

**EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DE CEPILLOS CONTAMINADOS POR
Klebsiella pneumoniae ATCC 700603 y *Klebsiella oxytoca* ATCC 43086**

**Maira Daniela Rojas Reyes
Danna Sofia Valbuena Sánchez**

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE
PROGRAMA ODONTOLOGÍA - FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
BOGOTÁ D.C - JUNIO 2022**

HOJA DE IDENTIFICACIÓN

Universidad	El Bosque
Facultad	Odontología
Programa	Odontología
Título:	Evaluación microbiológica de cepillos contaminados por <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 y <i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 43086
Grupo de investigación	Unidad de Investigación Básica Oral (UIBO)
Línea de investigación:	Microbiología Oral
Institución participante:	Instituto UIBO- Laboratorio de microbiología Oral
Estudiantes	Maira Daniela Rojas Reyes Danna Sofia Valbuena Sánchez
Director:	Dra. Nathaly Andrea Delgadillo
Co director:	Dra. Diana Marcela Castillo
Asesor metodológico:	Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

OTTO BAUTISTA GAMBOA	Presidente del Claustro
JUAN CARLOS LÓPEZ TRUJILLO	Presidente Consejo Directivo
MARIA CLARA RANGEL GALVIS	Rector(a)
NATALIA RUÍZ ROGERS	Vicerrector(a) Académico
RICARDO ENRIQUE GUTIÉRREZ MARÍN	Vicerrector Administrativo
GUSTAVO SILVA CARRERO	Vicerrectoría de Investigaciones.
CRISTINA MATIZ MEJÍA	Secretaria General
JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS	División Postgrados
MARIA ROSA BUENAHORA TOVAR	Decana Facultad de Odontología
MARTHA LILILIANA GOMEZ RANGEL	Secretaria Académica
DIANA MARIA ESCOBAR JIMENEZ	Director Área Bioclínica
ALEJANDRO PERDOMO RUBIO	Director Área Comunitaria
JUAN GUILLERMO AVILA ALCALÁ	Coordinador Área Psicosocial
INGRID ISABEL MORA DIAZ	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología

“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, damos gracias a Dios por todas las bendiciones recibidas, por darnos la salud, bienestar, entendimiento y la capacidad para permitirnos culminar los estudios.

Queremos agradecerles de manera especial y sincera a cada uno de los docentes que hicieron parte de esta formación integral, por el apoyo, la dedicación y la paciencia, que deja como producto un grupo de graduados en odontología con bases en conocimientos, fundamentos y valores para ejercer responsablemente esta profesión. Agradecemos a nuestros padres y familiares que fueron parte importante en este proceso con el apoyo incondicional y con cada palabra de aliento para que no fuésemos a desfallecer, así mismo gracias a nuestros compañeros y futuros colegas por su amistad, la responsabilidad y compromiso superando las dificultades para lograr esta meta conjunta y como recuerdo queda este proyecto que con mucho esfuerzo logramos concluir con éxito y sabemos que servirá como aporte a las nuevas generaciones.

Seguido agradecemos a la Universidad El Bosque por permitirnos hacer parte de la facultad de Odontología y brindarnos todo lo necesario para formarnos como profesionales integrales; al Instituto UIBO (Unidad de Investigación Básica Oral) y a la Dra. Gloria Lafaurie por permitirnos realizar este trabajo de grado en el grupo de Investigación, el cual ella lidera y a la Dra. Nathaly Delgadillo quien fue nuestra directora de tesis, así como a nuestra codirectora la Dra. Diana Marcela Castillo.

Hoy cerramos un capítulo maravilloso en esta historia de vida, pero iniciamos uno nuevo lleno de trayectos y oportunidades.

GUÍA DE CONTENIDO

RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1 Generalidades de los cepillos dentales	2
2.2 Contaminación de los cepillos de dientes	2
2.3 Bacterias entéricas en cavidad oral	4
2.4 Agentes desinfectantes de interés	5
2.4.1 Clorhexidina [CHX] 0.2%	5
2.4.2 Ácido hipocloroso [HOCl] 0.2%	5
2.4.3 Luz UV	6
2.4.4 Nanosilver	6
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
4. JUSTIFICACIÓN	10
5. SITUACIÓN ACTUAL	11
6. OBJETIVOS	13
6.1 Objetivo general	13
6.2 Objetivos específicos	13
7. METODOLOGÍA DEL PROYECTO	14
7.1. Tipo de estudio	14
7.2. Población y muestra	14
7.3. Materiales y métodos	14
7.3.1 Cultivo de la bacteria y preparación del inóculo	14
7.3.2 Contaminación de cepillos dentales convencionales por <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 y <i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 43086	15
7.3.3 Evaluación de los métodos de desinfección	15
7.3.4 Método de inmersión	15
7.3.5 Método de aspersion	16
7.3.6 Método de irradiación con luz UV	17
7.3.7 Recuento de UFC/mL	18
7.4. Plan de tabulación y análisis.	18

8. ASPECTOS ÉTICOS Y/O ASPECTOS RELACIONADOS CON PROPIEDAD INTELLECTUAL	19
8.1 Sustento legal	19
8.2 Consentimiento y asentimiento informado	19
9. RESULTADOS	20
9.1 Método de inmersión	20
9.2 Método de aspersión	21
9.3 Método de irradiación con luz UV	23
10. DISCUSIÓN	25
11. CONCLUSIÓN	27
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

LISTADO DE FIGURAS

		Pág
Figura 1	Preparación del inóculo 1×10^8 UFC/mL <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Klebsiella oxytoca</i>. Diseño de figura realizado por Maira Daniela Rojas Reyes y Danna Sofia Valbuena Sánchez	14
Figura 2	Contaminación de los cepillos dentales con las bacterias <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 y <i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC43086. Diseño de figura realizado por Maira Daniela Rojas Reyes y Danna Sofia Valbuena Sánchez	15
Figura 3	Método de inmersión. Diseño de figura realizado por Maira Daniela Rojas Reyes y Danna Sofia Valbuena Sánchez	16
Figura 4	Método de aspersión. Diseño de figura realizado por Maira Daniela Rojas Reyes y Danna Sofia Valbuena Sánchez	17
Figura 5	Evaluación del método de inmersión en <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 y <i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC43086. Diseño de gráfica y Análisis estadístico realizado por la Dra. Nathaly Andrea Delgadillo	21
Figura 6	Evaluación del método de aspersión con agentes antimicrobianos. Diseño de gráfica y Análisis estadístico realizado por la Dra. Nathaly Andrea Delgadillo	22
Figura 7	Evaluación del método de aspersión vs irradiación con luz UV en <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 y <i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC43086. Diseño de gráfica y Análisis estadístico realizado por la Dra. Nathaly Andrea Delgadillo	24

RESUMEN

EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DE CEPILLOS CONTAMINADOS POR *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 y *Klebsiella oxytoca* ATCC 43086

Introducción: Los cepillos dentales son herramientas de higiene personal que pueden jugar un papel importante en la transmisión de enfermedades y aumentar el riesgo de infección por microorganismos potencialmente patógenos. En las cerdas de los cepillos dentales se han encontrado bacilos entéricos como *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* con una prevalencia del 21% y 24,7%, respectivamente, siendo estos patógenos para el organismo humano debido a los múltiples factores de virulencia relacionados con procesos infecciosos localizados y sistémicos. Actualmente se han estudiado diferentes métodos y sustancias para la desinfección de cepillos dentales, como el uso de clorhexidina al 0,2%, enjuagues bucales, aceites esenciales, hipoclorito de sodio, luz ultravioleta, alcohol, entre otros. Sin embargo, ninguno ha demostrado ser eficiente y efectivo para eliminar estas dos bacterias. **Objetivo:** Evaluar la eficacia de los agentes antimicrobianos, clorhexidina 0,2%, HOCl 0,2%, nano partículas de plata (Nanosilver) 0,1% y luz UV como desinfectantes de cepillos dentales en la eliminación de *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *K. oxytoca* ATCC 43086. **Métodos:** Estudio experimental *In vitro*. 14 cepillos de dientes (Colgate®) fueron contaminados con *K. pneumoniae* ATCC700603 (1×10^8 UFC/mL) y 14 cepillos de dientes (Colgate®) con *K. oxytoca* ATCC43086. Se evaluaron tres métodos de desinfección: inmersión, aspersion e irradiación con luz ultravioleta (UV) (Violife/Zapi-Luxe-UV-Sanitizer). La inmersión y aspersion se realizó con ácido hipocloroso (HOCl) 0,2% pH5,8 y Nanosilver 0,1%. Se utilizó cloruro de sodio (NaCl) al 0,9% como control negativo y CHX (0,2%) como control positivo. Los recuentos se realizaron en agar soja tripticosa y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Después de la incubación, se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC/mL). El análisis de los datos se realizó mediante Shapiro-Wilk y una prueba de ANOVA de una vía con corrección de Bonferroni con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. Todos los análisis se realizaron utilizando el software Graphpad. **Resultados:** Se observó una reducción del 100% en el recuento de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* después de la inmersión con HOCl 0,2% y revelando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$) con las otras sustancias. Se encontró una reducción de 19.38% de *K. pneumoniae* en inmersión cuando se utilizó Nanosilver 0.1% y 12.03% para *K. oxytoca*. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,0002$) entre el grupo control y el conteo con Nanosilver 0,1%. Para los métodos de aspersion e irradiación se obtuvieron diferencias significativas en los desinfectantes CHX 0,2%, HOCl 0,2%, Nanosilver y NaCl 0,9%, y LUZ UV para *K. pneumoniae* y NaCl 0,9%, HOCl 0,2%, CHX 0,2%, Nanosilver 0.1% y LUZ UV para *K. oxytoca* todos con un valor $p < 0.0001$. HOCl 0,2% resultó ser el desinfectante más efectivo para eliminar estas bacterias en los métodos evaluados, seguido de CHX 0,2% y Nanosilver la sustancia menos efectiva para eliminar estas bacterias. **Conclusiones:** El método de inmersión y aspersion con HOCl 0,2% redujo el recuento de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, siendo esta una alternativa para la desinfección de cepillos dentales. La desinfección de cepillos dentales con un producto UV comercial mostró baja eficacia.

