

1. Introducción

a. Titanio como biomaterial

La definición de biomaterial engloba a todo aquel que “interactúe con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o sustituir algún tipo de tejido, órgano o función del organismo” [1]. En la actualidad, existen una gran cantidad de biomateriales (metálicos, cerámicos, poliméricos y compuestos) con características específicas según su campo de aplicación. En el campo de los biomateriales metálicos, ya que su finalidad es la sustitución o el refuerzo de tejido óseo, las propiedades ideales que se buscan en ellos son las de poseer un módulo de Young o módulo de elasticidad parecido al del hueso (propiedad intrínseca del material), una gran resistencia tanto a la corrosión y al desgaste como al de cargas cíclicas y, por supuesto, una excelente biocompatibilidad¹ [2]. Además de todas estas propiedades, es importante que los biomateriales que vayan a ser empleados como implantes sean capaces de pasivarse [2]. Esto es poseer la capacidad de formar una película inerte en su superficie con la finalidad de protegerlo frente a la acción de agentes externos. Esta película ralentiza la liberación de iones al medio biológico, alargando así la vida útil del implante [2].

El titanio y sus aleaciones son unos de los biomateriales metálicos más utilizados para la sustitución de tejido óseo. Esto se debe a que sus propiedades físicas y químicas se acercan bastante a las propiedades ideales nombradas anteriormente. De las propiedades del titanio y sus aleaciones [2-4] podemos destacar:

- Es pasivable.
- Excelente biocompatibilidad.
- Bioinerte, es decir, no es tóxico ni biológicamente activo.
- Estabilidad química, es decir, resistencia a la corrosión en fluido fisiológico.
- Módulo de Young similar al del hueso en comparación a otros metales.
- Propiedades mecánicas elevadas (límite elástico y resistencia a tracción).

Uno de los campos de aplicación estrella del titanio y sus aleaciones es la odontología. Los implantes dentales de titanio consiguen una “fijación sólida y estable” [2] con el hueso (osteointegración) y el tejido muscular [3]. A parte de para las prótesis dentales, también es muy común el uso de titanio y sus aleaciones para alambres en ortodoncia, coronas y prótesis parciales [4].

¹Biocompatibilidad se define como “la capacidad de un material para llevar a cabo sus prestaciones con respuesta apropiada del huésped en una situación específica”, es decir, implica que el material no sea tóxico o nocivo para el huésped y que además provoque una respuesta beneficiosa por parte del mismo [1].

Otra de las aplicaciones donde es más empleado el titanio y sus aleaciones es en la fabricación de prótesis de cadera y de rodilla [2] [3].

A pesar de las buenas propiedades que posee el titanio, éste también presenta inconvenientes que necesitan solución. Aunque el titanio posee una gran capacidad de osteointegración, no es perfecta, de manera que se forma una capa fibrosa entre el implante y el huésped que puede aumentar a causa de micromovimientos y provocar así el aflojamiento de la pieza [3] [5].

El fallo por fatiga supone otro de los problemas asociados a las prótesis de titanio. Esto “limita la vida en servicio de la mayoría de los implantes y prótesis” [5].

Por último, se ha recalcado anteriormente que el módulo de Young del titanio es parecido al del hueso en comparación al de otros metales. Esto no significa que tengan el mismo valor, ya que el módulo de Young del hueso cortical es de 20 GPa y el del hueso trabecular es de 1 GPa, mientras que el del titanio ronda los 100-110 GPa [2] [3] [5]. Esta diferencia provoca la reabsorción ósea por apantallamiento de tensiones. El tejido óseo necesita de esfuerzo mecánico para proliferar. Al tener la prótesis un módulo de Young superior al del hueso, aquella soporta toda la tensión, haciendo que el tejido circundante vaya perdiendo densidad al carecer del esfuerzo mecánico necesario para su proliferación [1] [5].

