



## **FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS EN DIENTES CON  
NECROSIS PULPAR DE PACIENTES QUE ACUDEN A LA  
CLÍNICA DE ENDODONCIA DE LA FACULTAD DE  
ODONTOLOGÍA, UNAM, EN LOS MESES DE SEPTIEMBRE A  
OCTUBRE DEL 2010.**

**T E S I N A**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**C I R U J A N A   D E N T I S T A**

**P R E S E N T A:**

**MARTHA CECILIA PÉREZ HERNÁNDEZ**

**TUTOR: C.D. VÍCTOR MANUEL MIRA MORALES**

**ASESORA: Mtra. AMALIA CONCEPCIÓN BALLESTEROS  
VIZCARRA**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*A mis padres por su dedicación, esfuerzo y sacrificio durante toda una vida, para ustedes y de ustedes.*

A Letty, por tu ejemplo, tu apoyo, tus desveladas a mi lado, por ser mi hermana y mi mejor maestra de medicina.

A Braulio, por ser un pequeño tan especial, por tus ocurrencias y tu cariño. Te adoro changuito.

A Alvaro, porque gracias a ti aprendí el sentido de responsabilidad, organización y perfeccionamiento; más que nada, porque ahora entiendo que el rencor es la carga más pesada de la vida.

Dr. Víctor Manuel Mira Morales, mil Gracias por su enseñanza, por ser la guía de este trabajo, sobre todo por el tiempo dedicado en ello.

Dr. Fernando Franco Martínez, porque sin usted la microbiología no hubiera tenido la misma importancia en mi formación, gracias por compartir su gran conocimiento, por su apoyo.

Para mi Borre, mi mejor amiga, compañera, mi apoyo incondicional y mi mejor educación. Espero que este pequeño regalo te anime de esa pérdida tan importante.

Te amo Mamá

A Jean, porque me has dado la oportunidad de conocerte más, por tu amistad ante cualquier otra cosa y tu gran apoyo en esta etapa tan importante de mi vida.

A Pau, Diana C., Mosh, Gabo, Vash, porque sin ustedes mi vida no sería igual, por aquellos momentos en que me alentaron, me hicieron crecer y en los que reímos juntos.

## **Un especial agradecimiento a**

**Dra. Argelia Almaguer por su gran ayuda para preparar una parte fundamental de este trabajo, por su tiempo dedicado para hacer posible este estudio.**

**Mtra. Ballesteros por brindarme la facilidad de acceder a la Clínica de Endodoncia y así mismo a los Profesores y alumnos que me permitieron trabajar con ellos y sus pacientes.**

**Al Dr. Fernando Sánchez por permitirme trabajar en el laboratorio de microbiología.**

**Y por último, y no por ello menos importante, a las Doctoras Ruth y Rosy por su especial apoyo y guía, por los momentos tan agradables que me hicieron pasar, el tiempo con ustedes se va volando.**

# ÍNDICE

	Páginas
1. Introducción	6
2. Antecedentes	
2.1. Definición de necrosis pulpar y su relación con la microbiología	7
2.2. Antecedentes históricos	9
2.3. Relación entre la microbiota de la cavidad bucal y el conducto radicular	12
2.4. Vías de penetración de los microorganismos al conducto radicular	16
❑ Exposición directa	16
❑ Exposición dentinaria	17
❑ Membrana periodontal	19
❑ Invasión bacteriana de la pulpa necrótica	20
❑ Anacoresis	20
❑ Extensión	21
2.5. Crecimiento de los microorganismos en el conducto radicular con necrosis pulpar	21
❑ Producción de endotoxinas	24
❑ Exoenzimas	24
❑ Exotoxinas	25
❑ Metabolitos	25
2.6. Métodos de cultivo y observación microbiana	25
❑ Microscopía	26
❑ Examen directo	27
❑ Tinción	28
❑ Medios de Cultivo	30
❑ Métodos moleculares	38
3. Planteamiento del problema	39

4. Justificación	39
5. Objetivos	40
5.1. General	40
5.2. Específicos	40
6. Metodología	
6.1. Tipo de estudio	40
6.2. Material	40
6.3. Método	43
6.4. Población de estudio y muestra	49
6.5. Criterios de exclusión	49
6.6. Criterios de inclusión	50
6.7. Aspectos éticos	50
7. Recursos	
7.1. Humanos	51
7.2. De infraestructura	51
7.3. Financieros	51
8. Resultados	52
8.1. Tablas	54
8.2. Gráficas	58
9. Discusión	62
10. Conclusiones	64
11. Referencias bibliográficas	65
12. Anexos	69



## 1. INTRODUCCIÓN

El tratamiento de conductos radiculares consiste en un adecuado planeamiento de la terapéutica y medicación de éstos con la eliminación del sustrato orgánico infectado o no infectado. El porcentaje de éxito de un tratamiento endodóntico bien realizado es elevado, puede fluctuar entre un 90 y un 95 por ciento, no obstante, las fluctuaciones dependen de la condición pulpar presente; es decir, en dientes con alguna patología como periodontitis apical y retratamientos endodónticos, los valores son inferiores a aquellos con necrosis en la ausencia de periodontitis apical o vitalidad pulpar. Dichos aspectos deben ser analizados con las condiciones sistémicas del individuo, ya que pueden influir en el fracaso del tratamiento.

La presencia de bacterias es la principal causa del fracaso, razón por la cual una parte relevante del procedimiento endodóntico está destinada a eliminarlas y asegurar su erradicación debido a que existen bacterias que poseen características que les permiten sobrevivir a los procedimientos y a las sustancias antisépticas que se utilizan durante la instrumentación e irrigación del conducto. Por ello es fundamental recordar la importancia del rol que juegan las bacterias en la patogénesis de la pulpa y las lesiones periapicales, de ahí que la eliminación de la infección del sistema de conductos radiculares se haya convertido en el objetivo del tratamiento endodóntico de dientes con pulpa necrótica y lesiones periapicales.

En los años sesenta, durante la eliminación de la infección, la toma de muestra microbiológica como principio para el cultivo bacteriano era parte de la rutina antes de la obturación radicular permanente, ya que algunos indicaban que el pronóstico del tratamiento era mejor después de obtener cultivos negativos.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Definición de necrosis pulpar y su relación con la microbiología

La pulpitis es una inflamación del paquete vasculonervioso que puede solucionarse en dos opciones: a) se resuelve o b) la pulpa se destruye gradualmente y por último se necrosa teniendo así el cese de los procesos metabólicos de ese órgano, con la consiguiente pérdida de su vitalidad, de su estructura y de sus defensas naturales.<sup>1,2,3,4</sup>

Dependiendo de la intensidad del agente agresor, la irritación podrá evolucionar lenta o rápidamente hacia la muerte pulpar; las causas más comunes son el bloqueo inmediato de la circulación por lesiones traumáticas, restauraciones hechas con materiales irritantes como adhesivos dentinarios, y resinas compuestas sin la adecuada protección pulpar y también las que ocurren como consecuencia de preparaciones cavitarias extensas, en las que se descuidó la refrigeración.<sup>5,6,7</sup>

Por tanto, durante la inflamación, el tejido no tiene cómo expandirse ya que la pulpa está encerrada en paredes rígidas, no tiene circulación sanguínea colateral y sus vénulas y linfáticos colapsan al incrementarse la presión del tejido; por tanto, la pulpitis irreversible produce una necrosis por licuefacción, en la cual existe flujo de pus de una cavidad de acceso, que se asocia a una buena vascularización y exudado inflamatorio (las enzimas proteolíticas reblandecen y producen licuefacción hística). Si el exudado producido durante la pulpitis irreversible se absorbe o drena a través de la caries o exposición pulpar a la cavidad bucal, la necrosis se retrasa. En cambio, el



cierre o sellado de una pulpa inflamada induce a una necrosis pulpar rápida, total y asintomática, así cuando llega al periápice lesiona al ligamento periodontal y por lo tanto genera una enfermedad perirradicular, traduciéndose en hipersensibilidad a la percusión y a la masticación. Además de la necrosis de licuefacción como resultado de la lesión traumática por la disminución o bloqueo del aporte sanguíneo, se presenta necrosis isquémica en la pulpa o necrosis de coagulación.<sup>8,9,10,11</sup>

Después de la necrosis, sea por licuefacción o coagulación, sin un crecimiento bacteriano concomitante en la cámara pulpar, la pulpa necrótica sola no inicia o mantiene los procesos inflamatorios defensivos en los tejidos periodontales con relación a los pequeños agujeros apicales y laterales; en otras palabras, los desechos necróticos solos, aunque estimulan la fagocitosis y la reparación hística, no producen irritación suficiente para sostener las reacciones inflamatorias en el periápice.<sup>12</sup>

Cuando la pulpa se infecta, da lugar a una lesión inflamatoria en los tejidos periradiculares denominada periodontitis apical; sin embargo, antes de la infección el tejido muestra un aspecto de masa sólida blanda con consistencia de queso (caseificación), compuesto principalmente por proteínas coaguladas, grasas y agua. Los productos de la necrosis son tóxicos para el tejido periapical y pueden indicar una respuesta inflamatoria, con formación posterior de abscesos sin microorganismos.<sup>5,10,13</sup>

La infección se produce sólo después de la necrosis pulpar ya que los componentes del tejido pulpar degenerado aportan una fuente nutricional importante en las fases iniciales de la colonización bacteriana. Otro factor esencial lo constituye el exudado inflamatorio que contiene elemento séricos y hemáticos; no obstante, si se presenta comunicación entre el espacio



pulpar y el medio bucal, la saliva aportará elementos que contribuirán al crecimiento bacteriano.<sup>5,14</sup>

Al morir, las bacterias liberan endotoxinas al medio ambiente; éste tan sólo es un ejemplo de los estudios que han demostrado que los productos microbianos pueden producir una reacción inflamatoria en la pulpa dental, y por consiguiente, necrosis. Entonces teóricamente, cualquier especie que colonice la pulpa necrótica podría participar en la patogénesis de enfermedades periradiculares.<sup>9,14</sup>

En la terapéutica, los antimicrobianos no pueden reemplazar al trabajo biomecánico adecuado y la medicación intraconducto. Los antibióticos no afectan a las bacterias confinadas que se encuentran en el tejido pulpar necrótico dentro del sistema endodóntico debido a que ya no existen vasos sanguíneos que distribuyan dicho (el) medicamento al interior de la lesión.<sup>3</sup>

## 2.2. Antecedentes históricos

Hace poco más de 150 años, existieron algunos científicos distinguidos que se distinguieron por sus trabajos e investigaciones sobre de la medicina y la microbiología, ejemplos de ellos son Robert Koch (1843-1910) que entre sus descubrimientos más sobresalientes se encuentra el agente de la tuberculosis o “bacilo de Koch”; y Alexander Fleming (1881-1955) que descubrió las propiedades antibióticas del hongo *Penicillium notatum* mientras estudiaba al *Staphylococcus aureus*.<sup>16</sup>

Acerca de la evolución de la microbiología bucal, Leuwenhoek observó en su saliva y en el material depositado en sus dientes, algo que denominó materia



alba, o bien “animalículos” y así lo comunicó en sus cartas a la Royal Society de Londres.<sup>17</sup> Tiempo después, nos encontramos con el considerado por algunos, padre de la microbiología bucal, Miller quien en el año de 1894, en su trabajo “The Micro-Organism of the Human Mouth”, considerando la pulpa y el periápice, hizo referencia a los resultados cuantitativos de las pulpas necróticas, y discutió los aspectos ecológicos e investigó el potencial patógeno de algunos microorganismos; reportó incluso que las bacterias intrarradiculares eran diferentes a las bacterias que estaban en la cámara pulpar.<sup>18,19</sup>

En el año de 1901 se encuentra el primer intento por identificar y controlar a los microorganismos dentro de los conductos radiculares infectados fue efectuado por Onderdonken; sin embargo, hace 120 años se demostró la presencia de formas bacterianas en el tejido pulpar necrótico.<sup>3</sup>

Pero, no es sino hasta 1905 cuando Burkley comenzó a relacionar a los microorganismos y observó la importancia del factor etiológico de las agudizaciones endodónticas, debido a la coacción de los restos necróticos y los microorganismos a través del foramen apical.

En cuanto a las técnicas para aislar microorganismos, después de 1950, los microorganismos más frecuentemente aislados eran aerobios ya que por lo general no se utilizaban técnicas anaeróbicas; unos diez años después con las técnicas de cultivo anaeróbicas se pudieron observar con mayor frecuencia a los anaerobios facultativos, destacando el *Streptococcus*  $\alpha$ -hemolítico, *Staphylococcus aureus*, y *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococos*, *Difteroides*, *Micrococos*, *Lactobacilos*, especies de *Candida*, *Neisseria* y *Veillonella*.<sup>20,21</sup>



Con el gran avance para cultivar microorganismos anaeróbicos, en 1966, Kakehashi et al, mostraron que las bacterias causaban necrosis pulpar e inflamación perirradicular.<sup>7,19</sup>

Oguntebi, Slee, Tanzer y Langeland, en 1982, mencionaron en su estudio “Microflora predominante asociada con abscesos periapicales en dientes humanos”, que tales abscesos periapicales no albergaban gran número de especies microbianas, en contraste con las observaciones publicadas de necrosis pulpar y abscesos periodontales en conjunto.<sup>22</sup>

Sen et al, en 1997, investigaron el patrón de crecimiento de *Candida albicans* en relación con la dentina radicular en humanos y observó blastoconidias y estructuras de hifas en las paredes del canal radicular de los especímenes. La mayor parte de estas estructuras, particularmente las pseudohifas mostraron tener la capacidad de penetración en los túbulos dentinarios expuestos.<sup>23</sup>

Bonifacio, ya en el año 2000, observó en dientes con necrosis pulpar sin lesión periapical aparente, la no presencia de microorganismos en los tejidos apicales y periapicales, tampoco áreas de reabsorción cementaria apical.

Más recientemente, Da Silva, 2006, en su estudio “Perfil bacteriano en dientes primarios con pulpa necrótica y lesiones periapicales”, obtuvo como resultados bacilos negro-pigmentados en 6 de 20 casos (30%) microorganismos aerobios en 12 conductos (60%), *Streptococcus* en 17 conductos (85%); estreptococos del grupo mutans fueron encontrados en 6 casos (30%); *Streptococcus mutans* presente en 5 conductos, y la asociación de *S. mutans* y *S. sobrinus* en sólo un caso. Encontró además bacilos Gram negativos en 3 conductos (15 por ciento); finalmente no halló



*Staphylococcus*. Concluyó que los dientes primarios presentan una infección polimicrobiana, muy similar a la microbiota de los dientes permanentes.<sup>2</sup>

### **2.3. Relación entre la microbiota de la cavidad bucal y el conducto radicular**

Los microorganismos que se encuentran con más frecuencia en el conducto radicular son residentes de la boca, y rara vez se recuperan bacterias de origen de otros compartimientos corporales. Sin embargo, la composición de la microbiota muestra una notable variabilidad entre diente y diente del mismo hospedero aunque también varía la cantidad de bacterias. Así como también pueden encontrarse cepas distintas, pero a menudo predominan de uno a seis microorganismos.<sup>3</sup>

Más de 300 especies de bacterias han sido reconocidas como flora normal de la cavidad bucal. Todas las bacterias que normalmente habitan la cavidad bucal teóricamente tienen la capacidad de invadir el conducto radicular durante y después de la necrosis pulpar, la de participar en la infección del conducto, y la de entrar a los tejidos periapicales. Un factor selectivo de la microbiota endodóntica es la baja disponibilidad de oxígeno, especialmente cuando no existe comunicación cámara pulpar-cavidad bucal, en particular en las porciones apicales, donde el bajo potencial de óxido-reducción del tejido necrótico favorece, en un principio, el crecimiento de bacterias anaerobias facultativas y posteriormente, anaerobias estrictas. Sin embargo, las bacterias presentes en conductos radiculares infectados incluyen grupos de especies restringidos comparados con la flora total de la cavidad bucal; estos microorganismos se encuentran en lugares estratégicos y privilegiados dentro del conducto radicular que contiene tejido pulpar necrótico, en el cual



se protegen de la acción de las células de defensa del hospedero, que en ese momento se encuentran concentrados en el periápice sin poder alcanzarlos.<sup>5,11,14,19,24</sup>

En contraposición, existen estudios de la bacteriología de la necrosis pulpar de los dientes humanos desvitalizados por traumatismo físico sin tener exposición con la pulpa; éstos demuestran que las bacterias no pueden ser aisladas de los dientes sin que exista periodontitis apical.<sup>25</sup>

Con respecto a los hongos, de las aproximadamente 50,000 especies que se conocen, 200 de ellas se conocen como causantes de enfermedades en animales vertebrados y seres humanos. La mayor parte de los hongos patógenos se encuentran dentro de los grupos de *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota*, y *Deuteromycota*. Los dichos hongos encontrados regularmente son especies oportunistas del género *Candida* y *Aspergillus*, ambos pertenecientes al grupo de los *Deuteromycota*. Algunas especies de *Candida* pueden causar una variedad de infecciones en humanos, que van desde una enfermedad superficial a micosis diseminadas que amenazan la vida.

La mayoría de los hongos patógenos son exógenos; sin embargo, las micosis con incidencia alta son causadas por hongos que forman parte de la microbiota normal del cuerpo humano. *Candida* pueden hallarse en la cavidad bucal, tracto gastrointestinal, ano, ingle, canal vaginal, y vulva de personas saludables.<sup>23</sup>

Los hongos constituyen una pequeña parte de la microbiota bucal. La mayor proporción de la microbiota de hongos se compone de *Candida*. La especie de hongo más común en la cavidad bucal es un hongo dimórfico, presente



como blastoconidias e hifas, esta especie es *Candida albicans*, la cual es encontrada en un porcentaje del 30 al 45 por ciento en adultos sanos, y del 95 por ciento en pacientes infectados con VIH.

