ARCHIVOS DE ODONTO ESTOMATOLOGÍA
PREVENTIVA Y COMUNITARIA
Volumen 18
Número 9
Noviembre-Diciembre 2002

Artículo Original

Contaminación bacteriana en unidades dentales por formación de «biofilm»

J.A. García-Molina[1]
Y. Greco-Machado[1]
I. Araujo[2]
J. Navarro[3]
N. Jiménez[3]
V. Lozano de Luaces[4]

1 Licenciado en Odontología. La Universidad del Zulia, Venezuela.
2 Doctora en Biología La Universidad del Zulia, Venezuela.
3 Licenciado en Biología. Centro de Investigación del Agua de La Universidad del Zulia, Venezuela.
4 Prof. Titular de la Universidad de Barcelona

Correspondencia:
Prof. Dr. V. Lozano De Luaces
Reina Victoria 20 Bis, 2º 1
08021 Barcelona

RESUMEN

Se realizó el análisis microbiológico por el método de contaje en placas y la técnica de placa vertida, para determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de heterótrofos aerobios en el agua proveniente del tanque que surte a los sillones de la clínica A de la Facultad de Odontología de la Universidad del Zulia (Maracaibo-Venezuela), de las mangueras de la turbina y jeringa de triple uso, del aire y sedimentos de dichas mangueras. Las muestras para este estudio fueron recogidas en envases de vidrio esterilizados por calor húmedo y seco. Los valores obtenidos del contaje de aerobios superaron casi cinco veces el valor permitido por la normativa vigente.

PALABRAS CLAVES

Microorganismos; Heterótrofos; Contaminación; «Biofilm».

ABSTRACT

Microbiological analyses were done, to determine the numbers of colony forming units (CFU/ml) of aerobic mesophilic heterotrophic bacteria from the public water in the tank which supplies the dental units of the clinic of the University of Zulia (Venezuela); from the waterlines of the air/water syringe and handpiece; from the air and the biofilm in the interior surface of the waterline tubing. The values obtained using the heterotrophic bacterial plate counts from the water, air and biofilm, was almost five times higher than the allowed value from the standard normative; because of these desviation it is required to implement a maintenance policy and perform periodic microbiological analyses to determine the quality of water.

KEY WORDS

Microorganisms; Heterotrophics; Contamination; Biofilm.

INTRODUCCIÓN

Los equipos dentales presentan en su interior una amplia red de mangueras de goma, que no son visibles pero que están conectadas a la turbina y a la jeringa de triple uso, suministrando agua y aire a las mismas. Se ha demostrado que estas mangueras pueden contener en su interior una amplia variedad de microorganismos que incluyen bacterias, hongos y parásitos[1-5]. Los períodos durante los cuales el agua de estas unidades dentales permanece estancada, brindan un ambiente favorable para su multiplicación y colonización, produciendo en el interior de la superficie de goma una intrincada y altamente organizada estructura de microorganismos que se adhieren a su superficie, conocida como «biofilm», la cual ha sido descrita por Kelstrup, Funder-Nielson y Theilade en 1977[6] y más recientemente por Mayo, Oertling y Andrieu en 1990[7], Whitehouse en 1991[8]; Williams, Baer y Kelley en 1995[9] y Lozano de Luaces en el año 2.000[10].

En el lumen de la manguera de goma, el agua circula rápidamente, mientras que hacia las paredes de la misma la velocidad se va haciendo menor debido a la fricción, permitiendo a las bacterias adherirse y colonizar la superficie, pudiendo entonces desprenderse una capa que puede alcanzar la boca del paciente o el ambiente del consultorio por el aire de la turbina o de la jeringa de triple uso[11]. La presencia e identificación de bacterias en el agua suministrada por equipos dentales fue por primera vez objeto de estudio en el año 1963 por Blake[1], desde entonces una extensa lista de estudios se han realizado. Una investigación a principios de 1971 realizada por Abel y cols.[12], evaluó la turbina y la jeringa de triple uso. Sus análisis demostraron un contenido bacteriano que excedía los límites permitidos para el agua potable. En 1995, Henry Williams y cols.[9] concluyeron en su estudio que el «biofilm» de las mangueras de las unidades dentales es la fuente primaria de contaminación del agua suministrada a los pacientes durante las consultas odontológicas. En 1993, Jeffrey Williams y cols.[4] determinaron en un estudio realizado en 150 unidades dentales, altos e inaceptables niveles de contaminación bacteriana. En 1974, Clark[13] sugirió la posibilidad de la colonización de las vías respiratorias de los odontólogos por bacterias provenientes de las turbinas, al demostrar una flora nasal alterada en 14 de 30 odontólogos estudiados. Nueve de los dentistas con flora alterada presentaron cepas de *Pseudomonas* de la misma especie a las encontradas en las unidades dentales.

