< 0,01
Error	45,85	56	0,81		

Ubic: agua de ingreso y agua de egreso, F: es el estadístico de significación a partir de su correspondiente distribución y los grados de libertad involucrados. Ubic: ubicación de la toma: agua de ingreso y agua de egreso.

Tabla 5.6- Análisis estadístico de las UFC/ml de bacterias planctónicas totales de acuerdo al factor de agrupamiento (zona Z1 y Z2).

Factor de agrupamiento (zona)					
Fuente	Suma de cuadrados.	Grados de libertad.	Cuadrado Medio.	F	Significación.
ZONA	0,015	1	0,01	,060	0,80
Error	13,586	56	0,24		

F: es el estadístico de significación a partir de su correspondiente distribución y los grados de libertad involucrados. Zona: corresponde a Z1 y Z2.

Al analizar la significación de las diferencias considerando los factores ubicación de la toma y zona (**Tablas 5.5 y 5.6**) se observa que cuando las poblaciones que se comparan con el número de microorganismos planctónicos presentes en el agua de ingreso a los equipos odontológicos y del agua de egreso con salida hacia las salivaderas, se encuentra una diferencia muy significativa ($P < 0,001$) con respecto al factor de la toma de la muestra (agua de ingreso y de egreso). Sin embargo, no se observa diferencia significativa ($P = 0,80$) en relación a las zonas (Z1 y Z2), considerándose significativo cuando $P < 0,05$.

5.2.2-Análisis estadístico descriptivo de los valores mínimos, medios, máximos y desviación estándar de las UFC/ml de los hongos planctónicos del agua de ingreso y agua de egreso.

Con respecto a la presencia de las unidades formadoras de los hongos planctónicos solamente fueron observados en el agua de egreso, presentando valores similares en ambas zonas (**Figura 5.6**), no siendo la diferencia estadísticamente significativa ($P > 0,05$). Por lo

tanto, la contaminación por hongos se produce al atravesar el equipo ya que no están presentes en el agua de ingreso, siendo las diferencias entre la contaminación en el agua de ingreso y egreso significativa ($P < 0,05$).

Tabla 5.7- Análisis estadístico descriptivo de los valores mínimos, medios, máximos y desviación estándar de las UFC/ml de los hongos planctónicos en el agua egreso.

	Zona	Valor Mn UFC/ml	Valor M UFC/ml	Desviación estándar	Valor Mx UFC/ml	N
UFCHPE	Z1	1,78	2,12	0,21	2,54	29
UFCHPE	Z2	1,99	2,18	0,21	2,67	30

N: número de muestras totales analizadas. UFCPE: unidades de colonias de hongos planctónicos enumeradas en el agua de egreso en Z1 y Z2, respectivamente.
Mn: valor mínimo, M: valor medio, Mx: valor máximo.

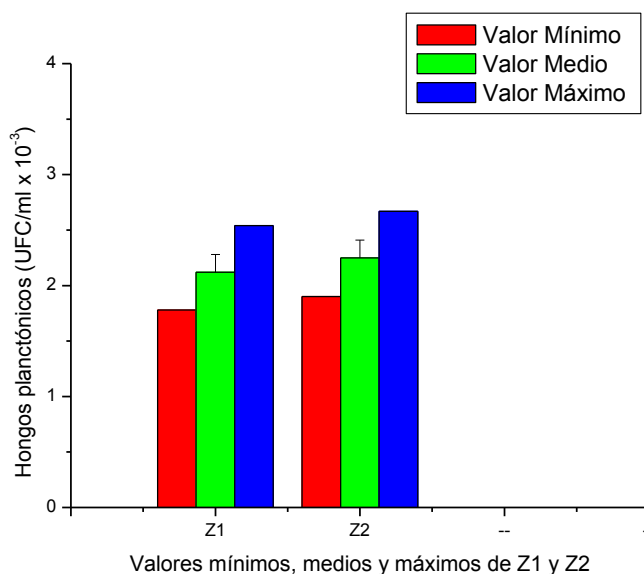


Figura 5.6- Valores mínimos, medios y máximos de las UFC/ml de los hongos planctónicos (HP) en el agua de egreso (E) de salida hacia las salivaderas de Z1 y Z2.

5.2.3- Análisis estadístico descriptivo de las UFC/ml de saliva de los pacientes sin enfermedad periodontal.

Para el estudio de los resultados de las UFC/ml de la saliva de los pacientes sin enfermedad periodontal asistidos en los consultorios de Z1 y Z2 (correspondiendo 25 pacientes a cada región) se utilizó el análisis de Variancia en la zona donde se atendieron los pacientes.

Tabla 5.8- Análisis estadístico descriptivo de los valores mínimos, medios, máximos y desviación estándar de las UFC/ml de las bacterias planctónicas de la saliva de los pacientes sin enfermedad periodontal asistidos en los consultorios de Z1 y Z2 de la ciudad de La Plata.

Zonas	Nº de pacientes	Valor Mn UFC/ml	Valor M UFC/ml	Desviación estándar	Valor Mx UFC/ml
Z1	25	5,35	6,58	0,65	8,24
Z2	25	5,85	6,38	0,38	7,25

Mn: valor mínimo, M: valor medio, Mx: valor máximo.

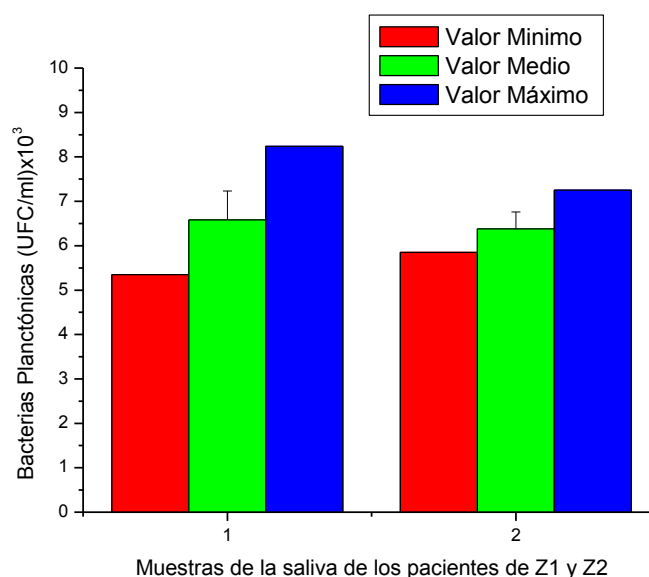


Figura 5.7- Valores mínimos, medios y máximos de las UFC/ml de la saliva de los pacientes sin enfermedad periodontal asistidos en Z1 y Z2.

La **Figura 5.7** indica los valores mínimos, medios y máximos de las UFC/ml de la saliva de los pacientes seleccionados son similares en ambas regiones (Z1 y Z2).

El Análisis de Varianza de los resultados de los valores medios de las UFC/ml de las bacterias observadas en la saliva de los 25 pacientes sin enfermedad periodontal, asistidos en los consultorios de cada zona (Z1 y Z2) de la ciudad de La Plata, no presentó una diferencia estadísticamente significativa respecto a la zona de muestra, siendo $P= 0,20$, considerando que hay significación estadística cuando $P < 0,05$. Sin embargo, pueden observarse importantes diferencias entre los valores mínimos y máximos (**Figura 5.7**) indicando el mayor grado de contaminación de la saliva de algunos pacientes.

5.3- Análisis estadístico de los microorganismos sésiles.

Este análisis comprende los microorganismos adheridos a las cañerías y a los cortes de las salivaderas ubicadas en la zona próxima al desagüe, tanto para bacterias como para hongos.

5.3.1.- Análisis de Variancia de las UFC de los microorganismos sésiles enumerados en el interior de las cañerías metálicas con salida hacia las salivaderas dentales.

Para el análisis de Variancia de las UFC de (bacterias y hongos) adheridos al interior de las cañerías metálicas con salida hacia las salivaderas dentales, luego de 24 horas de exposición y del cese de circulación del agua, se utilizó la prueba de Variancia de medidas repetidas.

5.3.1.a) Análisis estadístico de las bacterias sésiles.

La **Figura 5.8** muestra que los valores de UFC/cm² de las bacterias sésiles enumeradas en las muestras obtenidas del interior de las cañerías metálicas con salida hacia las salivaderas son similares para Z1 y Z2. Se observan importantes diferencias entre los valores mínimos y máximos de las bacterias adheridas a dichas cañerías.

Tabla 5.9- Análisis estadístico descriptivo de los valores mínimos, medios, máximos y desviación estándar de las UFC de las bacterias sésiles en cañerías metálicas de Z1 y Z2.

	Zona	Valor Mn UFC	Valor M UFC	Desviación estándar	Valor Mx UFC	N
UFCBC24	Z1	2,31	2,89	0,42	3,85	28
UFCBC24	Z2	2,62	3,25	0,49	4,03	30

N: número de muestras totales analizadas. UFCBC24: unidades formadoras de colonias en un área de 0,4cm² de las bacterias sésiles, luego de 24 h del cese de circulación del agua, de Z1 y Z2 respectivamente.

Mn: valor mínimo, M: valor medio, Mx: valor máximo.

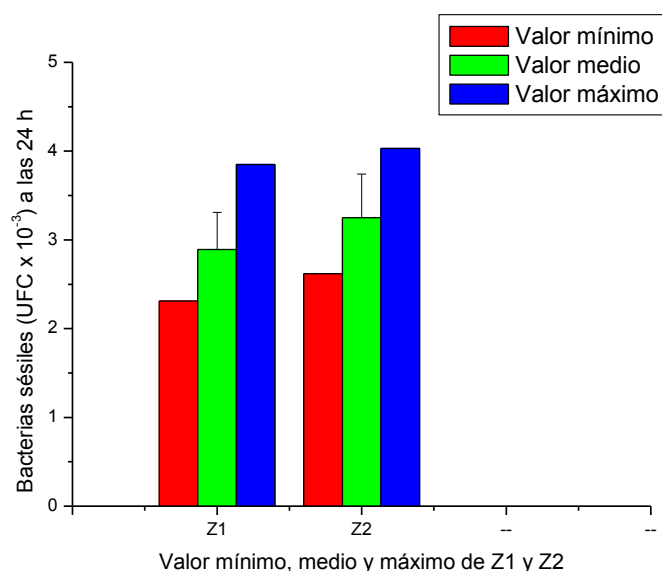


Figura 5.8- Valores mínimos, medios y máximos de las UFC de las bacterias sésiles provenientes del interior de las cañerías metálicas de los consultorios de Z1 y Z2. Las UFC corresponden a un área de raspado de la superficie de 0,4 cm².

Tal como muestra la **Tabla 5.9** los valores medios de las UFC de las bacterias sésiles adheridas a las paredes internas de las cañerías metálicas mostraron resultados similares en ambas zonas (Z1 y Z2) sin diferencias significativas ($P > 0,05$), aunque las dos regiones reciban agua de diferentes fuentes. En la **Figura 5.8** puede notarse una importante diferencia en los valores observados para distintos consultorios.

5.3.1.b) Análisis estadístico de los hongos sésiles.

Se utilizó el análisis de Variancia con medidas repetidas con respecto al factor de zona. La

Figura 5.9 muestra que los valores máximos y mínimos de hongos sésiles presentan diferencias apreciables, dando cuenta la posible influencia de la contaminación ambiental de cada consultorio sobre el número de hongos adheridos, ausentes en el agua de ingreso.

El análisis de Variancia de los hongos sésiles adheridos al interior de cañerías metálicas con salida hacia las salivaderas de las zonas Z1 y Z2 no mostró diferencias significativas ($P > 0,05$).

Tabla 5.10- Análisis estadístico descriptivo de Variancia de los valores mínimos, medios, desviación estándar y máximos de los hongos sésiles enumerados en el interior de las cañerías metálicas con salida hacia las salivaderas de Z1 y Z2, 24 horas después del cese de circulación del agua corriente.

	Zona	Valor Mn UFC	Valor M UFC	Desviación estándar	Valor Mx UFC	N
UFCHC24	Z1	4,05	7,29	0,64	10,4	28
UFCHC24	Z2	4,55	6,77	0,57	10,02	30

N: número de muestras totales analizadas. UFCHC24: unidades formadoras de colonias en un área de $0,4 \text{ cm}^2$ de los hongos sésiles, 24 horas después del cese del agua corriente.
Mn: valor mínimo, M: valor medio, Mx: valor máximo.

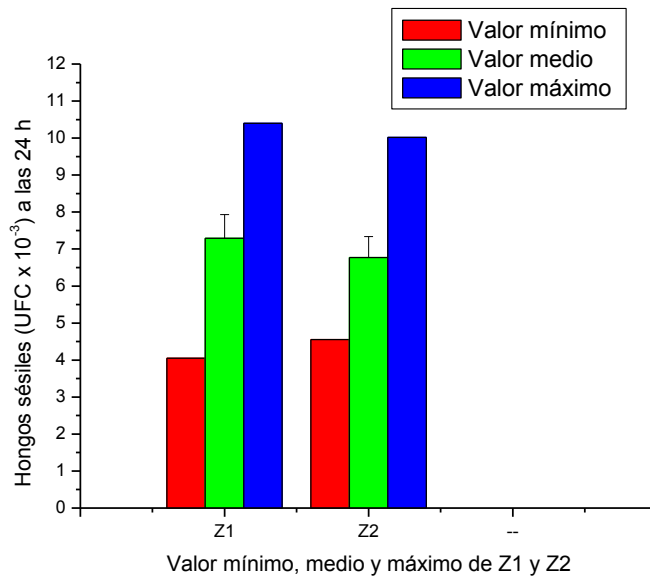


Figura 5.9- Valores mínimos, medios y máximos de las UFC de los hongos sésiles provenientes del interior de las cañerías metálicas de los consultorios de Z1 y Z2. Las UFC corresponden a un área de raspado de superficie de 0,4 cm².

5.3.2- Análisis de Variancia de los microorganismos sésiles adheridos sobre los cortes de acero inoxidable, cerámica y opalina de las salivaderas dentales, luego de 24 y 64 horas de exposición.

Para el análisis estadístico de los resultados de las medias de las UFC/cm² de los microorganismos sésiles (bacterias y hongos) y tomadas entre higienes sucesivas, observadas sobre los cortes de acero inoxidable, cerámica y opalina se utilizó el análisis de Variancia de medidas repetidas en el factor de ubicación de la toma (Z1 y Z2) y factores de comprobación tiempo (24 h y 64 h) y material de las salivaderas (acero inoxidable, cerámica y opalina).

5.3.2.a) Análisis estadístico de las bacterias sésiles.

Para el análisis estadístico de las UFC/cm² de las bacterias sésiles observadas sobre los cortes de los tres materiales (acero inoxidable, cerámica y opalina) luego de 24 y 64 horas de exposición, se utilizó la prueba de Variancia de medidas repetidas en relación al factor tiempo, y material de la salivadera.

5.3.2.a.i) Análisis cualitativo de valores mínimos, medios y máximos (bacterias adheridas a los cortes).

En la **Tabla 5.11** se realiza la comparación de los valores medios de las UFC/cm² de bacterias adheridas a los tres materiales. Puede observarse que en todos los casos los valores más altos corresponden a los cortes de cerámica y los más bajos a los de acero inoxidable. También puede notarse que en algunos casos las diferencias entre los valores máximos y mínimos son importantes indicando que en ciertos consultorios la contaminación es más significativa que en otros. Estas diferencias pueden estar asociadas a la distinta frecuencia y métodos de higiene.

En la **Tabla 5.12** se muestran los valores medios y se comparan los valores medios obtenidos para cada material, para cada zona y para cada tiempo.

Los valores correspondientes a las exposiciones de 64 h revelaron que existe un considerable aumento en los valores medios al incrementar el tiempo de exposición. La significación de las diferencias debidas a los factores tiempo, zona y material de salivadera se analiza en las **Tablas 5.13-14**.

