

CONTAMINACION *IN VITRO* DE CEPILLOS DENTALES*

Paola Andrea Gaviria¹
Heidy Liliana Rosales¹
Adolfo Contreras²

PALABRAS CLAVES: Contaminación de cepillos dentales, microorganismos patogénicos orales, *A. actinomycetemcomitans*, *E. cloacae* y herpes simplex tipo 1, transmisión de infecciones.

RESUMEN

Se determinó que los cepillos dentales mantienen viables y pueden transmitir 3 microorganismos frecuentemente implicados en infecciones orales. Los microorganismos fueron inoculados *in vitro* en cepillos mantenidos a temperatura ambiente y sometidos a subcultivo desde las 3 horas hasta los 16 días. Inóculos de aproximadamente 5 millones de bacterias/ml de un importante periodontopático, el *Actinobacillus actinomycetemcomitans*; de un entérico oportunista, el *Enterobacter cloacae* y una dosis infectiva 50, ID50 de un herpesvirus oral, el Herpes simplex virus tipo 1, (HSV-1) fueron colocados sobre las cerdas de los cepillos. *A. actinomycetemcomitans* y el HSV-1 resultaron viables hasta por 72 horas. *E. cloacae* fué viable hasta por 16 días, el tiempo máximo de subcultivo planteado en este estudio (Tabla 1). La viabilidad bacteriana se demostró por subcultivo de los microorganismos en TSBV y la identidad de los microorganismos se determinó por la morfología de la colonia, la catalasa, el MUG, la reacción en cadena de la polimerasa especie/específico para *A. actinomycetemcomitans* y pruebas bioquímicas

rápidas como subcultivo en McConkey y asimilación de sustratos para *E. cloacae*. La viabilidad viral se estableció por aparición del efecto citopatogénico en mononocapas de pulmón embrionario humano del inóculo recuperado de los cepillos, pase seriado e IFA indirecta contra HSV-1. Este estudio concluye que los cepillos dentales pueden ser un reservorio y además transmitir importantes patógenos orales entre familiares o individuos.

INTRODUCCION

Los cepillos dentales han sido usados para control de la higiene oral desde tiempos inmemoriales. El primer cepillo dental conocido provino de la China y fué hecho en marfil con cerdas de crin de caballo (1). Una variante de este cepillo fué reinventada en 1498 con cerdas de pelo de cerdo. En el siglo XIX, se usaron los cepillos dentales con mango de plata de la época Victoriana por la élite social de la época (2). En el siglo XX, con la aparición de los procesos industriales y la expansión de los mercados comerciales, los cepillos dentales se popularizaron. En 1920, en los Estados Unidos se comercializaban más de un centenar de cepillos dentales. La introducción de las cerdas de Nylon y los mangos de plástico en 1938, terminaron por revolucionar la tecnología de los cepillos dentales, incorporándose algunas ventajas al producto como la homogeneidad y elas-

* Esta publicación obtuvo Mención de Honor en el XI Encuentro Nacional de Investigaciones en ACFO 2000.

¹ Estudiantes de 9 semestre de Odontología, Escuela de Odontología, Universidad del Valle.

² Profesor Titular, Escuela de Odontología, Universidad del Valle.

ticidad en los cepillos, la modificación de las propiedades de las cerdas, el incremento en la repulsión del agua y la menor susceptibilidad a la contaminación por microorganismos (3). En los años 80, se difundió la idea del cepillo "ideal" que debería poseer una cabeza pequeña para facilitar el acceso a todos los dientes, poseer un mango largo y ancho para facilitar su agarre, poseer cerdas redondeadas de 0.2 mm de diámetro y de 10 mm de longitud para no lesionar la encía, y cerdas organizadas en multipenachos para incrementar la efectividad de la limpieza dental (4). El concepto del cepillo "ideal" en los últimos 5 años ha sido reemplazado por la formulación profesional de los cepillos dentales de acuerdo a las necesidades individuales de los pacientes, así los cepillos son formulados.