PALABRAS CLAVE: Evaluación microbiológica, cepillos dentales, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* y agentes antimicrobianos

ABSTRACT

MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF TOOTHBRUSHES CONTAMINATED WITH *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 AND *Klebsiella oxytoca* ATCC 43086

Introduction: Toothbrushes are personal hygiene tools which may transmit diseases and increase infection. *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* have been found on bristles with 21 % and 24.7 % prevalence respectively and are human pathogens due to localized and systemic processes. Different methods and substance for disinfection have been evaluated, such as chlorhexidine 0.2 %, mouthwashes, essential oils, sodium hypochlorite, UV light and alcohol. However, not one has been proven to eliminate them.

Objective: To evaluate the efficacy of antimicrobial agents, chlorhexidine 0.2 %, HOCl 0.2 %, silver nano particles (Nanosilver) 0.1 % and UV light as disinfectants of said bacteria. **Methods:** In vitro experimental study in which 14 toothbrushes (Colgate®) were contaminated with *K. pneumoniae* ATCC700603 (1×10^8 UFC/mL) and other 14 (Colgate®) with *K. oxytoca* ATCC43086. Three disinfection methods were assessed: immersion, aspersion and UV (Violife/Zapi-Luxe-UV-Sanitizer). Immersion and aspersion were with HOCl 0.2% pH 5.8 and Nanosilver 0.1%. Sodium chloride (NaCl) 0.9 % was used as negative control and CHX 0.2% as positive control. Cultures were grown in trypticase soy agar and incubated at 37 °C during 24 hours. After this, the colony units were accounted for (UFC/ml), data analysis was with Shapiro-Wilk and one-way ANOVA with Bonferroni correction and a significance level of $p \leq 0.05$. All analyses were with Graphpad software.

Results: A reduction of 100 % of *K.pneumoniae* and *K.oxytoca* after immersion in HOCl 0.2 % and revealing statistically significant differences ($p < 0.0001$) with other substances. A reduction of 19.38 % of *K.pneumoniae* in immersion with Nanosilver 0.1 % and 12.03 % of *K. oxytoca*. Statistically significant differences ($p = 0.0002$) were found between the control and count with Nanosilver 0.1 %. The disinfectants CHX 0.2%, HOCl 0.2%, Nanosilver and NaCl 0.9%, and UV for *K.pneumoniae* and NaCl 0.9%, HOCl 0.2%, CHX 0.2%, Nanosilver 0.1% and UV for *K. oxytoca* presented significant differences with aspersion and radiation, with a value of ($p < 0.0001$). HOCl 0.2% resulted the most efficient for eliminating said bacteria in the evaluated methods, followed by CHX 0.2%; Nanosilver was the less effective. **Conclusions:** The immersion method with HOCl 0.2 % proved to be efficient because it reduced the *K. pneumoniae* and *K. oxytoca*. A commercial UV product did not perform well.

Key words: microbiological evaluation, toothbrushes, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, antimicrobial agents.

1. INTRODUCCIÓN

El cuidado de la salud bucal juega un papel importante en la prevención y desarrollo de enfermedades bucales y sistémicas. Por lo cual la preservación de la salud oral juega un papel importante en donde una eficaz remoción de la placa bacteriana por medio de la higiene, el cepillado dental, las técnicas de cepillado, el uso de la seda y los enjuagues permiten eliminar microorganismos adheridos a las superficies de la boca. Aunque el cepillo dental cumpla su objetivo, esta herramienta tras el contacto con la boca de la persona e incluso al estar en contacto en contenedores que favorezcan la humedad, pueden llegar a convertirse en vector de contaminación oral, por bacterias, virus y levaduras, que pudiese producir la sobreinfección de enfermedades preexistentes en personas sanas y con enfermedades sistémicas, y más aún cuando no hay un método claro que permita la eliminación de estos microorganismos. (Cadena E. *et al.*, 2014)

Dentro las bacterias que pueden encontrarse en la cerdas de los cepillos se encuentran *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*, microorganismos pertenecientes de la microbiota normal, procedentes del sistema gastrointestinal y miembros de la familia *Enterobacteriaceae* las cuales se evaluaron en este estudio, puesto que en varios estudios son nombradas pero poco estudiadas frente a la efectividad de los desinfectantes; aun siendo estas reportadas en la literatura como resistentes a los efectos antimicrobianos de desinfectantes usados en los cepillos dentales (Muñoz *et al.*, 2013);(Hernández-Gómez *et al.*, 2014)

En este proyecto se evaluó la eficacia de agentes antimicrobianos como clorhexidina (CHX) 0.2%, ácido hipocloroso (HOCl) 0.2%, luz UV y Nanosilver como desinfectantes de cepillos dentales para la eliminación de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, esto con el fin de prevenir y mantener un adecuado uso del cepillo y así evitar que con el tiempo los microorganismos como las enterobacterias generen problemas infecciosos secundarios que comprometan la salud bucal de las personas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades de los cepillos dentales

El cepillo dental es un instrumento que sirve para realizar la higiene oral removiendo el biofilm que se acumula en las piezas dentales; se encuentran en diferentes formas y tamaños que se adaptan a las necesidades de la persona; hay diferentes tipos de cepillos, pero entre los que más se utilizan son los convencionales y los cepillos eléctricos, aunque tienen las mismas capacidades para remover la placa bacteriana son los menos abrasivos y cómodos en cuanto al acceso y costo. Los cepillos dentales poseen un mango o cuello flexible que permite su manipulación y agarre, además de un cabezal que es la parte activa del cepillo con hileras de 3 o 4 cerdas perpendiculares que facilitan la limpieza de áreas en la cavidad oral con difícil acceso. Entre las características de las cerdas se pueden clasificar en suaves, medias y duras, las cuales se usan dependiendo el gusto y necesidad de cada persona. (Napoles *et al.*, 2015);(Gil *et al.*, 2015)

2.2 Contaminación de los cepillos de dientes

Los cepillos de dientes desempeñan un papel fundamental en la higiene bucal personal al eliminar eficazmente la placa. Sin embargo, pueden albergar un sin número de microorganismos como bacterias, virus, levaduras presentes en microgotas y aerosoles en áreas de grifos y zonas húmedas al sanitario y en constante contacto con las cerdas de los cepillos, por lo tanto autores como Morris *et al.*, [2014], han expuesto una preocupación en el ámbito clínico de la salud bucal por la alta contaminación cruzada y además la complejidad de evaluar un antimicrobiano que logre desinfectar los cepillos, y así mismo que este no tenga efectos tóxicos en la salud del individuo humano.

Otros autores como Neal & Ripplin., [2003] refieren que los cepillos de dientes pueden ser fuentes de infección oral, infección secundaria o infección cruzada por el contacto con otros cepillos dentales durante su almacenamiento y el tiempo prolongado de uso,

más específicamente en individuos inmunosuprimidos e incluso individuos sanos, para ello sugieren implementar un desinfectante en aerosol que elimina los hongos y bacterias con amplio espectro microbiano que se encuentran adheridos al cepillo.

Dentro de los microorganismos que se pueden encontrar en las cerdas de los cepillos dentales, se encuentran las bacterias entéricas, las cuales en su mayoría son descritas como bacilos Gram negativos que se encuentran estrechamente relacionados, así mismo los bacilos entéricos, son clasificados como bacterias transeúntes en cavidad oral ya que el paso es transitorio. Sin embargo, su colonización se puede adquirir en un tiempo prolongado de fuentes como las microgotas de los inodoros, el lugar donde almacenan o guardan estos cepillos con mayor incidencia, pues aumenta la contaminación cruzada debido principalmente al entorno sanitario en el cual se alojan las enterobacterias, siendo las causantes de enfermedades infecciosas que comprometen la salud oral y sistémica del individuo. (Perez *et al.*, 2014);(Kumar *et al.*, 2015)

Autores como Salazar-Chicaiza [2016] mencionan los microorganismos mayormente encontrados en los cepillos dentales bacterias como: *Streptococcus mutans*, *Bifidobacterium* spp, *Lactobacillus* spp, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus del grupo viridans*, *Streptococcus salivarius*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus* spp, *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacteroides* spp, *Proteus* spp, *Moraxella Catarrhalis* y *Staphylococcus Saprophyticus*, siendo la mayoría microorganismos Gram negativos.

Estudios previos han evaluado el nivel de contaminación de los cepillo dentales almacenados en diferentes entornos sanitarios, autores como Medina-Patruno *et al.*, [2019] reportaron que el 92% de las cerdas de los cepillos evaluados estaban contaminados por grupos de microorganismos, entre ellos *Streptococcus del grupo viridans* 39%, bacilos Gram negativos lactosa positivo 40% y *Staphylococcus* coagulasa negativa 35%, mientras que otros autores como Muñúzuri [2019] encontró bacterias

como *Pseudomonas aeruginosa* con un 51% siendo esta la más predominante en los cepillos dentales, seguido por *Staphylococcus epidermis* con 21%, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterococcus faecalis* con un 12% y con un menor porcentaje el *Staphylococcus aureus* con un 4%.

Otro estudio identificó bacterias en los cepillos guardados en el baño dentro de las que se destacan *Escherichia coli* con un porcentaje del 35%, seguido de *Enterococcus faecalis* con 30%, *Staphylococcus aureus* 20% y finalmente *Pseudomonas aeruginosa* 10% y *Enterobacter spp* 5%. (Mandujano 2018)

2.3 Bacterias entéricas en cavidad oral

Los bacilos entéricos como *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* son bacterias Gram negativas de la familia *Enterobacteriaceae* que están estrechamente relacionadas. Sin embargo, tienen ligeras diferencias en su metabolismo bioquímico tal como lo reporta Kumar *et al.*, [2015] y Wyres *et al.*, [2011] quienes consideran que son bacterias causantes de enfermedades infecciosas oportunistas nosocomiales, siendo consideradas una amenaza clínica para la salud pública por su resistencia adquirida a múltiples antimicrobianos en pacientes hospitalizados.