En la **Tabla 5.13** se agrupan los valores medios y desviaciones estándares de las UFC/cm² de las bacterias sésiles obtenidos para los distintos materiales, y asimismo se reportan los valores medios calculados para todas las salivaderas de Z1, de Z2 y del total de salivaderas de Z1 + Z2, tanto para 24 como para 64 h de exposición, con fines comparativos.

Tabla 5.11- Análisis estadístico descriptivo de los valores mínimos, medios, máximos y desviación estándar de las UFC/cm² de las bacterias adheridas a los cortes de acero inoxidable, cerámica y opalina, luego de 24 horas de exposición en consultorios de Z1 y Z2.

Material de la salivadera	Zona y tiempo	Valor Mn UFC/cm ²	Valor M UFC/cm ²	Desviación estándar	Valor Mx UFC/cm ²	N
Acero In.	Z1	1,49	1,80	0,59	2,46	10
Acero In.	Z2	1,42	2,00	0,59	2,38	10
Cerámica	Z1	4,00	4,37	0,31	4,76	10
Cerámica	Z2	4,00	4,53	0,84	5,28	10
Opalina	Z1	2,26	2,72	0,64	2,99	9
Opalina	Z2	3,29	3,77	0,62	3,87	10

N: número de muestras totales analizadas en cada zona (Z1 y Z2), de cada material. Acero In.: acero inoxidable.

Mn: valor mínimo de UFC/cm², M: valor medio de UFC/cm², Mx: valor máximo de UFC/cm².

Tabla 5.12- Análisis estadístico descriptivo de los valores mínimos, medios, máximos y desviación estándar de las UFC/cm² de las bacterias adheridas a los cortes de acero inoxidable, cerámica y opalina, luego de 64 horas de exposición en consultorios de Z1 y Z2.

Material de las salivaderas	Zona y tiempo	Valor Mn UFC/cm ²	Valor M UFC/cm ²	Desviación estándar	Valor Mx UFC/cm ²	N
Acero In.	Z1	2,13	2,68	0,34	3,07	10
Acero In.	Z2	2,23	2,89	0,69	3,36	10
Cerámica	Z1	9,48	9,93	0,31	10,37	10
Cerámica	Z2	8,63	9,17	0,50	10,07	10
Opalina	Z1	3,57	4,17	0,49	4,81	9
Opalina	Z2	4,44	4,93	0,31	5,33	10

N: número de muestras analizadas de cada material. Acero In.: acero inoxidable.

Mn: valor mínimo de UFC/cm², M: valor medio de UFC/cm², Mx: valor máximo de UFC/cm².

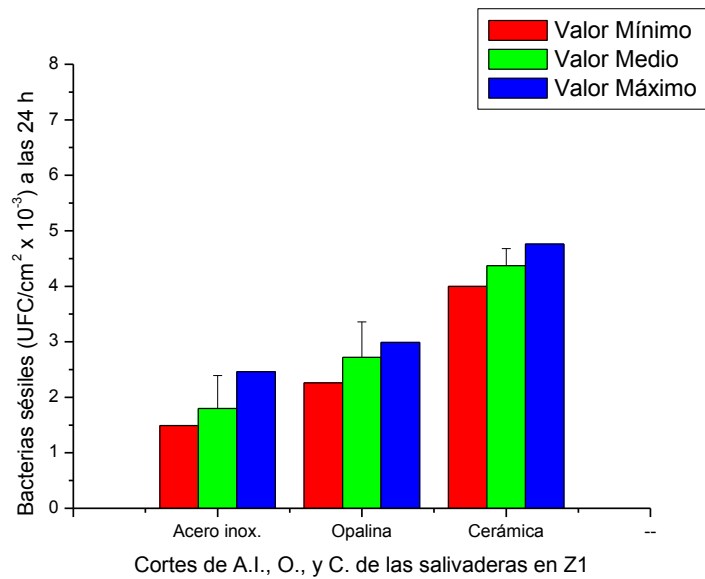


Figura 5.10- Valores mínimo, medio y máximo de las UFC/cm² de las bacterias adheridas sobre los cortes de acero inoxidable, opalina y cerámica de las salivaderas de Z1, con un período de exposición de 24 h. Acero Inox. y A.I: acero inoxidable, O: opalina, C: cerámica.

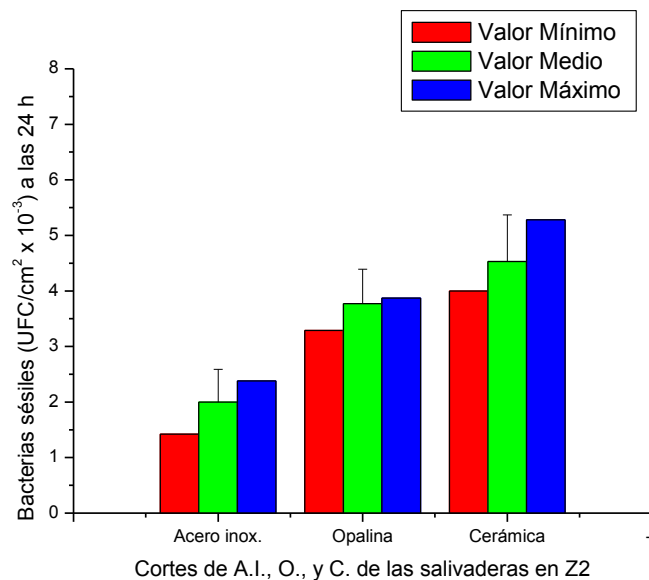


Figura 5.11- Valor mínimo, medio y máximo de las UFC/cm² de las bacterias adheridas sobre los cortes de acero inoxidable, opalina y cerámica de las salivaderas de Z2 con un período de exposición de 24 h. Acero Inox. y A.I: acero inoxidable, O: opalina, C: cerámica.

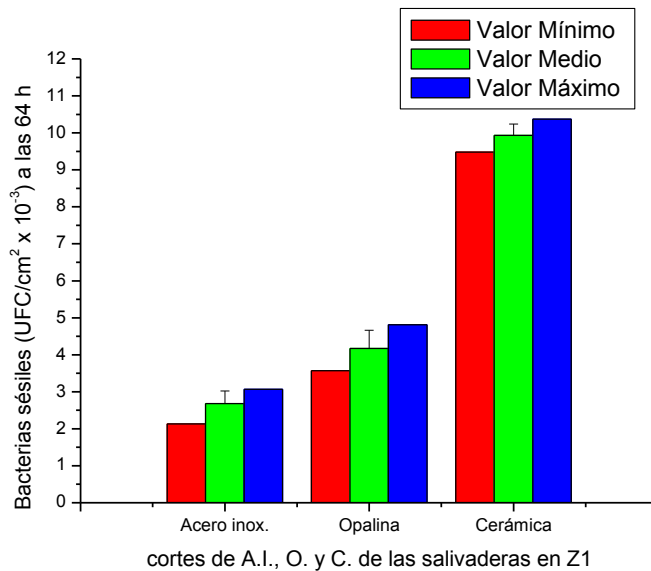


Figura 5.12- Valor mínimo, medio y máximo de las UFC/cm² de las bacterias adheridas sobre los cortes de acero inoxidable, opalina y cerámica de las salivaderas de Z1 con un período de exposición de 64 h.
Acero Inox. y A.I: acero inoxidable, O: opalina, C: cerámica.

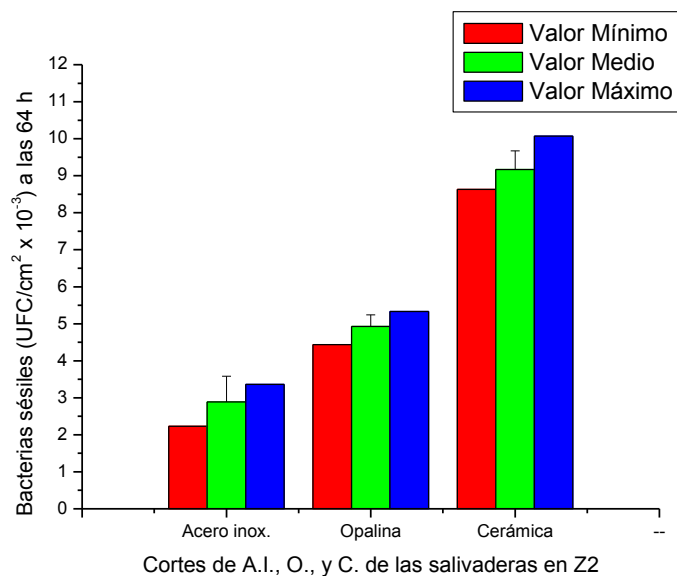


Figura 5.13- Valor Mínimo, Medio y Máximo de las UFC/cm² de las bacterias adheridas sobre los cortes de acero inoxidable, opalina y cerámica de las salivaderas de Z2 con un período de exposición de 64 h.
Acero Inox. y A.I: acero inoxidable, O: opalina, C: cerámica.

Tabla 5.13- Análisis estadístico descriptivo de Variancia de los valores medios de las UFC/cm² de las bacterias sésiles del biofilm formado sobre los cortes de acero inoxidable, cerámica y opalina de las salivaderas dentales de Z1 y Z2, con un período de exposición de 24 h y 64 h.

Estadística descriptiva					
	ZONA	Material de las salivaderas	Media	Desviación Estándar.	N
UFCBS24	Z1	Cerámica	4,37	0,31	10
		Opalina	2,72	0,64	9
		Acero	1,80	0,59	10
	Tot. Z1		2,96	0,51	29
	Z2	Cerámica	4,53	0,84	10
		Opalina	3,77	0,62	10
		Acero	2,00	0,59	10
	Tot. Z2		3,43	0,68	30
	Tot Z1 + Z2 24 h		3,19	0,59	59
	UFCBS64	Z1	Cerámica	9,93	0,31
Opalina			4,17	0,49	9
Acero			2,68	0,34	10
Tot. Z1			5,59	0,38	29
Z2		Cerámica	9,17	0,50	10
		Opalina	4,93	0,31	10
		Acero	2,89	0,69	10
Tot. Z2			5,66	0,50	30
Tot. Z1 + Z2 64 h			5,62	0,44	59

N: número de los cortes totales analizados de cada material; UFCBS 24: UFC/cm² de las bacterias sésiles en las salivaderas, 24 horas después de la higiene de los equipos dentales; UFCBS 64: UFC/cm² de las bacterias sésiles en las salivaderas, 64 horas después de la higiene de los equipos dentales.

5.3.2.a.ii) *Análisis de Variancia (bacterias adheridas a los cortes).*

El análisis de variancia de las UFC/cm² de las bacterias adheridas a todos los cortes considerando el factor zona (Z1 y Z2) no mostró una diferencia significativa (**Tabla 5.13**).

Sin embargo, se observó una diferencia estadísticamente significativa al examinar el factor tiempo, siendo $P < 0,01$. Por lo tanto, el conjunto de las muestras analizadas luego de una exposición de 24 horas (**Figuras 5.10 y 5.11**) mostró valores significativamente menores próximo a la mitad que los de las muestras tomadas a las 64 horas (**Figuras 5.12 y 5.11**).

El tipo de salivadera, también representó un factor con diferencia muy significativa ($P < 0,01$) (**Tabla 5.13 y 5.14**), mostrando (**Figuras 5.10 a 5.13**) que el número de bacterias adheridas crece en el orden: acero inoxidable < opalina < cerámica.

En el análisis de variancia de las UFC/cm² de las bacterias sésiles con factor comprobación ubicación (cañerías o salivaderas) también reveló que la diferencia era estadísticamente significativa. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la comparación sólo es cualitativa, debido a que en el caso de las cañerías es imposible tomar muestras a partir de un sustrato estéril como se realizó en el caso de las salivaderas.

Tabla 5.14- Análisis estadístico de las UFC/cm² de las bacterias sésiles de acuerdo al factor de agrupamiento: zona (Z1 y Z2) y de comprobación: material de las salivaderas (acero inoxidable, cerámica y opalina) y tiempo (24 h 64 h).

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Significación.
Zona	0,04	1	0,04	0,04	0,83
Material de las salivaderas	208,19	2	104,10	110,08	< 0,01
Error (Material salivadera)	50,11	53	0,94		
Tiempo	257,65	1	257,65	605,95	< 0,01
Error (Tiempo)	22,57	53	0,42		
Ubicación	88,84	1	88,84	127,53	< 0,01
Error (ubicación)	36,91	53	0,69		

Zona: región a la que corresponden los consultorios analizados (Z1 o Z2). Material de las salivaderas (acero inoxidable, cerámica y opalina). Tiempo: tiempo de exposición de las muestras y de cese de circulación del agua corriente (24h y 64 h). Ubicación: ubicación de la muestra (cañerías, salivaderas), gl: grados de libertad, F: estadístico de significación a partir de su correspondiente distribución y los grados de libertad involucrados.

5.3.2.a.iii) Análisis estadístico multifactorial (bacterias adheridas a los cortes).

Cuando se realizó el análisis estadístico multifactorial considerando la combinación de los factores con diferencias significativas (ubicación, material de salivadera y tiempo): a) tiempo + material de salivadera; b) ubicación + tiempo; c) ubicación + tiempo + material de salivadera; se obtuvieron diferencias muy significativas en todos los casos, pero no así cuando intervino el factor zona (que previamente había evidenciado diferencias no significativas). Por lo tanto, las diferencias observadas en las **Figuras 5.10-5.13** son muy significativas en lo que respecta a los materiales (acero inoxidable < opalina < cerámica) siendo para cada material el valor medio a 24 h significativamente menor que 64 h. Por el contrario, con referencia a la zona de toma de muestra (Z1 o Z2), no se detectaron diferencias significativas en su combinación con otros factores salvo con el tiempo. Como se había anticipado, con respecto a la ubicación, sólo podemos considerar las diferencias

de forma cualitativa debido a que es imposible tomar muestras equivalentes en salivaderas y cañerías.

Tabla 5.15- Análisis estadístico multifactorial de las UFC/cm² de las bacterias sésiles relacionado con los factores de agrupamiento: ubicación (cañerías- salivaderas), zona (Z1 y Z2) tiempo (24 h y 64 h), y el material de las salivaderas (acero inoxidable, cerámica y opalina).

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Significación.
Ubicación	88,84	1	88,84	127,53	<0,01
Error (Ubicación)	36,91	53	0,69		
Ubicación* Zona	1,89	1	1,89	2,72	0,10
Tiempo	257,65	1	257,65	605,95	<0,01
Error (Tiempo)	22,57	53	0,42		
Tiempo * Zona	6,17	1	6,17	14,52	<0,01
Tiempo * Material de las salivaderas	46,72	2	23,36	54,94	<0,01
Tiempo* Zona* Material de las salivaderas*	2,15	2	1,07	2,53	0,08
Ubicación * Tiempo	2,93	1	2,93	8,40	<0,01
Error (Ubicación*Tiempo)	18,49	53	0,34		
Ubicación. * Tiempo * Zona	0,00	1	,00	,01	0,92

GL; grados de libertad, F: estadístico de significación a partir de su correspondiente distribución y los grados de libertad involucrados.

5.3.2.b) Análisis estadístico de hongos sésiles.

Para el análisis estadístico de los hongos sésiles adheridos sobre los cortes de los tres materiales (acero inoxidable, cerámica y opalina), luego de 24 y 64 horas de exposición y del cese de circulación del agua, se utilizó la prueba de variancia de medidas repetidas.

5.3.2.b.i) Análisis cualitativo de valores mínimos, medios y máximos (hongos adheridos a los cortes).

En la **Tabla 5.16** y en las **Figuras 5.12-5.15** se realiza la comparación de los valores medios de las UFC/cm² de hongos adheridos a los tres materiales. Puede observarse que todos los valores más altos corresponden a los cortes de cerámica y los más bajos a los de

acero inoxidable. También puede notarse que en algunos casos las diferencias entre los valores máximos y mínimos son muy importantes indicando que en ciertos consultorios la contaminación es más significativa que en otros. Estas diferencias pueden estar asociadas a la distinta frecuencia y métodos de higiene.