Recientemente, estudios realizados en Austria y en los Estados Unidos de Norteamérica, han demostrado una incidencia significativa de altos niveles de anticuerpos que sugieren que el riesgo de infección por *Legionella* se incrementa proporcionalmente con el tiempo de exposición clínica[14-16]. En 1.987, M.V. Martin[17] describió dos casos de pacientes comprometidos inmunológicamente con *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de agua suministrada por los equipos dentales.

La Gaceta Oficial de Venezuela del año 1.998, número 178, capítulo II, artículo 11[18], establece que «el agua potable no debe contener organismos heterótrofos aerobios en densidad mayor a 100 UFC/ml».

En este estudio se realizó un análisis microbiológico para determinar el número de unidades formadoras de colonias de heterótrofos aerobios en el agua proveniente del tanque de agua que surte a los sillones de la clínica A de la Faculta de Odontología de la Universidad del Zulia; del agua proveniente de las mangueras de la turbina y jeringa de triple uso, y del aire y sedimentos de dichas mangueras.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de Muestras

1. **Recipientes:** Las muestras para este estudio fueron recogidas en envases de vidrio esterilizados por calor húmedo (vapor de agua a presión), siendo éste el procedimiento más rápido y seguro, manteniendo una temperatura de 121C por 20 minutos.

2. **Procedimiento de toma de muestra:**
   - *Agua potable:* En este estudio, se realizaron tomas de agua terminal en los puntos seleccionados en las unidades situadas en la Clínica A de la Facultad de Odontología de la Universidad del Zulia, dichos puntos corresponden:
     a. Desagüe de la manguera de goma de la turbina.
     b. Desagüe de la manguera de goma de la jeringa de triple uso.
     c. Interior del tanque de agua equipado con una bomba mecánica que suministra agua a la Facultad de Odontología.

     Puntos seleccionados de manera que se asegurara una cobertura sistemática del sistema de distribución todas las semanas. Se tomaron muestras de los puntos a y b en cuatro equipos odontológicos escogidos al azar, una vez por semana hasta completar los 16 equipos odontológicos de dicha universidad. Todas las muestras se realizaron dos veces. Se tomó muestra del punto c una vez por semana durante 1 mes. Estos procedimientos se realizaron los días jueves por la mañana. Los envases estériles utilizados para la toma, se mantuvieron cerrados hasta el momento de llenarlos. Al hacer la toma de la muestra se dejó un amplio espacio aéreo en el envase (al menos 2.5 cm) para facilitar la mezcla por agitación antes de proceder al estudio. Se retiraron las tapas en el momento de llenado, para evitar la contaminación interna del envase. Se abrió completamente el grifo dejándose correr el agua durante dos o tres minutos o durante el tiempo suficiente para que se limpiara la tubería en servicio. Se llenó el envase sin enjuagarlo, cerrándolo inmediatamente y colocando la cinta de seguridad alrededor de la tapa del envase, para conseguir un mejor cierre hermético.
   - *Sedimentos:* Los sedimentos proporcionan un índice estable de la calidad general del agua que los cubre, en especial cuando está presente una gran variabilidad en su cantidad bacteriológica. La toma de estas muestras se realizó cortando parte de la manguera de los puntos a y b en cuatro sillones odontológicos escogidos al azar de la Clínica A, una vez por semana durante 1 mes. Estos procedimientos se realizaron los días jueves por la mañana, día de plena actividad de funcionamiento de la clínica universitaria y día en que los microbiólogos tomaban las muestras. Los envases utilizados para la toma se mantuvieron cerrados hasta el momento de colocar la muestra en su interior, los cuales contenían 12 ml de solución salina peptonada.
   - *Aire:* Las muestras se tomaron dos veces dejando correr el aire de la manguera de la turbina y de la jeringa de triple uso durante 30 segundos para asegurarse de la limpieza de ellas. Seguidamente se levantó la tapa de la placa de Petri lo suficiente para rociar con el aire el medio de cultivo Plate Count (agar-agar) durante 10 segundos[19].
3. **Conservación y Almacenamiento:**
   - *Tiempo y temperatura de conservación:* El estudio microbiológico de las muestras se inicio inmediatamente después de realizada la toma para evitar los cambios imprevisibles, guardándolas en una nevera con hielo, durante el transporte al laboratorio de Microbiología del Centro del Agua de La Universidad del Zulia. La temperatura de todas las muestras, se mantuvo por debajo de 10°C durante el transporte.