Uno de los esfuerzos por solventar los problemas que presenta el titanio se centra en la obtención de materiales o superficies porosas [3] [5]. La porosidad en las piezas de titanio tiene como objetivo que “se produzca crecimiento óseo y se alcance así una buena fijación del implante al hueso” [3], es decir, una mayor osteointegración. Además de esto, la presencia de poros en el material ayuda a la minimización de la reabsorción ósea por apantallamiento de tensiones al verse disminuido el módulo de Young [5]. En contraposición, la inclusión de poros en el material afectará de forma negativa a las propiedades mecánicas de resistencia mecánica y fatiga [3] [5].

A modo de conclusión y con lo expuesto anteriormente, puede demostrarse “la importancia que juega la porosidad, tanto en el comportamiento mecánico y biofuncional de los biomateriales, como en la premisa de evitar cualquier tipo de daño mecánico”, tal y como se recoge en [5].

2. Objetivos

a. Objetivo general

El objetivo principal es la elaboración del protocolo sobre el estudio de la influencia de bacterias propias de la boca o que pueda introducirse en la cavidad bucal sobre el titanio en implantes dentales.

b. Objetivos específicos

- Estudio del crecimiento bacteriano en presencia de titanio.
- Estudio de la influencia de placas de titanio con distintas porosidades sobre el crecimiento bacteriano.

3. Norma UNE-EN ISO 11737. “Esterilización de procesos sanitarios. Métodos microbiológicos.”

La norma que se ha seguido para la elaboración del protocolo es la Norma UNE-EN ISO 11737 “Esterilización de productos sanitarios. Métodos microbiológicos”, que consta de las siguientes partes:

- Parte 1: Determinación de la población de microorganismos en los productos (ISO 11737-1:2006). Esta norma especifica los requisitos y recomendaciones para la enumeración y caracterización microbiológica de la población de microorganismos viables en el producto de interés.

Para la redacción de este protocolo hemos seguido los criterios estipulados en esta norma, poniendo especial atención en los siguientes apartados:

- o 6.1.1. Selección de un método apropiado
- o 6.1.2. Extracción de los microorganismos
- o 6.1.3. Cultivo de microorganismos
- o 6.1.4. Enumeración de los microorganismos
- Parte 2: Ensayo de esterilidad efectuados para la validación de un proceso de esterilización (ISO 11737-2:2009). Esta norma especifica los criterios que deben usarse en los ensayos de los productos sanitarios esterilizados, es decir, para productos que han sido tratados con un agente esterilizante.
Durante todo el procedimiento ha de tenerse en cuenta esta segunda parte de la norma ya que si en alguna fase del mismo se produce una contaminación el resultado no será válido.

4. Normativa para el diseño del presente procedimiento de trabajo.

- Las normas ISO, EN, NF, AENOR (Asociación Española de Normalización) se van elaborando y revisando de forma continua. Como este proceso suele ser bastante largo, es aconsejable consultar las siguientes páginas web:
 - ISO: www.iso.ch
 - EN: www.cenorm.be
 - AFNOR: www.afnor.fr
 - AENOR: www.aenor.es

5. Bacteria Staphylococcus.

a. Historia e importancia médica.

Reconocidos por primera vez por Koch en 1878 y cultivados por Pasteur en 1880, son bacterias en forma de grano que se agrupan en forma de grano que se agrupan en racimos, de lo cual se deriva su nombre. Son grampositivos, no forman esporas, pilis ni flagelos; algunas cepas pueden formar cápsula en condiciones especiales y son aerobios y anaerobios. Familia Micrococcacea. En género Staphylococcus comprende actualmente 32 y 15 subespecies; las especies de importancia médica son: *S. aureus*, *S. epidermis* y *S. saprophyticus*. Desde el punto de vista de la medicina, Staphylococcus aureus es la bacteria más importante de este género, que a diferencia de las otras especies, produce coagulasa (que hace que la fibrina se aglomere y forme un coágulo). Las otras especies son coagulasa negativas. La coagulasa es una proteína capaz de coagular al plasma citratado u oxalado, con factores presentes en el suero.