CONTAMINACIÓN DE LOS CEPILLOS DENTALES

El primer trabajo sobre la contaminación de cepillos reveló que ellos tienen elevados porcentajes de microorganismos patogénicos y oportunistas (5). Otros estudios han confirmado estos hallazgos, (6). Se acepta en la actualidad que la caries dental y las periodontitis son enfermedades infecto-contagiosas, (7, 8) y que la contaminación entre individuos por microorganismos patogénicos se puede presentar por la saliva, besos, el compartir alimentos o utensilios de alimentación o elementos de higiene oral, (6). La contaminación del cepillo dental es inevitable pues los humanos poseemos una microbiota oral (9, 10, 11). Además de los cepillos dentales, otros elementos de higiene oral han sido reportados como contaminados, entre ellos, los vasos, el hilo y la crema dental, los enjuagues e irrigadores orales, los palillos y los enhebradores de hilo interdental (11). Un estudio realizado en Colombia, con estudiantes de odontología demostró que los cepillos dentales se contaminaron primero con diversos microorganismos orales, después con bacterias entéricas y por último con contaminantes ambientales como hongos-levaduras (12). En 1988 Glass y Jensen (13),

demonstraron que los cepillos dentales también podrían mantener viable el virus del herpes simplex tipo-1. Resulta teóricamente factible que otros virus humanos puedan diseminarse con la ayuda de los cepillos dentales contaminados (14).

Un factor importante en el grado de contaminación microbiana de los cepillos dentales es su tiempo de recambio. Hingst recomendó que los cepillos dentales se cambien cada tres meses, en ningún caso se deberían usar más de seis meses y se deberían cambiar cuando se presenten inflamaciones o infecciones virales de la garganta y/o la boca. Resulta paradójico que la profesión odontológica no haya hecho estudios sistemáticos sobre el papel de los cepillos dentales en las enfermedades virales recurrentes/crónicas, en las enfermedades periodontales y en los riesgos de contaminación con individuos VIH. Protocolos para la regular desinfección y/o el adecuado almacenamiento de los cepillos dentales tampoco han sido establecidos. Este estudio determinó la viabilidad bacteriana y viral de 3 importantes patógenos sobre los cepillos dentales mediante el subcultivo bacteriano y la visualización del efecto citopatogénico del HSV-1 en monocapas celulares de pulmón embrionario humano.

MATERIALES Y METODOS

Este es un estudio microbiológico *in vitro* de la determinación de la viabilidad un organismo periodontopático como el *A. actinomycescomitans*, de un organismo oportunista como el *E. cloacae* y de un prevalente herpesvirus oral como el HSV-1 en cepillos dentales. Inicialmente, se cultivaron y estandarizaron en el laboratorio las cepas de referencia ATCC de los organismos *actinomycescomitans* y de *E. cloacae* y un aislado clínico para HSV-1 de la sección de virus del departamento de microbiología de la Universidad del Valle. Posteriormente se inoculó por duplicado sobre las cerdas de los cepillos Colgate Junior, un equivalente a la dilución 0.5 en la escala de McFarland, conteniendo aproximadamente 5

millones de bacterias. Los cepillos inoculados se mantuvieron a temperatura ambiente en una cámara de flujo laminar hasta su subcultivo que se efectuó a las 3 h, 24 h, 48 h, 72 h, 5 días, 12 días y 16 días. Los subcultivos se hicieron en una atmósfera con 10% de CO₂ en el medio selectivo soya tripticasa agar con vancomicina y bacitracina (TSBV). Cada par de cepillos dentales fué identificado con la fecha y la hora del subcultivo. Para el subcultivo, se agregó 1 ml de VMGA I en un vial estéril de vidrio por 1 minutos y se mezcló continuamente la solución por pipeteo suave sobre las cerdas para desprender los microorganismos y esta mezcla se sometió a vibración en un vortex por 30 segundos para homogenizar la solución. 0.1 ml de la muestra se cultivo en el medio selectivo y se incubó por 2 días a 36°C. Las colonias bacterianas se visualizaron por microscopía estereoscópica y se realizaron pruebas adicionales de identificación como la catalasa, el MUG, la oxidasa, la asimilación de sustratos (API 20E) y la reacción en cadena de la polimerasa (RCP).