Autores como Moreno [2012], describe que la familia enterobacteriaceae forman parte de la microbiota normal de la cavidad oral. Sin embargo, se consideran bacterias transitorias que pueden llegar a colonizar por más tiempo aumentando la probabilidad de causar problemas infecciosos en la cavidad oral. Estos microorganismos llegan a la cavidad bucal de fuentes como: el medio ambiente, uso prolongado del cepillo, aparatología ortodóntica, uso de cobertores plásticos para cepillo, contaminación cruzada con otros cepillos almacenados en entornos sanitarios y personas con patologías bucales que contaminan el cepillo en cada lavado de dientes; estos factores aumentan la probabilidad de contaminación con estas bacterias y sus efectos en la salud humana. Estas bacterias ocasionan mayor implicación cuando persisten de forma concomitante en pacientes con enfermedades periodontales y por lo tanto en los

cepillos dentales; estudios en diferentes países han demostrado que tiene una frecuencia significativa siendo esta entre el 30 y 40% de la población. (Ardila, 2010)

2.4 Agentes desinfectantes de interés

Estudio como el de Agrawal *et al.*, 2019 ha informado que cerca del 70% de los cepillos usados se encuentran contaminados con una enorme cantidad de microorganismos. Por esto se han desarrollado varios métodos de desinfección de cepillos como la radiación y/o compuestos químicos, como lo son la luz UV, nanopartículas de plata, CHX, hipoclorito de sodio, entre otros.

2.4.1 Clorhexidina 0.2%

La clorhexidina (CHX) es una sustancia antiséptica bactericida que se aplica en la técnica de enjuague del cepillo de dientes, cita autores como Rao *et al.*, [2015], quienes evaluaron el uso de CHX 0.2% en inmersión como desinfectante sobre cerdas de cepillos y evidenciaron que reduce significativamente la contaminación de bacterias Gram positivas de los cepillos de dientes ubicados dentro del baño con inodoros adjuntos.

2.4.2 Ácido hipocloroso (HOCl) 0.2%

HOCl es descrito como un ion no disociado del cloro, dependiente del oxígeno, altamente inestable y altamente reactivo. Por ser uno de los ácidos hipohalogenados más fuertes, así como, uno de los más poderosos oxidantes entre los oxácidos clorados y es el responsable directo de la acción bactericida de los compuestos derivados del cloro, investigaciones previas como la de Lafaurie *et al.*, [2009] concluyeron que el HOCl 500ppm es un buen bactericida ya que inhibió todas las cepas bacterianas empleadas en el estudio, siendo efectivo en un 100%, a concentraciones de 500 ppm y a un 1 minuto de acción sobre *S. sanguis*, *S. mutans*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *C. rectus*, *F. nucleatum*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae* y *E. cloacae*.

2.4.3 Luz UV

La luz ultravioleta es un tipo de radiación electromagnética con longitudes de onda entre 100 y 400 nanómetros (nm). Rodríguez [2018] refiere que la radiación germicida ultravioleta es producida como resultado del flujo de corriente a través del vapor de mercurio entre los electrodos de la lámpara, su presentación se da por lámparas ultravioleta y fluorescentes, las cuales son de uso desinfectante e incluso para esterilizar equipos y crear ambientes estériles, así como en la industria alimentaria y del agua para inactivar microorganismos.

Descontaminar el cepillo dental reduce la carga bacteriana, por ello autores como Boylan *et al.*, [2008] y Agrawal *et al.*, [2019] ilustraron un efecto significativo en los cepillos dentales expuestos a rayos ultravioleta y microondas, puesto que redujeron el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en un promedio de 86%. Mientras que autores como Guridi *et al.*, [2019], reportaron el efecto desinfectante de la luz UV fue > 99,999% en bacterias *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *B. subtilis* y *C. albicans*.

2.4.4 Nanosilver

Las nanopartículas (NP) son sustancias particuladas que tienen dimensión menor a 100 nm como mínimo, autores como Laurent *et al.*, [2008] sugieren que los agentes antibacterianos inorgánicos tales como los metales y los óxidos de metal poseen ventajas en comparación con compuestos orgánicos debido a su estabilidad y bioseguridad. Dentro de estos materiales promisorios, las nanopartículas de plata, óxido de zinc, dióxido de titanio y nanopartículas de cobre han atraído una atención especial.

Las nanopartículas se han reportado como potencialmente antimicrobianas y dentro de las que mayormente se ha visto esa capacidad ha sido las NP de plata y de zinc, puesto que se usa constantemente ya se han habilitado en productos de consumo masivo, uno

de ellos es en el cepillo dentales, el cual se considera un vector de exposición humana oral donde hay muchas bacterias contaminando, citado de (Johnson *et al.*, 2020).

Las NP han sido modelos de estudio por sus propiedades antimicrobianas fisicoquímicas, por su participación en la eliminación de bacterias Gram positivas y Gram negativas, entre los tipos de nanopartículas, las NP de plata irrumpen en los procesos vitales de la célula bacteriana por medio de diferentes mecanismos de acción bactericida, entre ellos, la liberación de iones metálicos, la disrupción de la membrana celular e inhibición en la producción de ATP, mientras que las nanopartículas de óxido de zinc exponen mayor bioactividad hacia diferentes bacterias, hongos y virus dado a la producción de especies reactivas de oxígeno y a la liberación de iones de Zinc. Sin embargo, dadas las evidencias comparadas con otros estudios y los desinfectantes usados, se considera que las NP pueden aplicarse en el desarrollo de nuevos agentes con propiedades mejoradas para obtener mejores resultados sobre la eliminación eficaz de las bacterias presentes en los cepillos de dientes tal como lo menciona Betancur *et al.*, [2016] y Monedeiro *et al.*, [2019].

Aunque hay estudios que evidencian la eficacia y efectividad de los antimicrobianos en los cepillos no hay literatura que involucre a *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* a pesar de que se puedan encontrar como contaminantes en las cerdas de los cepillos. Sin embargo, se encontraron datos con prevalencia de otros microorganismos presentes en los cepillos de dientes, aunque su epidemiología precisa es diversa entre otros países y regiones. El porcentaje de los desinfectantes juega un papel importante en la eliminación de las bacterias, dependiendo de su composición y cantidad va a eliminar cierto tipo de bacterias, los desinfectantes no van a eliminar todas las bacterias ya serán más eficaces para la eliminación de unas bacterias que de otras así como lo mencionó Mandujano *et al.*, [2018].

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los cepillos dentales son herramientas de higiene personal conocidas tanto en ambientes comunitarios como hospitalarios; los cuales se componen de un mango y un cabezal que contiene pequeñas cerdas generalmente de nylon. Su distribución ha sido ampliamente conocida, ya que permite la eliminación de la placa, así como la prevención de enfermedades como la caries y la enfermedad periodontal. Sin embargo, los cepillos de dientes pueden desempeñar un papel importante en la transmisión de enfermedades y aumentar el riesgo de infección por parte de microorganismos potencialmente patógenos como hongos, virus, y bacterias, ya que pueden servir como reservorio de microorganismos en adultos sanos, con enfermedades bucales y con enfermedades médicas (Gil *et al.*, 2005);(ADA 2006);(Frazelle *et al.*, 2012);(Cadena *et al.*, 2014).

Choubey *et al.*, [2021] menciona que la contaminación de las cerdas del cepillo generalmente ocurre por contacto con aerosoles en ambientes sanitarios, pésimos hábitos de higiene y contaminación cruzada con otros cepillos o recipientes de almacenamiento, los cuales se ven favorecidos por la humedad, generando adherencia en las cerdas y cúmulos de microorganismos los cuales pueden transmitirse al individuo, diseminarse y causar enfermedad como endocarditis bacteriana o neumonía.

Por otro lado, autores como Bustos [2018] y De la Cruz *et al.*, [2021] han reportado la presencia de bacterias como *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* en cepillos dentales con una prevalencia de 21% y 24,7% respectivamente, las cuales hacen parte del sistema gastrointestinal y a su vez son importantes patógenos para el organismo humano debido a los múltiples factores de virulencia relacionados con procesos infecciosos localizados y sistémicos. Así mismo, la presencia de estos bacilos en la cavidad oral también se puede ver relacionada con complicaciones en el tratamiento de enfermedades preexistentes debido al alto contenido de genes que contribuyen a la resistencia de antibióticos de uso común en el manejo clínico odontológico, principalmente en personas inmunosuprimidas, diabéticas y adultos mayores.

Actualmente autores como Komiyama *et al.*, [2010] han descrito varios procedimientos para reducir la carga microbiológica de los cepillos de dientes, como el recambio continuo del cepillo, la inmersión y pulverización en soluciones antisépticas como CHX 0.12% así como el uso de ozono o UV, los cuales han tenido éxito en descontaminando los cepillos contaminados con *Streptococcus* spp y *Staphylococcus* spp; Sin embargo, no siempre son económicos o fácil de realizar. (Sato *et al.*, 2005);(Bezirtzoglou *et al.*, 2008);(Nascimento *et al.*, 2010)

Otros estudios han evaluado la descontaminación de cepillos mediante radiaciones 2450 MHz durante 5 minutos y agentes naturales como la inmersión durante 12 horas en extracto de ajo; polifenoles del té verde mostrando una reducción (96%) en *Streptococcus mutans*. Sin embargo, es muy poco lo que se conoce con respecto a la descontaminación de las cerdas de los cepillos con *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*. (Agrawal *et al.*, 2019)

En la actualidad se han estudiado diferentes métodos para la desinfección de los cepillos dentales, tales como, el uso de CHX 0.2%, enjuagues bucales comerciales, aceites esenciales, hipoclorito de sodio, luz ultravioleta, alcohol, entre otros como Konidala *et al.*, [2011] y Basman *et al.*, [2016]. Sin embargo, ninguno ha demostrado ser eficaz y efectivo en la eliminación de enterobacterias como *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* presentes en las cerdas de los cepillos dentales, ya sea por la concentración empleada o por prácticas incorrectas e incluso por la falta de accesibilidad que se tienen a estos debido a sus elevados costos, por lo tanto, el presente trabajo tiene como pregunta de investigación:

¿Cuál es la eficacia del HOCl 0.2%, CHX 2%, luz UV y Nanosilver 0.1% en la eliminación de *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *K. oxytoca* ATCC43086 en Cepillos dentales?

4. JUSTIFICACIÓN

Es importante para los odontólogos investigar y conocer la relación de las bacterias *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* en la cavidad oral, ya que estas bacterias se adhieren a los cepillos de dientes favoreciendo su contaminación, pero así mismo los profesionales deben tener en cuenta que hay otros posibles métodos de desinfección de estos mismos (Wetzel *et al.*, 2005);(Peres *et al.*, 2019).