La importancia médica de estas bacterias radica en que es el agente etiológico de un gran número de infecciones en el hombre. Pueden producir procesos inflamatorios supurativos en casi cualquier tejido, los cuales son desde muy leves, hasta la alta gravedad y muerte. Además son fabricantes de toxinas que provocan cuadros clínicos de muy diversas manifestaciones. Otro aspecto muy importante es que con gran finalidad puede desarrollar resistencia a una gran variedad de antimicrobianos, lo que significa que la colonización en el hombre es un gran peligro. Sobre todo en enfermos hospitalizados infectados por cepas hospitalarias, altamente resistentes.[8]

b. Patología.

El patógeno que se conoce de muchos años atrás es el *S. aureus*, pero actualmente se ha comprobado que el *S. epidermidis* puede infectar la piel, las mucosas y las heridas, y que el *S. saprophyticus* es el responsable de infecciones en vías urinarias. Se ha mencionado que todos los tejidos pueden ser colonizados o infectados por estas bacterias, de tal manera que puedan producir:

Impétigo: causa maceración de la piel, pápula eritematosa, costras, lesiones satélite y adenitis.

Forúnculo: pequeño absceso en la piel y el tejido celular subcutáneo.

Celulitis: Proceso infeccioso del tejido celular subcutáneo.

Abscesos: colección purulenta en una bolsa fibrótica.

Ántrax estafilocócico: abscesos múltiples interconectados en la región de la nuca.

Pénfigo del recién nacido , sinusitis, otitis, faringitis, neumonitis, abscesos pulmonares o pleurales, enterocolitis, abscesos del hígado, peritonitis, intoxicación, meningoencefalitis, cistitis, prostatitis, conjuntivitis, pericarditis, fascitis, miositis...[8]

c. Diagnóstico

El diagnóstico de estas infecciones se basa en la demostración de la bacteria y su identificación por estudio bacterioscópico. Al frotis hay cocos gran positivos en racimos, inmóviles; al cultivo la mayoría son anaerobios facultativos, desarrollan colonias redondas, convexas, con un tinte ligeramente amarillento. Bioquímicamente son oxidasa negativas, catalasa positivas y coagulasa positivas, su tipificación es por fagos o por ribotipificación. Existe un polisacárido "A" específico de *S. aureus* y no de otras especies. Entre los factores de virulencia están: adhesina, coagulasa, lipasa, hialuronidasa, estafiloquimasa, nucleasa, toxina alfa o hemolisina alfa, toxina beta o esfingomilina, toxina delta o hemolisina delta, toxina gamma o hemolisina gamma, leucocidina, enterotoxinas, exfoliatina...[8]

d. *Staphylococcus aureus*.

Es un microorganismo Gram (+), anaerobio facultativo y se halla ampliamente distribuido en carnes, leches, quesos y ambientes naturales como suelo, polvo, aire, etc. Es altamente vulnerable a la destrucción por tratamiento térmico y a casi todos los agentes sanitizantes. Así la presencia de esta bacteria o sus enterotoxinas en alimentos procesados o en equipos de procesamiento de alimentos generalmente es un indicador de una sanidad deficiente. *Staphylococcus* ha sido identificado como agente causante de muchos brotes de intoxicación alimentaria y es el posible responsable de incluso más casos de individuos y grupos familiares que los registrados. Los alimentos se examinan para determinar la presencia de *Staphylococcus aureus* a fin de confirmar que éste es el agente causante de enfermedades transmitidas por alimentos.

Las conclusiones respecto a la importancia de *Staphylococcus aureus* en alimentos debe tratarse con mucho cuidado. La presencia de gran cantidad de *Staphylococcus aureus* en alimentos puede indicar una manipulación o condiciones sanitarias deficientes. Sin embargo, no es suficiente evidencia para aseverar que un alimento sea la causa de envenenamiento. Se debe demostrar que *Staphylococcus aureus* aislado produce enterotoxinas. Las cepas del género *Staphylococcus* que producen intoxicación alimentaria pertenecen a la especie *Staphylococcus aureus*, casi todas las cepas de esta especie elaboran una encima denominada coagulasa, de allí que una de las principales pruebas para determinar la presencia de esta bacteria es la coagulasa utilizando plasma de conejo.

