



PILA DE MIGRACIÓN BACTERIAL

Mario Spector⁽¹⁾, Leandro Peretti⁽¹⁾, Fabio Vincitorio⁽²⁾, Luciano Iglesias⁽¹⁾

⁽¹⁾Laboratorio de Materiales. Depto. Electromecánica. UTN Facultad Reg. Paraná.
Almafuerte 1033 Paraná E. Ríos Argentina.

⁽²⁾Laboratorio de Física. UTN Facultad Reg. Paraná.
Almafuerte 1033 Paraná E. Ríos Argentina.

Palabras claves: Prótesis, infección, bacterias, migración bacterial, desinfección prótesis.

RESUMEN

Es común que prótesis metálicas infectadas deban ser extraídas del paciente ya que por los métodos convencionales suele ser difícil limpiar la infección. En este contexto se ha observado y estudiado un fenómeno físico que describiremos y al que se dio en llamar "Pila de migración bacterial". El enunciado que describe este principio sería como sigue. Dadas dos placas enfrentadas, una colonizada con bacterias conocidas y la otra estéril y dentro de un líquido conductor, cumpliendo ambas placas con características químicas y metalúrgicas definidas, es posible hacer migrar las bacterias de la placa infectada a la limpia, hasta limpiar la placa inoculada, eliminando totalmente las unidades formadora de colonias. Se ha trabajado con dos tipos de cultivos: levaduras y Staphylococcus aureus, bacterias causales de la mayor parte de las infecciones intrahospitalarias. Con resultados alentadores, confiamos que en un futuro próximo podamos con este medio limpiar totalmente, prótesis infectadas en pacientes.

Keywords: Prosthesis, infection, bacteria, bacterial migration, prosthesis disinfections.

ABSTRACT

It is common that infected prostheses should be removed from the patient when it is difficult or irreversible remove the infection. In this context a physical phenomenon has been observed and studied, which found no precedents, and that was called "Bacterial cell migration". The wording that describes this principle would be as follows. Given two facing plates, one known colonized with bacteria and other sterile and in an electrically conductive fluid, fulfilling both plates with defined chemical and metallurgical characteristics, it is possible to migrate the bacteria from the infected plate to the clean plate, completely eliminating the colony forming units. We have worked with two different cultures: yeast and Staphylococcus aureus, which is one of the bacteria that cause most hospital infections. We hope that with the implementation of this method we can completely clean infected prosthesis in patients, in the near future.

1. INTRODUCCIÓN

Un problema desafío en los próximos años serán las infecciones y los medios para contrarrestarlas, en especial si se tiene en cuenta las mutaciones de los gérmenes. Este estudio particulariza la colonización de una prótesis metálica y su desinfección no convencional. La colonización de bacterias en una prótesis genera en un paciente infecciones tan serias que en la mayoría de los casos se obliga a quitar la pieza metálica con una nueva intervención quirúrgica. Curado de la infección el paciente deberá ser nuevamente intervenido para instalar una nueva pieza en lugar de la anterior. Podemos deducir de aquí que el costo en dinero y en trastornos humanos es muy significativo.

Se ha reportado que con un campo eléctrico alternativo, es posible inhibir el crecimiento microbial de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* [1]. Un trabajo de S. Pickering *et al* [2] describe la forma de incrementar la eficacia del antibiótico con la aplicación de un campo electromagnético sobre implantes ortopédicos. El efecto bio-eléctrico descrito por Khoury *et.al* [3] muestra como se incrementa la susceptibilidad al antibiótico de un biofilm bacterial en presencia de un campo eléctrico de una densidad de corriente de $15 \mu\text{A}/\text{cm}^2$.

Como consecuencia de otro trabajo de nuestra investigación [4] y estudiando la influencia de distintos metales en la inoculación de bacterias pudimos observar que sistemáticamente algunos eran más afín a ser colonizados que otros.

Estas observaciones nos permitieron pensar que tal vez sería posible evitar la inoculación, o mejor aún quitar las bacterias de una probeta colonizada. Esto es lo que se transformó en el objetivo de la investigación. Para ello se instaló dentro del laboratorio de materiales un laboratorio microbiológico.

La consecuencia de este trabajo promovió el desarrollo o descubrimiento de lo que se dio en llama "pila de migración bacterial" y que se describirá más adelante.

El objetivo planteado es que separando *in vitro* las bacterias de las prótesis inoculadas, se estaría frente a un principio de sistema para poder desinfectar prótesis sin quitarlas del paciente. Este concepto genera una expectativa muy grande en el traumatólogo porque si se logra el objetivo se evita tener que intervenir quirúrgicamente más de una vez.

Las hipótesis formuladas fueron que si las bacterias en el medio acuoso tienen carga eléctrica negativa serían atraídas eléctricamente a la prótesis que tiene una masa mucho mayor y que puede presentar superficialmente carga positiva. Esto podría explicar porque las bacterias colonizan algunos metales más que a otros y otros metales son difíciles de inocular.