El dorso de la lengua se considera como el hábitat primario de *C. albicans*, mientras que otros sitios pueden ser colonizados secundariamente como la mucosa supragingival, la dentina, el cemento, la encía subgingival y las bolsas periodontales. Un gran número de otras levaduras también han sido aisladas de la cavidad bucal, incluyendo a *Candida glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. inconspicua*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, y especies de *Saccharomyces*.<sup>23</sup>

Ha sido demostrado que algunas especies de *Candida* se coagregan con ciertas bacterias, por ejemplo, *C. dubliniensis* con *Fusobacterium nucleatum* y *C. tropicalis* con *Streptococcus gordonii*. Varios autores han reportado que *C. albicans* suele combinarse con algunas cepas de *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis*, *S. gordonii*, y *S. anginosus*, pero nunca con *S. mutans* ni *Enterococcus faecalis*.<sup>5,20</sup>

No obstante, a los hongos se les reporta comúnmente reportados como miembros comunes de la microbiota asociada con infecciones endodónticas primarias. Pero, Möller, en 1966, aisló especies de *Candida* en 1 de cada 29 muestras de dientes con pulpas necróticas con corona intacta.<sup>7,18</sup>

Siguiendo el tema de la coagregación, tenemos al biofilm, que es una estructura formada por bacterias adheridas a un sustrato rígido. Tal conformación les permite vivir en comunidad y protegerse del ataque de los sistemas de defensa del huésped. Aunque la mayoría de los fracasos endodónticos se deben a la persistente presencia de bacterias dentro de los



conductos radiculares, aunque también se han reportado infecciones radiculares que también son causales de fracasos.<sup>1</sup>

Lo anterior asegurado por Spångberg, quien en 2002 mencionó que en una infección primaria existen cocos, bacilos, filamentos y espirilos, que la mayoría de estos microorganismos se encontraban suspendidos en una fase fluida y que otras se pueden observar adheridas a las paredes del conducto radicular. Siqueira en ese mismo año, aseveró que en general las infecciones primarias mezclan predominantemente bacterias anaerobias, cuyas especies usualmente pertenecen a los géneros de *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Treponema*, *Peptoestreptococcus*, *Eubacterium*, y *Campylobacter*. Dijo también que los estreptococos facultativos o microaerófilos también se les puede encontrar en infecciones primarias.<sup>14,24</sup>

Entonces, las infecciones endodónticas son causadas por microorganismos bucales, que a su vez son usualmente patógenos oportunistas; sin embargo, cualquiera de las cerca de 300 especies de la microbiota bucal puede invadir el conducto radicular con necrosis pulpar y establecer un proceso infeccioso. Casi todas las bacterias que se encuentran en el conducto radicular carecen de la capacidad para invadir los tejidos periodontales, su abundancia y sus metabolitos en el conducto radicular determinan su efecto patógeno. Finalmente, las lesiones periapicales ocurren por el crecimiento de bacterias patógenas en pulpas necróticas y por la liberación de sus productos lesivos.<sup>24</sup>



## 2.4. Vías de penetración de los microorganismos al conducto radicular

Las vías de penetración al conducto pueden ser diversas, sin embargo, en tanto permanezca intacta la cubierta exterior del tejido dental duro (esmalte y capas de cemento), es imposible una penetración bacteriana hacia la pulpa dental. Pero en diversas circunstancias clínicas (como caries, procedimientos operatorios o traumatismo dentario), se pierde la integridad del tejido duro, produciéndose la entrada de bacterias e irritación pulpar. Cuando la fractura de la corona afecta esmalte y dentina, en las proximidades de la cavidad pulpar, la exposición de los túbulos dentinarios puede convertirse en una vía de entrada a los microorganismos presentes en la cavidad bucal. Esta posibilidad cobra mayor importancia en niños y pacientes jóvenes, puesto que presentan túbulos de mayor calibre que los adultos y en personas de edad avanzada.<sup>7,8,29</sup>

Aunado a ella, las diferentes especies bacterianas en la microflora bucal poseen diversas exigencias nutricionales para mantenerse incluso dentro de un túbulo dentinario. En consecuencia, las bacterias que se establecen por sí mismas son aquellas que pueden utilizar y compiten mejor por los factores de crecimiento disponibles en la pulpa necrótica. Los componentes del tejido pulpar desintegrado aportan una fuente nutricional importante, al menos durante las fases iniciales de colonización bacteriana.<sup>3,7</sup>

▣ **Exposición directa.** Cualquier exposición pulpar a través de la barrera de tejido duro, permite la entrada directa de la microbiota bucal, y así, en una semana, las reacciones del tejido pulpar aumentan de una inflamación superficial aguda hasta una necrosis pulpar; pero la microbiota bucal también logra tener acceso directo a la pulpa después del deterioro



progresivo de la inserción en la enfermedad periodontal. O sea, conforme se alteran los tejidos de soporte, pueden exponerse los conductos accesorios (sobre todo los conductos laterales) y los agujeros apicales pequeños. La placa bacteriana en relación con la enfermedad periodontal también provoca pulpitis y necrosis del tejido pulpar debido a los desechos bacterianos que puedan estar en contacto o cerca de la pulpa.<sup>3,21</sup>

**Exposición dentinaria.** Los túbulos dentinarios miden entre 0.5-1  $\mu$  de diámetro en la periferia y hasta 3-5  $\mu$  cerca de la pulpa, zona en la cual hay alrededor de 50,000 a 60,000 túbulos dentinarios por  $\text{mm}^2$ ; las bacterias avanzan más por división hasta una profundidad considerable, que por desplazamiento autónomo. Así que cuando la pulpa vital sana queda expuesta como resultado de un traumatismo, la penetración del tejido es relativamente lenta.

Estudios experimentales sugieren que en el proceso carioso esa invasión solamente ocurre cuando el grosor de la dentina alcanza como máximo 0.2 mm entre límites de dicho proceso y la pulpa, invasión que garantiza gradualmente el proceso de división celular, y se ve favorecida, a veces, por el efecto mecánico de la masticación. Mencionando que la penetración bacteriana no supera los 2mm después de 2 semanas. Si la pulpa se ha necrosado, los espacios vacíos de los túbulos dentinarios son penetrados con rapidez. Incluso ante la ausencia de una exposición directa, las bacterias afectan a la pulpa.

Luego de expuestos los túbulos dentinarios, sirven como rutas para las bacterias. El ancho de los túbulos es suficiente, aun en la periferia, esto permite el ingreso de casi todos los microorganismos que colonizan los dientes.<sup>3,7,8,18</sup>



Así también, se ha encontrado en la caries, al frente bacteriano de avance que las bacterias no penetran más allá del límite de la lesión, a menos que ocurra alguna desmineralización dentinaria. Sin embargo, a menudo se presentan lesiones inflamatorias en la pulpa luego que las bacterias colonizan la dentina expuesta. Es probable que tales lesiones ya sean notables por debajo de la caries incipiente, después de la exposición reciente de dentina, así como el crecimiento bacteriano por debajo de una restauración dental.

Por lo tanto, es claro que las bacterias no invaden la pulpa o dentina para producir en sí la irritación pulpar. Con el crecimiento y desintegración, las bacterias en la caries o la placa dental provocan una variedad de sustancias que inician y preservan la lesión hística, así como las reacciones inflamatorias; éstos productos son tóxicos enzimáticos, metabólicos y otros de origen bacteriano que se diseminan por el líquido de los túbulos dentinarios y alcanzan la pulpa antes que los propios microorganismos. Tales productos bacterianos de desecho, luego de la penetración por los túbulos dentinarios, pueden destruir el tejido pulpar por la acción tóxica.<sup>3</sup>

La penetración bacteriana en los túbulos dentinarios se da usualmente cerca de la entrada del conducto principal. En algunos especímenes se han encontrado infectados hasta 300  $\mu\text{m}$  de profundidad del tubo dentinario; pero puede haber una extensión variable de las invasiones bacterianas. Algunas mediciones precisas han encontrado bacterias en 250  $\mu\text{m}$  de profundidad dentro de conductos radiculares después de la instrumentación; así mismo, se han recuperado bacterias viables de túbulos dentinarios de asociados con lesiones periradiculares con la mayor penetración bacteriana, es decir, de 375  $\mu\text{m}$ .

Estudios de la penetración *in vitro* de algunas especies alcanzan valores extremos de 700 a 900  $\mu\text{m}$  cuando el cemento del barrillo dentinario han sido



removidos; sin embargo, tal profundidad de penetración no ha sido reportada *in situ*.<sup>8,24</sup>

Retomando el tema de los hongos, las levaduras van de un rango de 1 a 6  $\mu\text{m}$  de diámetro, mientras que las hifas tienen usualmente de 1.9 a 2.6 $\mu\text{m}$  de diámetro. Sobre la base de estas dimensiones celulares, se puede suponer que los hongos también tienen la habilidad de penetrar por los túbulos dentinarios.<sup>23,24</sup>

▣ **Membrana Periodontal.** Otro medio de invasión de los microorganismos es el surco gingival ya que a través de este acceso pueden alcanzar la cámara pulpar utilizando un conducto lateral o el foramen apical. Esta vía puede ser facilitada a los microorganismos, por ejemplo, durante la realización de una profilaxis dentaria y a consecuencia de una luxación y, más significativamente, a partir de la migración de la inserción epitelial durante el establecimiento de una bolsa periodontal.<sup>8,18</sup>

También grandes lesiones periapicales pueden llegar a dañar el paquete vasculonervioso de un diente vecino y provocar la necrosis de la pulpa; ésta situación aunque es rara, debería considerarse como explicación a la pérdida progresiva de la vitalidad pulpar de un diente adyacente a otro que presente una gran lesión periapical radiolúcida.<sup>8</sup>

En relación con esa vía de penetración, es importante considerar a especies periodontopatógenas como *Wolinella*, *Selenomonas* y *Campylobacter spp* por su capacidad de locomoción.<sup>8,18</sup>



▣ **Invasión bacteriana de la pulpa dental necrótica.** La lesión del tejido pulpar es un prerequisite para el establecimiento del crecimiento microbiano en el sistema de conductos radiculares.

Las infecciones bucales difieren de las que ocurren en otro compartimiento corporal, en las que los microorganismos infectantes habitan la cavidad bucal; pero las bacterias bucales también se establecen por sí mismas en las pulpas necróticas de dientes intactos (no expuestos) o restaurados. En tales casos, las bacterias entran desde la boca hasta la pulpa por túbulos dentinarios como ya se ha mencionado. Entonces como los sistemas pulpares defensivos ya no funcionan, se presenta la invasión bacteriana.

Las fisuras del esmalte en dientes traumatizados sirven como ruta hacia los túbulos dentinarios y pulpa. En dientes con pulpas necróticas, la vía de invasión bacteriana es la dentina radicular, expuesta a los conductos accesorios expuestos.

▣ **Anacoresis.** La invasión bacteriana a través de esta vía depende de una bacteriemia o una septicemia; la primera consiste en la presencia de microorganismos viables en la vía hematógica, y es un fenómeno transitorio cuya duración no se prolonga por más de 30 minutos; y la segunda, es una manifestación patológica sistémica asociada a la presencia y multiplicación de microorganismos en la sangre. Las bacteriemias transitorias pueden producirse por diversas razones: extracciones dentales, traumatismos, procedimientos periodontales y sobreinstrumentación de los conductos. Así, los microorganismos circulantes por vía sanguínea pueden anidar en los tejidos alterados y comenzar a multiplicarse.<sup>7,8,18</sup>



Cuando este medio es utilizado como vía se necesita que el hospedero presente previamente resistencia disminuida, favoreciendo los mecanismos del agresor, así como también es necesario tener una irritación o reacción inflamatoria, como una pulpitis. Misma que se considera como una posible vía de penetración bacteriana hacia zonas de necrosis pulpar; sin embargo, no es tan sencillo como parece, puesto que esta ruta de invasión requiere: 1) que la pulpa muestre daño parcial o total (necrosis), y 2) que las bacterias se diseminen hacia la circulación y puedan dejarla para que pasen a la pulpa lesionada. Esta vía de infección ha sido muy controversial.

▣ **Extensión.** En este caso, los microorganismos a partir de dientes infectados y en consecuencia de contigüidad con el tejido, llegarían hasta los conductos principal o lateral, y se localizarían en la pulpa de dientes sanos.<sup>18</sup>

## **2.5. Crecimiento de los microorganismos en el conducto radicular con necrosis pulpar**

Ya que se ha logrado la invasión microbiana al conducto, el crecimiento de la población de los mismos depende del éxito en la competencia por sobrevivir dentro de él, y esto se traduce en la habilidad de las diferentes especies microbianas para tolerar las condiciones adversas en el conducto, generalmente creadas por las especies competidoras. Aunque pueda ser variable la existencia de necrosis aséptica, el remanente necrótico y el ambiente favorable, desprotegido por las defensas orgánicas, posibilitan la infección.<sup>4</sup>

Así, la infección de la pulpa dental moviliza los microorganismos a desarrollarse en sentido apical para invadir y colonizar los tejidos periapicales produciendo una patología aún mayor.<sup>13</sup>



Posterior a la necrosis, el ambiente de la cavidad pulpar, se torna propicio e ideal para aquellos factores que influyen en el crecimiento y en la colonización microbiana (nutrientes, baja tensión de oxígeno, gas carbónico e interacciones que se puedan presentar). El consumo de lactato por las especies de *Veillonella* es otro ejemplo clásico de interacción bacteriana positiva. Es importante señalar que la mayor parte de las necrosis pulpares incluyen aerobios estrictos, anaerobios facultativos o microaerófilos, los cuales disminuyen la tensión de oxígeno y el potencial de oxidorreducción en el conducto necrótico, que a su vez proporciona las condiciones favorables para que se desarrollen las bacterias estrictamente anaerobias. También es probable que las bacterias u hongos fuertemente proteolíticos puedan romper proteínas y ser utilizados como nutrientes por otras bacterias.<sup>4</sup>

Así entonces, tenemos que los componentes del tejido pulpar desintegrado aportan la fuente nutricional más importante, al menos durante las fases iniciales de la colonización bacteriana. Otro factor esencial en la nutrición bacteriana es el exudado inflamatorio que contiene elementos séricos y hemáticos excretados de alteraciones inflamatorias concomitantes en los tejidos pulpares o periapicales restantes. Si existe comunicación directa con el medio bucal, la saliva brinda elementos que fomentan el crecimiento de las bacterias que los emplean.

Sin embargo, los microorganismos que obtienen de modo primario su energía mediante la fermentación de carbohidratos tienen menores probabilidades de crecimiento, ya que por lo general el medio endodóntico es deficiente en tales nutrientes, a menos que el conducto tenga comunicación bucal y esté en las primeras fases de la colonización.



Como ya se mencionó, un factor muy selectivo de la microbiota endodóntica es la baja disponibilidad de oxígeno en conductos radiculares infectados. En especial esto se presenta en las cámaras pulpares sin comunicación bucal directa, la concentración de oxígeno permanece reducida, en particular en porciones apicales del sistema endodóntico, lo que favorece el crecimiento de bacterias anaerobias facultativas, las cuales pueden, en un principio, colonizar la cámara pulpar, pero por la desaparición de oxígeno, se fomenta el desarrollo bacteriano anaeróbico del 70 al 90 por ciento de la invasión total.<sup>13,18</sup>

Además es importante considerar que las bacterias intercambian productos nutricionales esenciales. El crecimiento de ciertas especies bacterianas depende por completo de la presencia de otras que producen los metabolitos necesarios. Por ejemplo, la elaboración de vitamina K y hemina por otras bacterias alienta el crecimiento de especies de *Bacteroides* pigmentados de negro. El hecho que las bacterias pueden contrarrestarse entre sí y produzcan elementos (por ejemplo, bacteriocinas) que suprimen o eliminan otras, fomenta la complejidad del ecosistema que constituye el conducto radicular.<sup>3</sup>

Cualquier microbio que infecte el conducto radicular puede desencadenar una inflamación periapical. Sin embargo, la virulencia y la patogenicidad varían de forma considerable y pueden verse afectadas por la presencia de otros microorganismos. Aunque las especies individuales constituyentes de la flora endodóntica suelen tener virulencia baja, en conjunto actúan como patógenas debido a una combinación de factores como: 1) interacciones con otros microorganismos presentes en el conducto radicular, que pueden producir sinergismo; 2) liberación de endotoxinas; 3) síntesis que dañan los



tejidos del huésped, y 4) capacidad para interferir y anular las defensas del huésped.<sup>6,8,13,18</sup>

Es importante señalar que se pueden producir bacteriemias provocadas por la salida de bacterias del ápice en combinación con la instrumentación endodóntica, de manera especial cuando existe necrosis pulpar y sobreinstrumentación. Los pacientes con alteraciones médicas graves y en alto riesgo de contraer infecciones sistémicas que reciben tratamiento endodóntico tienen que, según lo propuesto por la American Heart Association, recibir protección antibiótica profiláctica para la cita terapéutica.<sup>3</sup>

▣ **Producción de endotoxinas.** Ya que se han establecido los microorganismos, debemos recordar que algunas especies de ellos tienen más capacidad virulenta que otras, virulencia que es asociada a *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* y *Prevotella intermedia*; la producción de estas moléculas es un factor determinante del poder patógeno bacteriano. Son pobremente neutralizados por los anticuerpos y capaces de desencadenar reacciones inmunitarias específicas e inespecíficas.

▣ **Exoenzimas.** Las especies que las pueden liberar son: *Prevotella* y *Porphyromona*, así como otras bacterias proteolíticas (*Peptostreptococcus spp*, *Fusobacterium spp*, *Enterococcus spp*) liberan enzimas que ayudan a la desestructuración de los tejidos pulpar y periapical y a facilitar la progresión de la invasión bacteriana. Las enzimas más sobresalientes son la heparinasa, fibrolisina y colagenasa; algunas que son liberadas por algunas especies de *Streptococcus*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Propionibacterium* y *Fusobacterium*. La hialuronidasa, coagulasa excretada por *Staphylococcus*



*aureus*; y las  $\beta$ -lactamasas producidas por algunas especies de *P. intermedia*.

