



CONDUCCIÓN BACTERIAL EN PRÓTESIS

Mario Spector⁽¹⁾, Leandro Peretti⁽¹⁾, Francisco Salas⁽²⁾, Gustavo Romero⁽³⁾, Luciano Iglesias⁽¹⁾

⁽¹⁾ Laboratorio de Materiales. Depto. Electromecánica. UTN Facultad Reg. Paraná.

Almafuerte 1033 Paraná E. Ríos Argentina.

⁽²⁾ Laboratorio de Electrónica. Depto. Electrónica. UTN Facultad Reg. Paraná.

Almafuerte 1033 Paraná E. Ríos Argentina.

⁽³⁾ Laboratorio de Física. Depto Ciencias Básicas. UTN Facultad Reg. Paraná.

Almafuerte 1033 Paraná E. Ríos Argentina.

Correo Electrónico (autor de contacto): mariospector@frp.utn.edu.ar

Palabras claves: Prótesis, infección, *Staphylococcus aureus*, conducción bacteriana, defectos superficiales.

RESUMEN

En este trabajo se estudia la relación de la formación de colonias de Staphylococcus aureus y su biofilm, con las características superficiales de las prótesis usadas para osteosíntesis. En particular la resistencia que oponen a la desinfección con antibiótico los distintos tipos de superficies o defectos mecánicos metalúrgicos. Los defectos metalmeccánicos pueden ser producto de la fabricación o producirse durante la cirugía. Un método fue desarrollado para corroborar la forma en que las distintas probetas pueden conducir bacterias. En nuestro léxico conducir significa que a pesar de haber sido sometidas a la acción de alta concentración de antibiótico una probeta puede conservar con vida bacterias o colonias de bacterias. La conclusión de este trabajo es que las probetas perfectamente pulidas no conducen y pueden ser tratadas con antibióticos y las prótesis con defectos o rugosas sí conducen y el antibiótico no produce el efecto esperado.

Keywords: Prosthetics, infection, *Staphylococcus aureus*, bacterial conduction, surface defects.

ABSTRACT

This work studies the relationship of colony and biofilm formation of Staphylococcus aureus, with the surface characteristics of the prostheses used for osteosynthesis. In particular the reluctance to disinfection with antibiotic of prostheses with different types of mechanical defects. Metal mechanical defects may result from the manufacture or occur during surgery. A method was developed to verify the way in which the probes can conduct bacteria. In our lexicon conduct means that despite being subjected to the action of high concentration of antibiotic a probe can be kept alive bacteria or bacterial colonies. The conclusion of this work is that the samples perfectly polished do not conduct and can be treated with antibiotics and prostheses with defects or rough driving and the antibiotic itself does not produce the desired effect.

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones producidas por implantes quirúrgicos en clínicas y hospitales son numerosas en cantidad y traumáticas en resultado. Un motivo común en prótesis de acero inoxidable, es que en caso de producirse una infección generada por un agente infeccioso capaz de colonizar la prótesis (bacterias, hongos) puede ser muy difícil de combatir [1]. En muchos casos la desinfección con antibióticos (ATB) o antifúngicos no tiene éxito, las colonias continúan su crecimiento y en algunos casos las bacterias pueden generar resistencia al ATB. Así es que el paso siguiente es extraer la prótesis y comenzar un tratamiento contra la infección.

Cualquiera puede imaginarse que esto tiene un costo alto en dinero y, lo más importante, un serio problema humano, en especial si el paciente no es joven.

En el Laboratorio de Materiales de la UTN Regional Paraná se realizan trabajos de control de calidad de prótesis, y en los mismos hemos notado que las prótesis extraídas de pacientes cuya historia clínica indicaba que se había tratado de evitar la extracción de la prótesis por todos los medios (ATB, toilet, etc.), existían defectos metalmecánicos como dobleces, rebabas, enulado del metal, corrosión intracrystalina y fisuras.