Presencia en alimentos

La presencia en los alimentos de números mayores a 10^4 células de *S. aureus* por gramo, pueden producir cantidades suficientes de enterotoxina de forma que desencadenen intoxicación por *S. aureus* en los consumidores. Los alimentos cocidos, cuando se vuelven a contaminar mediante manipulación inadecuada, promueven la fácil multiplicación de *S. aureus*, especialmente a la escasa competencia microbiana que resulta de la cocción.

Los alimentos producidos o almacenados de forma inapropiada han estado vinculados frecuentemente por brotes de intoxicación por *Staphylococcus*.

Los reportes indican que la contaminación del alimento ocurre después de la cocción, dado que la bacteria se halla en números mayores y raras veces iguales a las dosis infectante.

Los alimentos contaminados son principalmente productos de confitería, dulces y bocadillos, así como también pasteles de crema, natillas, ya que tienen presión osmótica alta por su contenido de azúcar y también por presentar zonas de escasa humedad que siguen siendo adecuadas para el crecimiento de *Staphylococcus*.

En términos generales, se espera que los *Staphylococcus* vivan, al menos en número escaso en cualquier alimento de origen animal o en aquellos que son manipulados directamente por las personas, a no ser que se apliquen fases de tratamiento térmico para llevar a cabo su destrucción.

Staphylococcus aureus es un microorganismo de distribución en el medio ambiente muy amplia, se encuentra de forma natural en el hombre, los animales de granja, el polvo y diversos alimentos y otros productos en los que la contaminación se debe principalmente a los manipuladores.

El principal problema a nivel de la microbiología de los alimentos es que *S. aureus* puede producir una enterotoxina termoestable, y otras toxinas.

Estas toxinas actúan sobre receptores intestinales cuyo estímulo alcanzan el centro del vómito del cerebro, por lo que deberían considerarse como neurotoxinas.

El mayor inconveniente de estas toxinas es su elevada resistencia a los tratamientos térmicos habituales, soportando tratamientos de pasterización a 72°C / 13 segundos, e incluso 100°C / 30 minutos. Se inactivan a temperaturas de esterilización de 115°C , resisten la irradiación y las enzimas proteolíticas.

Para la producción de toxinas en un alimento tienen que concurrir los siguientes requisitos:

-contaminación del alimento por *Staphylococcus aureus*: en origen, por los manipuladores o por falta de higiene en locales o utensilios

- la multiplicación de una cepa enterotoxigénica del microorganismo en el alimento alcanzando al menos 10⁶ células por gramo.

Staphylococcus aureus se multiplica en alimentos proteicos, soporta concentraciones normales de azúcar e incluso elevadas de sal y el tratamiento con nitritos.[1]

Estudio de *Staphylococcus aureus* en catéter.

El uso de catéteres vasculares ha sido de gran utilidad clínica al proporcionar un acceso rápido al torrente sanguíneo para la administración de soluciones, medicamentos, nutrición parenteral y para el monitoreo hemodinámico; desafortunadamente, el uso de catéteres vasculares también implica riesgos de complicaciones mecánicas, infecciosas y trombóticas.

De 5 a 19% de los pacientes con un catéter venoso central presentarán alguna complicación infecciosa asociada.

La infección del torrente sanguíneo relacionada con catéter tiene dos definiciones:

- 1) crecimiento del mismo microorganismo en un hemocultivo central y en el cultivo de la punta del catéter, sin crecimiento del hemocultivo periférico y;
- 2) crecimiento microbiano en una muestra de sangre obtenida de un lumen de catéter al menos dos horas antes de que se registre crecimiento microbiano en una muestra obtenida de un hemocultivo periférico.

Esto debe estar acompañado de manifestaciones clínicas de bacteriemia y haber descartado otra fuente aparente de infección.