▣ **Exotoxinas.** Tienen un efecto necrótico directo sobre los tejidos con las que contactan. Los microorganismos de interés en esta tesina son: *Streptococcus pyogenes* (estreptolisina), *S. aureus* (toxina eritrogénica y  $\alpha$ -toxina), *Escherichia coli* (enterotoxina), *Pseudomona aureginosa* (exotoxina A) y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (leucotoxina, que destruye los leucocitos polimorfonucleares sanguíneos y del surco gingival).<sup>8</sup>

▣ **Metabolitos.** La degradación de aminoácidos por la acción de la descarboxilasa, por la presencia de *Prevotella spp*, *Porphyromonas spp* y *Fusobacterium spp*, conduce a la formación de amoníaco, tóxico para los tejidos del hospedador y una fuente nitrogenada para *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Leptotrichia* y *Lactobacillus*. La acción del catabolismo del lactato por la acción de *Veillonella* forma gas hidrógeno necesario para especies anaerobias.

También la transformación anaerobia de la microflora se establece porque la destrucción del tejido conjuntivo por bacterias aerobias y anaerobias facultativas da origen a nutrientes utilizados en el metabolismo de las bacterias estrictamente anaerobias.<sup>4</sup>

## 2.6. Métodos de cultivo y observación microbiana

Gracias a muchos investigadores que se dedicaron intencional o espontáneamente a los microorganismos, podemos utilizar actualmente una



gran gama de métodos para su estudio, pudiendo considerar entonces la microbiología clínica como una de las materias más importantes en la odontología ya que nos permite identificarlos, controlarlos y eliminarlos.

La microbiota endodóntica puede ser analizada por bastas técnicas. Éstas incluyen el cultivo, diversos métodos de coloración utilizando microscopía óptica y electrónica, técnicas inmunológicas, métodos moleculares para la caracterización de ADN o ARN microbiano. La selección de las técnicas depende de la disponibilidad de recursos y del objetivo de investigación.<sup>4</sup> Entre las técnicas más utilizadas se encuentran:

▣ **Microscopía.** El ojo humano es incapaz de percibir objetos cuyo diámetro sea menor de 0.1 mm. No es de extrañar que los microbios, de tamaño inferior pasaran desapercibidos para el hombre y no fue sino hasta que se perfeccionaron los instrumentos para su visualización, que pudo observarlos. Tenemos así al microscopio, nombrado así por Johann Giovanni Faber (1570-1640). Tiempo después construidos y modificados por Anton van Leuwenhoek (1632-1723). Es entonces cuando la verdadera complejidad de nuestro entorno no comenzó a apreciarse hasta que se observaron por primera vez los microorganismos a través de la lente del microscopio.<sup>16,17</sup>

En general, la microscopía se utiliza en la microbiología con dos propósitos básicos: la detección inicial de microorganismos y la identificación preliminar o definitiva de los mismos. Es por tanto que el examen microscópico de muestras clínicas se utiliza para detectar bacterias, hongos, parásitos e incluso virus presentes en células infectadas.<sup>27</sup>

**Microscopio óptico, de campo brillante o de Luz.** Los componentes básicos de los microscopios ópticos consisten en una fuente de luz que se



utiliza para iluminar la muestra colocada en el portaobjetos, un condensador que se emplea para enfocar la luz sobre la muestra y dos sistemas de lentes (lentes del objetivo y lentes oculares) que se usan para aumentar la imagen de la muestra. La muestra se visualiza por transiluminación dejando pasar la luz a través del condensador hacia la muestra. El aumento total de la imagen es el producto de los aumentos logrados de las lentes del objetivo y el ocular. Se utilizan tres lentes del objetivo: de bajo aumento (x10), las cuales se pueden utilizar para obtener una visión general de la muestra; de alto aumento en seco (x40), que se emplea para detectar microorganismos de gran tamaño, como parásitos u hongos filamentosos; y de inmersión de aceite (x100), que se utiliza para observar bacterias, levaduras y detalles morfológicos de microorganismos.<sup>27</sup>

Existen también otros tipos de microscopios como el de fluorescencia, que emplea un emisor de luz ultravioleta; el microscopio de campo oscuro y el de contraste de fases; y otros de los cuales se pueden obtener mayor poder de resolución y permiten observar y reconocer, en cortes ultrafinos, las diferentes estructuras internas de la célula bacteriana como el microscopio electrónico, el cual utiliza un haz de electrones.<sup>17</sup>

❑ **Examen directo.** Los métodos de examen directo son los sistemas más sencillos de preparación de muestras para un examen microscópico. La muestra se puede suspender en agua o suero fisiológico (preparación en fresco), se puede mezclar con álcali para disolver el material de trasfondo (método del hidróxido de potasio, KOH) o bien se puede mezclar con una combinación de álcali y una tinción de contraste, por ejemplo, yodo. Los pigmentos tiñen de manera inespecífica el material celular, lo que incrementa el contraste con el trasfondo y permite llevar a cabo un examen detallado de las estructuras.<sup>27</sup>



▣ **Tinción.** Se utilizan diversas tinciones diferenciales para teñir cada tipo de microorganismo o componente del material celular; entre ellas existen la tinción de Wright-Giemsa, Ziehl-Neelsen, Kinyoun entre otras tinciones que pueden llegar a ser específicas para ciertas especies bacterianas (Figura 1).<sup>27</sup>

Tinciones diferenciales	
Tinción de Gram	Es la tinción usada más comúnmente en los laboratorios de microbiología. Constituye el criterio básico para separar los grandes grupos de bacterias (es decir, grampositivas, gramnegativas). Después de la fijación de la muestra en un portaobjetos de cristal (por calentamiento o tratamiento con alcohol), esta se expone a cristal violeta y después se agrega yodo para formar un complejo con el pigmento principal. Durante la decoloración con alcohol o acetona, las bacterias grampositivas retienen el complejo, mientras que los microorganismos gramnegativos lo pierden; se añade saponina como contracolorante, que es retenido por los microorganismos gramnegativos (de ahí su color rojo). El grado en que cada microorganismo retiene la tinción depende del organismo, las condiciones de cultivo y la habilidad para la tinción del microscopista
Tinción de hematoxilina férrica	Utilizada para la detección e identificación de protozoos fecales. Los huevos y larvas de helmintos retienen demasiada tinción y se identifican más fácilmente con una preparación en fresco
Tinción de metenamina argéntica	Se usa generalmente en laboratorios de histología más que en laboratorios de microbiología, sobre todo para la detección de elementos fúngicos en tejidos, aunque se pueden detectar otros microorganismos, como bacterias. La tinción con plata requiere habilidad debido a que una tinción no específica puede hacer que las muestras sean ininterpretables
Tinción de azul O de toluidina	Se usa principalmente para la detección de organismos de <i>Pneumocystis</i> en muestras respiratorias. Los quistes se tiñen de un color entre azul rojizo y violeta oscuro, sobre un fondo azul claro. La tinción de fondo se elimina por sulfatación. Las células de levadura se tiñen y son difíciles de distinguir de las células de <i>Pneumocystis</i> . Los trofozoitos no se tiñen. Muchos laboratorios han sustituido esta tinción por tinciones fluorescentes específicas
Tinción tricrómica	Es una alternativa a la hematoxilina férrica para la tinción de protozoos. Los protozoos tienen citoplasmas de color entre verde azulado y violeta, y núcleos y cuerpos de inclusión de color entre rojo y rojo púrpuro; el fondo de la muestra es verde
Tinción de Wright-Giemsa	Se utiliza para detectar parásitos sanguíneos, cuerpos de inclusión de virus y clamidias, y especies de <i>Borrelia</i> , <i>Toxoplasma</i> , <i>Pneumocystis</i> y <i>Rickettsia</i> . Es una tinción policromática que contiene una mezcla de azul de metileno, azul B y eosina Y. La tinción Giemsa combina azul de metileno y eosina. Los iones de eosina están cargados negativamente y tiñen los componentes básicos de las células de color entre naranja y rosa, mientras que otros pigmentos tiñen las estructuras celulares ácidas en varios tonos entre azul y violeta. Los trofozoitos de los protozoos tienen núcleos rojos y citoplasmas de color azul verdoso; las levaduras intracelulares y los cuerpos de inclusión generalmente se tiñen de azul; las rickettsias, las clamidias y las especies de <i>Pneumocystis</i> se tiñen de violeta
Tinciones acidorresistentes	
Tinción de Ziehl-Neelsen	Se utiliza para teñir micobacterias, así como otros microorganismos acidorresistentes. Los microorganismos se tiñen con carbolfucsina básica y resisten la decoloración con soluciones ácido-base. El fondo se tiñe para contrastar con azul de metileno. Los microorganismos se ven rojos sobre un fondo azul claro. La captación de la carbolfucsina requiere el calentamiento de la muestra (tinción acidorresistente en caliente)
Tinción de Kinyoun	Tinción acidorresistente en frío (no requiere calentamiento). Basada en el mismo principio que la tinción de Ziehl-Neelsen
Tinción auramina-rodamina	Basada en el mismo principio que otras tinciones acidorresistentes, excepto que se usan pigmentos fluorescentes (auramina y rodamina) para la tinción principal, y el permanganato de potasio (agente fuertemente oxidante) es la tinción de contraste e inactiva los pigmentos de fluorocromo no fijados. Los microorganismos tienen una fluorescencia verde amarillenta sobre un fondo negro

FIGURA 1. Fuente: Murray P. "Microbiología Médica" PÁGINA. 173



**Tinción de Gram.** En 1886 Christian Gram inventó ésta técnica. En este estudio la utilizaremos ya que constituye el fundamento de la clasificación fenotípica de las bacterias e incluso de las levaduras, revela la morfología de los microorganismos, e indiscutiblemente la relación Gram (positiva o negativa). Puede también utilizarse en situaciones especiales como: 1) obtener información adicional de los cultivos y una información preliminar rápida sobre los microorganismos presentes en la infección; 2) para demostrar la presencia de microorganismos en una zona en particular, y 3) por razones pedagógicas, mostrando a los estudiantes los tipos celulares presentes en el conducto.<sup>4,33</sup>

Las ventajas más notables es que es rápida, simple en comparación con otras técnicas y barata. La coloración y la morfología obtenida de esta técnica son las que se muestran en las siguientes imágenes (Figuras 2 y 3):



FIGURA 2. Técnica de Gram.

Fuente directa

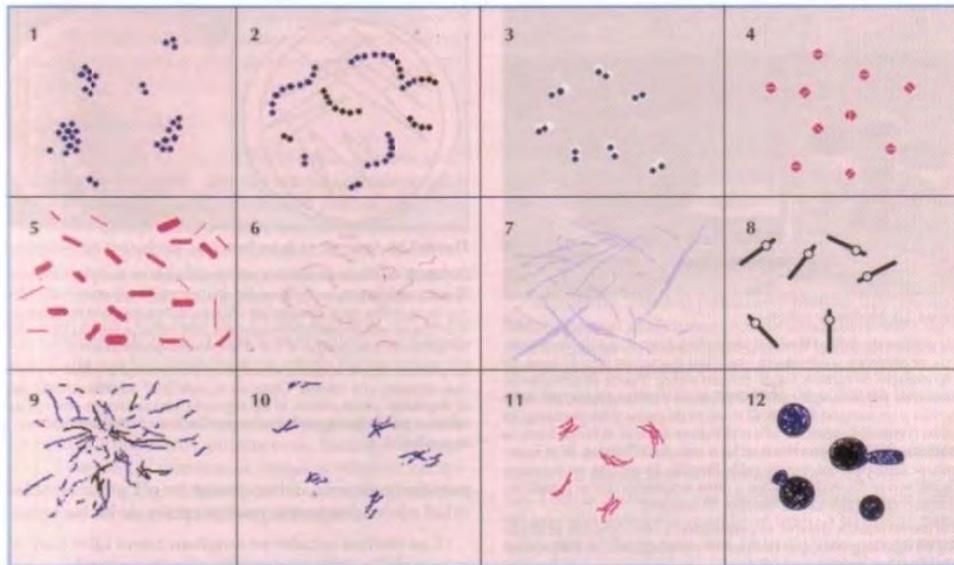


Figura 2.7. Morfología de algunas bacterias de interés médico.

Tanto la forma de las bacterias como el color que adquieren tras la tinción de Gram dependen de la pared, que es rígida. Los patrones morfológicos básicos de las bacterias están representados por la forma redondeada, a la que se denomina «coco» y la alargada conocida como «bacilo». Los cocos pueden disponerse en parejas, «diplococos», o formar cadenas, a veces poseen cápsula. Los bacilos pueden ser rectos o «fusiformes», lineales o curvados formando «vibriones» o «espirilos». Algunos bacilos forman esporas.

1. Estafilococos, 2. Estreptococos, 3. Neumococos (diplococos capsulados).
4. Neisserias (gonococo y meningococo). *Acinetobacter* y *Moraxella* tienen una morfología semejante.
5. Enterobacterias (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, etc.). *Pseudomonas*. Parvobacterias (*Brucella*, *Pasteurella*, *Haemophilus*).
6. Bacterias espirilares (*Campylobacter*, *Helicobacter*) y vibriones (*Vibrio cholerae*). 7. Bacteroides y fusobacterias (anaerobios).
8. *Bacillus*. *Clostridium* (anaerobios) ambos géneros forman esporas. 9. Actinomicetales (*Nocardia*, estreptomices) 10. Corinebacterias 11. Micobacterias (bacterias alcohol-ácido resistentes).
12. Levaduras (hongos unicelulares). Se incluyen con objeto de comparación del tamaño.

Figura 3. Fuente: Prats G. "Microbiología Clínica" PÁGINA. 25

**▣ Métodos de cultivo.** Las bacterias patógenas para el ser humano son células similares a toda célula viva; por lo tanto, para crecer y multiplicarse deben alimentarse con las mismas fuentes de energía necesarias, como proteínas, carbohidratos, vitaminas, minerales, etcétera. Para cultivarlas *in vitro* debemos reunir las condiciones de nutrición y otros factores para simular que están creciendo dentro del hospedero humano. Por ejemplo, algunas de las bacterias presentes en el conducto requieren nutrición específica como especies de *Prevotella* y *Porphyromonas* (bacilos largos anaerobios de pigmento negro) son ejemplos de bacterias que requieren nutrición específica: la Vitamina K y hemina. La Vitamina K se hace



disponible cuando la hemoglobina se desdobra, pero solo algunas bacterias pueden producir hemina.<sup>3,25</sup>

Por lo tanto, el cultivo microbiano nos ayuda a conocer las características únicas de cada bacteria para identificarla y obtener un diagnóstico microbiológico correcto.<sup>17</sup>

Entonces, los cultivos de acuerdo con su consistencia, los medios de cultivo son:

**Líquidos.** Cuando las sustancias nutritivas están disueltas en agua; por eso también se les conoce como infusión o caldo. Cuando los cultivos se hacen en medios líquidos, el crecimiento bacteriano se detecta por medio de los cambios que suceden en él, los cuales podemos notar al inocularlo e incubarlo, debe ser traslúcido al estar estériles, se vuelve turbio e incluso liberar aroma; puede también formarse una película en la parte superior del caldo, además de fóculos y anillos en la superficie superior del tubo.

**Sólidos.** Cuando al medio se le agrega 5 por ciento de un polisacárido gelatinoso llamado agar, el cual se obtiene de las algas marinas *Rodofíceas*, el medio de cultivo es de tipo sólido. Esta sustancia solidificante no la usan las bacterias como alimento y se licua a más de 40°C, propiedad indispensable para poder incubarlo a 37°C.

**Semisólido.** Cuando un medio de cultivo posee una concentración de agar cercano a 1.5 por ciento, el medio adquiere una apariencia suave y es de tipo semisólido.

Los medios también son clasificados según su aporte nutritivo en:



**Usuales.** Los medios usuales contienen las sustancias nutritivas mínimas para el crecimiento de las bacterias metabólicamente no exigentes, pero también son utilizados como base para la preparación de otros medios (enriquecidos, selectivos).

**Enriquecidos.** Aquellos en los que sólo crecen microorganismos muy exigentes en sus requerimientos nutritivos (suero, sangre, vitaminas, etc.).<sup>16</sup>

**Selectivos.** Cuando de una mezcla bacteriana interesa aislar específicamente un solo tipo de bacteria que está en escasa cantidad. Este tipo de medio permite el crecimiento de dicha bacteria, inhibiendo al resto de las existentes en la muestra. Las sustancias que pueden cumplir dicha función son como ejemplo, cloruro de sodio a concentraciones elevadas, cristal violeta, sales biliares, etc.<sup>28</sup>

**Selectivo-Diferenciales.** En los medios selectivos siempre crecen algunas bacterias diferentes a la buscada, por ello, para diferenciar las distintas colonias, se añaden sustancias que confieren un color diferente a las colonias según la distinta actividad metabólica de las bacterias que la forman. De esta manera se puede hacer diagnóstico de género y tal vez de especie.<sup>16,28</sup>

Es importante destacar que después de sembrar e incubar en medios sólidos o placas de agar, se origina un cúmulo de bacterias llamadas colonias, las cuales tendrán características muy específicas, ello permitirá conocer de qué tipo son las colonias, lo que es de gran relevancia ya que nos puede ayudar a identificar el género bacteriano (Figura 4).