Para comprobar la viabilidad de herpes simplex virus tipo 1 en los cepillos dentales, estos fueron inoculados con 1 ml de 10⁵ dosis infectiva de cultivo de tejido o (tissue culture infective dose) TCID₅₀ /0.1 ml de solución de Hank's y los cepillos fueron mantenidos también a temperatura ambiente. El virus fué cuantificado en pulmón embrionario humano crecido en microplacas de 96 huecos para establecer la TCID₅₀ mediante diluciones con base 10 del inóculo fueron hechas con medio esencial de Eagle's suplementado con 2% de suero fetal bovino y gentamicina 50 g/ml. 0.1 ml de las muestras fueron inoculadas para cada dilución. La microplaca fue visualizada por 5 días para registrar la aparición del efecto citopatogénico de infección por HSV-1 y la positividad fue comprobada por pase seriado e inmunofluorescencia indirecta con un monoclonal contra HSV-1.

Una fracción de la suspensión original de los cepillos dentales previa extracción del ADN fue usada para detección de *A. actinomycetemcomitans*

especie-especifico usando la cadena de la polimerasa, con los primers y condiciones reportadas por Ashimoto (15).

Para *A. actinomycetemcomitans*:

Pares de primers (5'-3')

Posiciones en el gen 16S rRNA

AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC

ATG CCA ACT TGA CGT TAA AT

478-1.034 (504) pares de bases

Para la extracción del ADN bacteriano, 500 µl de la suspensión en VMGA I de los cepillos dentales fue mezclada con un Vortex y se adicionaron otros 500 µl de agua destilada en un tubo Eppendorf. Esta mezcla se hirvió por 10 minutos e inmediatamente se preservó en hielo por 5 minutos. Esta muestra se centrifugó a 12.000 Xg por 2 minutos y el sobrenadante se pasó a otro tubo eppendorf estéril para descartar los restos celulares. 5 µl del sobrenadante se usaron como templado para el RCP añadiendo 45 µl de la mezcla de la reacción que contuvo 5 µl de 10xRCP buffer, 1.25 unidades de Taq DNA polimerasa y 0.2mM de cada uno de los deoxiribonucleótidos. El perfil de la temperatura para el *A. actinomycetemcomitans* incluyó un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 2 minutos, seguido por 36 ciclos de 94°C por 30 seg, 55°C por 1 minuto y 72°C por 2 minutos y un paso final de 72°C por 10 minutos. Los productos de RCP fueron analizados por electroforesis en 1.5% gel de agarosa a 4V/cm en Tris - acetate EDTA buffer. El gel fue teñido con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio y fotografiado bajo 300-nm de luz ultravioleta. 1 kb de ADN ladder digest se usó como marcador de peso molecular Ashimoto et al, 1996 (15).

RESULTADOS

La contaminación con microorganismos diferentes a los estudiados aquí no se presentó en los cepillos dentales, puesto que siembras, el almacenamiento y los subcultivos se realizaron en una cámara de flujo laminar. Un total de 48 cepillos fueron

inoculados, 16 con *A. actinomycetemcomitans*, 16 con *E. cloacae* y 16 con HSV-1. Cuatro cepillos dentales fueron estudiados como controles negativos y resultaron estériles después de la incubación de una suspensión en tioglicolato y en monocapas de pulmón embrionario humano. Los cepillos inoculados se cubrieron con un tubo de vidrio estéril hasta la mitad del mango del cepillo y se mantuvieron a temperatura ambiente, 30°C durante el tiempo de los experimentos.

Después de dos días del subcultivo, se procedió a la lectura de los mismos teniendo en cuenta la morfología típica de la colonia, la respuesta positiva a la catalasa, el MUG, la velocidad del crecimiento bacteriano y algunas pruebas bioquímicas como la asimilación de sustratos (API 20E). Las colonias de *A. actinomycetemcomitans* formaron en TSBV colonias circulares pequeñas, de borde aserrado, firmemente adheridas a la superficie de agar, con una frecuente estructura interna estrellada. *A. actinomycetemcomitans*, fué además catalasa positivo y lactosa-negativo, MUG (-). La identificación definitiva de 5 aislados de *A. actinomycetemcomitans* se efectuó por RCP, en donde se consiguió una banda igual a la del control positivo de 504 pares de bases.

E. cloacae produjo una colonia grande, mucosa, aplanada, catalasa positiva con crecimiento rápido y tendencia al crecimiento confluyente, y arginina, ornitina y Voges/Proskauer positivos (API 20E).

Cultivo positivo para HSV-1 generó la aparición de efecto citopatogénico en monocapas de pulmón embrionario humano que se caracterizaron por alteración de la polaridad celular, redondeamiento y desprendimiento de los fibroblastos. El efecto citopático apareció a las 24/48 horas del subcultivo. La positividad viral fué demostrada por pase seriado y por IFA.