Los valores correspondientes a las exposiciones de 64 h (**Tabla 5.17**) revelaron que existe un considerable aumento en los valores medios al incrementar el tiempo de exposición. En el caso de la cerámica el aumento promedio del número de hongos sésiles fue menor que el de las bacterias. Sin embargo, algunos consultorios evidenciaron valores muy altos luego de 64 h. La significación de las diferencias debidas a los factores tiempo, zona y material de salivadera se analiza en las **Tablas 5.18 y 5.19**.

Tabla 5.16- Análisis estadístico descriptivo de los valores mínimos, medios, máximos y desviación estándar de las UFC/cm² de los hongos adheridos a los cortes de acero inoxidable, cerámica y opalina luego de 24 horas de exposición.

Material de la salivadera	Zona	Valor Mn UFC/cm ²	Valor M UFC/cm ²	Desviación estándar	Valor mx UFC/cm ²	N
Acero inoxidable	Z1	1,22	2,07	0,76	2,44	10
Acero inoxidable	Z2	1,65	2,35	0,56	2,90	10
Cerámica	Z1	4,41	5,24	0,76	6,26	10
Cerámica	Z2	4,62	5,70	0,56	6,63	10
Opalina	Z1	2,96	4,44	0,77	4,78	9
Opalina	Z2	3,34	4,89	1,36	5,34	10

N: número de muestras totales analizadas de cada material correspondientes a cada una de las zonas (Z1 y Z2).

Mn: valor mínimo, M: valor medio, Mx: valor máximo de las UFC/cm².

Tabla 5.17- Análisis estadístico descriptivo de los valores mínimos, medios, máximos y desviación estándar de las UFC/cm² de los hongos adheridos a los cortes de acero inoxidable, cerámica y opalina luego de 64 horas de exposición.

Material de la salivadera	Zona	Valor Mn UFC/cm ²	Valor M UFC/cm ²	Desviación estándar	Valor M UFC/cm ²	N
Acero inoxidable	Z1	2,90	3,49	0,70	3,69	10
Acero inoxidable	Z2	2,85	3,81	0,72	4,27	10
Cerámica	Z1	5,61	7,02	1,92	8,53	10
Cerámica	Z2	6,15	7,07	1,76	9,91	10
Opalina	Z1	4,66	5,41	0,43	6,52	9
Opalina	Z2	4,62	5,84	0,39	6,63	10

N: número de muestras totales analizadas de cada material correspondientes a cada zona (Z1 y Z2).

Mn: valor mínimo, M: valor medio, Mx: valor máximo de las UFC/cm².

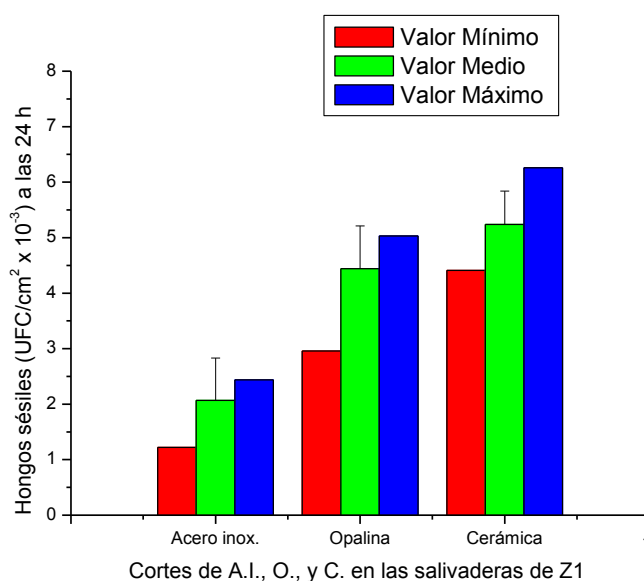


Figura 5.14- Valores mínimo, medio y máximo de las UFC/cm² de los hongos adheridos sobre los cortes de acero inoxidable, cerámica y opalina de las salivaderas dentales en Z1, con un período de exposición de 24 h.

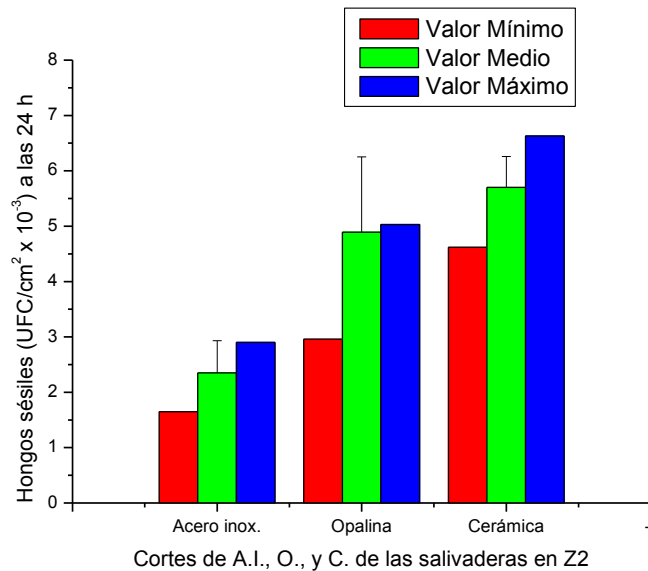


Figura 5.15- Valores mínimo, medio y máximo de las UFC/cm² de los hongos adheridos sobre los cortes de acero inoxidable, cerámica y opalina de las salivaderas dentales en Z2, con un período de exposición de 24 h.

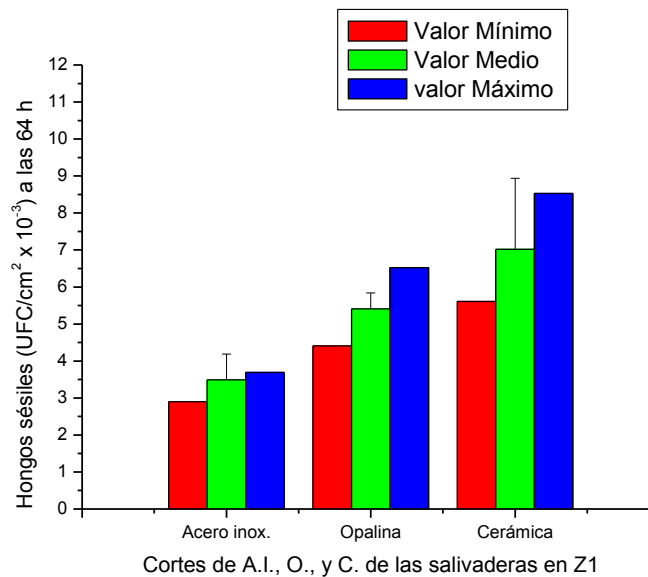


Figura 5.16- Valores mínimo, medio y máximo de las UFC/cm² de los hongos adheridos sobre los cortes de acero inoxidable, cerámica y opalina de las salivaderas dentales en Z1, con un período de exposición de 64 h.

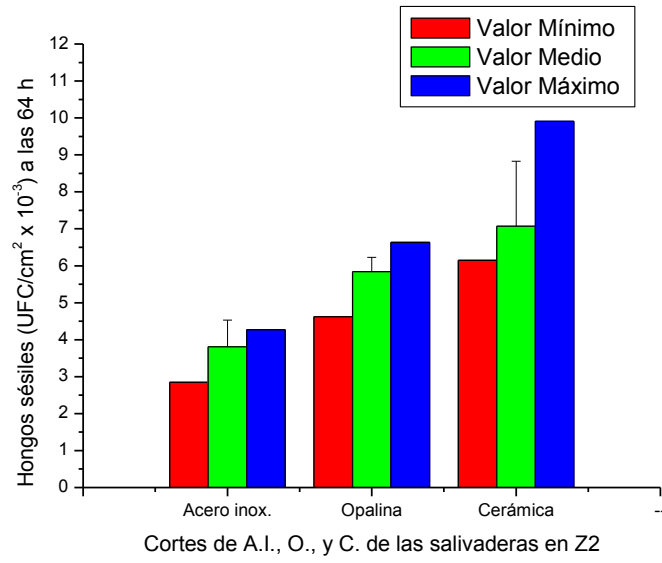


Figura 5.17- Valores mínimo, medio y máximo de las UFC/cm² de los hongos adheridos sobre los cortes de acero inoxidable, cerámica y opalina de las salivaderas dentales en Z2, con un período de exposición de 64 h.

Tabla 5.18- Análisis estadístico descriptivo de Variancia de los valores medios de las UFC/cm² de los hongos sésiles del biofilm formado sobre los cortes de acero inoxidable, cerámica y opalina de las salivaderas de Z1 y Z2, luego de 24 y 64 horas de exposición.

Estadística descriptiva					
	ZONA	Material de las salivaderas	Media	Desviación Estándar.	N
UFCHS24	Z1	Cerámica	5,24	0,76	10
		Opalina	4,44	0,77	9
		Acero	2,07	0,76	10
	Total Z1		3,91	0,76	29
	Z2	Cerámica	5,70	0,56	10
		Opalina	4,89	1,36	10
		Acero	2,35	0,56	10
	Total Z2		4,31	0,82	30
	Total Z1 + Z2		4,11	0,79	59
	UFCHS64	Z1	Cerámica	7,02	1,92
Opalina			5,41	0,43	9
Acero			3,49	0,70	10
Total Z1			5,30	1,01	29
Z2		Cerámica	7,07	1,76	10
		Opalina	5,84	0,39	10
		Acero	3,81	0,72	10
Total Z2			5,57	0,95	30
Total Z1 + Z2			5,44	0,98	59

UFCHS24: unidades formadoras de colonias por cm² de hongos sésiles provenientes de los cortes de las salivaderas luego de 24 horas de exposición y del cese de circulación del agua en Z1 y Z2 respectivamente.

UFCHS64: unidades formadoras de colonias por cm² de hongos sésiles provenientes de las cañerías metálicas luego de 64 horas exposición y del cese de circulación del agua.

5.3.2.b.ii). *Análisis de Variancia (hongos adheridos a cortes).*

El análisis de variancia de las UFC/cm² de los hongos adheridos a todos los cortes considerando el factor zona (Z1 y Z2) no mostró una diferencia significativa (**Tablas 5.19 y 5.20**). Sin embargo, se observó una diferencia estadísticamente significativa al examinar el factor tiempo, siendo $P < 0,01$ (**Tabla 5.19**). En particular, el conjunto de las muestras analizadas luego de una exposición de 24 horas (**Figuras 5.14 y 5.15**) mostró valores significativamente menores que los de las muestras tomadas a las 64 horas (**Figuras 5.16 y 5.17**).

El tipo de salivadera, también representó un factor con diferencia muy significativa ($P < 0,01$) (**Tabla 5.19 y 5.20**), mostrando (**Figuras 5.14 a 5.17**) que el número de hongos adheridos crece en el orden: acero inoxidable < opalina < cerámica.

En el análisis de variancia de las UFC/cm² de los hongos sésiles con factor comprobación ubicación (cañerías o salivaderas) también reveló que la diferencia era estadísticamente significativa.

Tabla 5.19- Análisis estadístico de las UFC/cm² de los hongos sésiles de acuerdo al factor de agrupamiento: zona (Z1 y Z2) y de comprobación: material de las salivaderas (acero inoxidable, cerámica y opalina) y tiempo (24 y 64 h).

Fuente	Suma de cuadrados.	gl	Cuadrado Medio.	F	Significación.
Zona	2,864	1	2,86	2,356	0,131
Material de las salivaderas	140,385	2	70,19	57,748	< 0,01
Tiempo	504,829	1	504,82	642,89	< 0,01
Error (Tiempo)	42,403	54	0,78		
Ubicación	1,011	1	1,01	0,76	0,38
Error ubicación	71,865	54	1,33		

Zona: región a la que corresponden los consultorios analizados (Z1 y Z2). Material de las salivaderas: acero inoxidable, cerámica y opalina. Tiempo: tiempo de cese de circulación del agua por los equipos odontológicos y de exposición del material (24- 64 h), gl: grados de libertad, F: estadístico de significación a partir de su correspondiente distribución y grados de libertad involucrados.

5.3.2.b.iii) *Análisis estadístico multifactorial (hongos adheridos a cortes).*

Cuando se realizó el análisis estadístico multifactorial (**Tabla 5.20**) considerando la combinación de los factores con diferencias significativas (ubicación, material de salivadera y tiempo): a) ubicación + material de salivadera; b) ubicación + tiempo; c) ubicación + tiempo + material de salivadera; se obtuvieron diferencias muy significativas en todos los casos, pero no así cuando intervino el factor zona (que previamente había evidenciado diferencias no significativas). Por lo tanto, las diferencias observadas en las **Figuras 5.14-5.17** son muy significativas en lo que respecta a los materiales (acero inoxidable < opalina < cerámica) siendo para cada material el valor medio de UFC/cm² de hongos sésiles a 24 h < 64 h. Por el contrario, con referencia a la zona de toma de muestra (Z1 o Z2), no se detectaron diferencias significativas en su combinación con los otros factores (ubicación + tiempo + material de salivadera + zona). Como se había anticipado, con respecto a la ubicación, sólo podemos considerar las diferencias de forma cualitativa debido a que es imposible tomar muestras equivalentes en salivaderas y cañerías.

Tabla 5.20- Análisis multifactorial de las UFC/cm² de los hongos sésiles relacionado con los factores de agrupamiento; ubicación (cañerías- salvaderas), zona (Z1 y Z2), tiempo (24 y 64h) y el material de las salvaderas (acero inoxidable, cerámica y opalina).

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Significación.
Ubicación	1,011	1	1,01	0,76	0,38
Error (Ubicación)	71,865	54	1,33		
Ubicación * Zona	14,893	1	14,89	11,19	< 0,01
Ubicación * Material de las salvaderas	94,374	2	47,18	35,45	< 0,01
Ubicación.* Zona * Material de las salvaderas	14,446	2	7,22	5,42	< 0,01
Tiempo	504,829	1	504,82	642,89	< 0,01
Error (Tiempo)	42,403	54	0,78		
Ubicación* Tiempo	255,202	1	255,20	459,69	< 0,01
Error (Ubicación*Tiempo)	29,979	54	0,55		
Ubicación. * Tiempo * Zona	2,284	1	2,28	4,11	0,04
Ubicación. * Tiempo * Material de las salvaderas	11,537	2	5,76	10,39	< 0,01
Ubicación. * Tiempo * Zona* Material de las salvaderas	2,092	2	1,04	1,88	0,16

Ubicación: ubicación: (cañerías metálicas- salvaderas). Zona (Z1 y Z2). Material de las salvaderas: acero inoxidable, cerámica y opalina. Tiempo: tiempo de cese de circulación del agua por los equipos odontológicos o de exposición de los cortes (24 h y 64 h), gl.: grados de libertad, F: estadístico significativo de comparación.

DISCUSIÓN

6- DISCUSIÓN.

6.1-Contaminación del agua que atraviesa los equipos odontológicos.

En el presente trabajo se investigó la incidencia de distintos factores sobre la contaminación microbiana de los equipos odontológicos, en general, y de las salivaderas, en particular. Con ese propósito se analizó la carga microbiana proveniente de las fuentes de abastecimientos públicos, que ingresan a los equipos odontológicos, las modificaciones que sufre la misma durante su recorrido por las cañerías y mangueras hasta su egreso hacia las salivaderas, la flora planctónica de la saliva de los pacientes, y las características químicas y físicas de los materiales de las salivaderas dentales que pueden incidir sobre la formación del biofilm en las paredes internas de las salivaderas.