Análisis Microbiológico

1. **Recuento heterótrofo en placa (RHP)[29]:** es un procedimiento que consiste en calcular el número de bacterias vivas heterótrofas que existen en el agua. Las colonias pueden surgir en pares, cadenas, grupos o células únicas, todas ellas englobadas bajo el término de unidades formadoras de colonias (UFC). El número final depende de la interacción entre las colonias en desarrollo.
2. **Selección del método:** El método de la placa vertida (siembra de la muestra en agar-agar), es fácil de poner en práctica y puede adaptarse a volú-

menes de muestra diluida que oscilan entre 0,1 y 2,0 ml.

3. **Muestra:** Se analizaron muestras y cada análisis se realizó por triplicado.
4. **Preparación de la muestra:** Antes de proceder a su estudio, se marcó cada placa con el número de la muestra, la dilución, la fecha, número de sillón, y tipo de muestra (manguera jeringa, manguera turbina, aire jeringa, aire turbina, agua jeringa, agua turbina o agua tanque).
5. **Dilución la muestra:**
   - *Selección de las diluciones:* Se seleccionó de forma que el número de colonias en una placa fuese de 30 a 300. Para ello, se realizaron tres diluciones por cada muestra (directa, 10^{-1}, 10^{-2}) con sus respectivos duplicados.
   - *Medición de las porciones de la muestra:* Se utilizaron pipetas esterilizadas distintas para los pases inicial y posteriores del material procedente de cada envase. Al extraer la muestra, las pipetas no se introdujeron más de 2,5 cm por debajo del nivel de la superficie de la misma.
   - *Medición de las diluciones:* Al desechar proporciones de la muestra, se mantuvo la pipeta en un ángulo alrededor de 45 grados, con el extremo tocando el fondo de la placa de Petri o dentro del envase de diluciones. Se levantó la tapadera de la placa de Petri lo suficiente para introducir la pipeta, dejando que el líquido drenase desde una marca de graduación de 1 ml al extremo de la pipeta durante 2-4 segundos.
6. **Siembra:**
   - *Licuación del medio:* Se licuó el medio de agar sólido estéril en agua hirviendo, en un envase parcialmente cerrado. Se agregó al medio estéril, un antimicótico (solución de Nistatina) para evitar el crecimiento de hongos en la placa de Petri, haciendo posible el contaje de heterótrofos. El medio líquido se mantuvo en baño de agua entre 44-46°C hasta el momento de usarlo.
   - *Vertido en las placas:* Fueron vertidos 10-12 ml de medio licuado mantenido a 44-46°C en cada placa y levantándose suavemente la tapa lo suficiente para introducir el medio. Luego de añadido el medio a todas las placas, se mezcló cuidadosamente el medio líquido con la porción de muestra en estudio previamente colocado en la placa, con cuidado de no proyectar la mezcla contra el borde, girando primero el disco en una dirección y después en la contraria o rotándolo e inclinándolo a la vez. Se dejó solidificar las placas 10 min. y fueron invertidas y colocadas en la estufa a 37°C durante 48 horas.
   - *Controles estériles:* Se comprobó la esterilidad del medio y de los blancos de agua de dilución preparando con ellos placas fluidas en cada serie de muestras.
7. **Medios:** Fue utilizado para el recuento en placa: Agar-agar (agar enzimas hidrolizadas de caseína, dextrosa y extracto de levadura).
8. **Incubación:** Las placas fueron colocadas en estufas a 37°C durante 48 horas.
9. **Recuento y registro:** Utilizando placas fluidas, inmediatamente después de la incubación, se realizó el contaje de todas las colonias de las placas seleccionadas. Se registró en el informe los resultados de los controles estériles de cada uno de los lotes de muestra, con un contador de colonias Quebec. Al preparar las placas, se introdujo volúmenes de muestra que proporcionaron 30-300 colonias/placas. Por lo general no deben sembrarse más de 2.0 ml de muestra; por tanto, cuando el número total de colonias que se desarrollan con 2.0 ml sea inferior a 30 no se observará la regla antes expuesta y se registrarán los resultados obtenidos en la dilución anterior. Se registró el recuento bacteriano por ml, multiplicando el número de colonias por placa por el recíproco de la dilución utilizada. Se presentó el informe en UFC por ml y cm^2.
10. **Cálculo y comunicación de los recuentos:** Para calcular el recuento heterótrofo en placas, se multiplicó el número total de colonias por placa por el inverso de la dilución utilizada. Se notificó las diluciones utilizadas y el número de colonias contadas o calculadas en cada placa.