Como esto pasaba en un 100 % de los casos elaboramos la hipótesis de que estos defectos microscópicos son aptos para que las bacterias colonicen el material, incluso llegando a formar biofilm, y se encuentren protegidas al ATB. Estos eran los motivos del fracaso de la intervención que obligaba a extraer el implante. Los móviles de adherencia de bacterias a biomateriales se han reportado en publicaciones tales como Y. Na y R. Friedman [2] que analiza los fenómenos físico químicos de adherencia. La importancia de la terminación superficial en acero inoxidable está informado por J. Arnold y G. Bailey [3] en la utilización de cañerías para la industria alimenticia. M. Katsikogianni y Y. Missirlis [4] se refieren en otra publicación a los mecanismos de adherencia bacteriana a las superficies de biomateriales, los factores que afectan a la adhesión, las técnicas utilizadas en la estimación de las interacciones bacterias-materiales y los modelos que han sido desarrollados con el fin de predecir la adhesión.

No habiendo encontrado antecedentes sobre el tema de defectos metalmecánico en prótesis y sus consecuencias, se decidió evaluar la hipótesis formulada siguiendo una metodología científica, y en caso de verificarse, cuáles son los motivos de estos defectos y cómo serían las soluciones para transferir el conocimiento a los equipos de traumatología de clínicas y hospitales.

Este estudio se realizó para prótesis de acero inoxidable y podría extenderse al titanio pero se debe circunscribir a piezas metálicas con defectos metalmecánicos.

2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL / METODOLOGÍA

Las probetas estudiadas son trozos de prótesis de acero que han sido utilizadas en personas y luego retiradas. Estos trozos fueron cortados de manera que puedan entrar en un tubo de ensayo. Se eligieron algunos con defectos de dobleces producidos por la colocación de la prótesis en el paciente y otros trozos similares pero sin defectos, en algunos casos se llegó a pulir alguna probeta con defecto, hasta quitárselo totalmente. Dependiendo del ensayo realizado fueron de la misma área superficial e idéntica forma o de distintas formas y áreas superficiales.

Una vez elegidas las probetas a ensayar se limpiaron y esterilizaron por calor seco dentro de un tubo de ensayo a 270 °C por el espacio de 2 horas.

El próximo paso fue la inoculación de las probetas, esto significa colonizarlas con un microorganismo y lograr que el mismo desarrolle sobre las probetas metálicas.

Se trabajó con levaduras comerciales (*Saccharomise spp*) y con la bacteria *Staphylococcus aureus*, veamos las ventajas y desventajas de cada uno.

2.1 Ensayos con levaduras

Las levaduras tienen la ventaja de ser totalmente inocuas para la salud y miden aproximadamente 6 micrones, por lo que se las puede ver interactuar con el metal en un microscopio metalográfico. Se puede hacer el ensayo en medio líquido y seguir el movimiento de las levaduras en el momento del experimento y se puede asumir que de manera similar se comportarán las bacterias. El estudio con un microscopio metalográfico de esta interacción es importante para entender alguno de los fenómenos que ocurren.

La desventaja de este microorganismo es que al ser más grande que las bacterias no logran entrar a algunos tipos de deformaciones microscópicas, por lo cual la limpieza y desinfección resulta más fácil en este caso.

El procedimiento es el siguiente. En todos los pasos se garantizó una atmósfera estéril trabajando entre mecheros y todo el material de vidrio utilizado fue esterilizado por calor seco durante 120 minutos a 270 °C. En un erlenmeyer estéril se colocaron 4g de levadura y se agregaron 200 mL de medio de cultivo, para el desarrollo de las levaduras se empleó jugo de uva pasteurizado. Se colocaron las probetas previamente esterilizadas y se incubaron en estufa a 28 °C durante 96 horas. Luego se sacaron las probetas y se enjuagaron en agua destilada estéril y dejaron secar, en condiciones de esterilidad. Luego las probetas se desinfectaron introduciéndolas en una solución pura de desinfectante comercial (composición: Trietilenglicol 5.91%, Sacarinato de alquil dimetil benzil amonio 0.29%) durante 1 hora, se enjuagaron en agua destilada estéril durante 2 horas para quitar restos de desinfectante y finalmente se colocó cada probeta en un tubo de ensayo con medio de cultivo estéril e incubó a 28 °C hasta observar aparición de desarrollo.