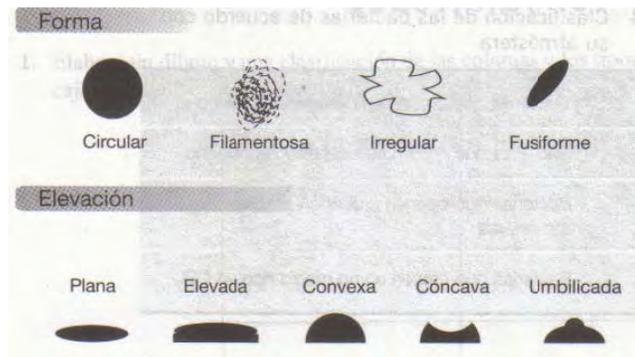


FIGURA 4. Fuente: Rodríguez E. "Manual de Microbiología Oral" PÁGINA. 29

Así pues, después de tomada la muestra, ésta misma es diluida cuando es necesario, e inoculada en medios selectivos o no selectivos, cultivada en aerobiosis o anaerobiosis un día o hasta un par de semanas. Después del cultivo, las placas son examinadas y en relación con el crecimiento, representantes de distintas colonias pueden ser subcultivadas para obtener cultivos puros y examinados con distintos métodos de coloración y reacciones bioquímicas.<sup>4</sup>

**Descripción de los medios de cultivo usados en esta investigación**  
(Anexo 1).

- **Medio líquido de Tioglicolato enriquecido.** Cultivo líquido cuya composición permite el crecimiento de microorganismos anaerobios, microaerófilos y aerobios, por lo que es apropiado como medio de enriquecimiento directo de muestras clínicas. Una de las principales características de este medio es que el tioglicolato sódico disminuye el potencial de óxido-reducción, lo que favorece al crecimiento de bacterias anaerobias. En este estudio se utilizará como medio de enriquecimiento de la muestra clínica para microorganismos anaerobios.



Fórmula:

Peptona de caseína 15grs

Cloruro de sodio 2.5grs

Extracto de levadura 5grs

L-cistina 0.25grs

Tioglicolato de sodio 0.5grs

Agar base 0.75grs

Vitamina K

Hemina (menadiona)

pH 7.0 ± 0.2grs

Resultados:

Después del periodo de incubación, deben examinarse los tubos para observar la presencia de turbidez, la cual indica el crecimiento. Si se mantiene en incubación anaerobiosis, se reproducirán *Prevotella* spp.

- **Caldo Infusión cerebro corazón (BHI).** Es utilizado para el cultivo de microorganismos fastidiosos como estreptococos, neumococos y meningococos. En este estudio se utilizará como medio de enriquecimiento de la muestra clínica para microorganismos aerobios.

Fórmula:

Infusión de cerebro de ternera 200

Infusión de corazón de res 250

Peptona de gelatina 10grs

Cloruro de sodio 5grs

Fosfato disódico 2.5grs

Dextrosa 2grs

pH 7.4 ± 0.2



Resultados:

La presencia y desarrollo de microorganismos es observado por turbidez en el medio. Los microorganismos desarrollados deberán ser subcultivados en medios específicos.

- **Agar Sangre.** Es un medio para el aislamiento y el cultivo de una gran variedad de microorganismos fastidiosos. Se suplementa con sangre de carnero, caballo o conejo al 5-10% para aislar, cultivar y estudiar reacciones hemolíticas de varios microorganismos.

Fórmula:

Infusión de músculo de corazón 2grs

Extracto de levadura 5grs

Cloruro de sodio 5grs

Agar base 15grs

Digerido pancreático de caseína 13grs

pH 7.3 ± 0.2

Resultados:

Los estreptococos hemolíticos presentan colonias traslúcidas u opacas, grises, pequeñas y mucoides con una hemólisis incluyen a *Listeria*, *Corinebacterias*, estafilococos hemolíticos., *E. coli*, y *Pseudomonas*. Las colonias de neumococos aparecen planas, lisas, traslúcidas, grisáceas y algunas veces mucoides rodeadas por una pequeña zona verdosa de  $\alpha$ -hemólisis. Las colonias de estafilococos tienen una apariencia opaca, de color blanco a amarillo y rodeadas de una zona clara por  $\beta$ -hemólisis.

- **CHROMagar Orientation.** Es un medio no selectivo para el aislamiento, permite la diferenciación e identificación de *E. coli* y



*Enterococcus, Klebsiella-Enterobacter-Serratia y Proteus-Morganella-Providencia.*

Reactivos:

Cromopeptona 16.1grs

Mezcla cromógena 1.3grs

Agar base 15grs

pH 6.9 ± 0.2

Resultados:

Debido a que es un medio selectivo-diferencial, las colonias que pueden crecer serán rosas para *E. coli*, azules con o sin halos violeta no indica que se encuentra *Klebsiella-Enterobacter-Serratia*, beige o pálidas para *Enterococcus, Staphylococcus saprophyticus*, azul verdoso equivalente a *Proteus-Morganella-Providencia*, colonias muy pequeñas azul claro verdoso a azul con o si halos para *Streptococcus*, levaduras en color crema.

- **CHROMagar Candida.** Es un medio de aislamiento e identificación para *Candida albicans, C. tropicalis y C. krusei*. Inhibe bacterias y también puede utilizarse como medio de aislamiento selectivo para otras especies de levaduras y para hongos filamentosos.

Reactivos:

Cromopeptona 10grs

Glucosa 20grs

Mezcla cromógena 2grs

Cloranfenicol 0.5grs

Agar base 15grs

pH 6.0 ± 0.3

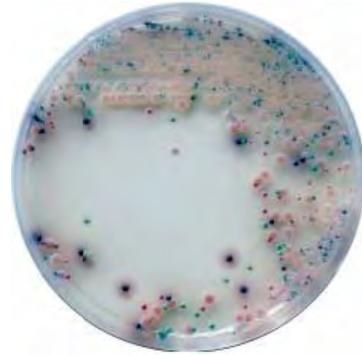
Resultados:



Éste también es un medio selectivo-diferencial, las colonias que pueden crecer serán verde claro a mediano para *C. albicans*, verde oscuro para *C. dubliniensis*, rosa claro a rosa con borde blancuzco para *C. krusei* y azul grisáceo a azul verdoso o metálico con o sin halos violetas serán colonias de *C. tropicalis*.



CHORagar Orientation



CHROMagar Candida

FIGURA 5. Fuente: <http://www.chromagar.com/>

- **Agar sangre enriquecido.** Además de ser utilizado para la investigación de los tipos de hemólisis que realizan algunas bacterias como estreptococos  $\beta$ -hemolíticos y  $\alpha$ -hemolíticos, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus*, *E. coli*; también el crecimiento de microorganismos exigentes, que en su metabolismo necesitan vitamina K y/o hemina como *Neisseria* spp, *Porphyromonas* spp, *Prevotella* spp y *Campylobacter* spp

Fórmula:

Por cada 500 ml de agua

Agar soya tripticasa 10grs

Agar infusión cerebro corazón 13grs

Extracto de levadura 5grs

Hemina 5ml

Vitamina K 2.5 ml



Sangre desfibrinada de carnero 25ml

Resultados:

Utilizado en atmósfera anaerobia, encontraremos bacterias de pigmento negro *Neisseria* spp, *Porphyromonas* spp, *Prevotella* spp.

**▣ Métodos moleculares.** El número de nuevas especies provenientes de las infecciones endodónticas aumenta continuamente, el aislamiento de las especies ya conocidas cambió enormemente los distintos casos de bacterias resistentes. El desarrollo de métodos nuevos y constantemente mejorados de multiplicación de ADN a través de PCR (reacción en cadenas de polimerasa) aumentó la selección de los métodos válidos en la investigación microbiana. Los cuales incluyen PCR, PCR en tiempo real, PCR de cultivo, PCR cuantitativo (Q-PCR), PCR con transcriptasa revertasa (RT-PCR), primers especie-específicos, secuencia de subunidades 16s del RNA, secuencia del ADN, electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE), por mencionar algunos de los métodos relativamente más recientes.

Las ventajas de las nuevas técnicas moleculares son muchas y ciertamente equilibran estas limitaciones. Estas hicieron que fuera posible identificar diversas especies nuevas y no cultivables en las infecciones endodónticas ofrecen una sensibilidad muy alta que puede ser útil para propósitos epidemiológicos, y la anaerobiosis ya no es necesaria durante el manejo de la muestra y muchos de los métodos son rápidos.<sup>4</sup>



### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Existen desde ya hace algunas décadas estudios experimentales que describen la microbiota del conducto radicular, así como su relación con las patologías periapicales; sin embargo, en diversas ocasiones el tratamiento suele fracasar a pesar de haber trabajado de la manera ideal, esto puede suceder debido a que la microbiota no es exactamente la misma en todos los casos clínicos, por ello es importante realizar un análisis microbiológico del conducto radicular; lo cual también podría servir como propuesta para la enseñanza y perfeccionamiento de la técnica utilizada de los alumnos que cursan la materia de endodoncia.

### **4. JUSTIFICACIÓN**

Debido a que se presentan un número considerable de pacientes a la clínica de endodoncia con necrosis pulpar y en la mayoría de las ocasiones los estudiantes que cursan el primer o segundo año de endodoncia no le dan la debida importancia a enfermedades pulpares no severas como una necrosis pulpar comparada a un absceso o la presencia de una fístula. Por lo tanto, este estudio se realizará con el fin de conocer si existen microorganismos aunados a dicha patología, así como proponer la toma de muestras durante el tratamiento de conductos, para así demostrar que es muy importante a fin de disminuir el riesgo de fracaso, sobre todo durante el aprendizaje y orientación de los alumnos.



## 5. OBJETIVOS

### 5.1. General

Determinar si existen microorganismos en los conductos radiculares con necrosis pulpar.

### 5.2. Específicos

- Identificar los microorganismos presentes en el conducto radicular con necrosis pulpar en pacientes mayores de 18 años que acuden a la clínica de endodoncia de la Facultad de Odontología, UNAM.
- Proponer que se realicen estudios microbiológicos en los pacientes que acudan con el diagnóstico de necrosis pulpar para evitar desencadenar una infección agresiva o difícil de tratar.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. Tipo de estudio

Este estudio fue de tipo prospectivo, transversal y descriptivo, piloto.

### 6.2. Material

10 pacientes con diagnóstico de necrosis pulpar que asistan a consulta a la clínica de endodoncia de la Facultad de Odontología.

Medios de enriquecimiento de la muestra

- 10 tubos de 5ml con Infusión Cerebro Corazón (BHI)<sup>18,21</sup>
- 10 tubos de 8ml con Tioglicolato enriquecido con vitamina K y hemina<sup>18,21</sup>

### Medios de cultivo

- 10 placas de CHROMagar Candida®
- 10 placas de CHROMagar Orientation®
- 10 placas de Agar sangre<sup>21</sup>
- 10 placas de Agar sangre enriquecido con vitamina K y hemina<sup>2,18,25</sup>



FIGURA 6. Medios de enriquecimiento y de cultivo utilizados en este estudio.

Fuente directa

### Misceláneos

- 30 puntas de papel estériles<sup>2,21,29,30</sup>
- Pinzas de curación estériles
- 10 cajas de Petri estériles 100x15cm



- 
- Sobres generador de anaerobiosis Gaspak EZ<sup>2,21</sup>
  - Bata
  - Cubrebocas
  - Guantes de látex
  - 100 cubreobjetos
  - 50 portaobjetos
  - Colorantes para tinción de Gram (cristal de violeta, lugol, alcohol acetona, fuscina básica)
  - Solución salina
  - Vaso de precipitados
  - Encendedor
  - Mechero Bunsen
  - Microscopio óptico
  - Aceite de Inmersión
  - Incubadora
  - Asa microbiológica metálica
  - Micropipetas estériles
  - Jarra de anaerobiosis<sup>2,18,21</sup>
  - Cuenta colonias
  - Cinta adherible
  - Plumón de tinta permanente
  - Cámara fotográfica



### 6.3. Método

De acuerdo con el protocolo, se seleccionaron pacientes que tuvieron órganos dentales con necrosis pulpar de sexo indistinto, los cuales asistían a consulta a la clínica de endodoncia de la Facultad de Odontología. Se realizó un pequeño cuestionario (Anexo 2) previo a la toma de la muestra para no seleccionar erróneamente el espécimen y evitar la recolección de bacterias de una patogenia distinta.

En la clínica, se procedió a obtener la muestra de pacientes que previamente hayan sido diagnosticados, con el órgano dental en cuestión debidamente aislado y desinfectado. Se utilizaron durante la muestra: bata, guantes de látex y cubrebocas. Por muestra se tuvo lista una caja pequeña con puntas de papel, pinzas de curación, caja de Petri vacía, todo lo anterior previamente esterilizado; todo los medios de transporte y de cultivo se marcaron con marcador permanente para registrar el número de la muestra: un tubo de medio de transporte líquido de Infusión Cerebro Corazón; y un tubo con medio de transporte líquido de Tioglicolato enriquecido previamente colocado en anaerobiosis, lo cual se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante, y de la misma forma para los medios de cultivo para anaerobios:

1. Se colocaron las placas o tubos deseados dentro del contenedor GasPak (Jarra de anaerobiosis).
2. Se extrajeron del envase los sobres del GasPak EZ Container System y se retiró la cubierta externa.

3. Se colocó el sobre activado en el contenedor con las placas o los tubos dentro, a un lado de ellos, entre la gradilla de las placas y el exterior del recipiente.
4. Se cerró el contenedor completamente.
5. Tras la incubación, se abrió el recipiente, se retiraron las placas y desecharon los sobres GasPak EZ.
6. Resultados: las condiciones anaerobias se alcanzaron en 2.5 hrs con el 15 por ciento o más de dióxido de carbono en 24 hrs a 35°C. Las placas de agar que contenían sangre mostraron reducción en 2-4 horas a 35°C.



FIGURA 7. Medio de Tioglicolato enriquecido prereducido

Fuente directa

Se colocaron secuencialmente 3 puntas de papel, dejando cada una en un lapso de 30 segundos dentro del conducto; cabe destacar que si el órgano dental era multiradicular, la muestra se tomó del conducto de la raíz más larga.<sup>29</sup> Las muestras obtenidas se procesaron de la siguiente manera (Anexo 3):

- a) La primera punta de papel se guardó en una caja de Petri estéril vacía, de dicha muestra se realizó el frotis en el portaobjetos y se tiñó con el método de Gram para su observación microscópica.



FIGURA 8. Puntas de papel y cajas de Petri

Fuente directa

- b) La segunda punta de papel se introdujo en el tubo del medio de transporte líquido de BHI. Se incubó 24 horas a 37°C.
- c) La tercera punta de papel se introdujo en el tubo del medio de transporte de Tioglicolato enriquecido previamente prereducido. Se volvió a colocar en anaerobiosis y se incubó 48 horas a 37°C, con observación a las 24 horas.

Las muestras se trasladaron, a no más de 15 minutos de haberlas tomado<sup>29</sup> al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología, UNAM, para colocarlas dentro de la incubadora.

Cuando pasó el lapso de tiempo de incubación requerido, se observó si hubo o no crecimiento microbiano, lo cual se determinó por enturbecimiento del medio.



FIGURA 9. Medio de enriquecimiento aerobio (BHI) y anaerobio (Tioglicolato).  
Ambos con crecimiento positivo.

Fuente directa

Al obtener muestras positivas, se resembraron en las placas con la técnica de estría cruzada:

- a) De la muestra obtenida del medio caldo Infusión Cerebro Corazón, se realizó un frotis y se tiñó con Gram, posterior a esto se resembró en los siguientes medios de cultivo: Agar sangre, CHROMagar Orientation® y CHROMagar Candida®. Se incubó en aerobiosis 24-48 horas a 37°C; y se observaron las características macroscópicas cada 24 hrs.

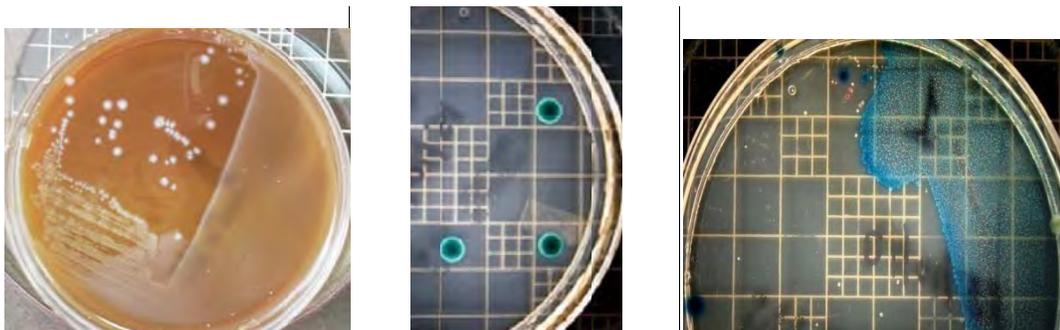


FIGURA 10. Crecimiento de las colonias en Agar Sangre y CHROMagar Candida® y  
CHROMagar Orientation®

Fuente directa

Transcurrido el tiempo de incubación total, se realizaron el frotis y tinción Gram de las colonias obtenidas del Agar sangre y del CHROMagar Orientation®; se observaron al microscopio óptico a inmersión.