Para realizar un análisis comparativo del grado de contaminación de los distintos equipos evaluados se tomó como referencia el valor establecido por el Código Alimentario Argentino, que establece un valor máximo de 500 UFC/ml de bacterias mesófilas aerobias presentes en la flora planctónica del agua corriente. Los resultados del presente estudio, mostraron valores mayores a dicho máximo para agua de ingreso a los consultorios en ambas zonas (Z1 y Z2), encontrándose un promedio de $1,75 \times 10^3 (\pm 0,48)$ UFC/ml en los 29 consultorios analizados en Z1 y de $1,89 \times 10^3 (\pm 0,65)$ UFC/ml, para los 30 consultorios correspondientes a Z2, de bacterias planctónicas mesófilas aeróbicas del tipo Gram positivas. En este análisis se observó que algunos consultorios tuvieron el triple de bacterias respecto al ingreso. Esto revela que la calidad de agua domiciliaria varía de un punto a otro de la región, dependiendo no solo de las fuentes, sino también de las cañerías que conducen el agua al consultorio. A pesar de las variaciones de la flora microbiana debe aclararse que no se hallaron hongos en el agua de ingreso.

En el análisis realizado sobre la flora planctónica presente en las muestras obtenidas del agua de egreso hacia las salivaderas, después que la misma atraviesa los diferentes ductos

o anexos de las unidades dentales, se observó un importante deterioro en la calidad del agua que fluía, incrementándose la cantidad (aumento mayor al 100 %) y variedad de los microorganismos.

Los conteos revelaron que había un promedio de $4,29 \times 10^3$ ($\pm 0,64$) UFC/ml de bacterias planctónicas aerobias mesófilas en el agua de egreso hacia las salivaderas dentales, para los 29 consultorios de Z1 y de $3,86 \times 10^3$ ($\pm 0,80$) para los 30 consultorios seleccionados en Z2, con diferencias no significativas entre ambas zonas. La variación de la carga microbiana entre el agua de ingreso y la de egreso, fue distinta de un consultorio a otro, lo que hace presumir la influencia del nivel de contaminación del equipo que afecta en mayor o menor grado la calidad del agua al atravesarlo. Miller *et al.*, (1996), Shanon *et al.*, (2000), Montebugnoli *et al.*, (2002), mostraron niveles de bacterias planctónicas heterótroficas de un orden superior en las muestras testeadas de agua de egreso de líneas de agua de unidades dentales de otras ciudades.

En otro trabajo realizado sobre la calidad del agua de egreso de 30 jeringas triples, en Berisso y aledaños, Partido de La Plata, provincia de Buenos Aires, también se demostró un cambio en la flora planctónica entre el agua de ingreso a las unidades dentales y el agua de egreso de las jeringas triples (Butler *et al.*, 2002).

Otros resultados reportados anteriormente (Butler *et al.*, 1999) evidenciaron diferencias en el agua de egreso de 20 equipos dentales del casco urbano de la ciudad de La Plata entre las cañerías de conducción del agua corriente de bronce y acero. Se reportaron 100 UFC/ml de hongos planctónicos, ausencia de UFC/ml de bacilos Gram negativos no fermentativos y 150 UFC/ml de cocos Gram positivos coagulasa negativos, para los equipos con cañerías de acero y ausencia de UFC/ml de hongos planctónicos, 250 UFC/ml de cocos Gram positivos coagulasa negativos y 100 UFC/ml de bacilos Gram negativos no fermentativos para las cañerías de bronce, mostrando la posible influencia de los productos

de corrosión de las cañerías y susceptibilidad a la formación de biofilms de los materiales componentes de las mismas a la contaminación del agua que atraviesa el equipo odontológico. Las variaciones que sufre el agua de ingreso al atravesar los equipos odontológicos reportadas en este trabajo, son coincidentes con las de Walker *et al.*, (2000), quienes reportaron un estudio realizado en el agua de 55 unidades dentales, pertenecientes a consultorios del sudoeste de Inglaterra, un rango de 500 a 10^5 UFC/ml de bacterias planctónicas en el agua de egreso, siendo dichos valores superiores a los permitidos por la Union Europea y a los establecidos por la ADA (American Dental Association) en Estados Unidos.

Los resultados del presente trabajo demostraron la incidencia del tiempo de reposo del equipo odontológico sobre la contaminación del agua de egreso. Shanon *et al.*, (2000) y Szymanska, (2004) señalaron que durante los períodos de inactividad de los tubos de agua de los equipos dentales se produce el depósito de carbonato de calcio y de pequeñas porciones de desprendimiento de biofilm, que contaminan el agua de egreso de las unidades dentales y que facilitan la colonización de gérmenes patógenos oportunistas tales como *Pseudomona aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Legionella* spp. (*L. spp.*) y *Mycobacterium* spp. (Schulze-Robbecke *et al.*, 1995; Szymanska, 2004). En particular Miller (1996) reportó un promedio de 105 UFC/ml de *P. aeruginosa* y de 102 UFC/ml a 104/UFC/ml de *Legionella* spp., en el agua de egreso de las unidades dentales. También fue demostrado (Pankhurst *et al.*, 1998) un caso circunstancial de neumonía en un odontólogo en E.E.U.U. causado por la transmisión de *Legionella dumoffi*, por la aspiración del spray eliminado por el mismo equipo dental. En concordancia con otros investigadores (Kohn *et al.*, 2004) señalaron el peligro de que el agua contaminada eliminada por las turbinas ingrese por inhalación a los profesionales o pacientes, después de haber tomado contacto con la cavidad bucal de estos últimos. Por otra parte, se ha demostrado que los profesionales de la

odontología evidencian la presencia de bacterias Gram negativas (*P. aeruginosa*) en su flora nasal y signos de exposición a *Legionella* spp. (Clark, 1974; Penn *et al.* 1981).

Franco *et al.*, (2005), también reportó que los fluidos orales pueden quedar retenidos en las piezas de mano dental, de ahí que es recomendable el uso de válvulas que impidan la retracción del fluido hacia el interior del equipo.

El análisis de hongos planctónicos del presente trabajo demostró que no estaban presentes en el agua de ingreso y que la contaminación llegaba a $2,12 \times 10^3 (\pm 0,16)$ UFC/ml en Z1 y $2,26 \times 10^3 (\pm 0,16)$ UFC/ml en Z2 en el agua de egreso. Por lo tanto, la misma se producía durante el recorrido del agua por el equipo odontológico, y provendría del mismo equipo o del ambiente del consultorio. Butler *et al.*, (2002) reportaron que en el agua de ingreso a las unidades dentales de 30 consultorios de Berisso tampoco fueron hallados hongos planctónicos. Sin embargo, después que el agua atravesó el circuito interno de las cañerías del equipo, se encontró un promedio de 100 UFC/ml. En otros análisis realizados por Göttlich *et al.*, (2002) y Szymanska, (2005b) se encontraron algunas especies de hongos (*Cándida albicans* (*C. albicans*), *C. curvata*, *Geotrichum candidum*, *Aspergillus fumigatus*) en el fluido de agua de las piezas de mano de 25 unidades dentales con una variación de las UFC/ml de hongos de entre 0 y 37,5 y entre 0 y 64,5 UFC/ml en los reservorios de agua de los equipos dentales. Porteus *et al.* (2003) reportó la presencia de un hongo patógeno (*Exophiala mesophila*) en unidades de agua dentales en Alemania, posiblemente proveniente de pacientes inmunocomprometidos, con conidias de 4,8 μm de largo.

Con respecto a las bacterias planctónicas provenientes de la saliva de 50 pacientes sin enfermedad periodontal, asistidos en los consultorios de ambas regiones (Z1 y Z2), se observó que el promedio fue de $6,58 \times 10^3 (\pm 0,65)$ UFC/ml de estreptococos en Z1 y de $6,38 \times 10^3 (\pm 0,38)$ en Z2, en su mayoría correspondiendo a la especie de *Streptococcus*

salivarius. Se pudo comprobar, en coincidencia con resultados de otros autores (Pankhurst 1998 y Szymanska, 2005b), que tanto el biofilm de las cañerías como el de las salivaderas se hallaban contaminados con los mismos, lo que demostraba que la fuente de contaminación eran los pacientes.

6.2- Biofilms en los dispositivos de los equipos odontológicos.

Cabe preguntarse por qué al atravesar los equipos odontológicos se altera la calidad del agua. Como se explicó anteriormente algunas superficies de cañerías son excelentes sustratos para la adhesión bacteriana y formación de biofilms. En el caso de las tuberías de los equipos odontológicos el flujo lento del agua (flujo laminar) que atraviesa la cañería, con una relación de superficie/volumen diez veces mayor que la correspondiente a la cañería domiciliaria favorecen la presencia del biofilm e inducen la colonización de otras bacterias y la liberación posterior de las bacterias al medio (Shearer, 1996; Shanon *et al.*, 2000).

Es importante tener en cuenta que durante los procesos de limpieza y aplicación de agentes químicos biocidas, el movimiento del fluido dentro de las cañerías del agua de los equipos odontológicos solamente puede arrastrar la flora planctónica, pero no es posible desprender la flora sésil adherida sobre las paredes de los ductos internos, que es más resistente a la acción biocida.

Los resultados del análisis de la rugosidad superficial (Ra) en 18 cortes en total de los materiales estudiados demostraron que las caras cercanas al desagüe de las salivaderas presentan mayor rugosidad que en los bordes externos, menos expuestos al agua y a los elementos de higiene. Los valores mínimos y máximos de Ra presentan mayores diferencias en las paredes internas que en los bordes, lo que haría suponer que está relacionado al tipo de higiene y materiales utilizados en cada consultorio, para limpiar las

regiones más comprometidas. Algunos de los materiales analizados presentaron crestas y valles que probablemente correspondieron a las rayaduras producidas en su superficie por elementos abrasivos utilizados para la higiene de los mismos. El análisis comparativo demuestra que la adhesión aumenta directamente con la rugosidad (Ra) y la biocompatibilidad. Los resultados observados muestran el siguiente orden creciente: acero inoxidable (Ra = 0,22 μm) < opalina (Ra = 0,43 μm) < cerámica (Ra = 0,76 μm) para las caras internas próximas al desagüe. En consecuencia, nuestros resultados, en coincidencia con algunos estudios realizados por otros científicos (Verran *et al.*, 2001; Boyd *et al.*, 2002; Whitehead *et al.*, 2004), muestran que la rugosidad tendría un efecto significativo en relación a la biopelícula, evidenciando un orden creciente de contaminación relacionado con un orden creciente para Ra. En concordancia, Whitehead *et al.*, (2004) encontró en las superficies de los equipos dentales que tuvieran una Ra menores que 0,2 μm poseían bajos niveles de acumulación de biopelícula. Las que se hallaban entre los 0,20 μm y 0,80 μm podrían ser consideradas superficies limpias con moderada acumulación de biofilm, y las que superaban los 0,80 μm fueron consideradas superficies que permitirían la fácil retención y proliferación microbiana. En particular estudios realizados por microscopía de epifluorescencia sobre las superficies de 0,2, 0,5 y 2 μm de Ra revelaron que la *Pseudomona aeruginosa* de 1 μm y el *C. albicans* de 4 μm de diámetro, eran retenidas en superficies de Ra de 1 μm (Whitehead *et al.*, 2005).

En relación al análisis químico de los materiales, se ha reportado que tanto la cerámica como la opalina contienen sílice. Estudios realizados por otros investigadores (Bernal *et al.*, (2003) y Ábalos (2005)) mostraron que la presencia de este elemento favorecería la biocompatibilidad del material y por lo tanto la adherencia microbiana. De acuerdo a ello en el presente trabajo los resultados revelaron que la cerámica y la opalina presentaron mayor la adherencia microbiana que el acero inoxidable. Los investigadores coinciden en

recomendar que el instrumental médico y elementos o receptáculos afines, estén confeccionados con acero inoxidable del tipo austenítico (Kazemi Reza *et al.*, 2000; Verran *et al.*, 2001). Sin embargo, las salivaderas de acero inoxidable analizadas, mostraron menor cantidad de níquel y mayor cantidad de hierro, correspondiendo a un acero ferrítico y no austenítico como el recomendado. En particular, en el presente trabajo se demostró que la cerámica, cuyas características físicoquímicas la hacen muy biocompatible, fue el material que tuvo características más retentivas en los cortes de las caras próximas al desagüe de las mismas.

La adhesión de bacterias sobre los cortes de los tres tipos de materiales analizados muestra que el número de células adheridas a la cerámica es casi el triple del correspondiente al acero inoxidable, incrementándose las diferencias a tiempos mayores. En la bibliografía no se hallaron valores de retención bacteriana y de hongos para las salivaderas de los equipos odontológicos, por lo que no puede realizarse comparación al respecto.

El número de los hongos sésiles sobre los cortes de los tres materiales expuestos durante diferentes períodos de tiempo (24 y 64 horas), mostraron una secuencia similar a las bacterias, pero en el caso de la cerámica la acumulación de hongos a lo largo del tiempo era menor que en el caso de las bacterias. Además, quedó demostrado que la contaminación por hongos proviene del ambiente y del agua que fluye por la salivadera. Si bien no está comprobada su patogenicidad, los mismos facilitan la adherencia de los estreptococos y otras bacterias provenientes de los pacientes y del ambiente, tanto sobre las salivaderas como sobre las cañerías (Mayo *et al.*, 1990; Mills *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1994; Shanon *et al.*, 2000). Los resultados discutidos previamente, en relación con la contaminación en el agua de ingreso de los equipos odontológicos, del agua que fluye por las mismas y los biofilms formados en las cañerías y en las salivaderas, conducen a importantes consecuencias en relación a la bioseguridad.

6.3- Importancia clínica y recomendaciones de Bioseguridad.

No debe olvidarse que los procedimientos odontológicos dentro del surco gingival pueden exponer el sistema vascular actuando como vía de transmisión de microorganismos, tanto desde los tejidos del surco gingival que ya se halla colonizado, como a través de las jeringas triples, turbinas, buches, etc. Por otra parte, dicha carga microbiana se expulsa posteriormente hacia la salivadera a través de los buches y el flujo salival. Finalmente el agua de la salivadera normalmente desagota en las cloacas con el consecuente peligro de contaminación de napas.

Estas consideraciones pueden extenderse teniendo en cuenta el factor de riesgo que constituyen los pacientes inmunocomprometidos, con endocarditis bacteriana, con tuberculosis, etc., ya que ciertas bacterias pueden sobrevivir adheridas sobre las superficies (salivaderas, platinas, pisos, etc) hasta 90 días, en caso de no realizar la debida desinfección ambiental. Por los motivos expuestos se sugiere la instalación de filtros seriados dentro de las mangueras de agua, incluídas las cañerías hacia las cloacas, y su remoción periódica para disminuir la carga microbiana y de sustancias tóxicas (nitratos, plomo, etc) en el agua de egreso y en las salivaderas dentales (Oertling *et al.*, 1990; Miller, 1996; Petti *et al.*, 2006).

Asímismo con respecto a la higiene de los equipos dentales se observó la conveniencia de no utilizar algunas sustancias y elementos abrasivos como los polvos limpiadores de grano grueso o esponjas metálicas duras, ya que los materiales de las salivaderas podrían rayarse al poco tiempo de uso y la rugosidad actuar como factor retentivo de microorganismos.

Otra precaución importante es dejar correr el agua por las mangueras, cañerías, canillas, jeringas etc. durante 1 minuto, antes de comenzar las prácticas odontológicas, después del período de receso de los equipos, para descartar el agua que ha quedado retenida y que está

más contaminada, y colocar válvulas antiretracción, a fin de prevenir que la saliva de los pacientes penetre en el equipo odontológico (Bagga *et al.*, 1984; Kuhmer *et al.*, 1996; Shanon *et al.*, 2000; Montebugnolli *et al.*, 2002; Petti *et al.*, 2006). También es recomendable el uso de agua estéril para procedimientos quirúrgicos y de sistemas independientes que provean agua de calidad controlada, cuyos recipientes deben ser periódicamente verificados.