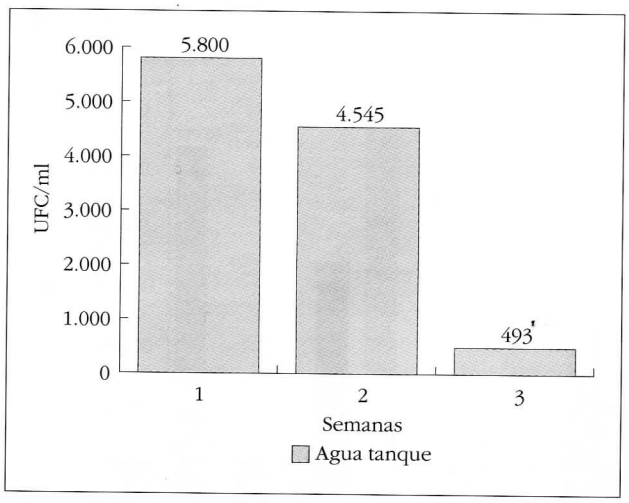

Figura 1. *Contaje de heterótrofos en muestras de agua del tanque de almacenamiento.*

DISCUSIÓN

Los valores de heterótrofos aerobios, obtenidos durante la primera semana en el tanque de almacenamiento que surte de agua a la Facultad de Odontología, fueron considerablemente altos, alcanzando un máximo de 5.800 UFC/ml. Se pudo observar una disminución progresiva en el valor de heterótrofos en la segunda y tercera semana, esta última presentó una disminución considerable en comparación con la primera semana de muestreo, con un valor de 493 UFC/ml. Se puede inferir que estos cambios se debieron a que durante la primera semana de muestreo el servicio de agua estuvo interrumpido, por lo cual el tanque de almacenamiento no recibió agua favoreciendo así, al incremento de microorganismos. Un día antes de realizar el segundo muestreo el servicio de agua fue restablecido lo que pudo agitar el material sedimentado; así el contaje obtenido fue mayor que lo esperado. Mientras que para la tercera semana el constante flujo de agua favoreció la disminución del número de microorganismos. Aun así estos valores son altos en comparación con la normativa para agua potable que se especifica según gaceta oficial de Venezuela del año 1998, número 178, años 87 y 138, capitulo II, articulo 11 donde establece que «el agua potable no debe contener organismos Heterótrofos en densidad mayor a 100 UFC/ml» (Fig. 1).

Las muestras de agua obtenidas de las turbinas y las jeringas triples, de la Clínica A de la Facultad de Odontología, presentaron valores de heterótrofos aerobios que en todos los casos superaron los permitidos por la normativa. Para la primera semana, se observaron valores hasta de 5.600 UFC/ml. Estos valores se corresponden con los encontrados en el tanque de agua de almacenamiento para esa semana. Durante la segunda semana de muestreo, se observó un aumento considerable, que alcanzó en algunos casos las 30.000 UFC/ml, para la tercera semana, en casi todos los casos los valores disminuyeron. Es importante señalar, que los valores más altos siempre fueron obtenidos de las mangueras de las jeringas de triple uso, probablemente porque el agua circula con una menor frecuencia en dichas jeringas. Así para la segunda semana, período en el cual las actividades clínicas se encontraban suspendidas, el agua permaneció estancada en las mangueras de las unidades, y esto favoreció su crecimiento y multiplicación. Durante este período, se realizaron las actividades de mantenimiento a dichas clínicas. Las mangueras de las unidades 1, 4 y 14 fueron reemplazadas por unas nuevas lo que puede explicar los bajos niveles de heterótrofos encontrados en las mismas. La tercera semana, las actividades clínicas fueron reiniciadas y el número de microorganismos fue menor, probablemente debido a que éstos habían disminuido en el tanque de almacenamiento y también debido al incremento en la circulación y residencia del agua dentro del sistema (Fig. 2).