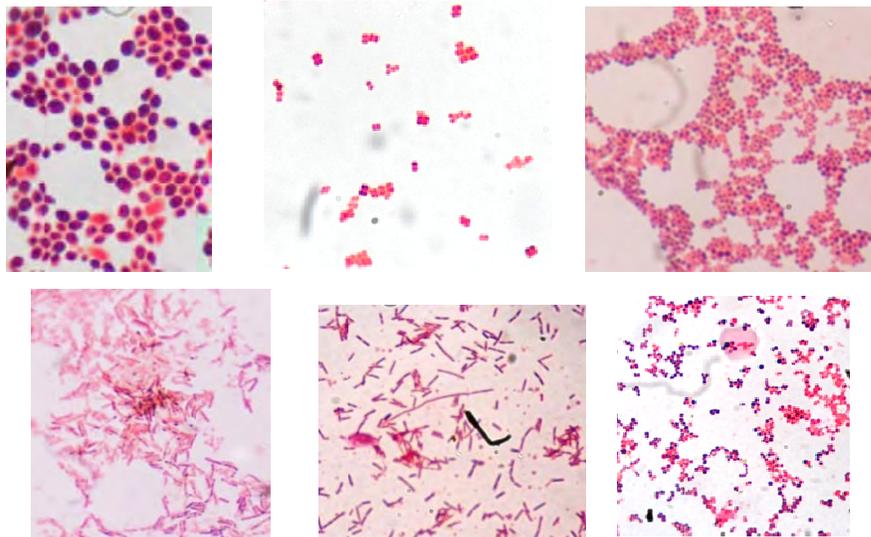


FIGURA 11. Tinción Gram de colonias del medio Agar Sangre

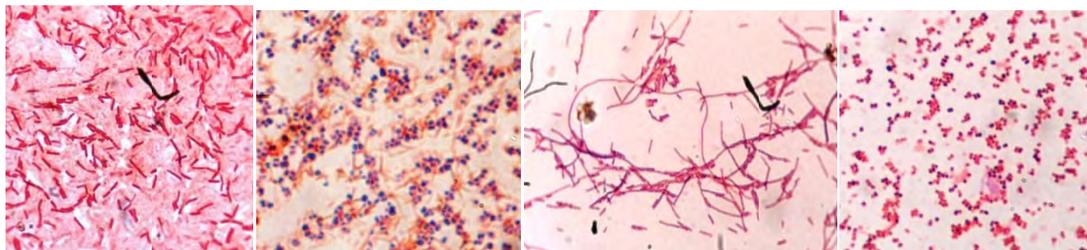


FIGURA 12. Tinción Gram de colonias del medio CHROMagar Orientation®.

Fuente directa

Del CHROMagar Candida®, se observaron las características macroscópicas y de las colonias obtenidas y se realizó un examen en fresco con solución salina; se observó al microscopio óptico en aumento de 40x.

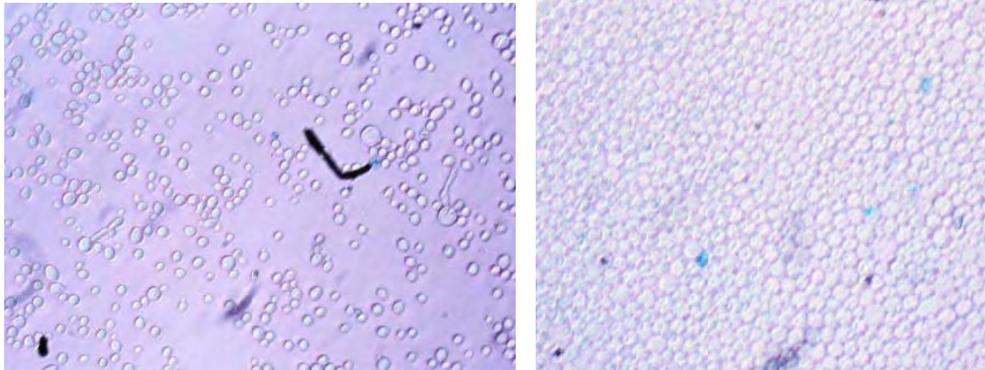


FIGURA 13. Examen den fresco de las colonias de CHROMagar Candida®

Fuente directa

- b) De la muestra colocada en el medio de Tioglicolato enriquecido, se realizó un frotis y se tiñó con Gram, posterior a esto se resembró en Agar sangre enriquecido. Se incubaron de 2 a 4 días<sup>30</sup> en anaerobiosis a 37°C; se observó cada 24 horas.

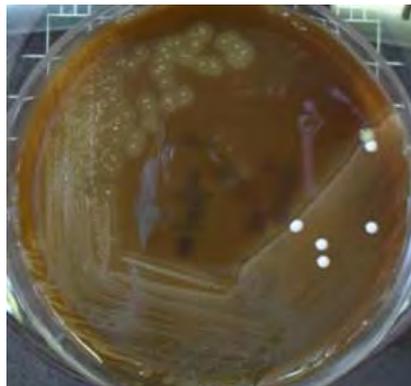


FIGURA 14. Crecimiento de las colonias en agar Sangre enriquecido.

Fuente directa

De la misma manera, transcurrido el tiempo de incubación, se observaron las características macroscópicas de las colonias y se hicieron un frotis y tinción de Gram de las colonias obtenidas; de igual manera se observaron al microscopio óptico a inmersión.

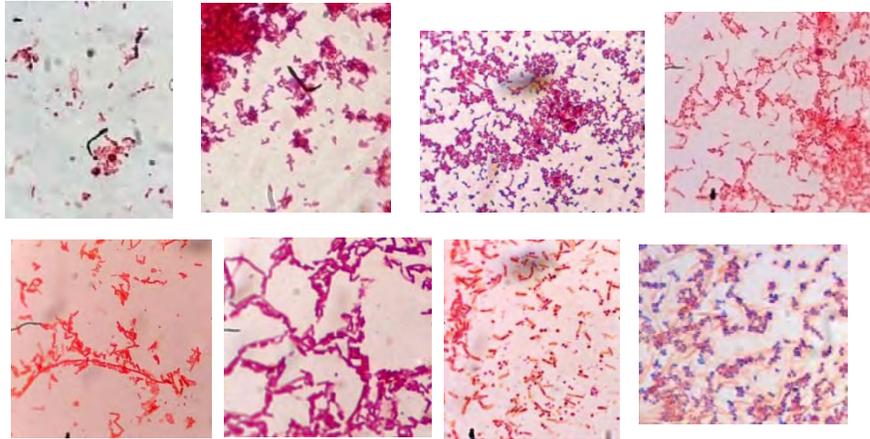


FIGURA 15. Tinción Gram de colonias del medio de Agar Sangre Enriquecido.

Fuente directa

#### 6.4. Población de estudio y muestra

Se utilizaron muestras de conductos radiculares con diagnóstico de necrosis pulpar de personas de sexo indistinto, que asistían a consulta a la clínica de endodoncia de la Facultad de Odontología, UNAM; se seleccionaron de acuerdo a los criterios de inclusión.

#### 6.5. Criterios de exclusión

- Pacientes que no desearon participar en la investigación.
- Dientes temporales.<sup>21</sup>
- Dientes con bolsa periodontal.<sup>2</sup>



- Pacientes que se encontraban bajo tratamiento periodontal con administración de clorhexidina.<sup>21</sup>
- Conductos irrigados o trabajados mecánicamente antes de la toma de la muestra.
- Conductos demasiado estrechos, que impedían la toma de la muestra.
- Conductos calcificados.
- Aislamiento deficiente.

#### **6.6. Criterios de inclusión**

- Pacientes de sexo indistinto.
- Conductos radiculares con diagnóstico de necrosis pulpar.
- Que tuvieran la radiografía dentoalveolar inicial del diente a tratar.<sup>30</sup>

#### **6.7. Aspectos éticos**

Previamente se le solicitó a la Mtra. Amalia Ballesteros Vizcarra, Coordinadora de la asignatura de Endodoncia, su apoyo y autorización para ingresar a la Clínica de Endodoncia de la Facultad de Odontología con los alumnos de cuarto año (Anexo 4). Posteriormente, se le dio a firmar al paciente una Carta de Consentimiento Informado (Anexo 5) correspondiente al estudio, en el que se le explicó el procedimiento para que nos autorizara a aplicarlo.



---

## 7. RECURSOS

**7.1. Humanos:** 10 pacientes con diagnóstico de necrosis pulpar en órgano dental, que acudieron a consulta a la clínica de endodoncia de la Facultad de Odontología. Una tesista, un tutor, una asesora.

### 7.2. De Infraestructura:

- Clínica de Endodoncia, Facultad de Odontología de la UNAM.
- Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Posgrado de la Facultad de Odontología, UNAM.
- Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la UNAM.

**7.3. Financieros:** El estudio fue financiado por el tesista (Anexo 6).



## 8. RESULTADOS

De las muestras estudiadas pudimos observar con mayor frecuencia en el frotis directo la presencia de cocos Gram positivos en cadenas en la mayoría de los casos, seguido de cocos Gram positivos en pares y racimos, encontramos en mucha menor incidencia bacilos cortos Gram positivos en pares y bacilos largos Gram negativos en cadena, también encontramos filamentos tanto Gram positivos como negativos.

Respecto a los medios enriquecidos donde hicimos crecer las muestras provenientes de los conductos necrosados, en el medio aerobio se encontraron cocos Gram positivos en cadena, pares, tétradas y racimos; sin embargo, en esta ocasión los filamentos Gram negativos fueron los siguientes en frecuencia, seguidos de los bacilos cortos y largos Gram positivos en cadena, así como los bacilos Gram negativos cortos en pares y largos en cadena; para el medio anaerobio, la presencia de cocos Gram positivos en cadenas predominaron, seguidos de bacilos cortos Gram positivos en cadena, seguidos de los bacilos cortos Gram positivos en cadena, y en mucho menor cantidad tuvimos cocos Gram negativos en masa y cocos Gram positivos en pares y racimos.

Referente de los medios de cultivo aerobio, exceptuando el CHROMagar Candida®, predominaron los cocos Gram+ aislados, en pares, tétradas y racimos y casi con igualdad se encontraron bacilos cortos Gram positivos en pares seguidos de cocos Gram negativos aislados, así como de bacilos Gram negativos largos en cadena, cortos en pares, y filamentos Gram negativos.



Se encontró crecimiento en todas las placas de CHROMagar Orientation® observándose colonias rosas pequeñas sin halos, lo que nos indica que la colonia corresponde a *E. coli*; colonias muy pequeñas de blancas a beige muy claro pálidas indicadas para *Enterococcus* y *Staphylococcus*; y colonias muy pequeñas azul claro verdoso sin halos, resultado para *Streptococcus*; sólo se encontraron en dos medios colonias color crema, indicadas para levaduras.

Con respecto a los hongos, se observaron formas levaduriformes tanto en Agar sangre como en CHROMagar Orientation® en muy escasa cantidad. En cuanto a CHROMagar Candida®, sólo hubo crecimiento en dos muestras, observando en ambas placas, colonias verde oscuro con un halo verde claro, resultado que el fabricante indica como *C. dubliniensis* y *C. albicans* respectivamente. Al realizar el frotis de las colonias sólo se observaron hifas y blastoconidias.

Por último, al realizar el frotis y la tinción de Gram en las colonias del medio anaerobio de agar sangre enriquecido, encontramos crecimiento de cocos Gram positivos en cadenas, seguido de cocos Gram negativos no agrupados, bacilos Gram negativos cortos en pares y largos en cadena; y en menor cantidad, observamos bacilos Gram positivos cortos en pares y largos en cadenas, bacilos cortos Gram negativos en cadena y formas levaduriformes.

Tales resultados se exhiben en las siguientes tablas por cada muestra y medio.



## 8.1. Tablas

No. MUESTRA	SEXO (F o M)	EDAD	FECHA DE TOMA DE MUESTRA	ÓRGANO DENTAL	CONDUCTO	ESTADO DE SALUD GENERAL DEL PACIENTE	ESTADO DE SALUD BUCAL DEL PACIENTE	RESULTADO DEL FROTIS DIRECTO CON TINCIÓN DE GRAM
1	F	60	13/10/2010	14	Palatino	Hipertensión	Aparentemente sano	Cocos Gram + en cadenas y cocos Gram – agrupados
2	F	28	13/10/2010	37	Distal	Sano	Aparentemente sano	Cocos Gram + en pares y cadenas
3	F	48	14/10/2010	15	Único	Sano	Aparentemente sano	Cocos Gram+ en cadenas, cocos Gram-agrupados y bacilos cortos Gram+ en pares
4	F	34	15/10/2010	22	Único	Sano	Aparentemente sano	Cocos Gram+ en cadenas, cocos Gram-, bacilos cortos Gram+
5	F	56	15/10/2010	16	Meiso-Distal	Sano	Aparentemente sano	Cocos Gram + en cadenas, bacilos cortos Gram+, filamentos Gram+, micelios verdaderos
6	F	55	18/10/2010	12	Único	Sano	Aparentemente sano	Cocos Gram+ en pares y bacilos cortos Gram+ en cadena
7	F	39	19/10/2010	22	Único	Sano	Aparentemente sano	Filamentos Gram- y diplococos Gram+
8	M	48	19/10/2010	15	Único	Sano	Fístula y toma de medicamentos	Cocos Gram+ aislados y en tétradas
9	F	30	20/10/2010	22	Único	Sano	Aparentemente sano	Cocos Gram+ en racimos y pares, bacilos largos y cortos Gram+ aislados
10	M	48	20/10/2010	26	Meiso-Vestibular	Sano	Fístula hace 5 meses	Cocos Gram+ en cadenas, bacilos largos Gram-, bacilos Gram+ enmarañados, cocos Gram- aislados



No. MUESTRA	RESULTADO DEL CRECIMIENTO DE LA MUESTRA			
	BHI		TIOGLICOLATO	
	CARACTERÍSTICAS DEL CRECIMIENTO	TINCIÓN DE GRAM	CARACTERÍSTICAS DE LA COLONIA	TINCIÓN DE GRAM
1	POSITIVO: Turbidez y sedimentación	Cocos Gram+ en cadenas	POSITIVO: Turbidez y grumos pequeños	Cocos Gram+ en cadenas, cocos Gram+ en pares, bacilos cortos Gram-, cocos Gram- agrupados
2	POSITIVO: Turbidez y sedimentación	Cocos Gram+ en pares, cocos Gram- aislados.	POSITIVO: Grumos.	Cocos Gram+ en cadenas y cocos Gram- agrupados
3	POSITIVO: Turbidez y sedimentación	Cocos Gram+ en pares, racimos y cadenas, cocos Gram- en pares y Bacilos largos Gram+ en cadenas, bacilos cortos Gram+ en cadenas, bacilos cortos Gram- en cadenas y pares	POSITIVO: Turbidez y grumos pequeños	Bacilos cortos Gram+ en cadenas y cocos Gram+ en cadenas
4	POSITIVO: Turbidez y sedimentación	Cocos Gram+ en cadenas y cocos Gram- agrupados	POSITIVO: Grumos.	Cocos Gram + en cadenas y bacilos largos Gram+ en cadenas y enmarañados
5	POSITIVO: Turbidez y sedimentación	Filamentos Gram- con extremos ahusados, cocos Gram- agrupados, cocos Gram+ en pares, bacilos largos Gram+ en cadenas	POSITIVO: Turbidez y grumos	Bacilos largos Gram+ en pares y cocos Gram+ en cadenas
6	POSITIVO: Turbidez y sedimentación	Cocos Gram+ en cadenas y filamentos ahusados Gram-	POSITIVO: Turbidez y escasos grumos a la mitad del tubo	Cocos Gram+ en cadenas, cocos Gram- en tétradas, bacilos Gram- largos en cadenas
6	POSITIVO: Turbidez	Cocos Gram+ en cadena, diplococos Gram+, bacilos cortos Gram- en pares y cadenas	POSITIVO: Turbidez y grumos a la mitad del tubo	Bacilos cortos Gram+ en cadenas y empalizada, diplococos Gram+, y cocos Gram- en pares y cadenas
8	POSITIVO: Turbidez	Cocos Gram+ en cadenas y diplococos Gram+, Bacilos cortos Gram+ en pares y tétradas, filamentos ahusados Gram-	POSITIVO: Turbidez	Cocos Gram+ en pares, bacilos cortos Gram+ en cadena, bacilos cortos Gram- en cadena
9	POSITIVO: Turbidez	Cocos Gram+ en cadenas, cocos Gram- aislados y en cadenas y agrupados, bacilos cortos Gram+ aislados	POSITIVO: Turbidez y grumos	Bacilos cortos Gram- en cadenas, cocos Gram- en cadenas
10	POSITIVO: Turbidez y sedimentación	Bacilos cortos Gram- en cadenas, cocos Gram+ en cadenas, pares y tétradas, bacilos cortos Gram+ aislados	POSITIVO: Turbidez y grumos	Bacilos cortos Gram- en cadenas