El cuidado del cepillo dental es importante para la higiene oral; remover la placa bacteriana y mantener una boca limpia y saludable, lo cual coopera en la calidad de vida del individuo. Sin embargo, autores como Gaviria *et al.*, (2001) concluyeron que los cepillos también actúan como una reserva que facilita la transmisión y propagación de bacterias patógenas orales entre diferentes individuos; en la actualidad hay contradicciones del transporte y almacenamiento del cepillo dental para que no sea un foco de infección a causa de la colonización y el crecimiento de microorganismos oportunistas (Naik *et al.*, 2015).

Generalmente los cepillos dentales están diseñados para contribuir el paso de la luz, para el secado, libre de humedad e incluso la distancia entre cepillo y cepillo para evitar la contaminación cruzada y la contaminación por el medio externo. Sin embargo, estos métodos no han sido suficientes para proteger los cepillos de bacterias como *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* (Paterson *et al.*, 2006);(Quiñones *et al.* 2014).

El presente estudio se centra en evaluar la eficacia de desinfectantes HOCl 0.2%, CHX 0.2%, luz UV y Nano silver 0.1% en la eliminación de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* sobre cepillos dentales, con el fin de mejorar el uso y cuidado de cepillos dentales y por medio de este llegar a una estrategia de mejoramiento de prácticas de limpieza y desinfección tal como lo plantea Nelson-Filho *et al.*, [2006].

5. SITUACIÓN ACTUAL

La contaminación del cepillo dental es un problema que surge al momento de realizar el cepillado, ya que en las cerdas de los cepillos quedan alojadas gran cantidad de bacterias presentes en la cavidad oral, mientras que otras por el contrario son procedentes del ambiente sanitario y el lugar donde se han almacenado los cepillos de dientes. Estas bacterias pueden llegar a causar enfermedades a nivel oral, respiratorio, cardiovascular, gastrointestinal, entre otras; por este motivo se han realizado varios estudios con el fin de conocer desinfectantes que sean eficaces en la eliminación de las bacterias alojadas allí (Contreras *et al.*, 2002);(Terézahaly *et al.*, 2008).

Se han buscado distintos métodos de desinfección naturales o diferentes productos químicos y radioactivos, como en el estudio de Konidala *et al.*, [2011] En el cual usaron Hexidine, Peróxido de hidrógeno, Listerine® y Dettol® para desinfectar cepillos de dientes de niños entre 8 y 11 años de edad, logrando concluir que el peróxido de hidrógeno al 3,0% es el más eficaz en la eliminación de *Klebsiella spp*, *Pseudomonas spp*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* y *Citrobacter spp*, que fueron las bacterias encontradas en los cepillos de dientes, en comparación con los otros métodos usados.

El estudio de Gujjari *et al.*, [2011] evaluó el método de desinfección a través de la irradiación en microondas y luz UV donde se expuso el cabezal de los cepillos de dientes a luz UV durante 12 minutos e irradiación por microondas por 5 minutos. Logrando concluir que la irradiación por microondas es un método eficaz en la desinfección y eliminación de bacterias presentes en los cepillos de dientes, ya que se cree que estos vienen contaminados desde su fabricación.

Basman *et al.*, [2016] estudiaron otros métodos de desinfección como lavavajillas, el gluconato de CHX 0,12%, hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2%, enjuague bucal con aceites esenciales alcohol y 50% de vinagre blanco. Se les indicó a los pacientes que se

cepillaran 2 veces al día durante 7 días para así poder evaluar la contaminación de los cepillos dentales; se encontró *S. mutans*, *S. aureus*, *E. coli* y *L. rhamnosus* en los cepillos de dientes con y sin contaminación, teniendo mayor prevalencia en los cepillos contaminados. En este estudio se concluyó que todos los métodos estudiados sugieren ser eficaces en la desinfección de los cepillos.

Los métodos de desinfección que se usan para el desarrollo de este trabajo se han estudiado anteriormente a excepción de las Nanonosilver al 0,1% las cuales no se han estudiado como desinfectante de cepillos de dientes. Hay que resaltar que son pocos los estudios que investigan sobre la eficacia de desinfectantes en la eliminación de bacterias como *K. oxytoca* y *K. pneumoniae* (Konidala *et al*, 2011);(Gujjari *et al* 2011).

Pese a que algunos estudios presentan la eficacia de HOCl 0.2%, CHX 2%, luz UV y Nano silver 0.1% como desinfectante de los cepillos de dientes, son muy pocos en los que se nombran las enterobacterias y más aún a *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, ya que al no hacer parte de microbiota normal de la cavidad oral, se cree que no tiene mucha importancia estudiarlas, pero lo que no se tiene en cuenta es que estas bacterias favorecen los procesos de reinfección, y aunque no estén presentes en la microbiota normal de la cavidad oral si se encuentran en los cepillos dentales, debido a que al ser derivadas del sistema gastrointestinal se alojan en los ambientes sanitarios y cuando los cepillos de dientes son almacenados en estos lugares o muy cerca, es más fácil que se adhieran a las cerdas de los cepillos de dientes (Herrera *et al*, 2012);(Castillo *et al*, 2015).

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Evaluar la eficacia de agentes antimicrobianos, CHX 0.2%, HOCl 0.2%, luz UV y Nano silver 0.1% como desinfectantes de cepillos de dientes en la eliminación de *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *K. oxytoca* ATCC 43086.

6.2 Objetivos específicos

1. Determinar el recuento de UFC de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* después de la aspersion sobre cerdas de cepillos de dientes con CHX 0.2%, HOCl 0.2%, y Nano silver 0.1%.
2. Determinar el recuento de UFC de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* después de la inmersión de cepillos de dientes con CHX 0.2%, HOCl 0.2%, y Nano silver 0.1%.
3. Determinar el recuento de UFC de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* después del uso de luz/UV (Violife/Zapi-Luxe-UV-Sanitizer).
4. Comparar los resultados obtenidos en el recuento UFC por el método de aspersion e inmersión en la reducción de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*.
5. Comparar los resultados obtenidos en el recuento UFC por el método de aspersion, inmersión con luz/UV (Violife/Zapi-Luxe-UV-Sanitizer) en la reducción de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*.

7. METODOLOGÍA DEL PROYECTO

7.1. Tipo de estudio

El estudio es de tipo experimental *in vitro*.

7.2. Población y muestra

Se incluyeron 28 cepillos con dimensiones estandarizadas, cerdas y marca registrada Colgate Premier Clean, contaminados por *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*.

7.3. Materiales y métodos

7.3.1 Cultivo de la bacteria y preparación del inóculo

Se obtuvieron las cepas de *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *K. oxytoca* ATCC 43086 del cepario del Laboratorio de Microbiología Oral del Instituto UIBO, para el cultivo se descongelaron 20µL de cada cepa y se sembraron por agotamiento en un agar Tripticasa de soya, los cuales fueron incubados a 37°C durante 18 a 24 horas (Fig 1). Pasado el tiempo se observó el crecimiento bacteriano, el cual se verificó teniendo en cuenta la pureza de las colonias. Posteriormente se ajustó el inóculo en 8 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion), el cual fue medido en un espectrofotómetro a $\lambda = 580$ nm hasta llegar a una $DO = 0.980 \pm 0.02$ previamente estandarizada por el laboratorio de microbiología oral para obtener un inóculo 1×10^8 UFC/mL (Fig 1). (Terézhalmi *et al*, 2008);(Abarca *et al*, 2020)

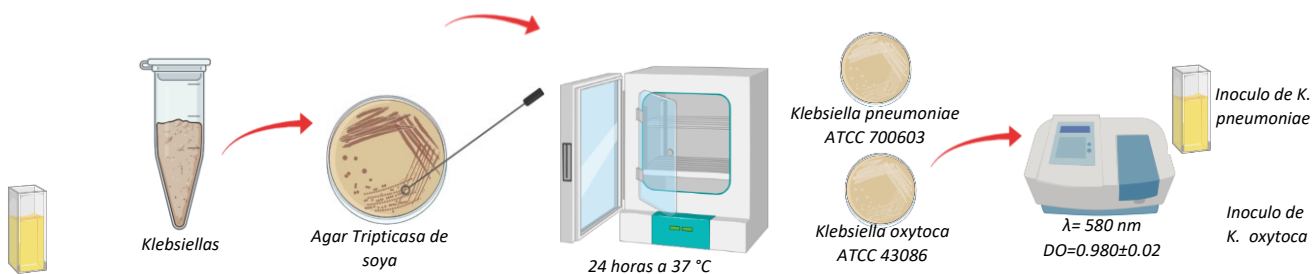


Figura 1. Preparación del inóculo a concentración de 1×10^8 UFC/mL de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*.

7.3.2 Contaminación de cepillos dentales convencionales por *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*.

Se seleccionan tubos de 50 mL, se colocó 15 mL de Caldo BHI y se adicionaron 100 μ L del inóculo ajustado con *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *K. oxytoca* ATCC 43086, cada cepillo de dientes fue previamente esterilizado mediante autoclave (121 °C 15 libras de presión por 15 min) se sumergieron todos los cepillos de tal manera que las cerdas tuvieron contacto con el caldo, se incubaron 18 horas a 37 °C en atmósfera de aerobiosis [Fig. 2].

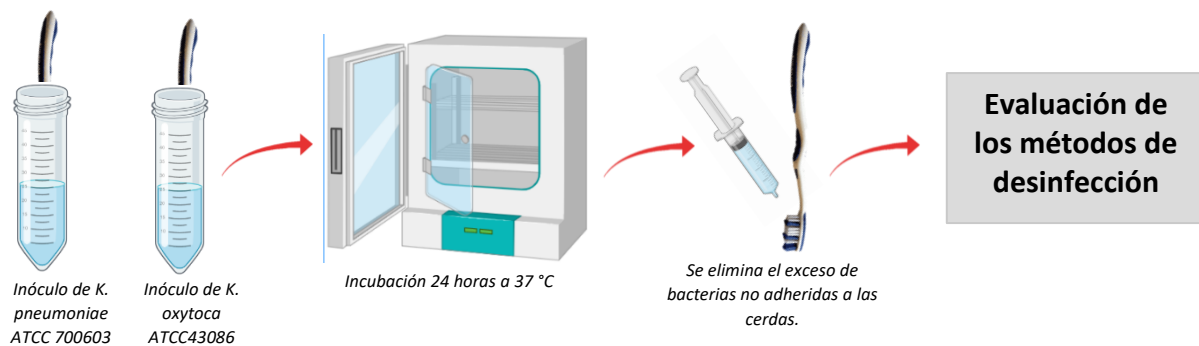


Figura 2. Contaminación de los cepillos dentales con las bacterias *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*.