En estudios realizados anteriormente (Butler *et al.*, 2006), se ha reportado la aplicación del glutaraldehído al 2% diluído en agua, como descontaminante de jeringas triples. Dicho biocida fue usado por inmersión durante 10 a 12 minutos y se observó una disminución en la flora presente en el agua a la salida de dicho dispositivo. En particular, el número de cocos planctónicos Gram positivos varió de 400 UFC/ml sésiles a 100 UFC/ml (después del tratamiento), y el de los hongos planctónicos de 220 UFC/ml a 40 UFC/ml respectivamente. Sin embargo, hay que considerar las recomendaciones dispuestas por el ANMAT para el uso de este desinfectante, aplicándolo en lugares ventilados y en ausencia de los pacientes, enjuagando con abundante agua debido a su alto grado de toxicidad.

Ciertas normas aconsejan que la higiene y desinfección de las salivaderas debe realizarse entre paciente y paciente con desinfectantes de nivel intermedio tales como el hipoclorito de sodio al 1%. También se indica la desinfección de otros anexos como los eyectores de saliva, los que deben ser puestos en funcionamiento y aspirados con una solución de hipoclorito de sodio al 1%, entre paciente y paciente (Karpay *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2001). Se puede concluir que es de suma importancia controlar la calidad del agua que ingresa y egresa a los equipos y la formación de biofilms sobre los dispositivos y poner en práctica las recomendaciones descriptas previamente para reducir la contaminación.

CONCLUSIONES

7- CONCLUSIONES.

Los resultados de los ensayos realizados en 59 consultorios de la ciudad de La Plata revelaron que:

- 1- La calidad del agua potable en relación con su carga microbiana que reciben los consultorios de la Z1 (Parque Saavedra) y la Z2 (Punta Lara) no presenta diferencias significativas, pero supera el valor admitido por el Código Alimentario Argentino respecto a su carga microbiana.
- 2- Los recuentos de microorganismos del agua de ingreso y egreso mostraron un incremento significativo de la contaminación al atravesar el equipo odontológico.
- 3- Todos los equipos odontológicos mostraron niveles de contaminación por microorganismos en el agua de egreso hacia las salivaderas que superaba ampliamente el valor admitido por el Código Alimentario Argentino.
- 4- Al atravesar los equipos odontológicos la composición de la microflora planctónica se modifica aumentando el número de bacterias e incorporando hongos ambientales.
- 5- La saliva de los pacientes sin enfermedad periodontal de las regiones Z1 y Z2 no mostró diferencias significativas respecto del número de microorganismos planctónicos.
- 6- Las biopelículas formadas sobre los cortes de los tres materiales (acero inoxidable, cerámica y opalina) colocados en la región próxima al desagüe de las salivaderas están constituidas por el aporte de los microorganismos planctónicos del agua de egreso de las cañerías metálicas, de la saliva de los pacientes y de los ambientales.
- 7- La composición de las biopelículas formadas sobre las cañerías de los equipos odontológicos difiere de la correspondiente a las salivaderas, debido a que el área de la toma de muestras fue diferente en ambos casos.
- 8- La adherencia de los hongos a la superficie de las salivaderas favorecería la retención de bacterias, particularmente de los cocos.

9- El número de microorganismos sésiles adheridos a las salivaderas depende de la composición de las mismas, siendo en orden creciente acero inoxidable < opalina < cerámica.

10- Las salivaderas de acero inoxidable mostraron mejor *performance* debido no sólo a la menor adherencia de microorganismos a corto plazo, sino a la menor acumulación en el tiempo. El análisis comparativo de las mismas, mostró que estaban constituídas por acero ferrítico y no austenítico como se recomienda.

11- La mayor rugosidad de la cerámica y opalina, producto de los procesos de higiene, y la mayor biocompatibilidad pueden favorecer la mayor susceptibilidad a la adherencia microbiana sobre estos materiales.

12- Las diferencias entre los valores mínimos y máximos de retención de microorganismos encontradas entre los consultorios con el mismo tipo de salivaderas probablemente están asociadas a las distintas rutinas de higiene que difieren en frecuencia y en los elementos empleados (uso de productos químicos agresivos, abrasivos de distinta dureza y tamaño de grano, etc.).

13- El tiempo de receso (sin utilizar el equipo y sin higienizarlo, ej. fines de semana, vacaciones) juega un rol fundamental favoreciendo la acumulación de microorganismos en las salivaderas y dificultando su remoción.

En consecuencia con el objeto de impedir la transmisión de infecciones sistémicas a través de las prácticas odontológicas es importante realizar la elección adecuada de los materiales y elementos de limpieza y la correcta aplicación de las normas de bioseguridad. Entre ellas se recomiendan: el estudio periódico de la calidad del agua, utilización de salivaderas de acero inoxidable quirúrgico, el uso de filtros, el empleo de agua estéril para las prácticas quirúrgicas, la utilización de sistemas independientes para proveer agua de calidad

controlada a los equipos odontológicos, dejar correr el agua luego de períodos de receso, y entre paciente y paciente, la desinfección de todos los anexos del equipo odontológico (turbinas, piezas de mano, jeringas triples, etc) después de cada prestación odontológica.

APÉNDICE I

8- APÉNDICE I

8.1-Biopelícula de la cavidad oral.

Entre las fuentes posibles de contaminación microbiológica de los dispositivos de los equipos odontológicos se encuentra la saliva de los pacientes y la placa dental.

Debe tenerse en cuenta que cuando el odontólogo procede a remover la placa dental, para realizar la limpieza de las piezas dentarias al salivar el paciente las volcará en las salivaderas, contaminando dichos receptáculos. Debido a su importancia en el proceso de contaminación microbiológica de los dispositivos es importante analizar los componentes, más comunes de la saliva y de la placa dental.

La película consta de dos partes, la capa salival o cutícula acelular adquirida y la capa formada por los microorganismos y polímeros extracelulares (Bing Yang *et al.*, 2005; Barrancos Mooney *et al.*, 2006).

En la formación de la placa dental participan enzimas y la actividad bioquímica y metabólica de las bacterias orales. Su composición varía según el tiempo de maduración y la superficie colonizada.

8.1.1- Película adquirida y adhesión primaria.

La capa salival es una delgada cutícula, amorfa, cuyo grosor varía según la superficie, aunque se estima que se halla entre 1 y 2 mm. Su formación se lleva a cabo dentro de las dos horas de haberse higienizado la superficie dental, carece de microorganismos y contiene proteínas y glucoproteínas (Bushnell, 1961; Blehert *et al.*, 2003; Barrancos Mooney *et al.*, 2006). Esta película temprana continúa madurando hasta constituirse en una película tardía, cuyos componentes son elementos de la saliva, productos microbianos, y exudado gingival. Una vez constituida la película salival, comienzan a adherirse las bacterias de la cavidad bucal tales como: el *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*)

(Kolenbrander, 2000; Blehert *et al.*, 2003). Las cargas negativas de estas bacterias y de las glucoproteínas, impiden la unión entre ambos, por lo que los iones de calcio presentes en la saliva neutralizan las mismas, formando el complejo: glucoproteínas- calcio- bacterias (Li *et al.*, 1994; van Ruyven *et al.*, 2000). Otras especies bacterianas que forman el consorcio son: *Streptococcus gordonii* (*S. gordonii*), el *S. oralis* y el *S. sanguinis* (formalmente conocido como *S. mitis*). El *S. mutans* se congrega en caso de que exista una dieta rica en hidratos de carbono (Loesche, 1988; Loo *et al.*, 2000; Blagwat *et al.*, 2001; Barrancos Money *et al.*, 2006),

8.1.2- Colonización secundaria.

Las bacterias mencionadas se van adaptando a las modificaciones del medio, de acuerdo a la variedad de nutrientes presentes en él y a las concentraciones de oxígeno. La etapa de colonización secundaria, depende de la presencia y de la síntesis extracelular de los polímeros de glucosa. En presencia de polisacáridos extracelulares, el *S. mutans* elabora mutanos (glucanos insolubles), que actúan como elementos de adhesión entre la superficie dentaria y los microorganismos (Blehert *et al.*, 2003). A partir de la producción de estas sustancias, comienzan a congregarse diferentes bacterias. Las condiciones acidogénicas, favorecen la colonización de las veillonellaes y de los lactobacillus (Paster *et al.*, 2001) Estos microorganismos predominan en la caries de dentina y de raíz, o bien, se hallan asociados a otras especies bacterianas (Cadwell *et al.*, 1997). Esta asociación está mediada por las fimbrias que poseen los actinomyces, que les otorga capacidad de adhesión para agregarse entre ellos y a los *S. oralis* o *S. mutans* (Yeung *et al.*, 1998; Palmer *et al.*, 2003). El metabolismo de estas bacterias produce ciertos productos químicos como amonio, que favorece la aparición de un grupo de bacilos Gram negativos tales como: el *Bacteroides fragilis* (*B. fragilis*) y el *B. melaninogénicus* (Listgarten, 1976; Guilarte *et al.*, 2004). La población de la cavidad oral continúa modificándose dependiendo del pH salival, de las

condiciones de higiene de los pacientes, del estado sistémico de los mismos, etc. Las diferentes congregaciones que aparecen, pueden adquirir diferentes grados de patogenicidad y de esta manera, pueden agredir a los tejidos duros y blandos de la cavidad bucal, causando diferentes patologías (Quirynem *et al.*, 1995).

8.1.3- Formación y población biológica de la placa subgingival.

Podemos definir a la placa subgingival como el consorcio de especies bacterianas Gram negativas anaerobias facultativas y anaerobias estrictas inmersas en una matriz que induce el desarrollo de alteraciones en los tejidos de soporte y sostén de las piezas dentarias (Slots *et al.*, 1980).

La enfermedad periodontal es una lesión mixta, donde existen formas bacterianas aerobias y anaerobias. Estas últimas se alojan con facilidad en la llamada bolsa periodontal, que es el descenso de la adherencia epitelial, considerándose bolsa patológica cuando la misma supera los 4 mm de profundidad. Se inicia con la evolución y maduración de la placa supragingival, sobre la que se adhieren otras formas anaerobias específicas como: *el Fusobacterium spp.*, *Prevotella spp.*, *Porphyromonas ssp. (P. spp.)*, *Treponemas macrodentium (T. macrodentium)*, *Peptoestreptococcus* y bacterias pigmentadas como los *Bacteroides ssp. (B. spp.)* (Loesche, 1988; Xymenez-Five *et al.*, 2000; Kaplan *et al.*, 2003).

Este tipo de biofilm presenta variaciones con respecto a su ubicación, por ejemplo puede estar “fijo”, cuando se adhiere sobre ciertos puntos del cemento o del ligamento periodontal, y puede estar “libre o flotante”, cuando se halla entre el cemento y ligamento periodontal, en la región del tercio apical (Friedman *et al.*, 1992). La llamada placa libre o flotante es más voluminosa y a microscopía electrónica o de campo oscuro aparece con manchas más oscuras, lo cual indica la presencia de treponemas que contienen gran cantidad de inclusiones, y de *B. pigmentados* (Friedman *et al.*, 1992). Otros autores, Listgarten (1976) hallaron otras especies bacterianas tales como: *Porphyromona gingivalis*,

Treponema denticola, *Campylobacter rectus*, *Actinobacillus naeslundii*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella intermedia* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (De Graff *et al.*, 1989; Noiriet *et al.*, 2001).

En estudios histoquímicos realizados sobre bacterias productoras de periodontitis putativa, fueron identificados: *P. gingivalis*, *T. denticola*, *C. rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum* y *Actinomycetemcomitans* (de Graff *et al.*, 1989; Quirynem *et al.*, 1995; Piovano, 1999; Noiriet *et al.*, 2001). Estas bacterias tienen capacidad de virulencia suficiente como para producir importantes lesiones en los tejidos de soporte y de sostén de las piezas dentarias.

APÉNDICE II

9- APÉNDICE II

Tabla II.1- Análisis de los valores medios y error estándar de la rugosidad (Ra) de los cortes pertenecientes a bordes externos y paredes internas de salivaderas de acero inoxidable, opalina y cerámica.

Material	Ra de borde externo (μm)	Ra de Pared interna (μm)
Acero inox.	0,19	0,24
Acero inox.	0,20	0,20
Aceroinox.	0,18	0,22
Opalina	0,25	0,45
Opalina	0,33	0,43
Opalina	0,29	0,40
Cerámica	0,53	0,75
Cerámica	0,48	0,84
Cerámica	0,53	0,70

Tabla II.2- Valores medio y error estándar de las UFC/ml de las bacterias planctónicas enumeradas en el agua de ingreso a los equipos odontológicos en Z1.

Nº de consultorio	Valores Medio	Error Estándar	Nº de consultorio	Valor Medio	Error Estándar
1	1,64	0,91	16	2,26	0,99
2	2,40	1,04	17	1,90	0,25
3	1,46	0,35	18	1,12	0,22
4	1,85	0,54	19	2,34	0,72
5	1,00	0,25	20	1,90	0,25
6	1,70	0,59	21	1,90	0,25
7	2,87	0,58	22	2,32	0,37
8	1,62	0,58	23	1,22	0,36
9	1,58	0,24	24	1,79	1,06
10	1,22	0,36	25	2,07	0,40
11	2,02	0,84	26	1,00	0,20
12	1,65	0,37	27	2,60	0,87
13	1,38	0,49	28	2,29	0,63
14	1,29	0,96	29	1,48	0,19
15	1,55	0,39			

Tabla II.3- Valores medios y error estándar de las UFC/ml de las bacterias planctónicas enumeradas en el agua de ingreso a los equipos odontológicos en Z2.

Nº de consultorio	Valor Medio	Error Estándar	Nº de consultorio	Valores Medio	Error Estándar
1	1,79	0,36	16	2,50	0,72
2	1,66	1,06	17	1,95	0,97
3	1,40	0,44	18	2,34	0,72
4	2,43	0,80	19	1,90	0,25
5	2,12	1,11	20	1,20	0,76
6	1,44	0,74	21	2,73	0,61
7	1,62	0,88	22	2,12	0,55
8	1,68	0,68	23	1,48	0,53
9	1,32	0,63	24	1,36	0,33
10	1,86	0,92	25	1,61	0,48
11	1,96	0,87	26	1,55	0,49
12	1,95	0,97	27	1,65	0,96
13	1,95	0,88	28	1,61	0,82
14	1,65	0,33	29	1,48	0,19
15	1,98	0,64	30	1,98	0,50

Tabla II.4- Valores medios y error estándar de las UFC/ml de las bacterias planctónicas enumeradas en el agua de egreso a las salivaderas dentales de Z1.

Nº de consultorio	Valor Medio	Error Estándar	Nº de consultorio	Valor Medio	Error Estándar
1	3,13	0,34	16	4,50	0,39
2	3,18	0,35	17	3,80	0,28
3	4,36	0,48	18	5,30	0,57
4	3,43	0,36	19	4,30	0,38
5	2,86	0,25	20	4,08	0,29
6	4,40	0,47	21	4,40	0,45
7	4,45	0,42	22	4,73	0,47
8	3,19	0,38	23	5,02	0,49
9	3,97	0,41	24	5,20	0,55
10	4,35	0,37	25	4,30	0,38
11	4,48	0,38	26	5,29	0,56
12	5,20	0,50	27	4,50	0,39
13	3,90	0,25	28	4,51	0,40
14	4,60	0,42	29	4,51	0,40
15	4,20	0,40			

Tabla II.5- Valores medios y error estándar de las UFC/ml de las bacterias planctónicas encontradas en el agua de egreso hacia las salivaderas dentales Z2.

Nº de consultorio	Valor Medio	Error Estándar	Nº de consultorio	Valor Medio	Error Estándar.
1	3,20	0,34	16	4,22	0,38
2	3,50	0,35	17	3,20	0,36
3	4,20	0,38	18	3,70	0,37
4	3,80	0,36	19	4,30	0,36
5	2,86	0,23	20	4,08	0,31
6	3,30	0,35	21	4,40	0,37
7	4,00	0,37	22	4,70	0,37
8	3,10	0,31	23	5,02	0,40
9	3,90	0,36	24	5,26	0,41
10	3,60	0,35	25	4,30	0,40
11	3,50	0,29	26	5,29	0,43
12	3,80	0,35	27	4,50	0,38
13	3,13	0,30	28	2,86	0,23
14	3,53	0,32	29	3,10	0,31
15	4,20	0,36	30	4,62	0,64

Tabla II.6- Valores medios y error estándar de las UFC/ml de bacterias planctónicas enumeradas en la saliva de los pacientes sin enfermedad periodontal asistidos en los consultorios de Z1.