No. MUESTRA	RESULTADOS DE LOS CULTIVOS AEROBIOS (continúa...)			
	CHROMagar CANDIDA®		CHROMagar ORIENTATION®	
	CARACTERÍSTICAS DE LA COLONIA	OBS. EN FRESCO	CARACTERÍSTICAS DE LA COLONIA	TINCIÓN DE GRAM
1	Colonias grandes, verde oscuro en el centro y con halo verde a blanco, brillosas, elevadas con bordes regulares	Blastoconidias e hifas	1) Colonia verde azulada, pequeña, brillante, poco elevada, bordes regulares, lisa. 2) Colonia blanca, pequeña, brillante, plana, lisa con bordes regulares. 3) Colonias rosa a morado, pequeñas, brillantes, lisas, planas con bordes regulares.	1) Cocos Gram+ en cadenas, cocos Gram- aislados. 2) Cocos Gram+ en cadenas, cocos Gram- aislados, bacilos cortos Gram+ en cadenas, bacilos cortos Gram-. 3) Cocos Gram- en cadenas, diplococos Gram+.
2	NEGATIVO	NEGATIVO	Colonias pequeñas a medianas, verde azuladas, brillantes, lisas, cremosas, elevadas, regulares.	Cocos Gram- formando redes y cocos Gram+ en cadenas
3	Colonias grandes, verde oscuro, brillosas, elevadas con bordes regulares	Blastoconidias	1) Colonias verde azuladas, pequeñas, brillosas, lisas, elevadas, bordes regulares. 2) Colonias blancas, brillantes, grandes, lisas, irregulares.	1) Cocos Gram- en cadenas, bacilos Gram- largos en cadena. 2) Bacilos largos Gram- en cadenas
4	NEGATIVO	NEGATIVO	1) Colonia blanca, pequeña, elevada, lisa, brillante, bordes regulares. 2) Colonia verde azulada, muy pequeña, crecimiento sólo alrededor del medio (entre el borde del agar y la caja)	1) Cocos Gram- en cadenas y tétradas. 2) Cocos Gram+ en cadenas y filamentos Gram-
5	NEGATIVO	NEGATIVO	Colonia verde azulada, muy pequeña, lisa, elevada, brillantes, bordes regulares.	Cocos Gram+ en cadenas, cocos Gram- en pares y bacilos cortos Gram- en cadenas
6	NEGATIVO	NEGATIVO	1) Colonia verde azulada, muy pequeña, brillante, plana, bordes regulares, lisas. 2) Colonia morada, muy pequeña, brillante, lisa, poco plana con bordes regulares.	1) Bacilos cortos y largos Gram- en cadena, bacilos muy largos Gram+ en cadena y cocos Gram+ en pares 2) Bacilos Gram- muy largos en cadenas, bacilos cortos Gram+ en pares.
7	NEGATIVO	NEGATIVO	Colonias verde azuladas, de pequeñas a medianas, elevadas, brillantes, bordes regulares y más oscuros.	Cocos Gram+ en cadenas y pares y cocos Gram- aislados
8	NEGATIVO	NEGATIVO	1) Colonias verde azuladas, pequeñas, brillosas, lisas, elevadas, bordes regulares. 2) Colonias blancas cremosas, medianas, brillantes, lisas, borde regular.	1) Cocos Gram- en pares, bacilos cortos Gram+ en pares. 2) Cocos Gram+ en pares, cocos Gram- en racimos, filamentos fusiformes Gram- y formas levaduriformes
9	NEGATIVO	NEGATIVO	1) Colonias blancas transparentes, muy pequeñas, brillantes, lisas, planas, bordes regulares. 2) Colonias Verde azuladas, pequeñas, lisas, brillantes, planas, bordes regulares. 3) Colonia rosa oscuro, pequeña, lisas, plana, brillante, borde regular	1) Cocos Gram+ en pares y cadenas, cocos Gram- agrupados. 2) Cocos Gram- aislados y bacilos cortos Gram- aislados. 3) Cocos Gram+ en cadenas, cocos Gram- aislados y bacilos largos Gram- en pares
10	NEGATIVO	NEGATIVO	1) Colonias verde azuladas, pequeñas y medianas, lisas, elevadas, brillantes, bordes regulares	Cocos Gram+ en pares y cadenas, bacilos cortos Gram+ aislados

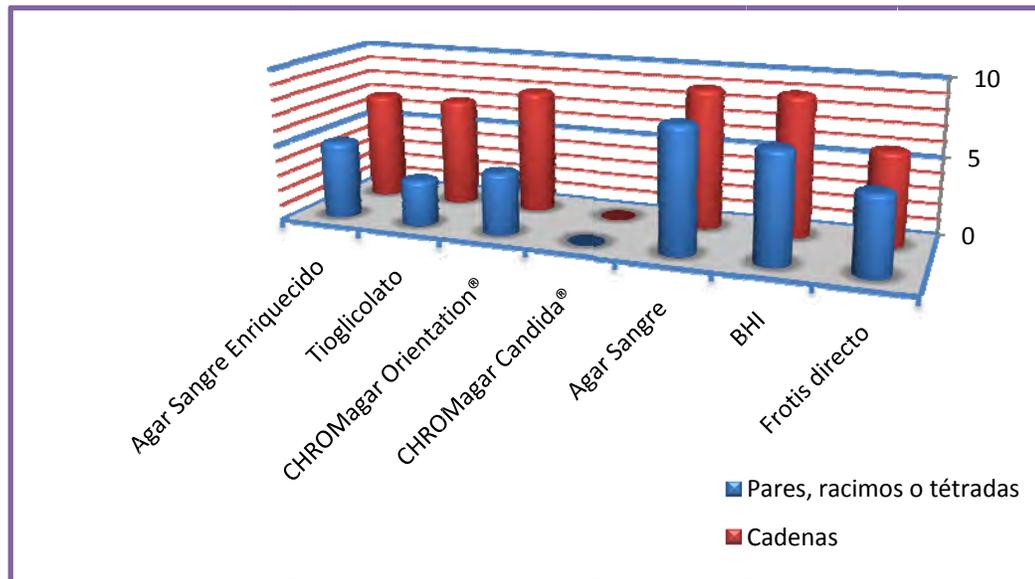


No. MUESTRA	(continuación...) RESULTADOS DE LOS CULTIVOS AEROBIOS		RESULTADO DEL CULTIVO ANAEROBIO	
	AGAR SANGRE		AGAR SANGRE ENRIQUECIDO	
	CARACTERÍSTICAS DE LA COLONIA	TINCIÓN DE GRAM	CARACTERÍSTICAS DE LA COLONIA	TINCIÓN DE GRAM
1	1) Colonia blanca, pequeña, rugosa, brillante, irregular, con β-hemólisis. 2) Colonias blancas cremosas, grande, brillante, lisa, circular. 3) Amarilla blanquecina, mediana, brillante, umbilicada, circular.	1) Blastoconidias. 2) Cocos Gram+ en cadenas, bacilos cortos Gram+, cocos Gram- aislados. 3) Bacilos cortos y redondeados Gram+ en tétradas y pares; y cocos Gram+ en racimos	Colonia blanca, grande, lisa, elevada, brillante, irregular.	Cocos Gram+ en cadena, cocos Gram-, Diplococos Gram+, bacilos largos con extremos puntiagudos.
2	1) Colonia blanca, cremosas, brillantes, elevadas, regulares. 2) Colonia amarilla, brillante, grande, elevada, regular. 3) Colonia blanca rosada, brillante, regular, cóncava.	1) Bacilos cortos Gram-. cocos Gram+ en pares y filamentos Gram-. 2) Cocos Gram+ en pares y cocos Gram- formando redes. 3) Bacilos largos y anchos Gram+ en pares	Colonias blancas, medianas, lisas, elevadas, brillantes, regulares.	Cocos Gram+ en pares y cadenas, cocos Gram-.
3	1) Colonias blancas, muy pequeñas, brillantes, elevadas, rugosas, bordes irregulares β-hemolíticas. 2) Colonias blancas cremosas, grandes, opacas, borde ondulado y crateriforme.	1) Cocos Gram+ en cadenas y pares, cocos Gram- formando redes. 2) Bacilos largos Gram- en empalizada con cocos Gram+ y cocos Gram- en conjunto a ellos	1) Colonias blancas cremosas, medianas, brillantes, lisas, bordes ondulados. 2) Colonia blanca, grande, plana, opaca, rizada, bordes irregulares.	1) Cocos Gram+ en cadenas y pares, cocos Gram-. 2) Bacilos cortos Gram+ en pares y empalizada, cocos Gram+ en pares.
4	1) Colonias blancas, muy pequeñas, brillantes, elevadas, rugosas, bordes irregulares β-hemolíticas. 2) Colonias crema, pequeñas, brillantes, elevadas, bordes irregulares. 3) Colonia amarilla, pequeña, lisa, brillante, elevada, regular.	1) Cocos Gram+ en cadenas. 2) Cocos Gram+ en pares y Gram- en tétradas. 3) Bacilos cortos Gram+ en pares y cocos Gram- aislados	1) Colonias blancas cremosas, pequeñas, brillantes, lisas, bordes regulares. 2) Colonia blancas, pequeñas, planas, rugosas, brillantes, regulares.	1) Bacilos Gram- cortos en cadenas, cocos Gram en cadenas y levaduras.
5	1) Colonias blancas, muy pequeñas, brillantes, elevadas, rugosas, bordes irregulares β-hemolíticas. 2) Colonias crema, pequeñas, brillantes, elevadas, bordes regulares. 3) Colonia blanca, muy pequeña, lisa, elevada, borde regula.	1) Cocos Gram+ en cadenas y pares, bacilos cortos Gram- en cadenas. 2) Cocos Gram+ en cadenas, bacilos cortos Gram- en cadenas, filamentos Gram- enmarañados y formas levaduriformes. 3) Cocos Gram+ en cadenas y pares y cocos Gram- agrupados	1) Colonia blancas cremosa, mediana, brillante, elevada, lisa, bordes regulares. 2) Colonia amarilla cremosa, grande, elevada, lisa, brillante, borde regular.	1) Bacilos cortos Gram- en pares y cadenas, cocos Gram+ en pares. 2) Cocos Gram+ en cadenas y tétradas, cocos Gram- y bacilos cortos Gram- en cadenas y pares.
6	Colonia blanca, muy pequeña, lisa, elevada, brillante, borde regular, y hemólisis.	Bacilos largos Gram- en cadena, bacilos cortos Gram+ en pares	Colonias blancas, pequeñas, lisas, elevadas, bordes regulares.	Bacilos largos Gram- en cadena y cocos Gram+ asociados a los bacilos.
7	1) Colonias blancas, muy pequeñas, brillantes, elevadas, rugosas, bordes irregulares β-hemolíticas. 2) Colonias blancas cremosas, medianas, lisas, elevadas, bordes transparentes mucosos y ondulados.	1) Cocos Gram+ en cadena 2) Cocos Gram+ en cadenas y pares, cocos Gram-	1) Colonias blancas cremosas, pequeñas, brillantes, medianas, elevadas, lisa, bordes ondulados. 2) Colonia amarillo, pequeña, convexa, lisa, opaca., borde regular. 3) Colonia crema, grande, elevada, lisa, brillante, borde regular .	1) Cocos Gram+ en cadenas, diplococos Gram+, cocos Gram- en pares y cadenas, bacilos cortos Gram- en pares. 2) Cocos Gram+ en cadenas, cocos Gram- en pares y bacilos cortos Gram- en pares. 3) Bacilos largos Gram- en cadena y empalizada asociados con cocos Gram- a lo largo de la cadena, cocos Gram+ en pares.
8	1) Colonias blancas, muy pequeñas, brillantes, elevadas, rugosas, bordes irregulares β-hemolíticas. 2) Colonia blanca cremosa, pequeña, lisa, brillante, elevada, bordes regulares.	1) Cocos Gram+ en cadena, bacilos cortos Gram+ en pares y cocos Gram- en racimos. 2) Cocos Gram+ en cadenas y tétradas, cocos Gram- aislados y en cadenas	1) Colonias blancas mucosas, medianas y pequeñas, lisas, elevadas, brillantes, bordes irregulares, β-hemólisis. 2) Colonia blanca cremosa, grande, lisa, brillante, elevada, borde irregular.	1) Cocos Gram+ en cadenas, bacilos cortos Gram- en pares y levaduras. 2) Cocos Gram+ en cadenas, pares y racimos, cocos Gram- aislados y levaduras.
9	Colonias blancas, muy pequeñas, brillantes, elevadas, rugosas, bordes irregulares β-hemolíticas.	Cocos Gram+ en pares y racimos, bacilos cortos Gram+ aislados, bacilos largos Gram-, cocos Gram- en pares y formas levaduriformes	Colonias blancas grisáceas, grandes, lisas, brillantes, elevadas, bordes irregulares.	Cocos Gram+ en pares y cadenas, bacilos largos Gram- en cadenas y bacilos cortos y largos Gram+ aislados.
10	1) Colonias blancas, muy pequeñas, brillantes, elevadas, rugosas, bordes irregulares β-hemolíticas. 2) Colonia blanca cremosa, pequeña, lisa, brillante, elevada, bordes ondulados. 3) Colonia crema oscuro, mediana, lisa, brillante, elevada, bordes irregulares.	1) Cocos Gram+ en pares, racimos y cadenas, formas levaduriformes. 2) Cocos Gram+ en cadenas, bacilos cortos Gram+ en cadenas y formas levaduriformes.	Colonias blancas cremosas, medianas a grandes, lisas, brillantes, elevadas, borde mucoso y regular.	Cocos Gram+ en cadenas, bacilos cortos Gram+ en pares y filamentos largos enmarañados Gram-.