A. actinomycetemcomitans y HSV-1 resultaron viables hasta las 72 horas de la inoculación en cepillos dentales mantenidos a temperatura

ambiente o a 30°C. *E. cloacae* resultó viable hasta los 16 días sobre los cepillos dentales a temperatura ambiente. Tabla 1.

DISCUSION

Este estudio demostró que los cepillos dentales pueden retener viables por días, importantes microorganismo orales cuando son inoculados in vitro. Incluso un virus considerado como muy sensible a las condiciones ambientales, como el HSV-1, se mantuvo viable e infectivo hasta por 72 h. *E. cloacae* se subcultivó hasta el día 16 días después de inoculado, lo es indicativo de su elevada resistencia a soportar condiciones ambientales extremas. Este hallazgo convierte *E. cloacae* en un microorganismo difícil de erradicar y controlar en la humedad relativa de los cepillos dentales. *A. actinomycetemcomitans* permaneció viable hasta por 72 horas lo que indica una menor resistencia a soportar condiciones ambientales, pero incluso esta resistencia limitada tendría implicaciones clínicas en pacientes portadores del organismo.

La importancia de estos hallazgos radica en que in vivo, los cepillos dentales pueden facilitar la diseminación/transmisión de importantes microorganismos patogénicos. Los pacientes con periodontitis que porten bacterias periodontopáticas contaminarían sus cepillos dentales con cada cepillado, perpetuando un círculo vicioso de inoculación/reinfección y la de transmisión patógenos a sus familiares. Pacientes con infecciones virales agudas orales infectarían los cepillos dentales facilitando la transmisión o la inoculación del virus en sitios sanos o a otros individuos. Además, el trauma que sobre las barreras naturales contra la infección, que generan las cerdas del cepillo, podría eventualmente diseminar los microorganismos sistémicamente.

Es importante recalcar que citomegalovirus, virus del Epstein Barr, herpes simplex virus tipos 1 y 2, hepatitis A, Hepatitis B, hepatitis C, HTLV 1 y 2 y HIV han sido detectados en la saliva, y podrían

así contaminar los cepillos dentales. El riesgo del uso de cepillos dentales en individuos contaminados con estos virus no ha sido establecido. Sin embargo, Glass y Jensen en 1988 (13) establecieron que en pacientes con episodios de herpes labial, el solo cambio de los cepillos dentales disminuía la severidad de la enfermedad clínica. En otro estudio, Glass en 1980 demostró que diversas enfermedades inflamatorias orales tales como, la estomatitis aftosa recurrente, la glositis migratoria, la glosopirosis, y la enfermedad periodontal severa tuvieron una resolución más rápida y un mejor pronóstico en los casos en que se cambió el cepillo dental. Resulta racional especular que la contaminación de los cepillos dentales facilitaría la aparición de ciertas enfermedades infecciosas orales y un incremento en la severidad de las enfermedades orales y periodontales. Los cepillos dentales deberían ser cambiados con una mayor frecuencia o en su defecto deberían desinfectarse regularmente en pacientes que sufran de enfermedades infecto/contagiosas.

CONCLUSIONES

Se demostró que los cepillos dentales pueden retener viables por varios días importantes microorganismos orales cuando son inoculados in vitro. In vivo, los cepillos dentales podían facilitar la diseminación/transmisión de infecciones. Los cepillos dentales deberían cambiarse con mayor frecuencia o desinfectarse diariamente.

RECOMENDACIONES

Resulta necesario realizar estudios in vivo sobre la contaminación de los cepillos dentales con diversos grupos de población, incluyendo pacientes de alto riesgo, pacientes con inmunodeficiencias, con enfermedad periodontal, diabéticos y enfermedades infecto-contagiosas, para conocer

cual es la real contribución de los cepillos a la salud oral y general de estos pacientes. Un modelo animal usando cepillos contaminados con patógenos, resultó en septicemia y enfermedad sistémica. Si el uso de los cepillos dentales contribuye a la aparición y agravamiento de enfermedades orales y sistémicas, nuevas regulaciones serán necesarias para efectuar el recambio más frecuente de los cepillos dentales y su apropiado almacenamiento y desinfección.