Las infecciones del torrente sanguíneo relacionadas con catéteres constituyen 15% de las infecciones nosocomiales y se asocian con un aumento importante en la morbimortalidad, principalmente en los pacientes

El riesgo para adquirir una infección del torrente sanguíneo relacionada con catéter está asociado con la calidad de la colocación los cuidados posteriores, la manipulación y el tiempo de permanencia del catéter. El efecto clínico es variable y el paciente puede permanecer asintomático o presentar un cuadro grave de sepsis. Esta variabilidad genera la necesidad de efectuar cultivos en pacientes con cuadros sugestivos de infección, aunque es común que los clínicos soliciten el cultivo de manera rutinaria al quitar el catéter.

La contaminación de catéteres generalmente ocurre por microorganismos que colonizan la piel como estafilococos coagulasa negativos, principalmente por *Staphylococcus epidermidis*, el cual, además de ser parte de la flora cutánea habitual, tiene una gran capacidad de adherencia a superficies plásticas.

Otro microorganismo que frecuentemente contamina los catéteres es *Staphylococcus aureus* (13%) y en menor proporción las levaduras y los bacilos Gram negativos (*Klebsiella spp*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp* y *Pseudomonas aeruginosa*); estos últimos son gérmenes muy eficientes en el desarrollo de mecanismos de resistencia a los antibióticos.

Todos estos microorganismos pueden infectar cualquiera de los catéteres mencionados. Sin embargo, hay algunas asociaciones que deben considerarse, como la relación del *S. aureus* con la infección de catéteres de hemodiálisis, y de *Candida* con las infecciones de los catéteres de nutrición parenteral. La causa más corriente de las raras contaminaciones de las soluciones de infusión es la infección por bacilos aerobios gran negativos. [9]

e. **Métodos normalizados para *Staphylococcus aureus*.**

ISO 6888 Directiva general para el recuento de *Staphylococcus aureus*. Método mediante enumeración de colonias

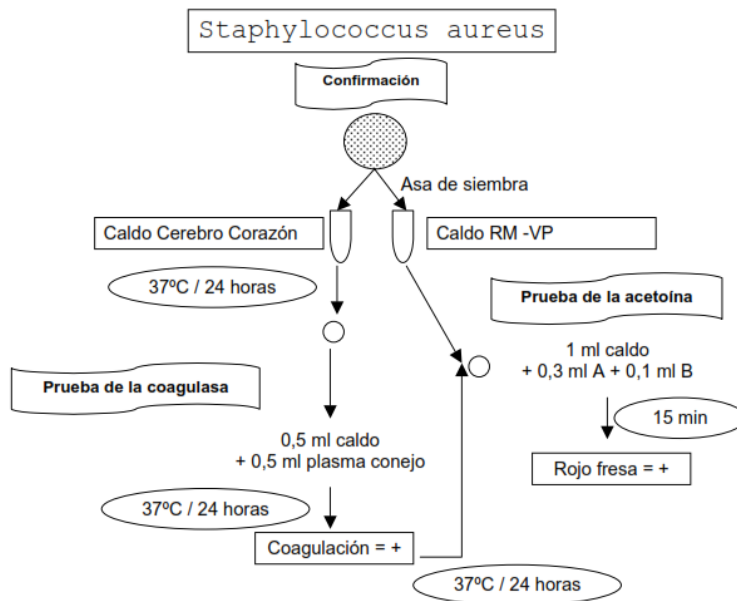
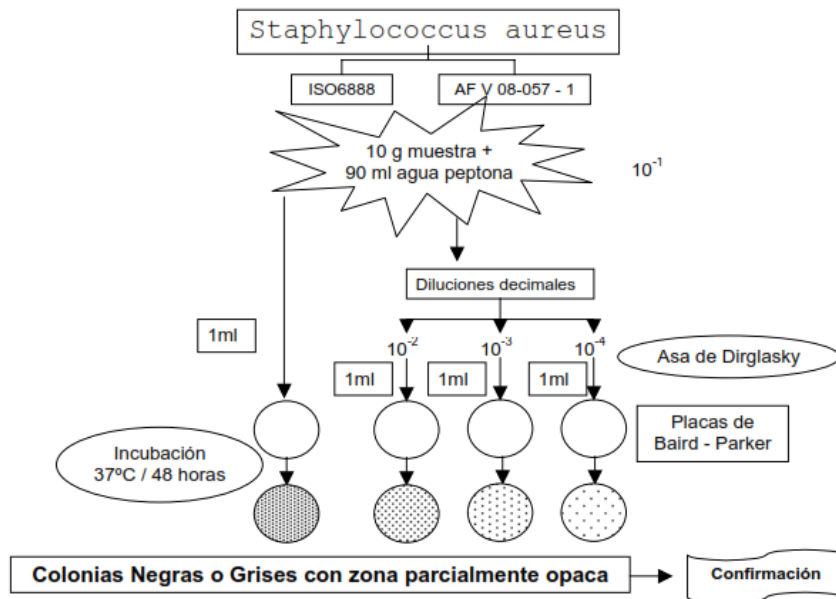
Este método se basa en la siembra en superficie en un medio de cultivo sólido, preparando dos series de placas, con una cantidad determinada de la muestra problema si es líquida o una cantidad determinada de la suspensión madre para otros productos.