7.3.3 Evaluación de los métodos de desinfección

Una vez pasado el tiempo de incubación, se retiró cada cepillo y se eliminó el exceso de bacterias no adheridas a las cerdas, lavando a chorro con 10 mL de solución salina (NaCl 0.9%).

7.3.4 Método de inmersión

Para evaluar el método de inmersión, se va a uso CHX 0.2%, HOCl 0.2% y Nano silver 0.1%, para esto se colocaron 15 mL de la solución a evaluar en un tubo de 50 mL en

donde se sumergió el cepillo previamente contaminado durante 10 minutos; una vez pasado el tiempo se eliminó el exceso de la sustancia donde fue inmerso el cepillo con 15 mL de NaCl 0.9%. Una vez los cepillos sumergidos en NaCl 0.9% se mezclaron en un vortex durante 30 segundos y se realizaron diluciones seriadas en base 10 en caldo VMGA I, hasta la dilución -3. Una vez hechas las diluciones se sembraron 100 μ L de cada dilución y se plaquearon en el agar Tripticasa de soya con una varilla de vidrio, se incubaron a 37°C durante 24 horas. Pasado el tiempo se realizó el recuento de UFC/mL. Los ensayos se realizaron por triplicado en experimentos independientes (Fig 3) (Sato *et al*, 2005);(Terézhalmy *et al*, 2008);(Wilches *et al*, 2020).

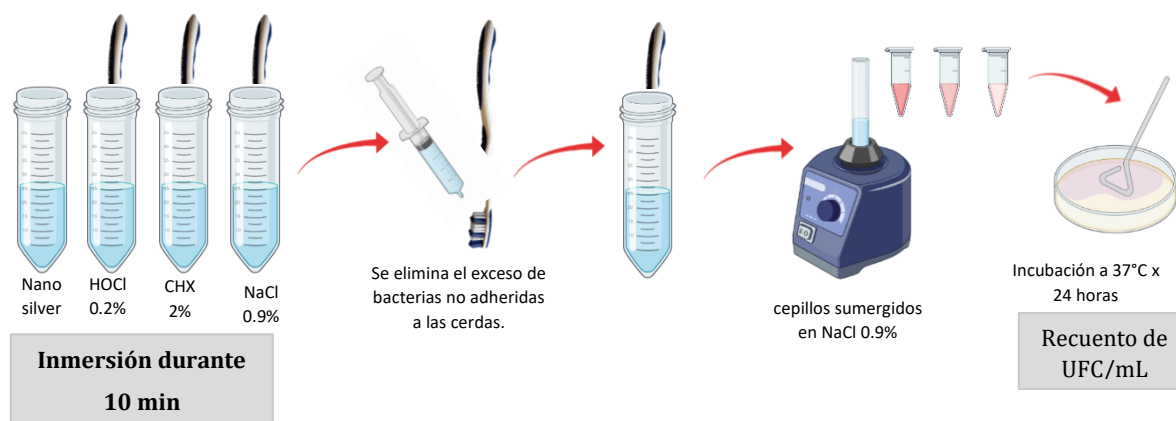


Figura 3. Procedimiento para la evaluación microbiológica en el método de inmersión.

7.3.5 Método de aspersión

Para evaluar el método de aspersión se usó el pulverizador Mini Moisturizing portable facial sprayer, con CHX 0.2%, HOCl 0.2%, luz UV y Nano silver 0.1% y un control negativo (NaCl 0.9%). Se colocaron 10 mL de HOCl 0,2% en el compartimiento para luego activar el dispositivo el cual tiene un temporizador de 1 minuto y se realizaron 10 activaciones del pulverizador nano mister de la marca Miniso para crear la aspersión en cada cepillo de dientes previamente contaminado; del mismo modo se evaluó la aspersión con HOCl 0.2%, CHX 2% y NaCl 0.9%. Una vez pasado el tiempo se eliminó el exceso de la sustancia con la que fue irrigado el cepillo 10 mL de NaCl 0.9% y se depositó en un tubo de 50 mL con 15 mL de NaCl 0.9%, se mezclaron con un vortex durante 30

segundos y se realizan diluciones seriadas en base 10 en caldo VMGA I, hasta la dilución -6. Se sembraron 100 μ L de cada dilución por plaqueo en el agar Tripticasa de soya con una varilla de vidrio y se incubaron a 37°C durante 24 horas, pasado el tiempo se hizo el recuento de UFC/mL. Los ensayos se realizan por triplicado en experimentos independientes (Fig 4) (Sato *et al.*, 2005);(Gujjari *et al.*, 2011);(Wilches *et al.*, 2020).

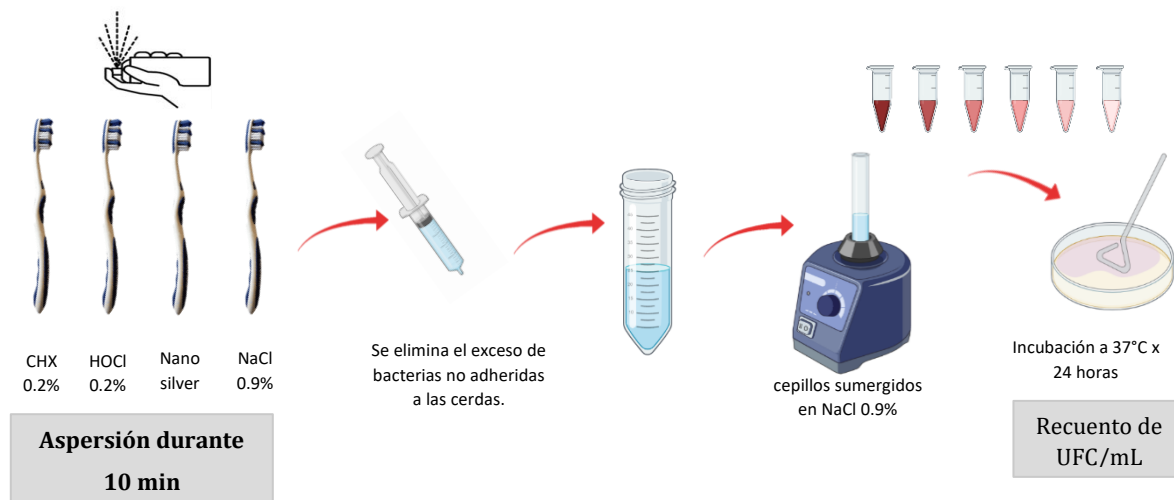


Figura 4. Método de aspersión.

7.3.6 Método de irradiación con luz UV

Para evaluar el método de irradiación con luz UV se usó el esterilizador Violife Zapi Luxe UV Sanitizer, una vez retirado el cepillo del tubo Falcon de 50 mL inoculado con *K. pneumoniae* y *K.oxytoca*, se eliminó el exceso del inóculo con 10 mL de NaCl 0.9%, posteriormente se introdujo en el dispositivo y se activó durante 10 minutos tal como lo indican las instrucciones del fabricante, una vez pasado el tiempo se depositó el cepillo en un tubo de 50 mL con 15 mL de NaCl 0.9%. Se homogenizaron con vortex durante 30 segundos y se realizaron diluciones seriadas en base 10 en caldo VMGA I, hasta la dilución -3. Una vez hechas las diluciones se plaquearon en el agar Tripticasa de soya con una varilla de vidrio y se incubaron a 37°C durante 24 horas, pasado el tiempo se hizo el recuento de UFC. Los ensayos se realizan por triplicado en experimentos independientes (Gujjari *et al* 2011);(Wilches *et al.*, 2020);(Ahmad *et al.*, 2020).

7.3.7 Recuento de UFC/mL

Los recuentos de UFC/mL de cada plaqueo de cada una de las condiciones evaluadas se sacaron mediante la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{\# De colonias por placa} \times \text{el factor de dilución}}{\text{mL de la muestra sembrada}}$$

7.4. Plan de tabulación y análisis.

Para determinar la distribución de los datos, se realizó la prueba Shapiro-Wilk y una prueba de ANOVA de una vía con corrección de Bonferroni con un el nivel de significancia $p \leq 0,01$. Todos los análisis se realizaron en el software GraphPad Prism 9.2.

8. ASPECTOS ÉTICOS Y/O ASPECTOS RELACIONADOS CON PROPIEDAD INTELECTUAL

8.1 Sustento legal

El presente trabajo no requiere aval ético y es una investigación sin riesgos según la resolución número 008430 de 1993, por el cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. No atenta contra el medio ambiente, salud humana y/o animal, sin embargo, todos los residuos generados experimentales fueron eliminados según la política ambiental de la universidad El Bosque, mediante el sistema institucional de gestión ambiental (SIGA) el cual se acoge y se da cumplimiento al concepto de desarrollo sostenible según lo exigido de la ley 99 de 1993.

8.2 Consentimiento y asentimiento informado

Este estudio no tuvo intervención, recolección de datos o muestras de paciente por lo tanto no requirió de consentimiento y/o asentimiento según la resolución 008431 de 1993, ya que no se manejan muestras de pacientes, se manejan cepas de referencia comerciales adquiridas en la ATCC.

9. RESULTADOS

9.1 Método de inmersión

En los resultados se encontraron diferencias estadísticamente significativas al evaluar la inmersión por 10 minutos en *K. pneumoniae* entre HOCl 0.2% versus NaCl al 0.9% con un valor $p < 0,0001$, siendo este último el control negativo. Al evaluar la inmersión con HOCl 0.2% no hubo recuento de unidades formadoras de colonias de *K. pneumoniae*, encontrando una reducción del 100%; diferente al recuento obtenido, cuando se evaluaron las Nanosilver 0.1% y CHX 0.2%, siendo este último el control positivo; por lo tanto, se encontró una mayor reducción en el recuento al usar el HOCl 0.2% que las otras sustancias evaluadas. Se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas al comparar CHX 0.2% versus HOCl 0.2% y HOCl 0.2% y Nanosilver 0.1% $p < 0,0001$ tal como se ve en la figura 5a.