En todos los ensayos se realizó un tubo control positivo incubando una probeta contaminada que no fue desinfectada y un control negativo que consistió en incubar solamente el medio de cultivo.

2.2 Ensayos con *S. aureus*

El segundo cultivo empleado, la bacteria *S. aureus*, tiene las siguientes ventajas: es más pequeño que las levaduras (1 micrón) por lo que puede acceder y colonizar cavidades más pequeñas, y es una de las bacterias que produce las mayor cantidad de infecciones intrahospitalarias, con lo que le da mayor legitimación al ensayo.

Por otro lado es difícil ver las bacterias en el microscopio metalográfico salvo que se los tiña, y no se los puede observar durante el proceso. Además se deben tomar mayores medidas de bioseguridad porque no se trata de un microorganismo inocuo.

A partir de una placa de Petri en donde la bacteria había desarrollado en medio Agar Tripteína Soya, se tomaron 2 o 3 colonias con un ansa ojal llevada al rojo incipiente y enfriada apropiadamente, y se realizó un inóculo en 1mL de Caldo Tripteína Soya con glucosa adicionada al 1%, para promover la formación de biofilm. Se incubó en estufa de cultivo durante 24hs a 37 °C.

Una vez que el inóculo desarrolló, se vertió el mismo en 100 mL de Caldo Tripteína Soya con glucosa adicionada al 1% y se colocaron las prótesis estériles. Se incubó en estufa de cultivo durante 24hs a 37 °C. Además del empleo de las probetas con defectos se emplearon como control 2 probetas perfectamente pulidas.

Luego de 24 horas de incubación el medio de cultivo se pone turbio, indicando que ha habido desarrollo. Se tomaron las probetas y se enjuagaron en agua destilada estéril por espacio de 10 minutos y con leve agitación. Se repitió el lavado 3 veces y las probetas se dejaron secar. En erlenmeyers individuales conteniendo el antibiótico cefazolina en una concentración de 1.28 mg de antibiótico por mililitro de solución fisiológica estéril se colocaron las probetas y se dejó actuar durante 6 horas.

Luego de transcurrido el tiempo mencionado, se enjuagaron las probetas en agua destilada estéril durante 15 minutos, en erlenmeyers individuales, para retirar el antibiótico, y se dejaron secar.

Las probetas fueron colocadas en tubos de ensayos estériles conteniendo 3 mL de Caldo Tripteína Soya y se incubaron en estufa de cultivo a 37 °C.

La incubación fue seguida mediante una cámara conectada a una computadora y se tomaron fotos cada 20 minutos durante el tiempo que duró el ensayo.

2.3 Ensayos de validación externa

Los ensayos fueron realizados en el Laboratorio de Microbiología, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral a los efectos de validar los resultados.

En esta experiencia se evaluaron dos prótesis, una perfectamente pulida y otra con defectos metalmecánicos. Se inoculó con *S. aureus* de un modo similar al descrito previamente y luego se enjuagó y se colocó por 7 horas en una solución de antibiótico cuya concentración fue calculada para ser aproximadamente igual a la concentración que alcanza el antibiótico en circulación sanguínea cuando se trata una infección en un paciente.

Luego se quitó la probeta y se enjuagó tres veces, en cada uno de los enjuagues se realizó un conteo de unidades formadores de colonias (UFC) por mL en el residual del enjuague.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Ensayos con levaduras

Se realizaron 10 ensayos, evaluándose diferente número de probetas en cada uno. Los resultados de los mismos se presentan en la Tabla 1. En el 60% de los ensayos, al menos una probeta resultó positiva, indicando que las levaduras que se habían desarrollado sobre la misma no pudieron ser eliminadas por el desinfectante (Figuras 1 y 2).