En las mismas condiciones, siembra de diluciones decimales obtenidas de la muestra o de la suspensión madre.

Incubación de las placas a 35° C durante 24 – 48 horas. Cálculo del número de *Staphylococcus aureus* por mililitro o por gramo de muestra a partir del número de colonias características obtenidas en las placas escogidas a los niveles de dilución que dan un resultado significativo, y confirmadas mediante la prueba de la coagulasa.

NF V 08-057-1 Método de rutina para la enumeración de estafilococos coagulasa positivos mediante recuento de colonias a 37°C. Técnica de confirmación de las colonias.

Este método se basa en la siembra en superficie en un medio de cultivo sólido selectivo, repartido en placas de Petri, con una cantidad determinada de la muestra problema si es líquida o una cantidad determinada de la suspensión madre para otros productos. Incubación de las placas a 37° C durante 24 – 48 horas. Cálculo del número de estafilococos coagulasa positivos por mililitro o por gramo de muestra a partir del número de colonias características y/o no características obtenidas en las placas escogidas a los órdenes de dilución que dan un resultado significativo, y confirmadas mediante la prueba de la coagulasa.



6. Referencias

- [1] Yadir Torres Hernández, "Introducción a Biomateriales", Universidad de Sevilla, 2014.
- [2] Yadir Torres Hernández, "Biomateriales Metálicos", Universidad de Sevilla, 2014.

- [3] F.J. Gil y J.A. Planell, "Aplicaciones biomédicas del titanio y sus aleaciones" Politécnica de Cataluña, E.T.S. Ingenieros Industriales Barcelona. Diagonal 647, 080208 Barcelona.
- [4] David Docio de Lera, "Biomateriales: el Titanio en Odontología," *CT*, vol. 5, pp. 233–258, 2013.
- [5] Paloma Trueba Muñoz, "Diseño, fabricación y caracterización de compactos de titanio con porosidad gradiente para aplicaciones biomédicas," Proyecto Fin de Máster, Universidad de Sevilla, Sevilla, 2012.
- [6] "Estafilococos. Síntomas, causas y tratamiento." [Online]. Available: <http://estafilococos.net/>. [Accessed: 11-Mar-2016].
- [7] Dolores Garvi Higuera, Grupo TAR, "Análisis Microbiológico de aguas. Laboratorio.," www.aguapedia.org.
- [8] Romero Cabello. R, "Libro Microbiología y Parasitología Humana". 3ª Edición. Editorial médica Panamericana.
- [9] Morán E y cols. Cultivo de catéter en pacientes asintomáticos. *Rev Mex Patol Clin*, Vol. 58, Núm. 3, pp 138-143 • Julio - Septiembre, 2011