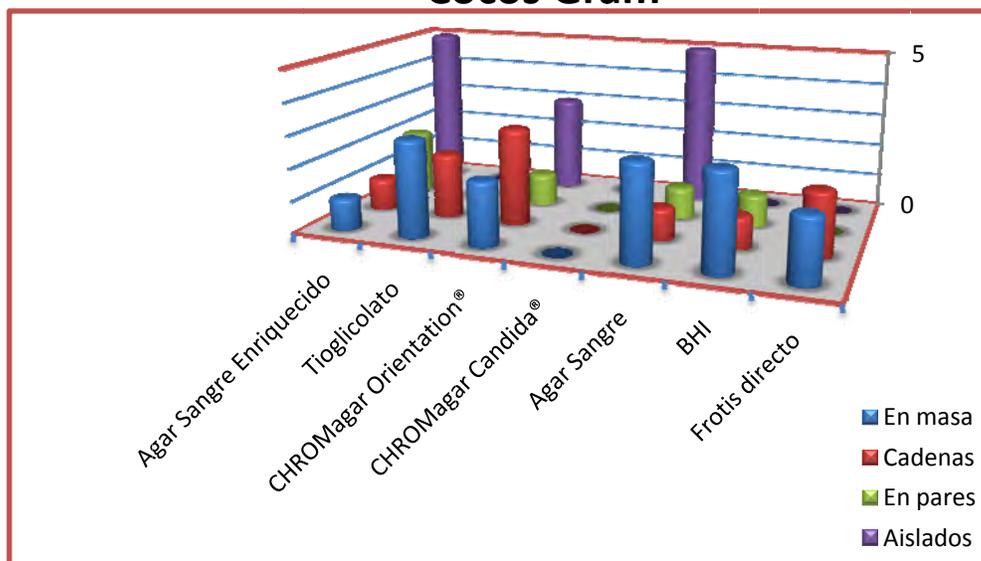


## 8.2. Gráficas

### Cocos Gram+

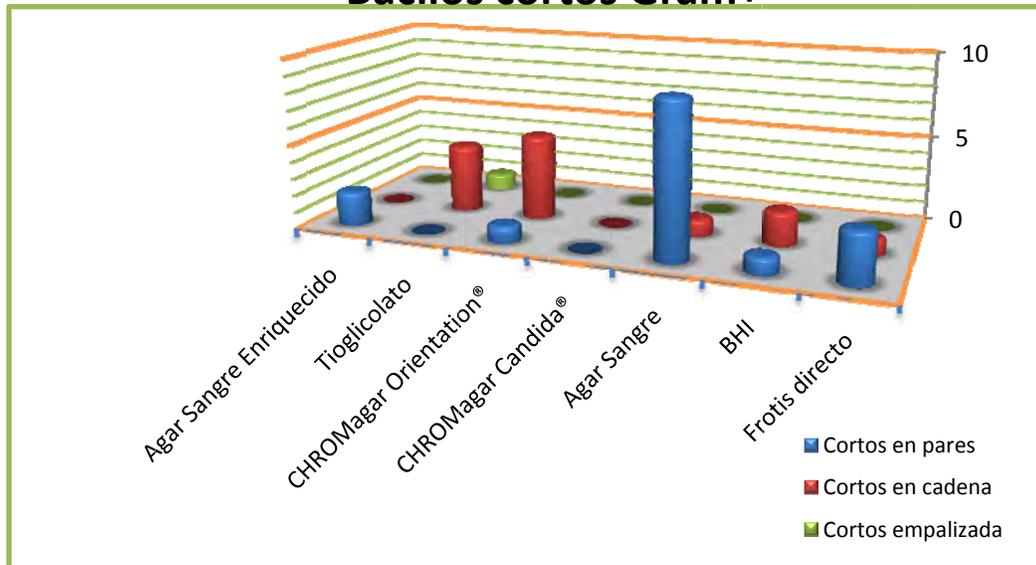


### Cocos Gram-

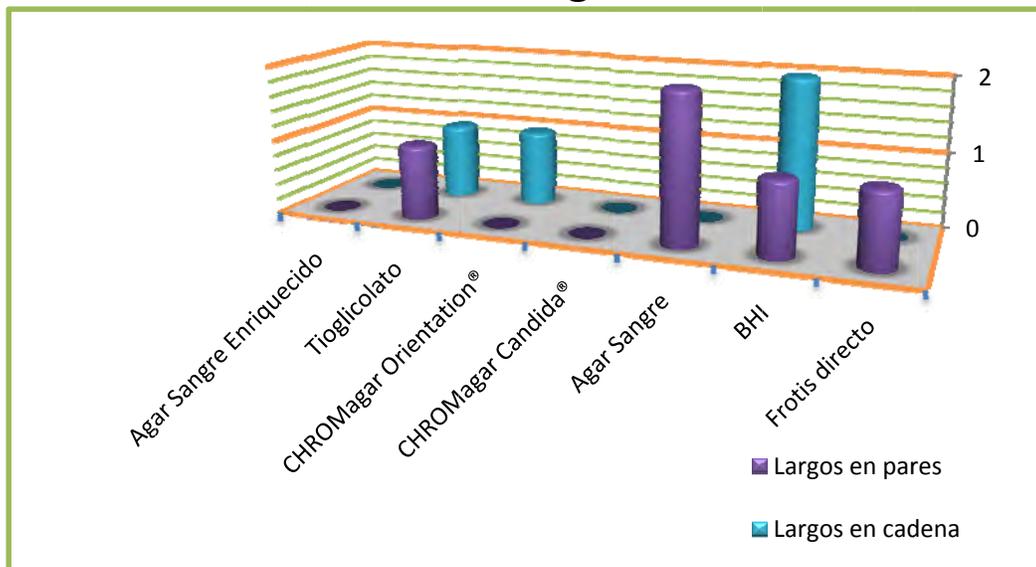




### Bacilos cortos Gram+

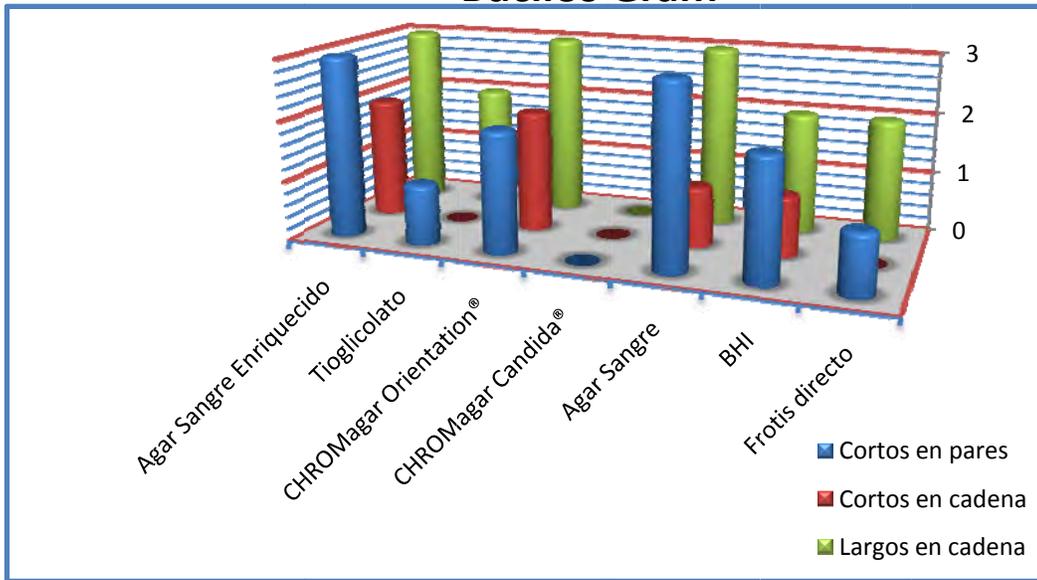


### Bacilos largos Gram+

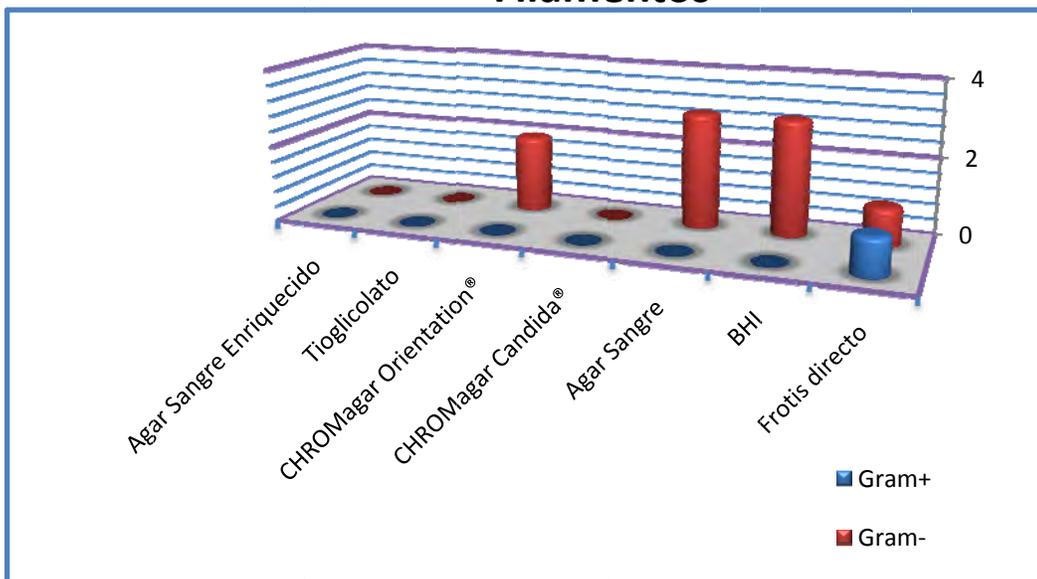




### Bacilos Gram-

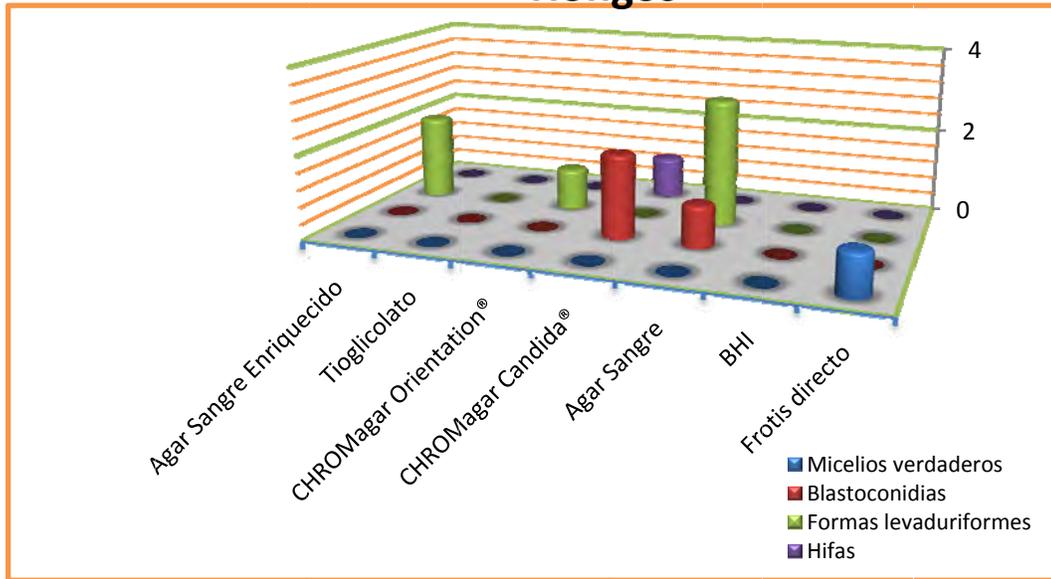


### Filamentos





## Hongos





## 9. DISCUSIÓN

Afirmando lo que dicen Silva y cols, Siqueira y cols, Sousa y cols, encontramos en la mayoría de las muestras, cocos Gram positivos en cadenas y bacilos cortos Gram negativos tanto en muestras de crecimiento aerobio como anaerobio. En cuanto a los microorganismos aislados exclusivamente del cultivo anaerobio, coincidimos con Spångberg y cols, donde predominaron los Gram positivos; mencionando también a Oguntebi y cols, concordamos que existen en el conducto radicular necrótico cocos Gram positivos, bacilos Gram negativos y bacilos pleomórficos Gram positivos todos de ellos anaerobios.

Sin embargo, no encontramos la misma coincidencia con *Candida*, ya que Hancock y cols no halló ninguna especie de hongo en su estudio; por el contrario, en nuestra investigación se observó el 20% de presencia de *Candida*, un resultado similar al de Siqueira y Sen, así como en el de Furuya y cols.

Es importante destacar que se tomaron dos muestras con una variante, una de ellas con un proceso fistuloso con evolución de 3 meses, y otra con medicación sistémica, esto se realizó con el fin de verificar que los microorganismos fueran diferentes en relación a los que se obtuvieron de las demás muestras. Sin embargo, observamos que los microorganismos eran morfológicamente iguales en los dos casos, de tal manera que se demuestra que la invasión microbiana ha dañado al tejido óseo y que hay mayor cantidad de ellos, pero debemos tomar muy en cuenta que pueden ser las mismas especies, lo que nos obliga a prestar la misma atención a un órgano dental con necrosis pulpar; de igual manera sucedió en el caso de la medicación sistémica, se encontraron morfológicamente los mismos



microorganismos y cuantitativamente similares a los de las demás muestras, así verificamos lo que dice Bergenholtz y Crawford, “en la terapéutica endodóntica, los antimicrobianos no pueden remplazar al tratamiento adecuado del conducto radicular; los antibióticos no afectan a las bacterias confinadas al tejido pulpar necrótico dentro del sistema endodóntico, y los antimicrobianos administrados parenteralmente tampoco alcanzan un receptáculo de bacterias confinado al interior de un absceso periapical a menos que se drene el mismo”.

A pesar que aún reconociendo la evidencia de la participación de los microorganismos en el establecimiento y manutención de los procesos en el conducto radicular y en la región periapical, el análisis microbiológico no se toma en cuenta en técnicas de rutina, lo cual se puede justificar en lo siguiente: la microscopía es limitada medida que es incapaz de diferenciar una gama variada de microorganismos; los procedimientos microbiológicos, relativos a la recolección, transporte, siembra e incubación, con objetivo de la preservación y la propagación de los microorganismos anaerobios, presentan poca practicidad al profesional, y son costosos y consumidores de tiempo; las técnicas genéticas presentan restricciones a nivel de la práctica y evaluación clínicas.

El uso de eficientes sustancias antimicrobianas durante el tratamiento químico-mecánico y en la medicación intraconducto optimiza el control microbiano más no lo garantiza. Por lo tanto, la relación costo-beneficio indica el momento conveniente para la obturación del conducto radicular para tener mayor probabilidad de éxito en la terapéutica pulpar.



## 10. CONCLUSIONES

Actualmente, aunque con algunas limitaciones, el análisis microbiológico en base en el cultivo de microorganismos propios de la necrosis del conducto radicular, parece constituirse en recursos de laboratorio muy valioso, siendo importante proponerlo parte de la enseñanza, o como recurso auxiliar en el tratamiento de casos convenientes, resistentes al tratamiento convencional. Ya que representa una gran importancia para la evaluación y perfeccionamiento de las técnicas aséptica y endodóntica utilizadas por estudiantes durante el tratamiento, tomando en cuenta que los antimicrobianos no harán el trabajo necesario por sí solos para eliminar el problema.

Finalmente el análisis microbiológico de los conductos radiculares es útil en la evaluación de los casos tanto recidivantes como con algún proceso infeccioso periapical, lo que puede facilitar su identificación y posteriormente permitiendo la determinación de su perfil de sensibilidad a antibióticos y/o quimioterápicos.

Tenemos entonces, que es de suma importancia que se realicen cultivos microbiológicos de rutina como parte integral del tratamiento de conductos; sobre todo en la enseñanza, para forjar confianza y seguridad en los alumnos respecto a la toma de decisiones del tratamiento, debido a que en la mayoría de las ocasiones no se le da el valor real a un proceso patológico como la necrosis pulpar, la cual nos podría llevar a complicaciones o infecciones más relevantes o incluso al fracaso continuo del tratamiento.



## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vázquez A, Sahagún J, Cantú C, Durán G. Probable participación del *Biofilm* en el fracaso endodóntico. Memorias de la XVIII Reunión Nacional de Posgrados en Endodoncia, efectuada en la Universidad Latinoamericana. Med Oral. Octubre-diciembre 2006; VIII(4): p. 191.
2. Da Silva L, Nelson-Filho P, Faria G, de Souza-Gugelmin MCM, Ito IY. Bacterial profile in primary teeth with necrotic pulp and periapical lesions. Braz Dent J 17(2) 2006, p. 144-48.
3. Bergenholtz G, Crawford JJ, Walton R. Microbiología endodóntica. Endodoncia; Principios y Práctica Clínica. México: Interamericana McGraw Hill; 1991.
4. Haapasalo M, De Lima ME. Microbiología de las infecciones endodónticas. Endodoncia de la Biología a la Técnica. Colombia: Amolca; 2009.
5. Piovano S y Negroni M. Microbiología pulpar y perirradicular. Microbiología Estomatológica; Fundamentos y guía práctica. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2009.
6. Cohen S, Burns RC. Vías de la Pulpa. Madrid: Mosby; 2002. Pp. 27, 56-59, 451-456.
7. Baumgartner JC, Hutter JW, Cohen S, Burns RC. Microbiología endodóntica y tratamiento de las infecciones. Vías de la Pulpa. Madrid: Mosby; 2002.



8. Canalda C, Brau E. Endodoncia. Técnicas Clínicas y Bases Científicas. Barcelona: Masson; 2001. Pp. 29-33, 61.
9. Leonardo MR. Filosofía del tratamiento de conductos radiculares. Vol I. Principios técnicos y biológicos. Brasil: Editorial Artes Médica; 2005. Pp. 43
10. Weine F. Terapéutica en endodoncia. 2ª edic. Barcelona: Salvat editores; 1991. Pp. 152-154
11. Leonardo MR, Da Silva LA, De Toledo R. Filosofía del tratamiento de conductos radiculares. Necropulpectomía: conceptualización. Endodoncia. Tratamiento de Conductos Radiculares; Vol I. Principios técnicos y biológicos. Brasil: Editorial Artes Médica; 2005.
12. Walton, R. Endodoncia. Principios y Práctica. 2a edición. México: McGraw-Hill Interamericana; 1997. Pp. 41
13. Estrela C. Ciencia Endodóntica. Brasil: Artes Médica Latinoamérica; 2005. Pp. 175-185, 235-239, 385.
14. Siqueira JF. Endodontic infections: Concepts, paradigms, and perspectives. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, September 2002; 94(3): p. 281-93.
15. Khabbaz M, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in the vital pulp of human carious teeth: Association with pulp pain. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endod, May 2001; 91(5): p. 597-93.



16. Rodríguez E. Manual de Microbiología Oral. México: McGraw-Hill Interamericana; 2006. Pp. 1-17, 27-30
17. Liébana J. Microbiología oral. México: McGraw-Hill Interamericana; 1997. Pp. 3-4, 9-10, 13-14
18. Bammann LL, Estrela C. Aspectos microbiológicos en endodoncia. Ciencia Endodóntica. Brasil: Artes Médica Latinoamérica; 2005.
19. Lumley P. Base científica para el manejo de la infección endodóntica. Práctica Clínica en Endodoncia. Editorial Ripano: 2009.
20. Chávez L. Gram-positive organisms in endodontic infections. Endodontic topics. 2004; 9: 79-96.
21. Furuya A, et al. Evaluación de la actividad antibacteriana en una mezcla de hidróxido de calcio y clorhexidina al 0.12% como irrigante pulpar; Primera parte. Revista Oral. Invierno 2006; 7(23): p. 355-59.
22. Oguntebi B, Slee AM, Tanzer JM, Lageland K. Predominant microflora associated with human dental periapical abscesses. Journal of clinical microbiology. May 1982; 15(5): 964-66.
23. Siqueira JF, Bilge H. Fungi en endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endod. May 2004; 97(5): p. 632-41.
24. Siqueira JF, Rôças IN, Lopes HP. Patterns of microbial colonization in primary root canal infection. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endod. February 2002; 93(2): 174-8.



25. Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. October 1994; 78(4): p. 522-30.
26. Hancock III HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North America population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endod*, May 2001; 91(5): p. 579-86.
27. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. *Microbiología médica. Principios y aplicaciones microscópicos*. 5a edición. España: Elsevier; 2006.
28. Prats G. *Microbiología Clínica*. España: Editorial Médica Panamericana; 2005. Pp. 21-29, 71
29. Rolim E, et al. Bacteriological study of root Canals associated with periapical abscesses. *Oral surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endod*, September 2003; 96(3): p. 332- 49.
30. Jung Y, et al. Identification of oral spirochetes at the species level and their association with other bacteria in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endo*. September 2001; 92(3): p. 329-34.
31. Spångberg L, Khemaleelakul S, Baumgartner C, Pruksarkorn BS, Mai C. Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, December 2002; 94(6): p. 746-55.



## 12. ANEXOS

### Anexo 1



Becton Dickinson and Company  
 BD Diagnostic Systems  
 PO Box 999  
 Sparks MD 21152-0999 US

## Certificate of Analysis

Page: 1 of 3

Product Name	: TUBE THIOGLYCOLLATE VIT K HEM 8ML 10 BA																	
Catalog Number	: 221787	Manufacture Date	: 2010/05/06															
Batch Number	: 0113556																	
Expiration Date	: 2011/04/27																	
<p>01 Broth Appearance: Light to medium light yellow, trace hazy to clear.</p> <p>02 Biological Performance: Samples were inoculated with 1.00E+05 to 1.00E+06 CFU's of the test organisms, incubated at 35±2°C for 2 days and gave cultural responses as indicated:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>CULTURE</th> <th>ATCC®</th> <th>RESULT</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Bacteroides vulgatus</td> <td>8482</td> <td>Trace to Heavy</td> </tr> <tr> <td>Clostridium perfringens</td> <td>13124</td> <td>Trace to Heavy</td> </tr> <tr> <td>Clostridium novyi</td> <td>7659</td> <td>Trace to Heavy</td> </tr> <tr> <td>Peptostreptococcus anaerobius</td> <td>27337</td> <td>Trace to Heavy</td> </tr> </tbody> </table>				CULTURE	ATCC®	RESULT	Bacteroides vulgatus	8482	Trace to Heavy	Clostridium perfringens	13124	Trace to Heavy	Clostridium novyi	7659	Trace to Heavy	Peptostreptococcus anaerobius	27337	Trace to Heavy
CULTURE	ATCC®	RESULT																
Bacteroides vulgatus	8482	Trace to Heavy																
Clostridium perfringens	13124	Trace to Heavy																
Clostridium novyi	7659	Trace to Heavy																
Peptostreptococcus anaerobius	27337	Trace to Heavy																
Characteristic	Unit	Value	LowLimit HighLimit															
pH at 25°C :		7.1	6.8 7.2															
Animal Source	Country of Origin	Tissue Category BIC SIC	ABC															
Bovine	Australia	IV IV	C															
Porcine	Canada	III III	B															
Porcine	USA	III III	B															
Avian	Taiwan	IV IV	NDF															
Porcine	Netherlands	IV IV	B															
<p>For an avian origin ingredient used in the manufacture of this product, the BD supplier is not able to confirm animal health. The supplier has confirmed that the ingredient undergoes extensive processing that includes exposure to strong acid, filtration, crystallization, and drying.</p> <p>The Batch Number on this certificate is synonymous with the Lot Number shown on the product label.</p> <p>BD Diagnostic Systems (BDDS) is an ISO 13485:2003 and ISO 9001:2000 Registered facility. BDDS products are manufactured in facilities registered with the United States Food and Drug Administration (FDA), and are regulated by the FDA's Quality System Regulations (QSRs). This product met BDDS stringent quality standards at time of batch/lot release. Any test results reported on this certificate were obtained</p>																		

Creation Date: 2010/06/03 15:26:05



Becton Dickinson and Company  
 BD Diagnostic Systems  
 PO Box 999  
 Sparks MD 21152-0999 US

## Certificate of Analysis

Page: 2 of 3

Product Name	: TUBE THIOLYCOLLATE VIT K HEM BML 10 EA
Catalog Number	: 221787
Batch Number	: 0113556
Expiration Date	: 2011/04/27
Manufacture Date	: 2010/05/06

at time of release.