Tabla 1. Resultados de los ensayos de conducción con levaduras.

<i>Ensayo</i>	<i>Probetas ensayadas</i>	<i>Probetas que condujeron</i>	<i>Tiempo (días)</i>
<i>1</i>	6	1	10
<i>2</i>	7	0	-
<i>3</i>	9	1	5
<i>4</i>	9	0	-
<i>5</i>	9	3	5
<i>6</i>	7	0	-
<i>7</i>	7	1	8
<i>8</i>	7	0	-
<i>9</i>	7	1	6
<i>10</i>	7	1	5

Los casos donde no hubo desarrollo en ninguna probeta pueden deberse a que durante la colonización las levaduras no desarrollaron en sitios protegidos y quedaron expuestas a la acción del desinfectante. Sin embargo, se debe destacar que si las prótesis de acero inoxidable presentan algunos de los defectos mencionados, existe el riesgo potencial de que un microorganismo patógeno encuentre allí un sitio donde no sea alcanzado por el antibiótico o antifúngico y la infección del paciente no pueda ser erradicada.

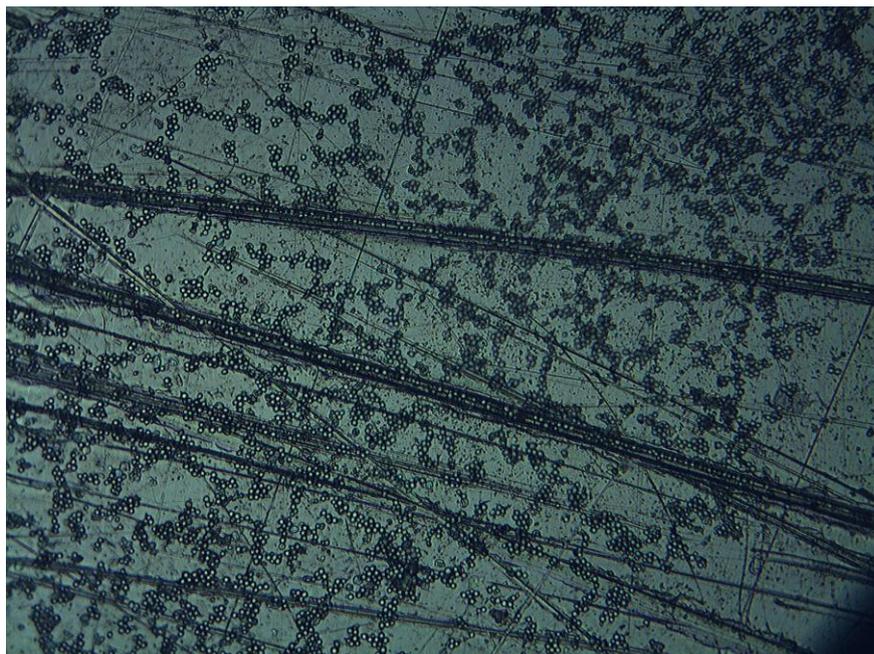


Figura 1. Probeta rayada e inoculada con levaduras.

Observese que las rayas mas gruesas permiten el alojamiento de las levaduras dentro de ellas.