Al evaluar la inmersión de los cepillos contaminados con *K. oxytoca* se obtuvieron resultados muy similares; ya que se encontró una reducción del 100% en el recuento de esta bacteria; una vez fue evaluada después de inmersión con HOCl 0.2%. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el recuento en Log entre CHX 0.2% versus HOCl 0.2% y HOCl 0.2% y Nanosilver 0.1% $p < 0,0001$, así como se observa en la figura 5b.

La CHX 0.2% mostró una alta reducción de las bacterias en los cepillos contaminados tanto en *K. pneumoniae* como en *K. oxytoca*, siendo este el control positivo y cuya efectividad ha sido ampliamente demostrada. Sin embargo, HOCl 0.2% redujo completamente el recuento de las dos bacterias, lo que indica que este desinfectante tuvo mejores resultados que CHX 0.2%, siendo esta la molécula ampliamente estudiada en la literatura por excelencia. El HOCl 0.2% bajo inmersión por 10 minutos, fue eficaz durante los experimentos frente a las dos *Klebsiellas* spp. evaluadas en los cepillos dentales contaminados.

Por otro lado, las Nanosilver 0.1% en inmersión tuvieron un menor recuento de unidades formadoras de colonias con respecto a la evaluación con NaCl 0.9% frente a

K. pneumoniae y *K. oxytoca* siendo estos estadísticamente significativos $p < 0,0001$. Sin embargo, la eficacia de este fue menor a la encontrada por CHX 0.2%.

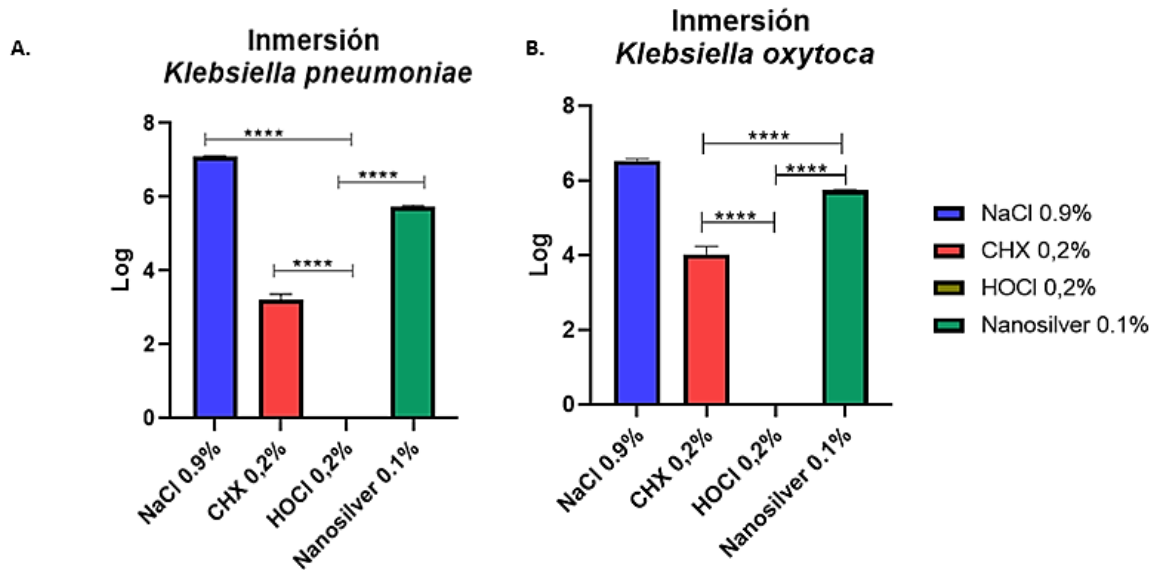


Figura 5. Reducción en la viabilidad de *K. pneumoniae* (A) y *K. oxytoca* (B) usando el método de inmersión con HOCl 0,2%, CHX 0,2%, Nanosilver 0,1% y un control negativo con NaCl 0,9%. ANOVA **** $p < 0,0001$.

9.2 Método de aspersion

En el método de aspersion se encontraron mayores recuentos de unidades formadoras de colonias de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* después de la aspersion con CHX 0.2% y HOCl 0.2% diferente a lo encontrado con el método de inmersión con estas dos mismas sustancias, como se puede observar en la figura 6. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de *K. pneumoniae* en Log de HOCl 0.2% versus NaCl 0.9%, $p < 0,0001$. Así mismo al comparar NaCl 0.9% vs Nanosilver, se encontraron diferencia estadísticamente significativa con un valor de $p < 0,0173$, lo cual evidencia una menor reducción de las bacterias además de presentar logaritmos más altos comparados con la CHX y el HOCl. Al comparar CHX 0.2% vs HOCl 0.2% se encontraron diferencias estadísticamente significativas con un valor $p < 0.0056$ evidenciando un menor recuento de *K. pneumoniae* al usar HOCl 0.2% en aspersion. Se

encontró un menor recuento de esta misma bacteria al comparar HOCl 0.2% con Nanosilver 0.1% $p < 0,0001$, lo cual indica que el HOCl 0,2% en aspersion fue la sustancia que tuvo los menores recuentos, así como se evidencia en la figura 6A. En el método de aspersion evaluado en *K. oxytoca* se encontraron diferencias significativas al comparar NaCl 0.9% vs. HOCl 0,2%, CHX 0,2% $p < 0,0001$. Por otro lado, al comparar NaCl 0.9% vs Nanosilver 0.1% se encontraron diferencias estadísticamente significativas $p < 0,0173$; mientras que al comparar CHX 0.2% vs HOCl 0.2% se encontró un valor $p < 0.0056$ con resultados muy similares a *K. pneumoniae*, como se observa en la figura 6b.

Los resultados obtenidos con HOCl 0,2% evidencian ser el desinfectante más eficaz comparado con las otras sustancias evaluadas; a pesar de que tiene mayor eficacia en la eliminación de *K. oxytoca* que en *K. pneumoniae*, es la sustancia que presento los recuentos más bajos.

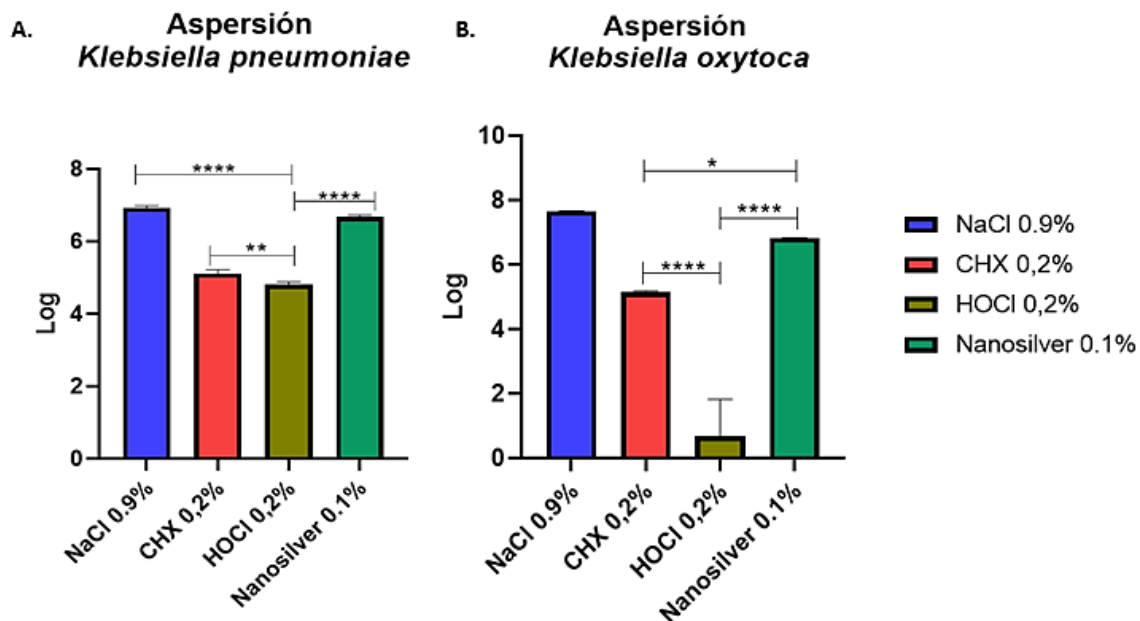


Figura 6. Reducción en la viabilidad de *K. pneumoniae* (A) y *K. oxytoca* (B) usando el método de aspersion con HOCl 0,2%, CHX 0,2%, Nanosilver 0,1% y un control negativo con NaCl 0,9%. ANOVA **** $p < 0,0001$ *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$ * $p < 0,1$

9.3 Método de irradiación

Se observó que el método de irradiación no es tan eficaz en la reducción del recuento de unidades formadoras de colonia como se esperaba, ratificando los resultados obtenidos por otros autores, pues, aunque en los experimentos se evaluaron por 10 minutos, no fue eficiente, ya que se encontraron recuentos similares a los encontrados con NaCl 0.9%, siendo este el control negativo. Se encontró que HOCl 0.2% en el método de aspersión fue el antimicrobiano más efectivo para eliminar *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, siendo el de mayor reducción de las bacterias comparado con las otras soluciones, mientras que la luz UV presenta un log de 6,7 para *K. pneumoniae* y de 7,2 para *K. oxytoca*, siendo de los más altos, lo que indica la presencia de un mayor recuento de unidades formadoras de colonia, tal como se observa en la figura 7.

Aunque se quiso evaluar las Nanosilver 0.1% como un nuevo desinfectante se pudo observar que estas no logran ser eficaces en la eliminación de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, las cuales se encontraban en las cerdas de los cepillos de dientes que fueron evaluados en los métodos de inmersión y aspersión.

Se encontraron diferencias entre la aspersión e irradiación entre CHX 0.2% versus Violigth luz UV $p < 0,001$ evidenciando un menor recuento de *K. pneumoniae* al usar CHX 0.2% en aspersión. Cuando se comparó HOCl 0.2% versus Violigth "luz UV" se encontraron diferencias estadísticamente significativas $p < 0,0001$ a favor de un recuento más bajo por parte de HOCl 0.2%. Resultados similares se encontraron al comparar la aspersión e irradiación en *K. oxytoca*.