BD Diagnostic Systems' Certificates of Analysis (COA) typically are set up to contain animal origin information for finished products manufactured using materials of animal origin. The animal origin information may be contained in the animal source table and/or in one or more of the additional paragraphs found on the COA. This information is a compilation of animal origin data from the individual lots of raw materials used to manufacture the batch of BD Diagnostic Systems (BDDS) finished product for which the COA was created.

At the time the BDDS Certificate of Analysis is created and sent to the Internet website address at <http://www.bd.com/regdocs/>, the animal origin information as provided to BDDS by its suppliers is pulled into the certificate as it is created by the BDDS automated certificate system.

At times, suppliers notify BDDS of new and/or additional information they have received from their raw material suppliers that modifies the animal origin information for lots previously provided to BDDS. When this situation occurs, BDDS updates the animal origin information in the automated certificate system, recreates the affected finished product COAs for batches within expiration date, and sends them to the Internet website where they replace the prior certificate and are immediately available to customers.

Customers enrolled in BD Diagnostic Systems' Automated Change Notification Program will be notified of the changes described above.

For complete details refer to "BD Position Statement - BD Diagnostic-Diagnostic Systems, COA Animal Origin Information Position Statement", located on the Internet website address at <http://www.bd.com/regdocs/>.

Representative samples of this lot were tested for microbial viability or the  $F_0$  value for parametric release was examined and found to be acceptable.

Stability data for this product is on file.

The pH stated was obtained at the time of release, the pH may vary depending on the age of the product and the type of pH meter and probe used.

Creation Date: 2010/06/03 15:26:05



Becton Dickinson and Company  
BD Diagnostic Systems  
PO Box 999  
Sparks MD 21152-0999 US

### Certificate of Analysis

Page: 3 of 3

Product Name	: TUBE THIOGLYCOLLATE VIT K HEM BML 10 EA		
Catalog Number	: 221787	Manufacture Date	: 2010/05/06
Batch Number	: 0113556		
Expiration Date	: 2011/04/27		

John Gerlich  
Vice President,  
Quality Management and  
Regulatory Compliance  
Signature Date: 2010/06/03

Creation Date: 2010/06/03 15:26:05



BD de México S.A. de C.V.  
 K.m. 37.5 Autopista México-Querétaro  
 Cuautitlán, Izcalli 54730 MX

## CERTIFICADO DE ANALISIS

Page: 1 of 2

Nombre del Producto : INFUSION CEREBRO CORAZ PTM 5ML CAJA C/10  
 Número de Catálogo : 252533 Fecha de producción : 2010/05/14  
 Número de Lote : 0125586  
 Fecha de caducidad : 2011/11/12

### REQUERIMIENTOS

Apariencia: Transparente a ligeramente turbio.  
 Color: Amarillo a bronceado ligero a medio.  
 pH (25°C): 7.4 +/- 0.2

Soporte de crecimiento: El medio fue preparado de acuerdo a las indicaciones de la etiqueta, los tubos fueron inoculados con 1,000 a 10,000 UFC de microorganismos de prueba y se incubaron a temperatura de 35+/-2°C durante 7 días. Incubar *C. albicans* a temperatura de 20 a 27°C.

MICROORGANISMOS	ATCC	RECUPERACIÓN
Bacteroides fragilis	25285	Buena
Candida albicans	10231	Buena
Enterococcus faecalis	29212	Buena
Neisseria meningitidis	13090	Buena
Streptococcus pneumoniae	6305	Buena
Streptococcus pyogenes	19615	Buena

ATCC es una marca registrada de la American Type Culture Collection.

Un resultado satisfactorio en la prueba de soporte de crecimiento corresponde a un crecimiento de moderado a abundante del microorganismo de prueba y una recuperación mayor al 50% que el control.

Muestras representativas de este lote fueron evaluadas y aprobadas para carga microbiana y se encontraron dentro de parámetros aceptables bajo las especificaciones de BD.

El valor de pH señalado en este certificado es el obtenido al momento de la liberación. El pH puede variar dentro del intervalo señalado dependiendo de la edad del producto y el tipo de pH metro y electrodo usado.

Conservar este producto entre 2 y 8 grados Celsius.

Fecha de creación: 2010/05/25 14:12:52



BD de México S.A. de C.V.  
K.m. 37.5 Autopista México-Querétaro  
Cuautitlán, Ixcalli 54730 MX

## CERTIFICADO DE ANALISIS

Page: 1 of 2

Nombre del Producto : INFUSION CEREBRO CORAZ PTM 5ML CAJA C/10  
Número de Catálogo : 252533 Fecha de producción : 2010/05/14  
Número de Lote : 0125586  
Fecha de caducidad : 2011/11/12

  
Juan Mijares  
GM - RC Plant Quality Leader  
BODS Mexico

FECHA DE FIRMA: 2010/06/26

Fecha de creación: 2010/05/25 14:12:52



BD de México S.A. de C.V.  
K.m. 37.5 Autopista México-Querétaro  
Cuautitlán, Iscalli 54730 MX

## CERTIFICADO DE ANALISIS

Page: 1 of 2

Nombre del Producto : AGAR TSA SANGRE 5PRCT PFM 90MM BOLSAC/10  
Número de Catálogo : 220150 Fecha de producción : 2010/08/17  
Número de Lote : 0224629  
Fecha de caducidad : 2010/11/23

### REQUERIMIENTOS

Apariencia: Opaco.  
Color: Rojo a rojo brillante  
pH (25°C): 7.4 +/- 0.2  
Firmeza de gel: Firme  
Soporte de crecimiento: Muestras fueron inoculadas con 100 a 1000 UFC de los microorganismos de prueba, incubadas a 35 +/- 2°C por 18-24 horas bajo condiciones atmosféricas apropiadas y se obtuvo la respuesta al cultivo como se indica:

MICROORGANISMOS	ATCC®	CRECIMIENTO	HEMÓLISIS
Candida albicans	10231	Satisfactorio	Gamma
Escherichia coli	25922	Satisfactorio	No aplica
Listeria monocytogenes	19115	Satisfactorio	Beta*
Staphylococcus aureus	25923	Satisfactorio	Beta
Streptococcus pneumoniae	6303	Satisfactorio	Alfa
Streptococcus pyogenes	19615	Satisfactorio	Beta

\* Puede observarse pequeñas zonas de hemólisis u observarse solo en zonas con crecimiento denso y no observarse en colonias aisladas.

### PRUEBA DE CAMP

Streptococcus agalactiae 12386 POSITIVA  
Streptococcus pyogenes 19615 NEGATIVA

ATCC es una marca registrada de la American Type Culture Collection.

Un resultado satisfactorio en la prueba de soporte de crecimiento corresponde a un crecimiento de moderado a abundante del microorganismo de prueba y una recuperación mayor al 50% que el control.

Muestras representativas de este lote fueron evaluadas y aprobadas para carga microbiana y se encontraron dentro de parámetros aceptables bajo las especificaciones de BD.

El valor de pH señalado en este certificado es el obtenido a una temperatura de 25°C al momento de la liberación. El pH puede variar dentro del intervalo señalado dependiendo de la edad del producto y el tipo de pH metro y electrodo usado.

Fecha de creación: 2010/08/25 17:40:46



BD de México S.A. de C.V.  
K.m. 37.5 Autopista México-Querétaro  
Cuautitlán, Iscalli 54730 MX

## CERTIFICADO DE ANALISIS

Page: 1 of 2

Nombre del Producto : AGAR TSA SANGRE 5PRCT PPM 90MM BOLSAC/10  
Número de Catálogo : 220150 Fecha de producción : 2010/08/17  
Número de Lote : 0224629  
Fecha de caducidad : 2010/11/23

Conservar este producto entre 2 y 8 grados Celsius.

  
Juan Mjares  
QM - RC Plant Quality Leader  
BDS Mexico

FECHA DE FIRMA: 2010/08/25

Fecha de creación: 2010/08/25 17:40:46



BD de México S.A. de C.V.  
 K.m. 37.5 Autopista México-Querétaro  
 Cuautitlán, Ixcalli 54730 MX

## CERTIFICADO DE ANALISIS

Page: 1 of 2

Nombre del Producto : AGAR CHROMAGAR ORIENTAD PPM 90MM BOL/10  
 Número de Catálogo : 252631 Fecha de producción : 2010/08/20  
 Número de Lote : 0231306  
 Fecha de caducidad : 2010/11/12

### REQUERIMIENTOS

Apariencia: Transparente a ligeramente opalescente  
 Color: De amarillo pálido a bronceado claro  
 pH (25°C): 6.9 +/- 0.2  
 Firmeza del gel: Firme  
 Soporte de crecimiento: Muestras fueron inoculadas con 10,000 a 100,000 UFC de los microorganismos de prueba, incubadas a 35 +/- 2°C por 18-24 horas bajo condiciones atmosféricas apropiadas y se obtuvo la respuesta al cultivo como se indica:

MICROORGANISMOS	ATCC®	RECUPERACIÓN	COLOR DE LAS COLONIAS
Enterobacter cloacae	13047	Buena	De azul a azul oscuro con o sin halos violetas alrededor del medio
Enterococcus faecalis	29212	Buena	Pequeñas de azul-verdes a ligeramente azules
Escherichia coli	25922	Buena	Medianas, transparentes de rosa a rosa oscuro con o sin halos
Klebsiella pneumoniae	33495	Buena	Mucoides, medianas de azul a azul oscuro
Proteus mirabilis	12453	Buena	De beige a café con un halo café a naranja
Staphylococcus aureus	25923	Buena	Pequeñas a medianas, blancas a crema
Staphylococcus epidermidis	12228	Buena	Pequeñas a medianas, blancas a crema
Streptococcus agalactiae	12386	Buena	Azul verdoso a azul claro, con o sin halos azules claro

ATCC es una marca registrada de la American Type Culture Collection.

Fecha de creación: 2010/08/26 14:07:20



BD de México S.A. de C.V.  
K.m. 37.5 Autopista México-Querétaro  
Cuautitlán, Iscalli 54730 MX

## CERTIFICADO DE ANALISIS

Page: 1 of 1

Nombre del Producto : AGAR CHROMAGAR ORIENTAD PPM 90MM BOL/10  
Número de Catálogo : 252631 Fecha de producción : 2010/08/20  
Número de Lote : 0231306  
Fecha de caducidad : 2010/11/12

Un resultado satisfactorio en la prueba de soporte de crecimiento corresponde a un crecimiento de moderado a abundante del microorganismo de prueba y una recuperación mayor al 50% que el control.

Muestras representativas de este lote fueron evaluadas y aprobadas para carga microbiana y se encontraron dentro de parámetros aceptables bajo las especificaciones de BD.

El valor de pH señalado en este certificado es el obtenido a una temperatura de 25°C al momento de la liberación. El pH puede variar dentro del intervalo señalado dependiendo de la edad del producto y el tipo de pH metro y electrodo usado.

Conservar este producto entre 2 y 8 grados Celsius.

Juan Mijares  
QM - RC Plant Quality Leader  
BDS México

FECHA DE FIRMA: 2010/08/26

Fecha de creación: 2010/08/26 14:07:20



BD de México S.A. de C.V.  
K.m. 37.5 Autopista México-Querétaro  
Cuautitlán, Ixcalli 54730 MX

## CERTIFICADO DE ANALISIS

Page: 1 of 2

Nombre del Producto : AGAR CHROMAGAR CANDIDA PPM 90MM BOL C/10  
Número de Catálogo : 252630 Fecha de producción : 2010/08/23  
Número de Lote : 0232902  
Fecha de caducidad : 2010/11/15

## REQUERIMIENTOS

Apariencia: Transparente a ligeramente turbio  
Color: Amarillo pálido a bronceado claro  
pH (25°C): 5.9 +/- 0.2  
Firmeza del gel: Firme  
Soporte de crecimiento: Muestras fueron inoculadas con 1,000 a 100,000 UFC de los microorganismos de prueba, incubadas a 35 +/- 2°C por 36-48 horas (y hasta 72 de ser necesario) bajo condiciones atmosféricas apropiadas y se obtuvo la respuesta al cultivo como se indica:

MICROORGANISMOS	ATCC®	RECUPERACIÓN	COLONIAS
Candida albicans	10231	Buena	Ligeramente verde a verdes
Candida albicans	60193	Buena	Ligeramente verde a verdes
Candida krusei	34135	Buena	Planas ligeramente rosas a rosas con borde blanquecino
Candida tropicalis	66029	Buena	Azul oscuro a azul metálico
Pseudomonas aeruginosa	27853	Inhibición parcial a completa	

ATCC es una marca registrada de la American Type Culture Collection.

Un resultado satisfactorio en la prueba de soporte de crecimiento corresponde a un crecimiento de moderado a abundante del microorganismo de prueba y una recuperación mayor al 50% que el control.

Muestras representativas de este lote fueron evaluadas y aprobadas para carga microbiana y se encontraron dentro de parámetros aceptables bajo las especificaciones de BD.

El valor de pH señalado en este certificado es el obtenido a una temperatura de 25°C al momento de la liberación. El pH puede variar dentro del intervalo señalado dependiendo de la edad del producto y el tipo de pH metro y electrodo usado.

Conservar este producto entre 2 y 8 grados Celsius.

Fecha de creación: 2010/08/30 22:37:50



BD de México S.A. de C.V.  
K.m. 37.5 Autopista México-Querétaro  
Cuscutitlán, Ixcalli 54730 MX

## CERTIFICADO DE ANALISIS

Page: 1 of 2

Nombre del Producto : AGAR CHROMAGAR CANDIDA PPM 90MM BOL C/10  
Número de Catálogo : 252630 Fecha de producción : 2010/08/23  
Número de Lote : 0232902  
Fecha de caducidad : 2010/11/15

  
Juan Mijangc  
GM - RC Plant Quality Leader  
BDS Mexico

FECHA DE FIRMA: 2010/08/30

Fecha de creación: 2010/08/30 22:37:50



**Anexo 2**

**UNAM**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**  
**SEMINARIO DE TITULACION - MICROBIOLOGIA**  
**CUESTIONARIO PREVIO A LA TOMA DE MUESTRAS**

**MUESTRA No:** \_\_\_\_\_ **OD:** \_\_\_\_\_ **Conducto:** \_\_\_\_\_  
**Fecha:** \_\_\_\_\_ **Edad** \_\_\_\_\_ **Sexo:** **F** **M**

1. ¿Hace cuánto tiempo presenta la falta de sensibilidad en el diente?

\_\_\_\_\_

2. ¿Presenta actualmente alguna enfermedad sistémica? SI ( ) NO ( )  
¿Cuál? \_\_\_\_\_

3. ¿Se encuentra actualmente en algún tratamiento periodontal?  
Si ( ) NO( ) ¿Cuál? \_\_\_\_\_

4. ¿Actualmente utiliza algún tipo de enjuague bucal? SI ( ) NO ( )  
¿Cuál? \_\_\_\_\_

5. ¿Actualmente toma algún medicamento? SI ( ) NO ( )  
¿Cuál? \_\_\_\_\_

Observaciones de la muestra: \_\_\_\_\_



Anexo 3





## Anexo 4





## Anexo 5



**UNAM**  
**FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA**  
**SEMINARIO DE TITULACION - MICROBIOLOGÍA**  
**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Consentimiento informado para realizar procedimientos de investigación.

Este documento escrito es presentado por el paciente, persona responsable o tutor, mediante el cual acepta bajo la debida información de los fines de la investigación el procedimiento a realizar, así como acepta que se le tomen muestras y fotos para llevar a cabo esta investigación.

Por consiguiente, en calidad de paciente DECLARO:

Que autorizo a la Facultad de Odontología de la UNAM para que presente con fines científicos, los procedimientos llevados a cabo en mi persona. Que cuento con la información suficiente y entiendo el procedimiento a realizar, permito que se me tomen fotos sobre mi caso, de padecer alguna cardiopatía, diabetes u otra enfermedad de tipo sistémico deberé informarlo.

En virtud de lo anterior doy mi consentimiento por escrito para que el alumna **Pérez Hernández Martha Cecilia** bajo la tutoría del **C.D. Víctor Manuel Mira Morales** a cargo, lleven a cabo los procedimientos que consideren para la investigación prospectivo, transversal y descriptivo de "Identificación de microorganismos en dientes con necrosis pulpar en pacientes que acuden a la Clínica de Endodoncia de la Facultad de Odontología, UNAM, en los meses de Septiembre a Octubre".

Coordinador del área de microbiología.

**Q.F.B. Fernando Javier Franco Martínez.**

**ACEPTO**

---

**NOMBRE Y FIRMA DEL PACIENTE, PADRE O TUTOR.**

---

**NOMBE Y FIRMA DEL ALUMNO**





Laboratorios Microlab, S.A. de C.V.  
*Productos para la Investigación Biomédica*

REMISION: 31/2010

24 de SEPTIEMBRE del 2010

México, D.F.  
PRESENTE

SANGRE DE CARNERO DESFIBRINADA \$ 70.00

01 x 50 mL.

RECIBIO:

Cerrada Cruz Verde 13 bis. Col. Lomas Quebradas  
Deleg. M. Contreras C.P. 10000 México, D.F.

Tel. 5595 1264  
Fax 5595 1071

correo electrónico: laboratoriosmicrolab@msn.com