Nº de paciente	Valor Medio	Error Estándar	Nº de paciente	Valor Medio	Error Estándar
1	7,09	0,41	14	6,97	0,44
2	6,94	0,46	15	6,56	0,51
3	8,08	0,57	16	6,62	0,49
4	9,00	0,42	17	7,70	0,52
5	7,21	0,43	18	8,24	0,43
6	6,58	0,31	19	7,47	0,37
7	7,21	0,36	20	6,90	0,48
8	6,39	0,33	21	6,54	0,44
9	7,21	0,35	22	6,40	0,44
10	6,35	0,40	23	7,52	0,45
11	5,53	0,48	24	8,04	0,29
12	6,12	0,33	25	7,01	0,43
13	6,45	0,50			

Tabla II.7- Valores medios y error estándar de las UFC/ml de bacterias planctónicas enumeradas en la saliva de los pacientes sin enfermedad periodontal asistidos en los consultorios de Z 2.

Nº de pacientes	Valor Medio	Error Estándar	Nº de pacientes	Valor Medio	Error Estándar
1	6,15	0,67	14	6,05	0,58
2	7,21	0,69	15	6,35	0,44
3	7,7	0,63	16	7,21	0,52
4	6,42	0,43	17	8,00	0,62
5	5,87	0,48	18	6,69	0,61
6	8,80	0,53	19	6,85	0,45
7	6,26	0,57	20	6,60	0,54
8	6,60	0,57	21	6,11	0,50
9	6,75	0,65	22	7,00	0,59
10	7,18	0,59	23	6,36	0,59
11	7,26	0,58	24	6,44	0,65
12	6,66	0,66	25	5,87	0,64
13	8,02	0,62			

Tabla II.8- Valores medios y error estándar de las UFC/ml de los hongos planctónicos enumerados en el agua de egreso hacia las salivaderas de Z1.

Número de consultorio	Valor Medio	Error Estándar	Número de consultorio	Valor Medio	Error Estándar
1	2,21	0,21	16	2,18	0,22
2	2,12	0,20	17	2,05	0,15
3	2,27	0,21	18	2,11	0,20
4	2,26	0,30	19	2,16	0,23
5	2,25	0,23	20	1,84	0,19
6	2,13	0,25	21	2,54	0,11
7	2,02	0,18	22	2,44	0,30
8	2,07	0,19	23	2,19	0,18
9	1,88	0,20	24	2,00	0,20
10	2,03	0,21	25	2,23	0,28
11	1,78	0,34	26	2,13	0,23
12	2,17	0,14	27	2,06	0,20
13	2,02	0,19	28	1,84	0,18
14	2,20	0,19	29	2,26	0,19
15	2,13	0,15			

Tabla II.9- Valores medios y error estándar de las UFC/ml de los hongos planctónicos enumerados en el agua de egreso hacia las salivaderas de Z2.

Número de consultorio	Valor Medio	Error Estándar	Número de consultorio	Valor Medio	Error Estándar
1	2,33	0,30	16	2,22	0,25
2	2,53	0,34	17	2,22	0,25
3	1,99	0,19	18	2,36	0,26
4	2,33	0,17	19	2,27	0,20
5	2,02	0,20	20	2,67	0,30
6	2,02	0,11	21	2,47	0,20
7	2,03	0,20	22	2,33	0,21
8	2,27	0,24	23	2,26	0,20
9	2,31	0,25	24	2,20	0,13
10	2,15	0,21	25	2,34	0,19
11	2,00	0,16	26	2,02	0,11
12	2,35	0,20	27	2,26	0,20
13	2,44	0,30	28	2,33	0,22
14	2,45	0,30	29	2,27	0,21
15	2,15	0,13	30	2,18	0,24

Tabla II.10- Valores medios y error estándar de las de UFC/ cm² de las bacterias sésiles enumeradas en el interior de las cañerías metálicas con salida hacia las salivaderas dentales de Z1, 24 horas después de la higiene de los equipos dentales.

Número de consultorios	Valor medio	Error estándar	Número de consultorios	Valor Medio	Error Estándar
1	2,37	0,14	16	2,89	0,26
2	2,80	0,27	17	3,25	0,21
3	2,76	0,34	18	3,18	0,20
4	2,91	0,25	19	2,48	0,16
5	3,36	0,20	20	2,48	0,15
6	2,71	0,23	21	2,82	0,20
7	2,91	0,25	22	2,58	0,22
8	2,33	0,19	23	2,46	0,19
9	2,31	0,16	24	2,91	0,21
10	2,55	0,22	25	3,27	0,22
11	3,85	0,30	26	3,54	0,23
12	3,27	0,20	27	3,72	0,26
13	2,57	0,20	28	3,40	0,22
14	3,11	0,19			
15	2,40	0,15			

Tabla II.11- Valores medios y error estándar de las UFC/cm² de las bacterias sésiles enumeradas en el interior de las cañerías metálicas con salida hacia las salivaderas dentales de Z2, 24 horas después de la higiene de los equipos dentales.

Número de consultorios	Valor Medio	Error Estándar	Número de consultorios	Valor Medio	Error Estándar
1	3,90	0,30	16	2,62	0,16
2	3,81	0,25	17	2,58	0,14
3	3,18	0,22	18	2,93	0,19
4	3,23	0,23	19	2,73	0,20
5	3,90	0,29	20	3,07	0,21
6	3,67	0,25	21	3,18	0,19
7	3,67	0,25	22	2,62	0,15
8	3,14	0,19	23	2,69	0,16
9	3,72	0,26	24	2,67	0,15
10	3,63	0,24	25	2,62	0,14
11	3,63	0,24	26	2,93	0,23
12	4,03	0,31	27	2,74	0,22
13	3,85	0,28	28	2,73	0,20
14	3,45	0,21	29	3,90	0,30
15	3,27	0,19	30	3,54	0,23

Tabla II.12- Valores medios y error estándar de las UFC/cm² de los hongos sésiles enumerados en el interior de las cañerías metálicas con salida hacia las salivaderas dentales de Z1, 24 horas después de realizada la higiene de los equipos odontológicos.

Número de consultorio	Valor Medio	Error Estándar	Número de consultorio	Valor Medio	Error Estándar
1	8,40	0,72	16	6,20	0,57
2	8,40	0,72	17	7,40	0,65
3	10,40	0,90	18	7,00	0,60
4	7,33	0,65	19	8,40	0,69
5	8,80	0,76	20	5,43	0,58
6	6,66	0,58	21	6,66	0,60
7	4,50	0,35	22	6,60	0,60
8	10,4	0,90	23	6,40	0,58
9	8,60	0,75	24	7,04	0,64
10	8,80	0,77	25	7,50	0,68
11	8,80	0,77	26	7,00	0,61
12	7,00	0,60	27	6,04	0,55
13	7,01	0,62	28	5,44	0,46
14	6,04	0,55			
15	6,04	0,55			

Tabla II.13- Valores medios y error estándar de las UFC/cm² de los hongos sésiles enumerados en el biofilm de las cañerías metálicas con salida hacia las salivaderas dentales de Z2, 24 horas después de realizada la higiene de los equipos odontológicos.

Número de consultorio	Valor Medio	Error Estándar	Número de consultorio	Valor Medio	Error Estándar
1	8,2	0,72	16	6,64	0,55
2	6,4	0,56	17	6,32	0,52
3	5,73	0,48	18	5,75	0,48
4	6,6	0,57	19	5,56	0,45
5	6,33	0,54	20	6,02	0,57
6	7,00	0,60	21	7,20	0,61
7	4,55	0,35	22	8,08	0,66
8	8,8	0,75	23	6,55	0,54
9	7,00	0,58	24	6,73	0,58
10	6,03	0,51	25	6,02	0,51
11	6,04	0,51	26	8,02	0,66
12	7,10	0,58	27	5,79	0,57
13	7,33	0,60	28	10,02	0,88
14	7,00	0,58	29	8,30	0,74
15	6,08	0,53	30	6,20	0,56

Tabla II.14- Valores medios y error estándar de las UFC/cm² de las bacterias sésiles enumeradas en los cortes de acero inoxidable de las paredes internas próximas al desagüe colocados en las salivaderas dentales de Z1 y Z2 luego de 24 horas de exposición.

Nº de consultorio	Medias de Z1	Error estándar de Z1	Nº de consultorios	Medias de Z2	Error Estándar de Z2
1	2,46	0,31	1	2,23	0,34
2	1,94	0,39	2	1,57	0,26
3	1,57	0,31	3	2,38	0,37
4	1,79	0,34	4	1,91	0,36
5	1,57	0,31	5	1,87	0,24
6	1,49	0,42	6	2,15	0,34
7	1,64	0,38	7	1,68	0,27
8	1,57	0,26	8	1,56	0,39
9	1,87	0,30	9	1,72	0,24
10	2,17	0,34	10	1,42	0,13

Tabla II.15- Valores medios y error estándar de las UFC/cm² de las bacterias sésiles enumeradas en los cortes de acero inoxidable de las paredes internas próximas al desagüe colocados en las salivaderas dentales de Z 1 y Z 2 luego de 64 horas de exposición.

Nº de consultorio	Medias de Z1	Error Estándar de Z1	Nº de consultorios	Medias de Z2	Error Estándar de Z2
1	2,84	0,35	1	3,36	0,36
2	2,87	0,35	2	3,02	0,37
3	2,64	0,37	3	2,40	0,40
4	2,30	0,45	4	2,52	0,34
5	2,13	0,43	5	2,76	0,42
6	2,54	0,44	6	2,45	0,41
7	3,01	0,29	7	2,91	0,43
8	3,07	0,42	8	2,75	0,46
9	2,17	0,34	9	2,23	0,34
10	2,77	0,38	10	2,66	0,44

Tabla II.16- Valores medios y error estándar de las UFC/cm² de las bacterias sésiles enumeradas en los cortes de cerámica de las paredes internas próximas al desagüe colocados en las salivaderas dentales de Z 1 y Z 2 luego de 24 horas de exposición.

Nº de consultorio	Medias de Z1	Error Estándar de Z1	Nº de consultorios	Medias de Z2	Error Estándar de Z2
1	4,31	0,33	1	5,20	0,38
2	4,16	0,25	2	5,18	0,23
3	4,02	0,34	3	4,69	0,25
4	4,70	0,26	4	5,28	0,41
5	4,10	0,31	5	4,28	0,40
6	4,62	0,30	6	4,61	0,49
7	4,67	0,33	7	4,40	0,49
8	4,76	0,29	8	5,13	0,24
9	4,00	0,35	9	4,08	0,49
10	4,00	0,33	10	4,00	0,34

Tabla II.17- Valores medios y error estándar de las UFC/cm² de las bacterias sésiles enumeradas en los cortes de cerámica de las paredes internas próximas al desagüe colocados en las salivaderas dentales de Z 1 y Z 2 luego de 64 horas de exposición.

Nº de consultorio	Medias de Z1	Error Estándar de Z1	Nº de consultorios	Medias de Z2	Error Estándar de Z2
1	9,62	0,66	1	10,07	0,73
2	10,25	0,81	2	9,98	0,78
3	9,93	0,89	3	8,64	0,93
4	9,48	0,66	4	9,47	0,79
5	9,91	0,91	5	9,26	0,97
6	10,05	0,77	6	8,88	0,80
7	10,10	0,73	7	8,63	0,77
8	10,37	0,67	8	8,87	0,91
9	9,57	0,72	9	9,28	0,75
10	9,50	0,64	10	8,70	0,74

Tabla II.18- Valores medios y error estándar de las UFC/cm² de las bacterias sésiles enumeradas en los cortes de opalina de las paredes internas próximas al desagüe colocados en las salivaderas dentales de Z1 y Z2 luego de 24 horas de exposición.

Nº de consultorio	Medias de Z1	Error Estándar de Z1	Nº de consultorios	Medias de Z2	Error Estándar de Z2
1	2,99	0,24	1	3,36	0,31
2	2,86	0,24	2	3,74	0,25
3	2,40	0,26	3	3,29	0,34
4	2,46	0,29	4	3,87	0,38
5	2,50	0,26	5	3,85	0,40
6	2,57	0,29	6	3,63	0,30
7	2,58	0,30	7	3,31	0,31
8	2,26	0,33	8	3,81	0,40
9	2,47	0,30	9	3,80	0,35
			10	3,56	0,36

Tabla II.19- Valores medios y error estándar de las UFC/cm² de las bacterias sésiles enumeradas en los cortes de opalina de las paredes internas próximas al desagüe colocados en las salivaderas dentales de Z1 y Z2 luego de 64 horas de exposición.

Nº de consultorio	Medias de Z1	Error Estándar de Z1	Nº de consultorios	Medias de Z2	Error Estándar de Z2
1	4,19	0,34	1	5,19	0,46
2	4,81	0,31	2	5,12	0,46
3	4,62	0,48	3	4,89	0,39
4	4,37	0,55	4	4,44	0,50
5	3,57	0,50	5	5,25	0,42
6	4,57	0,57	6	5,22	0,51
7	4,14	0,46	7	5,33	0,38
8	4,52	0,39	8	4,47	0,45
9	4,62	0,48	9	4,76	0,54
			10	4,68	0,49

Tabla II.20- Valores medios y error estándar de los hongos sésiles enumerados en los cortes de acero inoxidable de las paredes internas próximas al desagüe colocados en las salivaderas dentales de Z1 y Z2, luego de 24 horas de exposición.

Número de consultorios	Medias de Z1	Error Estándar de Z1	Número de consultorios	Media de Z2	Error Estándar de Z2
1	2,44	0,34	1	2,38	0,37
2	2,17	0,33	2	2,17	0,33
3	2,17	0,37	3	2,17	0,45
4	2,17	0,37	4	1,96	0,49
5	1,22	0,28	5	2,17	0,39
6	1,55	0,35	6	2,90	0,42
7	2,00	0,37	7	1,65	0,37
8	2,28	0,43	8	2,07	0,35
9	2,07	0,42	9	2,10	0,37
10	2,15	0,39	10	2,44	0,41

Tabla II.21- Valores medios y error estándar de los hongos sésiles enumerados en los cortes de acero inoxidable de las paredes internas próximas al desagüe de las salivaderas dentales de Z1 y Z2, luego de 64 horas de exposición.

Número de consultorios	Medias de Z1	Error Estándar de Z1	Número de consultorios	Medias de Z2	Error Estándar de Z2
1	3,30	0,29	1	3,79	0,34
2	3,33	0,41	2	3,89	0,48
3	3,67	0,45	3	3,44	0,46
4	3,18	0,35	4	2,85	0,35
5	3,39	0,30	5	3,40	0,52
6	3,30	0,41	6	3,49	0,52
7	3,22	0,40	7	3,30	0,38
8	2,90	0,30	8	3,76	0,39
9	3,27	0,45	9	4,27	0,31
10	3,69	0,39	10	4,09	0,43

Tabla II.22- Valores medios y error estándar de los hongos sésiles enumerados en los cortes de cerámica de las paredes internas próximas al desagüe colocados en las salivaderas dentales de Z1 y Z2, luego de 24 horas de exposición.

Número de consultorios	Medias de Z1	Error Estándar de Z1	Número de consultorios	Medias de Z2	Error Estándar de Z2
1	4,56	0,41	1	6,63	0,55
2	4,62	0,51	2	6,41	0,48
3	4,41	0,68	3	5,66	0,60
4	5,42	0,68	4	5,20	0,67
5	5,61	0,51	5	6,21	0,71
6	5,09	0,65	6	5,48	0,75
7	5,26	0,67	7	4,62	0,71
8	6,26	0,73	8	5,44	0,52
9	5,95	0,73	9	5,85	0,59
			10	5,55	0,49

Tabla II.23- Valores medios y error estándar de los hongos sésiles enumerados en los cortes de cerámica de las paredes internas próximas al desagüe colocados en las salivaderas dentales de Z1 y Z2, luego de 64 horas de exposición.