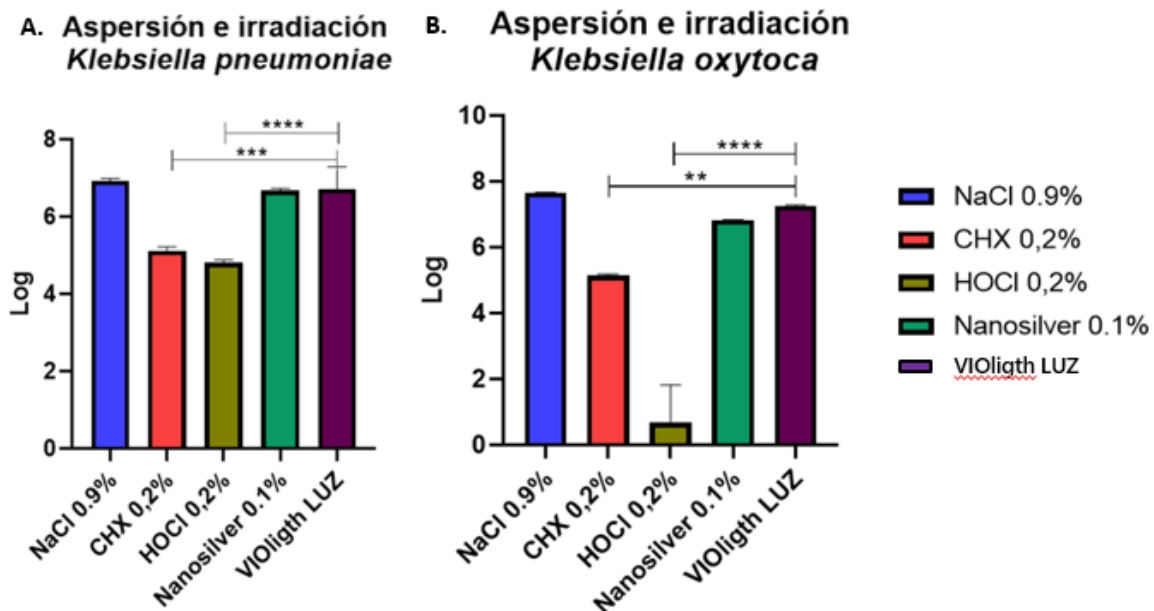


Figura 7. Reducción en la viabilidad de *K. pneumoniae* (A) y *K. oxytoca* (B) usando el método de aspersión con HOCl 0,2%, CHX 0,2%, Nanosilver 0,1%, Violigth luz UV y un control negativo con NaCl 0,9%. ANOVA **** $p < 0,0001$ *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$).

10. DISCUSIÓN

Pocos estudios se han referido a la contaminación de cepillos dentales con bacterias de la familia Enterobacteriaceae, entre ellas las especies *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, por lo cual esta investigación se hizo con el propósito de determinar el recuento de Unidades formadoras de Colonia (UFC) después de usar varios agentes desinfectantes.

Por lo tanto, consideramos que la salud oral es fundamental para identificar la presencia o ausencia de enfermedades orales y sistémicas por microorganismos patógenos en la cavidad oral. En los cepillos de dientes en especial las cerdas son propensas a ser infectadas por diferentes tipos de microorganismos orales como *S. aureus*, *S. mutans*, *C. albicans*, *Lactobacillus*, como también por enterobacterias como *E. coli* y *E. faecalis* (Medina *et al.*, 2019).

Autores como Herrera *et al.*, [2012] demostraron que el uso de vinagre al 5% es eficaz como desinfectante de cepillos dentales en la eliminación de *S. mutans* y *C. albicans*, por otro lado, demostró que el enjuague bucal con CHX al 0.12% es más eficaz en la eliminación de esta bacteria frente al vinagre. Comparándolo con el presente estudio la CHX al 0.2% no demostró ser tan eficaz como se esperaba en la eliminación de *K. pneumoniae*, por lo cual se sugiere que la concentración del antimicrobiano es un factor fundamental para lograr el objetivo.

Abarca *et al.*, [2020] concluyeron que el ácido acético al 5% es 100% eficaz en la eliminación de microorganismos presentes en las cerdas de los cepillos dentales, tales como *E. coli*, *S. epidermis*, *C. albicans*, *K. pneumoniae*, *Protius vulgaris*, *S. mutans*, *Aspergillus tubingensis* y *E. faecalis*.

Otros autores como Gujjari *et al.*, [2011] evaluaron la desinfección de los cepillos dentales haciendo uso de un microondas casero y luz UV, donde se observó una gran reducción de los microorganismos al hacer uso del microondas casero, frente a la luz UV que no demostró ser tan eficaz como se esperaba tal como ocurrió en el presente estudio. Lo que ratifica los resultados obtenidos con el método de irradiación con luz

UV, el cual no resultó ser eficaz en la eliminación de *K. pneumoniae* ni en *K. oxytoca*. Además, otro estudio como el de Wilches & Castillo [2020] demostraron que la aplicación de UV-C lejana con una irradiancia de 2,0mJcm² era suficiente para inactivar aerosoles contaminados, sin embargo, se puede decir que el aparato no está dentro del rango en el que es utilizado como desinfectante. Por otra parte, el experimento de Ahmad *et al.*, [2022] refieren una reducción significativa en el recuento bacteriano ($p < 0,05$) después de la esterilización del cepillo de dientes por varios métodos los cuales fueron efectivos para descontaminar los cepillos de dientes. Podemos decir que se encontraron resultados totalmente diferentes a este estudio con el Violigth.

Otro estudio comprobó la eficacia del peróxido de hidrógeno al 6% como desinfectante de las cerdas de los cepillos dentales, concluyendo que es 100% eficaz en la eliminación de las bacterias presentes en estos en pacientes que no presenten alguna alteración a nivel sistémica ni periodontal (Salazar-Chicaiza 2016).

Así mismo Basman *et al.*, [2016] compararon la eficacia de gluconato de CHX al 0,12%, hipoclorito de sodio al 2% (NaOCl), un enjuague bucal que contiene aceites esenciales, alcohol y vinagre blanco al 50%, donde el desinfectante más efectivo al momento de eliminar las bacterias presentes en los cepillos dentales fue el vinagre blanco, seguido por el hipoclorito de sodio al 2%. Las bacterias entéricas se encuentran comúnmente como contaminantes en muestras de saliva y placa subgingival (Bustos E. 2016). En este estudio *K. pneumoniae* mostró una similar reducción al 0,2% de CHX y las dos concentraciones de HOCl ($p > 0,05$). Además *K. oxytoca* mostró reducción en la viabilidad con HOCl 500 ppm para todos los grupos evaluados ($p < 0,001$), así mismo CHX 0.2% mostró una mejor eficacia contra *K. oxytoca* que HOCl a 500 ppm y el grupo control ($p < 0,001$). *E. cloacae* mostró una disminución significativa en la viabilidad bacteriana para 0.2% CHX en comparación con todos los grupos evaluados, por consiguiente, al compararlo con nuestro experimento se encontraron resultados similares a Castillo et al 2015 en dónde el HOCl 500 ppm tuvo una reducción sobre *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*. (Saleh D, *et al.* 2011).

11. CONCLUSIÓN

Se concluye en esta investigación que la solución de HOCl 0.2% es totalmente efectivo frente a las *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* en el método de inmersión; mientras que el nanosilver al 0.1%, la CHX 0.2% y la luz UV presentan efectos antibacterianos similares y no totalmente efectivos. Sin embargo, el presente estudio sugiere que futuras investigaciones evalúen la eficacia de estos agentes antimicrobianos frente a las bacterias entéricas en los cepillos con cerdas, por lo que se sigue considerando importante indicar a los pacientes sistémicamente comprometidos que desinfecte los cepillos dentales o los cambien durante el curso del tratamiento.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abarca P, Belén A, Vaca G, Israel D, Velastegui L, Alejandro M, *et al*, Clorhexidina al 0,12% y ácido acético al 5% como desinfectantes de cepillos dentales. *Rev Eugenio Espejo*. 2020, 14(1): 53-64.

ADA.org: ADA statement on toothbrush care: cleaning, storage and replacement. [serial online] 2006; 137(3): 415.

Agrawal S, Dahal S, Bhumika T, Nair N. Evaluating sanitization of toothbrushes using various decontamination methods: a meta-analysis. *J Nepal Health Res Counc*. 2019; 16(41): 364-371.

Ahmad A, Mahrous M, Ahmad Y A, *et al*. Efficacy of Different Sterilization Techniques for Toothbrush Decontamination: An Ex Vivo Study. *Cureus*. 2022; 14(1): e21117.

Ardila M. Efecto de las enterobacterias en pacientes con periodontitis crónica. *Avances en Periodoncia*. 2010; 22(1): 27-35.

Basman A, Peker I, Akca G, Alkurt M, Sarikir C, Celik I. Evaluación de la desinfección del cepillo de dientes mediante diferentes métodos. *Braz. res oral*. 2016; 30(1): e6.

Betancur C, Hernández V, Buitrago R. Nanopartículas para materiales antibacterianos y aplicaciones del dióxido de titanio. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 2016; 35(4): 387-402.

Bezirtzoglou E, Cretoiu SM, Moldoveanu M, Alexopoulos A, Lazar V, Nakou M. A quantitative approach to the effectiveness of ozone against microbiota organisms colonizing toothbrushes. *J Dent*. 2008; 36(8):600-605.

Boylan R, Li Y, Simeonova L, Sherwin G, Kreismann J, Craig R, *et al*. Reduction in bacterial contamination of toothbrushes using the Violight ultraviolet light activated toothbrush sanitizer. *American Journal of Dentistry*. 2008; 21(5): 313-317.

Bustos E. Evaluación microbiológica de un prototipo desinfectante de cepillos dentales. [Tesis de pregrado]. Bogotá D.C: Universidad el Bosque; 2018.

Cadena E, Delgado J, Peña D, Sánchez P, Gutiérrez S, Contreras A, *et al.* Contaminación de cepillos dentales denominados antibacteriales. Estudio in vitro. Rev. estomatol, 2014; 22(1): 9-14.