Los valores de organismos heterótrofos para las muestras de aire y «biofilm» mostraron un comportamiento similar al encontrado en el resto de las muestras. Estas revelaron altos valores de heterótrofos durante la primera semana. Para el segundo muestreo los valores se incrementaron mientras que para la tercera semana hubo una disminución, pero siempre los niveles de heterótrofos se presentaron elevados (Figs. 3 y 4).

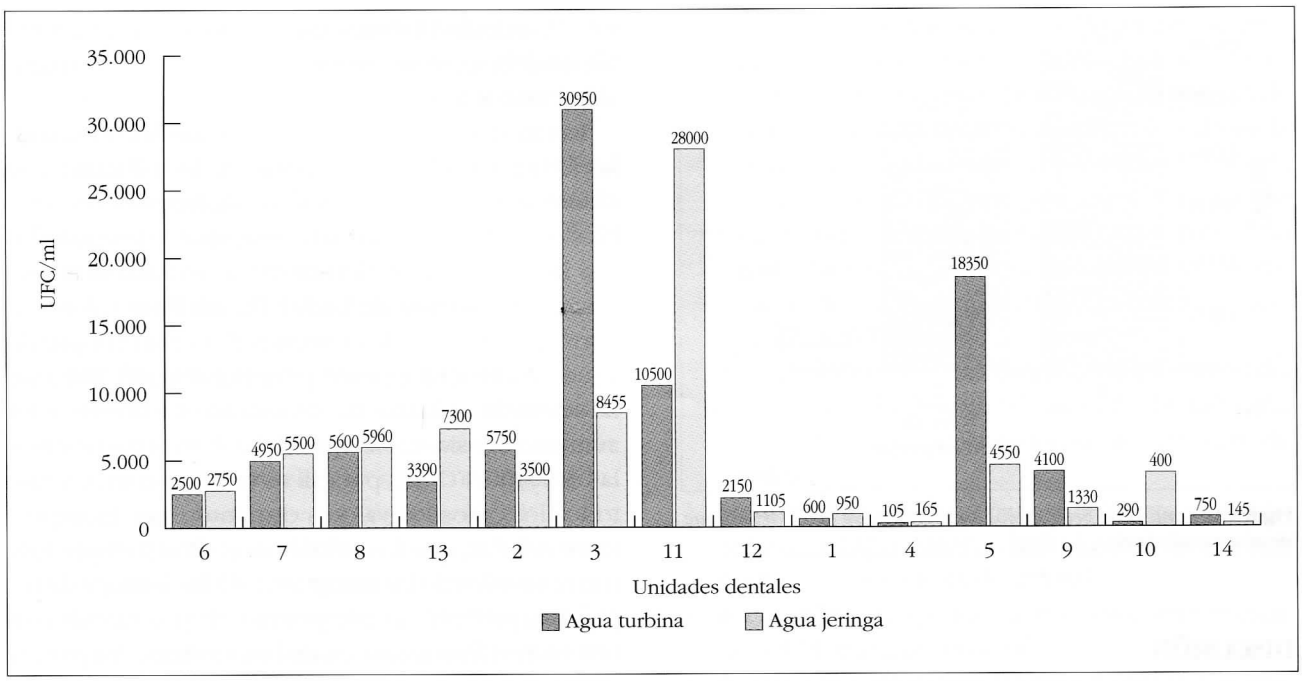

Figura 2. *Contaje de heterótrofos expresados en UFC/ml en muestras de agua obtenidas de la turbina y jeringa de triple uso.*