SUMMARY

This study determined that toothbrushes could maintain viable and perhaps transmit to other family member 3 important oral pathogens. The toothbrushes were infected with an approximate inoculum of 5 million bacteria's per ml of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, and *Enterobacter cloacae*, respectively and an infective dose 50 (ID 50) of Herpes Simplex type 1, (HSV-1). These microorganisms were placed directly on the tooth bristles at room temperature and subcultured at different times to establish individual microbial survival rates. Microorganisms were cultured at 3 hours, 24 hours, 96 hours, 5 days, 12 days, and 16 days after the initial toothbrush inoculation. *A. actinomycetemcomitans*, and HSV-1 resulted viable after 72 hours on toothbrushes. *E. cloacae* was viable as far as 16 days after the initial inoculation. The microbial viability was determined by subculture in TSBV and the identity of the microorganisms established by the bacterial colony morphology, rapid biochemical tests, and specie-specific polymerase chain reaction for *A. actinomycetemcomitans*. Viral viability was determined by visualization of the viral induced cytopathic effect on a cultured monolayer of embryonic lung fibroblasts from replicating HSV-1. Positive cultures were confirmed by IFA assay against HSV-1. In conclusion this study demonstrated in vitro that toothbrushes could act as a reservoir of microbes and maybe transmit important oral pathogens.

REFERENCIAS

1. Li Y, Zhang B, Christen A. The historical development of dentistry in China. *Bull Hist Dent* 1987; 35: 21-28.
2. Davis HC. The toothbrush. *Dental Practitioner* 1951; 1: 193-200.
3. Abraham NJ, Cirincione UK, Glass RT. Dentist' and dental hygienist' attitudes toward toothbrush replacement and maintenance. *Clin Prevent Dent* 1990, 12, 28-33.
4. Fransden A. Mechanical Oral higiene practices. In: Loe H, Kleinman DV, eds. *Dental plaque control measures and oral hygiene practices*. Oxford: IITL press, 1986; 109-149.
5. Glass RT, Lare MM. Toothbrush contamination a potential health risk. *Quintaessence Internat* 1986, 17, 39-42.
6. Glass RT, Shapiro S. Oral inflammatory disease and the toothbrush. *J Alabama Dent Assoc* 1993, 77, 12-16.
7. Alaluusua S, Saarela M, Jousimies-Somer H, Asikainen S. Ribotyping shows intrafamilial similarity in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8:225-9.
8. Asikainen S, Chen C, Slots J. Likelihood of transmitting *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in families with periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1996;11:387-394.
9. Malmberg E, Birkhed D, Norvenius G, Noren J and Dhalen G. Microorganisms on toothbrushes at day-care centers. *Acta Odontol Scand* 1994; 52: 93-98.
10. Kosai K, Iwai T, Miura K. Residual contamination of toothbrushes by microorganisms. *J Dent Child* 1989; 3: 201-205.
11. Hingst V. The significance of the contamination of dental care articles. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg* 1989; 187: 337-364.
12. Diaz AJ, Gómez MP, Gómez PM, Gracia HE, De Mora M, Abello R. Recambio del cepillo dental (Análisis microbiológico) Memorias VII encuentro de Investigación, ACFO 1997 pp-110-112.
13. Glass RT, Jensen HG. More on the contaminated toothbrush. The viral story. *Quintaessence Internat* 1988; 10: 713-716.
14. Contreras A, Slots J. Herpesviruses in human periodontal disease. *J Periodontal Res* 2000;35: 3-16.
15. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1996;11:266-73.

ANEXO

Tabla 1. Viabilidad de *A. actinomycetemcomitans*, *E. cloacae* y herpes simplex tipo 1 (HSV-1) en cepillos dentales.

Tiempo de subcultivo	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>E. cloacae</i>	Herpes simplex tipo 1
3 horas	+	+	+
24 horas	+	+	+
48 horas	+	+	+
72 horas	+	+	+
96 horas	-	+	-
5 días	-	+	-
12 días	-	+	-
16 días	-	+	-

Subcultivo positivo = +

Subcultivo negativo = -

AGRADECIMIENTOS:

Los autores agradecen a la señora Senovia Buriticá, Departamento de Microbiología de la Universidad del Valle y al doctor César Buitrago, de la Compañía Colgate Palmolive, la colaboración prestada para la realización de este estudio.