Castillo D, Castillo Y, Delgadillo N, Neuta Y, Jola J, Calderón J. Viability and Effects on Bacterial Proteins by Oral Rinses with Hypochlorous Acid as Active Ingredient, Braz Dent J 2015, 26 (5): 519-524.

Choubey S, Jain K, Dhariwal S, Dixit R and Bawankar S. Microbiological analysis of in-use toothbrushes and their decontamination using disinfection: A hospital based pilot study. Int. J. Adv. 2021; 9(09), 614-620.

Contreras A, Astudillo M, Daza L. *et al.* Contaminación microbiana de los cepillos dentales en pacientes con enfermedad periodontal. Revista Estomatología. 2002; 10(1):4-14

De la Cruz R. Contaminación microbiana en cepillos dentales con y sin protección de un estuche utilizado en el lapso de un mes por los estudiantes de 7mo año de educación básica de la Unidad Educativa "San Francisco de Quito" de la parroquia de Guayllabamba. [Tesis de pregrado]. Quito: Universidad central del Ecuador; 2017.

Echeverri L, Cataño J. Klebsiella pneumoniae como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia. Iatreia. 2010; 23(03): 240-9.

Frazelle MR, Munro CL. Toothbrush contamination: a review of the literature. Nurs Res Pract. 2012; 2012: 420630.

Gaviria PA, Rosales HL, Contreras A. Contaminación in vitro de cepillos dentales. Revista Estomatología. 2001; 9: 14-20.

Gil F, Aguilar M.J, Cañamas M, Ibañez P. Sistemática de la higiene bucodental: el cepillado dental manual. Periodoncia y osteointegración. 2005; 15(1):43-58.

Gujjari SK, Gujjari AK, Patel PV, Shubhashini PV. Comparative evaluation of ultraviolet and microwave sanitization techniques for toothbrush decontamination. J Int Soc Prev Community Dent. 2011; 1(1): 20-6.

Guridi A, Sevillano E, de la Fuente I, Mateo E, Eraso E, Quindós G. Actividad desinfectante de un equipo ultravioleta C portátil. *Rev internacional de investigación ambiental y salud pública*, 2019; 16 (23): 4747.

Hernández-Gómez C, Blanco V, Motoa G, Correa A, Maya J, de la Cadena E, *et al.* Evolución de la resistencia antimicrobiana de bacilos Gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia. *Biomédica*. 2014; 34(1): 91-100.

Herrera LV, Caballero SG, Claro A, Torres H, Martínez CA. Actividad antimicrobiana del ácido acético 5% y el cepillo Colgate 360° antibacterial®: un estudio in vitro. *Rev Fac Odontol Univ Antioq*. 2012; 24(1): 62-75.

Johnson C, Tran MN, Michelitsch L, Abraham S, Hu J, Gray K. Nano-enabled, antimicrobial toothbrushes – How physical and chemical properties relate to antibacterial capabilities. *J Hazardous Materials*. 2020; 396:122445

Komyiama EY, Back-Brito GN, Balducci I, Koga-Ito CY. Evaluation of alternative methods for the disinfection methods of toothbrushes. *Braz Oral Res*. 2010; 24(1): 28-33.

Konidala, U., Nuvvula, S., Mohapatra, A. y Nirmala, SV. Eficacia de varios desinfectantes en cepillos de dientes contaminados con microbios debido al cepillado. *Odontología clínica contemporánea*. 2011; 2(4): 302-307.

Kumar M, Patil S, Shettigar H, Bairwa K, Jana S. Phenotypic and Biotypic Characterization of *Klebsiella oxytoca*: An Impact of Biofield Treatment. *J Microb Biochem Technol*. 2015; 7(4): 202-205.

Lafaurie G, del Rosario A, Arboleda S, Escalante A, Castillo DM, Millan L, *et al.* Eficacia desinfectante del ácido hipocloroso sobre cepas con poder patogénico de cavidad oral. *Rev Col Invest Odont*. 2009; 1(1): 3-11

Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander L, *et al.* Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chemical reviews*. 2008; 108(6): 2064–2110.

Mandujano Y. Grado de contaminación microbiana de los cepillos dentales guardados en el baño y dormitorio de los estudiantes de Odontología de la Universidad de Huánuco 2017 [Tesis doctoral]. Huánuco, Perú: Universidad de Huánuco; 2018.

Mansoori N, Bakar I, Shahid N, Mubeen SM. Microbial contamination; a survey of microbial contamination of toothbrushes among general population of Karachi. *Professional Med J.* 2018; 25(11): 1785-1790.

Medina J. Prevalencia de microorganismos en cepillos dentales de estudiantes del nivel primario de la Institución Educativa Particular "El Paraíso", Chiclayo–2017. [Tesis de pregrado]. Pimentel, Perú: Universidad Señor de Sipán; 2018.

Medina-Patruno C, Bolaños-Rivero M, Martín-Sánchez AM, Saavedra-Santana P, Vicente-Barrero M. ¿Cuál es el nivel de contaminación del cepillo de dientes almacenado en diferentes entornos sanitarios?. *Av Odontoestomatol.* 2019; 35(2): 69-72.

Monedeiro F, Pomastowski P, Milanowski M, Ligor T, Buszewski B. Monitoring of bactericidal effects of silver nanoparticles based on protein signatures and VOC emissions from *Escherichia coli* and selected salivary bacteria. *Journal of Clinical Medicine.* 2019; 8(11): 2024.

Moreno L. Búsqueda de enterobacterias en pacientes con periodontitis crónica: Aislamiento e identificación. [Tesis de pregrado]. Bogotá D.C: Pontificia Universidad Javeriana; 2012.

Morris D, Goldschmidt M, Keene H, Cron S. Microbial contamination of power toothbrushes: a comparison of solid-head versus hollow-head designs: *JDH.* 2014; 88(4): 237-242.

Muñoz U, Uribe J, Guacarí H, Del Rio L, Barrera J. Efectividad de cepillos dentales antimicrobianos después de tres meses de seguimiento. *Rev Col Invest Odont.* 2013; 4(10): 19-32.

Muñúzuri L, Giles J, Medina-Rojas Y, Armenta-Solís A, Martínez S, Trejo T, *et al.*, El gran peligro que representa los microorganismos presentes en cepillos dentales cerca del

inodoro. Federación Dental Ibero-Latinoamericana A.C. Rev semestral Impacto odontológico. 2019; 4(8): 37-41.

Naik R, Ahmed Mujib BR, Telagi N, Anil BS, Spoorthi BR. Contaminated toothbrushes-potential threat to oral and general health. *J Family Med Prim Care*. 2015; 4(3): 444-448.

Nápoles I, Fernández M, Jiménez P. Evolución histórica del cepillo dental. *Rev Cuba Estomatol*. 2015; 52(2): 208-216

Nascimento AP, Watanabe E, Ito IY. Toothbrush contamination by *Candida* spp. and efficacy of mouthrinse spray for their disinfection. *Mycopathologia*. 2010; 169(2):133-138

Neal PR, Rippin JW. The efficacy of a toothbrush disinfectant spray - An in vitro study. *Journal of Dentistry*. 2003; 31(2): 153-157.

Nelson-Filho P., Faria G., Da silva R., Rossi M., Ito I. Evaluation of the contamination and disinfection methods of toothbrushes used by 24- to 48- month-old children. *J Dent child*. 2006; 73(3): 152-8.

Pai V. Effect of a single use toothbrush on plaque microflora. *Indian J Dent Res*. 2009; 20(4): 404-406.

Paterson D. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae, *American Journal of Infection Control*. 2006; 34 (5): 20-28.

Peres MA, Macpherson L, Weyant R, Daly B, Venturelli R, Mathur MR, *et al.*, Oral diseases: a global public health challenge. *Lancet*. 2019; 394(10194): 249-260.

Pérez P, Galán F, Gutiérrez D, Guerrero I. Infecciones por enterobacterias. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 2014; 11(55): 3276-3282

Quiñones D, Yenisel C, Zayas A, Abreu M, Salazar D, García S, *et al.* Resistencia antimicrobiana en aislamientos clínicos de *Klebsiella* spp. y producción de B-lactamasas de espectro extendido en hospitales de Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2014; 66 (3): 386-399.

Rao J, Chandrashekar B, Haritha N, Kumar G, et al. Microbial contamination of toothbrushes stored in different settings before and after disinfection with chlorhexidine-A comparative study. *J Young Pharm.* 2015; 7(4): 486–492.

Rodriguez K. Eficacia en la desinfección de cepillos dentales con luz ultravioleta, gluconato de clorhexidina al 0.12% y agua destilada de niños de 5 a 12 años que asisten al área de odontopediatría de la clínica Odontológica Dr. René Puig Bentz de la Universidad Nacional Pedro Henríquez Ureña, en el periodo mayo- agosto, 2018. Experimental, in vitro. [Tesis de pregrado]. Santo Domingo, República dominicana: Universidad Nacional Pedro Henríquez Ureña; 2018.

Salazar-Chicaiza S. Presencia de microorganismos en cepillos dentales utilizados por los residentes de 20 a 50 años del seminario teológico nazareno sudamericano y su desinfección con h₂O₂. [Tesis de pregrado]. Quito: Universidad central del Ecuador; 2016.

Saleh D. Effectiveness of different cleanser solutions on the microbial contamination of toothbrushes. *Journal of kerbala university.* 2011; 9 (3): 302-307.

Sato S, Pedrazzi V, Lara E, Panzeri H, Albuquerque Jr R, Ito I. Antimicrobial spray for toothbrush disinfection: an in vivo evaluation. *Quintessence Int.* 2005; 36(10): 812-16.

Terézhalmy G, Biesbrock A, Walters P, Grender J, Bartizek R. Clinical evaluation of brushing time and plaque removal potential of two manual toothbrushes. *Int J Dent Hyg.* 2008; 6(4): 321-7.

Wetzel W, Schaumburg C, Ansari F, Kroeger T, Sziegoleit A, Microbial contamination of toothbrushes with different principles of filament anchoring. *Journal of American Dental Association.* 2005; 136(6):758-65.

Wilches JH & Castillo MC. Luz ultravioleta lejana para inactivar superficies y aerosoles contaminados con SARS-CoV2. *Hacia. Promoc. Salud.* 2020; 25(2): 24-26.

Wyers K, Lam M, Holt K. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Rev Microbiol.* 2020; 18(6), 344–359.