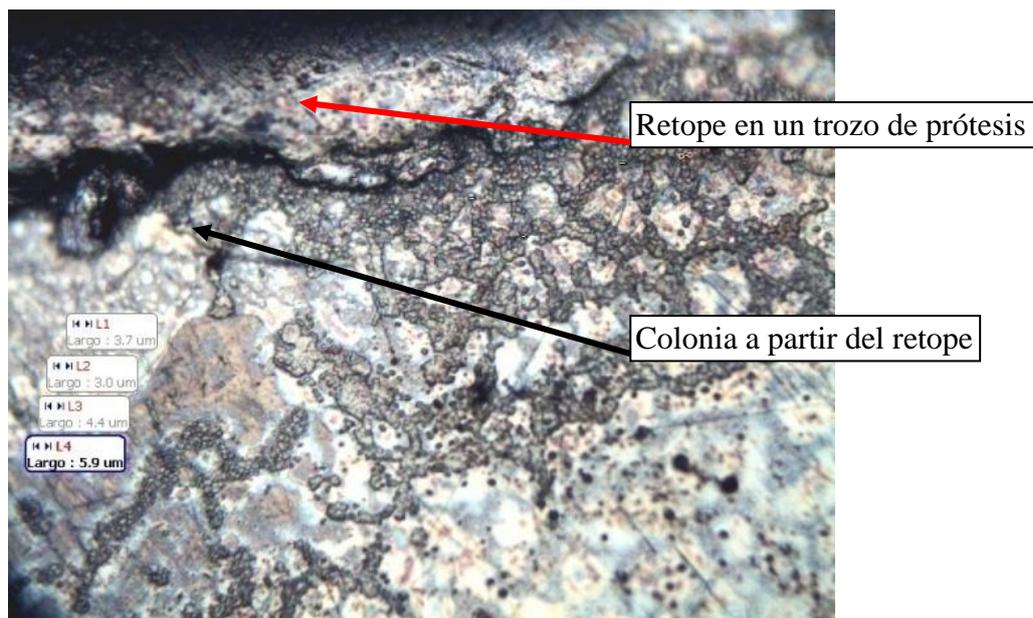


Figura 2. Probeta con un defecto metalmecánico producido durante la cirugía. Las levaduras sobrevivieron a la desinfección, y desarrollaron en nuevo medio de cultivo.

3.2 Ensayos con *S. aureus*

En la Tabla 2 se observan los resultados de los ensayos realizados. En el 100% de los casos las probetas con defectos arrastraron y protegieron bacterias de la acción del antibiótico, resultando en desarrollo positivo al incubarlas en los tubos de ensayos. En 6 de esos ensayos las probetas pulidas permanecieron negativas hasta el final del ensayo y en un ensayo las probetas pulidas mostraron un débil desarrollo luego de 4 días de incubación, igualmente esto representó una diferencia muy significativa con respecto a las probetas defectuosas que desarrollaron entre 24 y 48 horas. En la Figura 3 se observa una imagen ilustrativa de uno de los ensayos, donde pueden observarse los tubos que resultaron positivos (turbios) y el tubo que resultó negativo (cristalino)

Tabla 2. Resultados de los ensayos de conducción bacterial en prótesis.

<i>Ensayo</i> <i>Nº</i>	<i>Probetas con defectos</i>				<i>Probetas sin defectos</i>		<i>Control positivo</i>
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>
<i>1</i>	+ (24h)	+ (24h)	+ (48h)	-	-	-	+ (24h)
<i>2</i>	+ (24h)	+ (24h)	+ (24h)	+ (24h)	-	-	+ (24h)
<i>3</i>	+ (24h)	+ (24h)	+ (24h)	+ (24h)	+ (48h)	+ (48h)	+ (24h)
<i>4</i>	+ (24h)	+ (24h)	+ (24h)	+ (24h)	-	-	+ (24h)
<i>5</i>	+ (24h)	+ (24h)	+ (24h)	+ (24h)	-	-	+ (24h)
<i>6</i>	+ (24h)	+ (24h)	+ (24h)	+ (24h)	-	-	+ (24h)
<i>7</i>	+ (24h)	+ (24h)	+ (24h)	+ (24h)	-	-	+ (24h)

El signo “+” indica desarrollo positivo, entre paréntesis el tiempo en que se observó. El signo “-” indica ausencia de desarrollo.



Figura 3. Ensayo de conducción bacteriana en prótesis. Los tubos 1 a 4 (positivos) contienen probetas con defectos metalmecánicos y el tubo 5 (negativo) una probeta sin defectos.