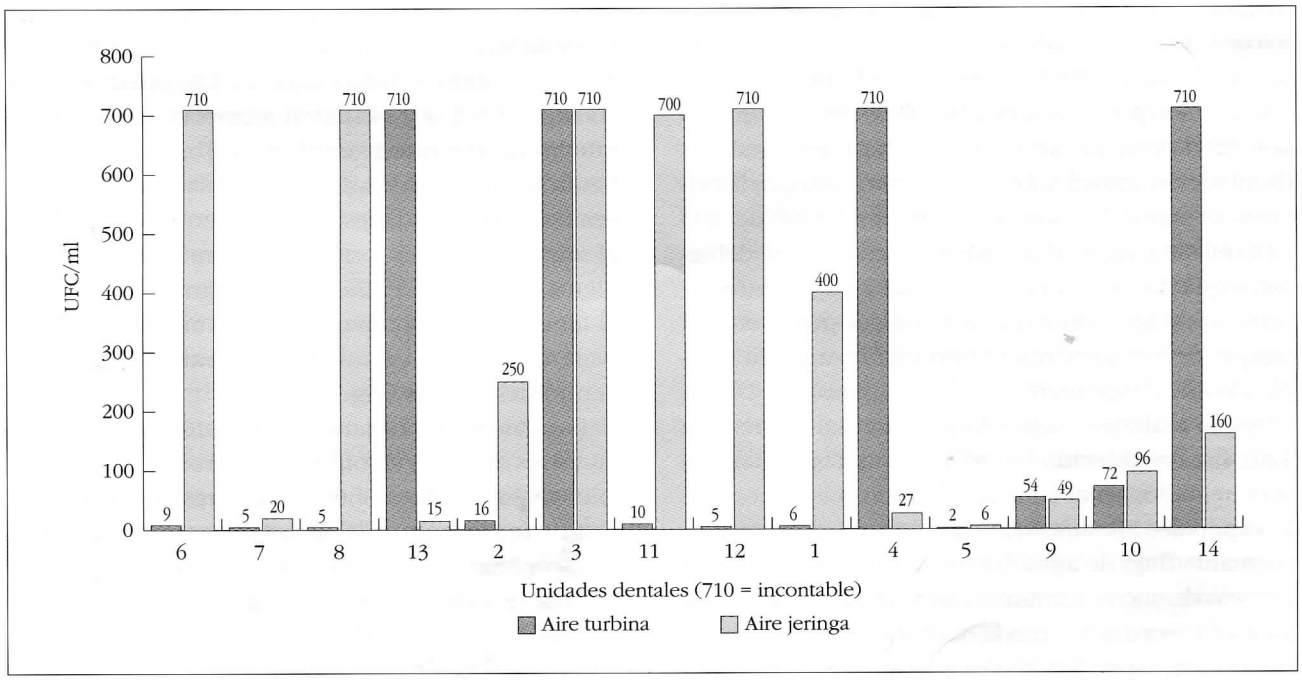

Figura 3. *Contaje de heterótrofos expresados en UFC/ml³ de muestras de aire obtenidas en partes estructurales de 14 unidades odontológicas.*