Número de consultorios	Medias de Z1	Error Estándar de Z1	Número de consultorios	Medias de Z2	Error Estándar de Z2
1	7,97	0,47	1	7,61	0,70
2	8,35	0,80	2	6,37	0,70
3	8,53	0,88	3	9,91	1,40
4	7,30	0,61	4	6,59	0,85
5	6,78	0,63	5	6,15	0,80
6	5,61	0,65	6	7,03	0,88
7	7,66	0,61	7	7,86	0,95
8	8,41	0,49	8	9,35	0,90
9	7,48	0,62	9	6,15	0,76
			10	6,71	0,61

Tabla II.24- Valores medios y error estándar de los hongos sésiles enumerados en los cortes de opalina de las paredes internas próximas al desagüe colocados de las salivaderas dentales de Z1 y Z2, luego de 64 horas de exposición.

Número de consultorios	Medias de Z1	Error Estándar de Z1	Número de consultorios	Medias de Z2	Error Estándar de Z2
1	4,56	0,41	1	5,06	0,43
2	4,62	0,51	2	5,34	0,51
3	4,41	0,58	3	5,12	0,62
4	4,00	0,58	4	4,99	0,61
5	4,78	0,55	5	4,10	0,52
6	4,40	0,58	6	4,47	0,50
7	2,96	0,53	7	3,34	0,47
8	3,89	0,60	8	3,76	0,73
9	4,13	0,53	9	4,44	0,58
10			10	3,86	0,56

Tabla II.25- Valores medios y error estándar de los hongos sésiles enumerados en los cortes de opalina de las paredes internas próximas al desagüe colocados en las salivaderas dentales de Z1 y Z2, luego de 64 horas de exposición.

Número de consultorios	Medias de Z1	Error Estándar de Z1	Número de consultorios	Medias de Z2	Error Estándar de Z2
1	5,03	0,50	1	6,63	0,55
2	4,66	0,68	2	5,41	0,48
3	4,96	0,68	3	5,66	0,60
4	5,42	0,68	4	5,20	0,67
5	5,61	0,51	5	6,21	0,71
6	5,09	0,65	6	5,48	0,75
7	6,26	0,67	7	4,62	0,71
8	6,52	0,73	8	5,44	0,52
9	5,95	0,73	9	5,85	0,56
			10	6,23	0,45

BIBLIOGRAFÍA

10- BIBLIOGRAFÍA.

- 1- Ábalos, C: Adhesión bacteriana a biomateriales. Avances en Odontostomatología. Ene-feb, 2005; 21 (1): 347-351.
- 2- ADA Council on Scientific affairs: Dental Unit Waterlines: Approaching the year 2000. J. Am. Dent. Assoc. 1999; 130:1633-64.
- 3- Amow, P.M; Weil, D; *et al*: Prevalence and significance of *Legionella pneumophila* of residential hot-tap water systems. J. Infect. Dis. 1985; 152:145-151.
- 4- Ariza Barrera, Rocío; Hernández Francisco: Análisis ultraestructural del fenómeno de “swarming” en *Clostridium beijerinckii* “. Rev. Costarric. Cienc. Méd. jun. 1999; 20 (1-2): 29-34.
- 5- Armon, R; Starosvetzky, T; Arbel T; *et al*: Survival of *Legionella pneumophila* and *Salmonella typhimorium* in biofilm systems. Water Sci.Technol.1997; 35:293.
- 6- Ashwell, C; Hartford, H: Carbohydrate- specific receptors of the liver. Ann. Rev. Biochem. 1982; 51: 531-554.
- 7- Austin, J. W; Sanders, G; Kay, W.W; *et al*: Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. FEMS Microbiol. Lett 1998; 162 (2): 295-301.
- 8- Azzimonti Renzo, J. C: Análisis de Varianza (ANOVA). Bioestadística Aplicada a Bioquímica y Farmacia Universitaria 2003, p.340-451.
<http://158.170.1.89/WEB/MATEMÁTICA/apestdes/tema17.pdf>
<http://158.170.1.89/WEB/MATEMÁTICA/ap est des/tema18.pdf>
- 9- Bagga, B. S. R; Murphy, R. A; *et al*: Contamination of dental unit cooling water with oral microorganisms and its prevention. J. Am. Dent. Assoc. 1984; 109, 712-716.
- 10- Barbeau, Jean; Tanguay, Richard; Faucher, Esther; *et al*: Multiparametric analysis of waterlines contamination in dental units. Applied and Environment Microbiology nov. 1996; 62 (11): 3954-3959.
- 11- Barbeau, J; Gauthier, C; and Payment, P: Biofilms, infections agents, and dental unit water-lines: a review. Can. J. Microbiol. 1998; 44: 1019-1028.
- 12- Barbeau, Jean: Waterborne Biofilms and Dentistry: the changing of infection control. J. Can. Dent. Assoc. 2000; 66: 539-41.
- 13- Barrancos Mooney, Julio; Rodríguez, Guillermo A: Cariología. En Barrancos Mooney, J.- Barrancos Money, P. Operatoria Dental. 2006; 4º Edición, Edit. Médica Panamericana, 2006. p. 297-337.
- 14- Benedetti, P; Insausti, J. W; Iurman, L; *et al*: Deformación y corrosividad de chapas de acero sometidas a tracción. Jornadas SAM 2000- IV Coloquio de Fractura y fatiga. Agosto, 2000; 483-490.

- 15- Benson, R. F; and Fields, B. S: Classification of the genus *Legionella*. Semin. Respir. Infect. 1998; 13: 90-99.
- 16- Bernal, I; Cabezas, H; Espitia, C; *et al*: Análisis próximo de arcillas para cerámica. Rev. Acad. Coloma. Ciencia 2003; 27 (105):569-578.
- 17- Bing-Yan, Wang; and Kuramitsu, Howard K: Interactions between oral bacteria: Inhibition of Strepto-Bacteriocin production by *Streptococcus gordonii*. Appl. Environ Microbiol. 2005, January; 71(1): 354-362.
- 18- Blagwat, S. P; Nary, J; and Burne, R.A: Effects of mutating putative two- component systems on biofilm formation by *Streptococcus mutans*. FEMS- Microbiol. Lett. 2001; 205: 225-230.
- 19- Blehert, D.S; Palmer, R. J. Jr; Xavier, J. B; *et al*: Autoinducer 2 production by *Streptococcus gordonii* DL 1 and the biofilm: phenotype of a lux *S. mutans* are influenced by nutritional conditions. J. Bacteriol. 2003; 185: 4851-4860.
- 20- Bos, R; van der Mei, H.C; and Busshcher, H. J: A quantitative method to study co-adhesion of microorganisms in a parallel plate flow chamber.II. Analysis of the kinetics of co-adhesion. J. Microbiol. Methodos 1995; 23: 169-182.
- 21-Boulangue Peterman, L; Rault, J; and Bellon- Fontaine, M.N: Adhesion of *Streptococcus termophyllus* to stainless steel with difference surface topography and roughness. Biofouling 1997; 11, 201-216.
- 22- Boyd, R.D; Verran, J; Jones, M.V; *et al*: Use of the atomic force microscope to determine the effect of substratum surface topography on bacterial adhesion. Langmuir 2002; 18: 2343-2346.
- 23- Bradshaw, D.J; Marsh, P. D; Watson, G. K; *et al*: Potential role for coaggregation in microbial community development “ in vitro”. J. of Dent. Res. 1996; 75: 206.
- 24- Branda, S. S; Viks Friedman, L; Kolter, R: Biofilms: the matrix revisited. Trends Microbiol. 2005; 13 (19): 20- 26.
- 25- Butler, T; Durso, G; Friso, E; *et al*: Variaciones microbiológicas del biofilm en tuberías de equipos odontológicos. Salud Bucal 1999; N° 88: 19-21.
- 26- Butler, T; Friso, E; Durso, G; *et al*: Variaciones del agua de ingreso y egreso de los equipos odontológicos relacionados con el biofilm. Rev. Ciencias Morfológicas agosto 2002; Año 6, VI (9): 29-35.
- 27- Butler, T; Friso, E; Durso, G; *et al*: Biofilm comparative study in triple syringes. Rev. Ciencias Morfológicas Junio 2005; Año 7, VII (1): 10.
- 28- Butler, T; Durso, G; Giachella, E; *et al*: Prevención de la contaminación del agua en jeringas triples. Publicación Informativa y Científica de la FOLP 2006; año: 3 (1): 55-59.

- 29- Cadwell, Douglas E; Atuku, Elijah; Wilkie, Darryl C; *et al*: Biofilms on oral surfaces: implications for health and disease". *Adv. Dent. Res.* 1997, April; 11 (1): 4-131.
- 30- Camesano, T. A; Logan, B.E: Probing bacterial electrosteric interactions using atomic force microscopy. *Environmental Science and Technology* 2000; 34: 3354-3362.
- 31- Characklis, W. G; and Marshall, K. C: Biofilm and microbial fouling. *Advances in Applied Microbiology* 1983; 29: 93-138.
- 32- Characklis, William G: Influencia de las biopelículas microbianas en los procesos industriales. Reunión de trabajo Argentino- estadounidense sobre Biodeterioro de Materiales (CONICET_NSF). La Plata (Argentina). Abril, 1985; 21: 185-221. Ed. Aquate Química, S. A.
- 33- Charland, R; Prévost, A. P; Barbeau, J; *et al*: Contamination des instruments rotatifs. À propos du problème et de ses solutions. *J. Dent. Québec* 1994; XXXI: 213-177.
- 34- Clark, A: Bacterial colonization of dental units and the nasal flora of dental personnel. *Proc. R. Soc. Med.* 1974; 64: 1269-70.
- 35- Código Alimentario Argentino: Microbiología del agua de bebida. Resolución Conjunta 68/2007 y 196/2007 Modificación.
- 36- Costerton, J. W; Lewandovski, Z; Cadwell, D. E; *et al.*: Microbial biofilms. *Ann. Rev. Microbiol.* 1995; 49 : 711-745.
- 37- Costerton, J.W.; Philip, S. S; Greenberg, E. P: Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284:1318-1322.
- 38- Costerton, J.W.; J. Philip; S. Stewart:"Películas bacterianas". *Investigación y Ciencia.* Setiembre, 2000; 55-62.
- 39- Cucarella, C; Solano, C; Valle, J; *et- al*: Bap, a *staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 2001; 183: 2888-2896.
- 40- Daeschel, M.A; and McGuire, J: Interrelationships between protein surface adsorption and bacterial adhesion. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 1998; 15: 413-438.
- 41- Dagostino, L; Goodman, A. D; and Marshall, K. C: Physiological responses induced in bacteria adhering to surfaces. *Biofouling* 1991; 4: 113-119.
- 42-Daniels, Ruth; Vanderleyden, Jos; Michiels, Jan: Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 2004, june; 28 (3): 261-289.
- 43- Davey, M. E; O'Toole, G. A: Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2006; 64 (4): 847- 867.
- 44- Davies, D. G; Parsek, M. R; Pearson, J. P; *et al*: The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterias biofilm. *Science* 1998; 280: 295-298.

- 45- De Graff, J; Winkelhoff, A. J, and Goene, R. J: The role of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontal disease. *Infection* 1989, July; 17 (4): 144-148.
- 46- De Mello, José D. B; y Bálamo, Paulo S: Aceros”. *Información tecnológica*. 2006; 17 (6): 20-57.
- 47- Faruque, S. M; Albert, M. J; and Mekalanos, J: Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998; 62: 1301-1314.
- 48- Ferrari, M. D; Mele M. F. L. de; Videla H. A: Corrosión microbiológica y Biofouling en sistemas industriales. *Manual Práctico de Biocorrosión para la Industria*. CYTED (Programa Ibero Americano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo). 1995; 4 -20.
- 49- Franco, F. F. S; Sprati, D; Leao, J. C; *et al*: Biofilm formation and control in dental unit water lines. *Biofilms* 2005; 2: 9-17.
- 50- Friedman, M. T; Barber P. M; Mordan, N. J; *et al*: “ The“plaque- free zone” in health and disease : a scanning electron microscopic study”. *J. Periodontol.* 1992; 63: 890-896.
- 51- Gaylarde, C. C: Advances in the detection of microbiologically induced corrosion. *International Biodeterioration* 1990; 26: 11-22.
- 52- Gibbons, R.J; Etherden, I; Moreno, E.C: Association of neuraminidase- sensitive receptors and putative hydrophobic interactions with high- affinity binding sites for *Streptococcus sanguis* C 5 in salivary pellicles. *Infect. Immun.* 1983; 42: 1006- 1012.
- 53- Göttlich, E; van der Lubbe, W; Lange, B; *et al*: Fungal flora in groundwater-derived public drinking water. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2002; 12: 260-279.
- 54- Guerrero, R; Berlanga, M: La “inmortalidad” procariótica y la tenacidad de la vida. *Inmort- Bact- Act. SEM- Dic.* 2001; 32:16.
- 55- Guilarte, C; y Perrone, M: Microorganismos de la placa dental relacionados con la etiología de la periodontitis. *Acta Venezolana*, Caracas, setiembre, 2004; 42 N° 3: 5-10.
- 56- Hara, A.T; Karlinsey, R. L; *et al*: Dentine remineralisation by simulated saliva formulations with different Ca and P; contents. *Caries Res.* 2007, november; 42 (1): 51-56.
- 57- Haverstein, L. S; Gaustad, P; Nes; I. F; *et al*: Identification of the Streptococcal competence – phenome receptor. *Molec. Microbiol.* 1996; 21:863-869.
- 58- Hernández; Francisco; Rodríguez, Evelyn: El fenómeno de swarming y otros tipos de desplazamientos bacterianos. *Rev. Costarric. Cienc. Méd.* mar- jun, 1993; 14 (1-2): 39-45.
- 59- Hinojosa Rivera, Moisés; Reyes Melo, Martín Edgar: La rugosidad de las superficies: Topometría. *Ingenierías*, Abril- Junio 2001; IV (11): 23-30.
- 60- Hsu, S.D; Cisar, J .O; Sandberg, A .L; *et al*: Adhesive properties of *viridans Streptococcae* 3 species. *Microbiol. Ecol. Health Dis.* 1994; 7: 125-137.

- 61- Instituto Argentino de Racionalización de Materiales. Rugosidad de superficies. Norma IRAM 5065. Enero, 1964; Buenos Aires, Argentina.
- 62- Irvin, K. J; Gladman, T; and Pickering, F. P: The strength of austenitic stainless steels. *Journal of the Iron Steels ISI J Int.* 2001; 41 (9): 1018-1027.
- 63- Jonas, Cristina; Tomenius, Henrik; Kader, Abdul; *et al*: Roles of curli, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. *BMC Microbiol.* 2007; 7: 70.
- 64- Jones, H; Pinker, J. S; Roth, R; *et al*: Fhln H adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 2081-2085.
- 65- Kaplan, J. B; Meyenhofer, M. F; and Fine, D. A: “ Biofilm growth and detachment of *Actinobacillus actinomycetecommittans*”. *J. Bacteriol.* 2003; 185: 1399-1404.
- 66- Karpay, R. L; Plamondon, T. J; Mills, S. E; *et al*: Combining periodic and continuous sodium hypochlorite treatment to control biofilms in dental unit water systems. *J. Am. Dent. Assoc.* 1999; 130: 957-965.
- 67- Kazemi, Reza B; Stenman, Evert; *et al*: A comparison of stainless steel and nickel-titanium instruments of identical design: tensional and bending tests. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics* 2000, October; 90 (4): 500-506.
- 68- Kölbel-Boelke, J; Tineken, B; *et al*: Microbial communities in the saturated ground water environment I. Methods of isolation and characterization of heterotrophic bacteria. *Microb. Ecol.* 1988; 16: 17- 29.
- 69- Kolenbrander, P. E: Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetics systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 2000; 54: 413-437.
- 70- Kohn, William G; Harte, J. A; Malvita, D.M: Guidelines for infection control in dental health care settings-2003. *J. Am. Dent. Assoc.* 2004; 135 (1): 33-37.
- 71- Kuhmer, Eleanora; Berveghieri, Mario; Cova, Marisa; *et al*: Microbial air analysis in dental surgeries: a comparison between two methods. *Aerobiología* 1996, december; 12 (1): 197-200.
- 72- Lasa Uzcudum, Iñigo: Biofilms bacterianos. *Actualidad SEM* 2006; 37:14-18.
- 73- Lee, T. K; Waked, E. J; Wolinsky, L. E; *et al*: Microbial contamination in dental unit waterlines. *J. Calif. Dent. Assoc.* 2001; 29: 679-684.
- 74- Lewandowsky, Z; Stoodley, P; Altobelli Fukushima, E: Hydrodynamic and kinetics in biofilm systems- recent advances and new problem. *Water Sci. Technol.* 1994; 29:223-229.