3.3 Ensayos de validación externa

En la Figura 2 se presentan los resultados obtenidos en los ensayos de validación realizados en la Universidad Nacional del Litoral. Se grafica la persistencia de *S. aureus* tras sucesivos lavados efectuados luego de 7 horas de contacto de las probetas con una solución del antibiótico cefazolina de 32 µg/ml.

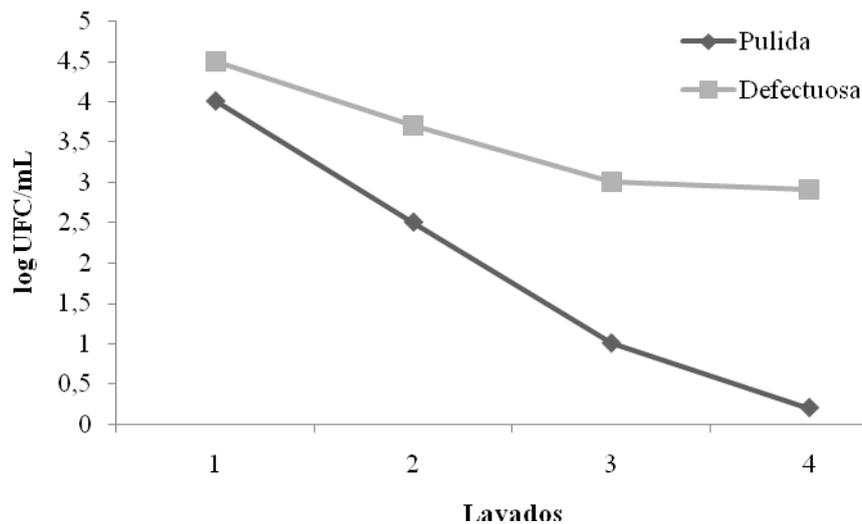


Figura 2. Persistencia de *S. aureus* en una probeta pulida y otra con defectos.

Con estos ensayos se pudo confirmar por un camino alternativo, que las bacterias que han colonizado una probeta defectuosa resistieron más la acción del ATB que las que han colonizado una probeta sin defectos, llegando a un valor constante donde ya no se consiguió disminuir el número de UFC. En cambio, en la probeta que no presenta defectos la eliminación total de las bacterias se alcanzó luego de 4 lavados.

Tal como supone la hipótesis de este trabajo las probetas o prótesis que contengan un defecto mecánico anterior o producido durante la colocación en la cirugía, y en caso que se produzca una infección de la prótesis, las bacterias serán protegidas por tales defectos y por lo tanto las prótesis conducen bacterias, es decir que por medio de tratamiento con antibiótico será casi imposible eliminarlas.

En cambio si se produce una infección de una probeta o prótesis perfectamente pulida puede no conducir bacterias luego de un tratamiento con antibiótico.

Estos defectos que deben evitarse en la cirugía también pueden producirse en el proceso de fabricación, por lo que resulta de vital importancia un estricto control de calidad y una permanente tecno-vigilancia para que los productos se adecuen a las normativas correspondientes [5-9]. Un defecto observado en muchas ocasiones en nuestro Laboratorio, y no siendo un conocimiento difundido, es que en la base del

mortajado de la cabeza de los tornillos allen, se encuentren en el fondo importantes rebabas y dobleces que pueden conducir bacterias si se infecta la prótesis. De hecho se han planteado las hipótesis de los motivos por los cuales tornillos para la intervención quirúrgica de ligamento cruzados hayan conducido esporas de hongos del género *Mucor* y hayan ocasionado en la Argentina más de cuarenta casos de infección grave.

La forma de evitar defectos en la cirugía es motivo de otro trabajo pero se puede adelantar que endureciendo la superficie sin que el proceso implique un deterioro de las propiedades como puede ser una nitruración iónica podría aplicarse. Otro punto a estudiar puede ser la diferencia de dureza entre los tornillos y las probetas. Los deterioros pueden ser por una deficiente utilización del instrumental o el uso de instrumental inadecuado. De todos modos esto debe ser experimentado, pero correspondería a otro proyecto.