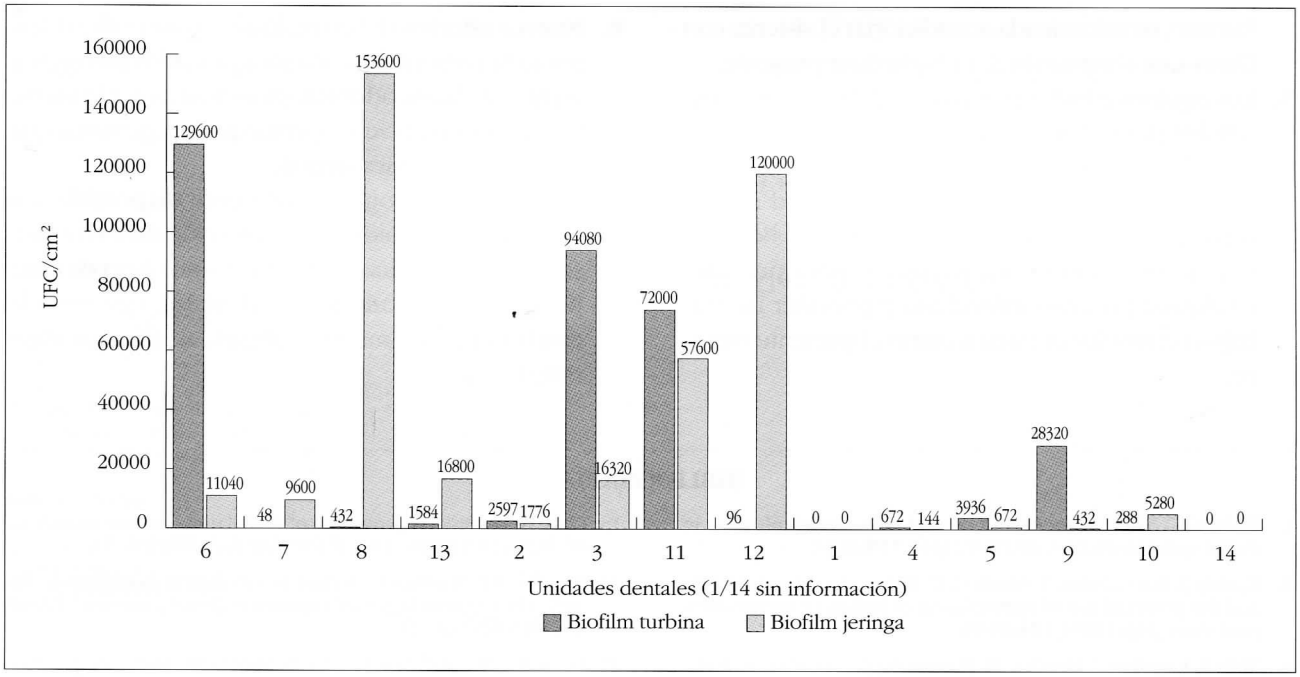

Figura 4. *Contaje de heterótrofos expresados en UFC/ml² en muestras de «biofilm» obtenidas en partes estructurales de 14 unidades odontológicas.*

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Los valores obtenidos del contaje de aerobios en el tanque de almacenamiento de agua, que surte a los sillones odontológicos de la Clínica A de la Facultad de Odontología de La Universidad del Zulia, superaron casi cinco veces el valor permitido por la normativa vigente; por lo tanto es necesario implementar una política de mantenimiento del tanque a través de la cual se controlen los niveles de heterótrofos. Del mismo modo, realizar análisis microbiológicos periódicos y frecuentes, para conocer permanentemente la calidad microbiológica del agua.
2. Todas las muestras de agua, evaluadas microbiológicamente, obtenidas de los sillones odontológicos de la Clínica A de la Facultad de Odontología de La Universidad del Zulia, presentaron contajes de heterótrofos por encima de la normativa vigente. El agua que reciben los equipos odontológicos, debe ser tratada previamente a su uso para garantizar un tratamiento aséptico[7,21-23]. Es importante instalar equipos de desinfección de agua o tecnologías de control microbiológico que inhiban y/o destruyan los microorganismos que puedan estar presentes en el agua circulante de las mangueras de las unidades odontológicas.
3. Todas las muestras de mangueras analizadas presentaron formación de «biofilm», es por ello importante la renovación periódica de esas mangueras para evitar su uso una vez que se ha formado el «biofilm» o aplicar una técnica de limpieza de las mismas, de modo que se garantice la calidad del agua circulante. Algunos agentes antimicrobianos propuestos, han demostrado reducir la adhesión de los agentes de unión en la dentina[24], por lo cual los odontólogos deben ser conscientes de las posibles interacciones de estos productos y los agentes adhesivos utilizados rutinariamente en la consulta dental.
4. Los microorganismos heterótrofos aerobios, estuvieron presentes en todas las muestras de aire y por

lo tanto, se recomienda acondicionar el sistema con filtros que eliminen la flora bacteriana presente.