- 75- Li, Y.H; Bowden, G.H: Characteristics of accumulation of oral Gram positive bacteria on mucin- conditioned glass surfaces in model system. *Oral Microbiol. Immunol.* 1994; 9:1-11.
- 76- Linton, D; Karlysher, A. V; and Wren, B. W: Deciphering *Campylobacter jejuni* cell surface interactions from genome sequence. *Curr. Opin. Microbiol.* 2001; 4: 35-40.
- 77- Listgarten, M. A: Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. *J. Periodontol.* 1976; 47: 1-18.
- 78- Loesche, W.J: Ecology of the oral flora. En Nisengard, R. J; Newman M.G editors, *Oral Microbiol and Immunol* 1988; p.p. 307-319. Philadelphia, P. A: W. B: Sanders Co.
- 79- Loo, C. J; Corliss, A; and Gauerhkumar, N: *Streptococcus gordonii* biofilm formation: identification of genes that code for biofilm phenotypes. *J. Bacteriol.* 2000; 182: 1374-1382.
- 80- Macchi, Luis Ricardo: Prueba t. Análisis de Variancia. Introducción a la Estadística Aplicada en Ciencias de la Salud. Panamericana, 2001.p. 82-104.
- 81- Mayo, J. A; Oerding, K. M; Andrieu, S. C: Bacterial biofilm: a source of contamination in dental air-water syringes. *Clin. Prev. Dent.* 1990; 12:15-20.
- 82- Mayo, J. A; Brown, C. E: Effect of in-line bacteriological filters on numbers of heterotrophic bacteria in water emitted from non autoclavable dental air-water syringes. *J. Am. Dent.* 1999; 12 (5): 256-60.
- 83- Marcantoni, Mabel: Caries dental. Antimicrobianos y vacunas para su control. En Negroni, M. *Microbiología Estomatológica.* Panamericana, 1999. p. 220-221.
- 84- Marcantoni, M; Piovano, S; Gobianchi, A; *et al*: Comparación de dos métodos de cultivo para *Streptococcus mutans* del grupo mutuas. *Rev. AAON* 2000; 28 (4): 6-10.
- 85- Meléndez- Martínez, J. J; Gómez- García, D; Domínguez- Rodríguez, A: Mecanismos de deformación plástica en policristales con fases secundarias vítreas. *Bol. Soc. Esp. Ceram.* 2005; 44 (5): 328-334.
- 86- Merino, S; Gavin, R; Altarriba, M; *et al*: The Mg⁺ E Mg²⁺ transport protein is involved in *Aeromonas hydrophila* adherente. *FEMS Microbiol.* 2001; 198:189-195.
- 87- Mills, S. E; Kuchne, J. C; and Bradley, D. V: Bacteriological analysis high-speed handpiece turbines. *J. Amm. Dent. Assoc.* 1993; 124 (1): 59-62.
- 88- Miller, C. H; Altweis, M. L; Palenik, C. J; *et al*: Removal of bacteria from dental unit water using an in-line filter. Paper presented at: Organization for Safety and Asepsis Procedures Annual Symposium; June 13, 1996; Las Colinas, Texas.
- 89- Miller CH: Microbes in dental unit water. *J Calif Dent Assoc* 1996; 24 (1): 47-52.

- 90- Moller, S; Stenberg, C; Andersen, J. B; et al: In situ gene expression in mixed-culture biofilms: evidence of metabolic interactions between community members. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64: 721-732.
- 91- Montebugnoli Lucio; and Dolci; Giovanni: A new chemical formulation for control of dental unit contamination: An “in vitro” and clinical “study”. *BMC Oral Health* 2002; 2:1-5.
- 92- Monteiro de Souza- Gugelmin, María Cristina; Torre Lima, Carolina; Della, Marques *et- al*: Microbial contamination in dental unit waterlines. *Brazilian Dental Journal* 2003, June; 14 (1): 140-148.
- 93- Názar, Julio C: Biofilms bacterianos. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello*, 2007; 67: 61-72.
- 94- Noiriet, J; and Ebisu, S: The localization of periodontal pockets. *J. Dent. Res.* 2001; 80: 1930-1934.
- 95- Oertling, K. M; and Andrieu, S. C: Bacterial biofilm: a source of contamination in dental air-water syringes. *Clin. Prev. Dent.* 1990; 12 (2): 13-20.
- 96- O’Toole, G. A; Kolter, R: Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS 365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways a genetic curalysis. *Mol. Microbiol.* 1998; 28: 449-461.
- 97- Palmer, R. J. Jr; Gordon, S. M; Cisar, J. O; *et al*: Coaggregation- mediated interactions of Streptococci and Actinomyces detected in initial human dental plaque. *J. Bacteriol.* 2003; 185: 3400-3409.
- 98- Pankhurst, C. L; and Philpott-Howard, J. N: The microbiological quality of water-air dental chair units. *J. Hosp. Infect.* 1993; 23 (3): 167-174.
- 99- Pankhurst, C. L; Johnson, N. W: Microbial contamination of dental unit waterlines. scientific argument. *Inter. Dent. J.* 1998; 48, 359-368.
- 100- Párasek, M.R; & Greenberg, E. P: Acyl- homoserine lactone quorum sensing in Gram – negative bacteria: A signalling mechanism involved association with higher organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2000; 97: 8789-8793.
- 101- Paster, B; Bocher, S. K; Galvin, J. L; *et al*: Bacteria diversity in human subgingival plaque. *J. Bacteriol.* 2001; 183: 3770-3783.
- 102- Penn, R. G; Sanders, C. C: Colonization of the oropharynx with Gram-negative bacilli: a major antecedent to nosocomial pneumonia. *AM J. Infect. Control* 1981; 9: 25-34.
- 103- Petti, Stefano D. M. D; Tarsitani, Gianfranco M. D: Detection and quantification of dental unit water line contamination by oral streptococci. *Infection control and Hospital Epidemiology* 2006, may; 27 (5): 504-509.

- 104- Picioreanu, C; van Loosdrecht M. C; and Heijnen J. J: Two-dimensional model of biofilm etachment caused by internal stress from liquid flow. *Biotechnol. Bioeng.* 2001; 72: 205-218.
- 105- Piovano, Susana: Microbiología de la enfermedad periodontal, de la periimplantitis, de los conductos radiculares y de los procesos periapicales. En Negroni Marta.- *Microbiología Estomatológica, Panamericana* 1999. p.255.
- 106- Porteus, N. B; Grooters, A. M; Redding, S. W; *et al*: Identification of *Exophiala mesophila* isolated from treated dental unit waterlines. *J. Clin. Microbiol.* 2003, August; 41 (8): 3885-3889.
- 107- Purevdorj- Gage, L.B; and Stoodley, P: Biofilm structure, behavior, and hydrodynamics in biofilms. Edited by Channoum and O'Toole G. A. 2004; ASM Press, Washington, D. C.
- 108- Quirynem, M; Bollen, L: The influence of surface roughness and surface –free energy on supra and gingival plaque formation in man. *J. Clin. Periodontol.* 1995; 22:1-14.
- 109- Rasita Harskey, M: Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual Review of Microbiology* 2003, October; 57: 249-273.
- 110- Recht, J; and Kolter, R: Glycopeptidoglipidacetylation affects sliding motility and biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* 2001; 183: 5718-5724.
- 111- Rey Millares, Manuel: Medios de cultivo selectivos, coloraciones compuestas. *Técnica Microbiológica.* López Libreros, 1960, p. 50-95.
- 112- Rondón, Clara de Rodríguez; y Elizalde, Graciano: Composición química mineralógica de microagregados de suelos. Arcillas para cerámicas. *Agronomía Trop.* 1997; 43 (3): 331-345.
- 113- Sánchez Rodríguez, Sergio Hugo: Adaptación de las especies a través de cambios genéticos influenciados por el medio ambiente. *Revista electrónica de Veterinaria* Febrero, 2005; VI N° 2 www.veterinaria.org/revistas/revdet
- 114- Schulze-Robbecke, R; Feldmann, C; Fischeider, R; *et al*: Dental units: an environmental study of sources of potentially pathogenic mycobacteria. *Tuber. Lung. Dis.* 1995; 76:318-23.
- 115- Serrano-Granger, Jorge; Herrera, David: La placa dental como biofilm. *RCOE Madrid*, jul-ago. 2005; 10 (4): 22-35.
- 116- Shanon E., Mills D. D. S: The dental unit waterline controversy: defusing the myths, defining the solutions. *J. Am. Dent. Assoc.* 2000; 131 (10): 1427-1441.
- 117- Shearer, B. G: “La película biológica y la clínica odontológica”. *Archivos de Odontoestomatología.* 1996, September; 12 (9): 525-534.

- 118- Singleton, S; Treloar, R; Warren, P; *et al*: Methods for microscopic characterization of oral biofilm: analysis of colonization, microstructure and molecular transport phenomena. *Adv. Dent. Res.*1997; 11:133-149.
- 119-Slots, Jorgen; Reynolds, H.S; and Genco, R. J: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. *Infect. Immun.* 1980, september; 29 (3): 1013-1020.
- 120- Smith, A. J; Bagg, J; and Hood, J: Use of chlorine dioxide to disinfect dental unit waterlines. *Journal of Hospital Infection*, 2001, December; 49 (4): 285-288.
- 121- Söderström, K. O; Parvimen Leena-Maija; and Parvimen, M: Early detection of cell damage by supravital acridine orange staining. *Cellular and Molecular Life Sciences* 1977, feb; 33 (2): 265.
- 122- Stoodley, P; Lewandowski, Z; Boyle, J. D; *et al*: Oscillation characteristics of film streamers in turbulent flowing water as related to drag and pressure drop. *Biotechnol Bioeng* 1998; 57:536-544.
- 123- Stoodley, P; Sauer, K; Davies, D.G; *et al*: Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology* 2002; 56:187-209.
- 124- Stuet, J. E; and Yu, V.L: Legionellosis. *N. Engl. J. Med.*1997; 337: 682-5613.
- 125- Szymanska, J: Risk of exposure to Legionella in dental practice. *Ann. Agric. Environ. Med* 2004; 11:9-12.
- 126- Szymanska, J: Control methods of the microbial water quality in dental unit waterlines. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2005a; 10: 1-4.
- 127- Szymanska, Jolanta: Evaluation of mycological contamination of dental unit waterlines. *Ann Agric Environ Med* 2005b; 12: 153-155.
- 128- Trulear, M. G; Characklis, W. G: Dynamic of biofilm processes. *J. Water Pollution Control Fed .* 1982; 54: 1288-1301.
- 129- van Ruyven, F. O; Lingstron, P; *et al*: Relationship among *mutans Streptococci*, “low-Ph” bacteria, and iodophilic polysaccharide producing bacteria in dental plaque and early enamel caries in humans. *J. of Dent. Res.* 2000; 79: 778-784.
- 130- Verran, J; Rowe, D. I; Boyd, R. D: The effect of nanometer dimension topographical features on the hygienic surface of stainless steel. *Journal of Food Protection* 2001; 64: 1183-1187.
- 131- Videla, H. A; and Characklis W. G: Biofouling and microbiologically influenced corrosion. *Internat. Biodeter. Biodegrad.* 1992; 20: 195-212.
- 132- Vieira, M. J; Melo, L. P; and Pinheiro, M. M: Biofilm formation: hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. *Biofouling* 1993; 7: 67-80.

- 133- Wadowsky, R. M; and Yee R. B: Effect of non-Legionellaceae bacteria on the multiplication of *Legionella pneumophila* in potable water. Appl. Environ. Microbiol. 1995; 49: 1206-1210.
- 134- Walker, James T; Bradshaw, David J; Bennett, Allan M; *et al*: Microbial biofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general dental practice. Appl. Environ. Microbiol. 2000, Aug; 66 (8): 3363-3367.
- 135- Walker, J. T; Bradshaw, D; Fulford, M. R; *et al*: Microbiological evaluation of a range of disinfectant products to control mixed-species biofilm contamination in a laboratory model of a dental unit water systems. Appl. Environ. Microbiol. 2003; 69: 3327-3332.
- 136- Whitehead, K. A; Colligon, J. S; Verran, J: The production of surfaces of defined topography and chemistry for microbial retention studies, using ion beam sputtering technology. International Biodeterioration & Biodegradation 2004; 54: 143-151.
- 137- Whitehead, Kathryn A; Colligon, John; Verran, Joana: Retention of microbial cell in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2005; 41: 129-138.
- 138- Wilson, Delgado, Azareño, Gabriel, Flores Mana, Víctor, Vives Barreto: Control de las infecciones transmisibles en la Práctica odontológica. Norma Técnica Bioseguridad en Odontología. Universidad Particular Cayetano Heredia. Lima- Perú 2005. p. 32-43.
- 139- Williams, J. F; Johnston, A. M; Johnston, B; *et al*: Microbial contamination of dental unit waterlines prevalence, intensity and microbiological characteristics. J. Am. Dent. Assoc. 1993; 124: 59-65.
- 140- Williams, J. F; Molinari, J. A; and Andrews, N: Microbial contamination of dental units waterlines: origins and characteristics. Compend. Contin. Educ. Dent. 1996; 17: 538-540.
- 141- Wirthlin, M. R; Marshall, G. W. Jr; Rowland, R. W: Formation and contamination of biofilm in dental unit waterlines. J. Periodontol. 2003, Nov.; 74 (11): 1595- 1609.
- 142- Wozniak, M.J; Glowaka, A; and Kozubowski, J. A: Magnetic properties os austeno-ferritic steel after cathodic hydrogen charging. Journal of Alloys and Compounds December, 2006; 8: 404-406.
- 143- Ximenez- Fyvie L. A; Afea A. D; and Socransky S. S: Comparision of the microbiota of supra-and subgingival plaque in health and periodontitis. J. Clin. Periodontol. 2000; 27: 722-732.
- 144-Yabune, T; Imazato, S; Ebisu, S: Inhibitory effect of PVDF tubes on biofilm formation in dental unit waterlines. Dent. Mater. 2005, Aug.; 21 (8): 780-6.
- 145-Yamamoto A; Mishima S; Maruyama N; *et al*: New technique for direct measurements of the shear force necessary to detach a cell from a material. Biomaterials 1998; 19: 871-879.

146- Yang, X; Beyenal, H; Harbin, G; *et al*: Quantifying biofilm structure using image analysis. *J. of Microbiol. Methods* 2000; 39:109-119.

147- Yeung, M.K; Donkersloot, J.A; Cisar, J.O; *et al*: Identification of a gene involved in assembly of *Actinomyces naeslundii* T 14 V type 2 fimbriae. *Infect. Immun.* 1998; 66: 1482-1491.

148- Zhang, T.C; and Bishop, P.L: Density, porosity, and pore structure of biofilm. *Water Res.* 1994; 28: 2267-2277.

149- Zobell, C.E: The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of Bacteriology* 1943; 46: 39-56.