4. CONCLUSIONES

En este trabajo experimental se estudió la influencia de los defectos superficiales (metal mecánico) en prótesis implantables de acero inoxidable y su relación a las infecciones que se generan luego de las cirugías y que en general conducen a su extracción.

Los trabajos fueron hechos según el protocolo propuesto en la sección anterior y los ensayos válidos deben ser considerados como fenómeno repetitivo del cual se pueden tomar las siguientes consideraciones. Si los ensayos coincidieron con la hipótesis planteada, en especial cuando se trata de un hecho aleatorio como la colonización de bacterias y el lugar de la probeta que sería inoculada, se puede aceptar como un hecho científico, que las prótesis con defectos metalmecánico en caso de ser infectadas por cualquier motivo, conducirán bacterias, lo cual para un implantado podría en algunos casos costarle la vida.

A los efectos de aumentar el rigor científico, hemos hecho validaciones con otra institución y de otro modo se ha llegado a los mismos resultados (Sección 2.3 y 3.3 *Ensayos de validación externa*).

Las probetas o prótesis que contengan un defecto metalmecánico anterior o producido durante la colocación en la cirugía, presentan potenciales sitios protectores si un agente infeccioso coloniza la prótesis, y la eliminación del mismo resulta de gran dificultad, terminando muchas de estas situaciones en una nueva cirugía o la muerte del paciente.

El resultado de este trabajo sugiere que, la forma de evitar que los defectos de piezas producidos por la fabricación lleguen a implantarse es haciendo un constante control de calidad, donde se evalúen de manera estricta las prótesis para que cumplan con los estándares de calidad que permita su uso en humanos.

En cuanto a cómo evitar los defectos producidos en cirugía amerita un trabajo de investigación aparte.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración de la Gobernación de la Provincia de Entre Ríos en la financiación de este proyecto, a la Facultad regional Paraná de la U.T.N. por el apoyo logístico y de infraestructura, y a la Dra. María Cristina Lurá por facilitarnos la cepa de *S. aureus*

REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFIA.

1. C. Bergallo. "Infección de prótesis de cadera: paradigma de las infecciones de prótesis articulares", Revista Chilena de Infectología, Vol. 17 (2) (2000) p. 87-91
2. Y.H. Na y R.J. Friedman, "Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surface", Journal of Biomedical Materials Research, Vol. 43 (1998), p. 338-348.
3. J.W. Arnold and G.W. Bailey, "Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and early biofilm formation: scanning electron and atomic force microscopy study", Poultry Science, Vol. 79 (2000), p. 1839-1845
4. M. Katsikogianni y Y.F. Missirlis, "Concise review of mechanisms of adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions", European Cells and Materials, Vol. 8. (2004) p. 37-57.
5. Norma oficial Mexicana NOM-153-SSA1-1996, "Que establece la condiciones sanitarias de los implantes metálicos de acero inoxidable para cirugía ósea", México, D.F., 2000.

6. Instituto Argentino de Normalización y Certificación, Norma IRAM 9402, “Implantes quirúrgicos. Materiales metálicos. Acero inoxidable austenítico semielaborado de bajo contenido de inclusiones”, Argentina, 1993.
7. Instituto Argentino de Normalización y Certificación, Norma IRAM 9424, “Implantes quirúrgicos. Tornillos metálicos para hueso. Parte 3 características mecánicas y método de ensayo de los tornillos con roscas asimétricas tipo HA y HB”, Argentina, 1997
8. INTERNATIONAL STRANDARD ISO 5832-1 “Implant for surgery. Metallic materials. Part 1 Wrought satainless steel”, Suiza, 2007.
9. ASTM Designation: F86-12, “Standard Practice for Surface Preparation and Marking of Metallic Surgical”, 1984