5. Los equipos e instrumentos odontológicos son utilizados para el tratamiento de dientes y superficies abiertas, que exigen un nivel de asepsia extrema requiriendo altos niveles de calidad microbiológica. Los cuidados y prevenciones que se tomen, no serán nunca excesivos para prevenir cualquier proceso infeccioso y permitir un trabajo con niveles correctos como el paciente merece.
6. Nuevos estudios deben realizarse, para poder determinar la presencia de microorganismos patógenos en las unidades odontológicas y su posible efecto tanto para los pacientes, como para el personal que trabaja en la clínica dental.
7. La nueva tecnología actualmente disponible, así como los protocolos de desinfección deben ponerse en práctica, para garantizar el suministro de agua potable en los consultorios dentales, que cumpla con la normativa mínima aplicada al agua que ingerimos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Blake G.C. The Incidence and control of bacterial infection in dental spray reservoirs. *Br Dent J* 1963;**115:**413-6.
2. Epstein J, Rea G, Sibau L, Sherlock C. Rotary dental instruments and the potential risk of transmission of infection: Herpes simplex virus. *JADA* 1993;**124:**55-59.
3. Mills S, Kueehne J, Bradley D. Bacteriological analisis of high-speed handpiece turbines. *JADA* 1993;**124:**59-60.
4. Williams J, Johnston M, Johnson B, Huntington M, Mackenzie C. Microbial Contaminaton of dental unit waterlines: prevalence, intensity and microbiological characteristics. *JADA* 1993; **121:**59-65.
5. Mills S. The dental unit waterline controversy: defusing the myths, defining the solutions. *JADA* 2000;**131:**1427-1441.
6. Kelstrup J, Funder-Neilsen TD, Theilade J. Microbial aggregate contamination of water lines in dental equipment and its control. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1977;**85:**177-183.
7. Mayo JA, Oertling KM, Andrieu SC. Bacterial «biofilm»: a source of contamination in dental air-water syringes. Clin Prev Dent 1.990; **12:**13-203.
8. Whitehouse RL, Peters E, Lizotte J, Lilge C. Influence of «biofilm's» on microbial contamination in dental unit water. *J Dent* 1991;**19:**290-5.
9. Williams H, Baer M, Kelly J.Contribution of bioflm bacteria to the contamination of the dental unit water supply. *JADA* 1995; **126:**1255-1259.
10. Lozano de Luaces V. *Control de las infecciones cruzadas.* Ediciones Avances, Madrid 2000, p. 190.
11. ADA Council on Scientific Affairs. Dental unit Waterlines: Approaching the year 2000. *JADA* 1999;**130:**1653-1663.
12. Abel LC, Miller RL, Micik RE, Ryge G. Studies on dental aerobiology, IV: bacterial contamination of water delivered by dental units. *J Dent Res* 1971;**50:**1567-9.
13. Clark A. Bacterial colonization of dental units and the nasal flora of dental personnel. *Proc R Soc Med* 1974;**67:**1269-70.
14. Reinthaler F, Mascher F, Stúnzer D. Serological examinations for antibodies against Legionella species in dental personnel. *J Dent Res* 1988;**67:**942-943.
15. Fotos PG, Westfall HN, Snyder IS, Miller RW, Mutchler BM. Prevalence of legionella-specific IgG and IgM antibody in a dental clinic population. *J Dent Res* 1985;**64:**1382-1385.
16. Zanetti F, Stampi S, de Luca G, Fate-Moghadam P, Bucci MA, Checchi L. Water characteristics associated with the occurrence of Legionella pneumophila in dental uits. *Eur J Oral Sci.* 2000;**108:** 22-28.
17. Martín MV. The significance of the bacterial contaminaton of dental unit water systemns. *Br Dent J* 1987;**163:**152-4.
18. *La Gaceta Oficial de Venezuela del año 1998,* número 178, años 87 y 138, capítulo II, articulo 11.
19. Araujo I. *Comunicación Personal. Centro de Investigación del Agua de La Universidad del Zulia,* Maracaibo-Venezuela, 2000.
20. *Standard Methods for the Examination of water and wastewater.* 18th, American Public Health Association, 1992.
21. Karpay R, Plamondon T, Mills S, Dove B. Combining periodic and continuous sodium hypochlorite treatment to control «biofilm's» in dental unit water systems. *JADA* 1999;**130:**957-965.
22. McEntegart MG, Clark A. Colonization of dental units by bacteria. *Br Dental J* 1973;**134:**140-2.
23. Murdoch-Kinch C, Andrews N, Atwan S, Jude R, Gleason M, Molinari J. Comparison of dental water quality management procedures. *JADA* 1997;**128:**1235-1242.
24. Roberts H, Karpay R, Mills S. Dental unit waterline antimicrobial agent´s. Efecct on dentin bond strength. *JADA* 2000;**131:**179-183.