Este trabajo que está descrito desde lo empírico muestra las observaciones experimentales de un fenómeno del cual aún no existe una formulación matemática, es un principio aún no matematizado y no tiene en cuenta las variables que conforman este fenómeno.

Estos ensayos están hechos *in vitro* pero la utilización del conocimiento y su profundización lleva a nuevas técnicas de tratamiento y esto representa un avance en el conocimiento científico del paradigma que en este momento son las prótesis metálicas, en especial las de acero inoxidable.

2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL / METODOLOGÍA

Se trabajó con 2 tipos de microorganismos, a) en el Laboratorio de Materiales se empleó levadura comercial (*Saccharomise spp*) y b) se realizaron experiencias con la bacteria *S. aureus*, las cuales fueron realizadas en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNL, con el objetivo de validar los resultados obtenidos con las levaduras.

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 $270 \text{ }^\circ\text{C}$. Para el desarrollo de las levaduras se empleó como medio de cultivo jugo de uva pasteurizado. En un erlenmeyer estéril se colocaron 4g de levadura y se agregaron 200 mL de medio de cultivo y se colocaron dentro del cultivo probetas metálicas, previamente esterilizadas, de distintos tipos de materiales, tales como Cobre, acero inoxidable, Aluminio, Magnesio y Titanio y se dejaron colonizar. En cada caso se fotografió con el microscopio metalográfico a los efectos de registrar la cantidad de levaduras que se habían adherido al metal.

Luego se emplearon las probetas colonizadas para el armado de la pila, cuyo funcionamiento se describe en la Figura 1. La placa 1, que ha sido colonizada por alguno de los microorganismos, se sumerge en un baño de solución fisiológica estéril, junto a otra placa (2) de similar superficie a la anterior y más electro positiva, pero estéril. Luego se conectan por fuera ambas placas formándose una pila en cortocircuito. De

este modo comienza la migración bacteriana (y de levaduras) desde 1 hacia 2. Llamaremos electronegativo a aquel metal que acepta electrones con facilidad, y en una pila cumple la función de ánodo (+), y llamaremos electropositivo al metal que cede electrones con facilidad, y cumple la función de cátodo (-).

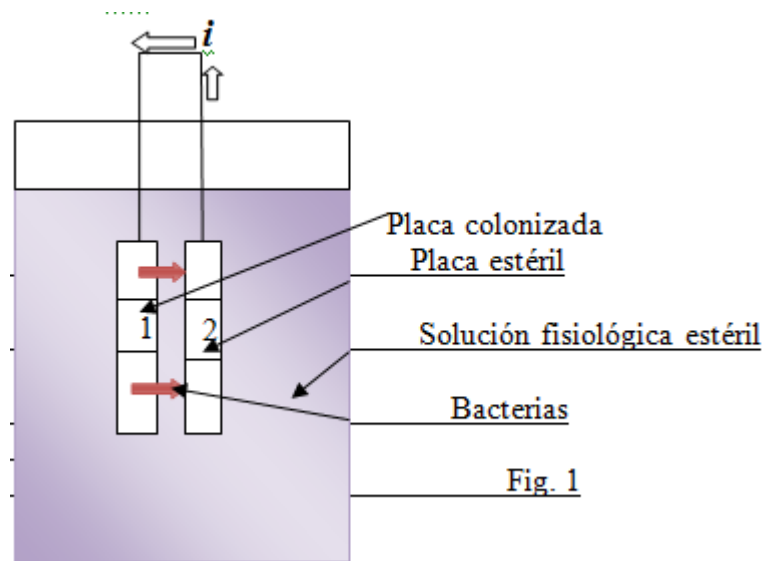


Figura 1. Esquema de funcionamiento de la pila de migración bacteriana

2.1 Experiencias con levadura

Las levaduras empleadas tienen las ventajas de ser inocuas para la salud humana y permiten sacar conclusiones sobre su comportamiento que pueden extrapolarse al caso de bacterias. Además son de un diámetro fácilmente reconocible al microscopio metalográfico tal como se observa en la Figura 2.

2.2 Experiencias con *S. aureus*

En los ensayos realizados en el Laboratorio de Microbiología (FBCB-UNL) se aplicó un sistema similar al nuestro en cuanto a la colonización de las probetas y posteriores enjuagues sucesivos donde se realizaron recuentos de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), para determinar las bacterias viables remanentes en las probetas.

Estos ensayos se hicieron del siguiente modo: se colocaron dos probetas de acero inoxidable 316L, una con imperfecciones superficiales metalmeccánicas y otra perfectamente pulida, dentro de un recipiente con un medio de cultivo con *S. aureus* y se incubó durante 24 horas. Luego se retiraron y se enjuagaron con solución fisiológica estéril. Luego se los colocaron individualmente en vasos de precipitado estériles, con una solución del antibiótico Cefazolina sódica (Northia) en una concentración de 32 $\mu\text{g/ml}$, equivalente a la usada en pacientes, junto con otro metal electropositivo respecto al acero, y se lo dejó actuar durante siete horas. Luego se retiraron las probetas y se realizaron enjuagues sucesivos, determinándose en cada uno de ellos las UFC/ml. En la Figura 3 se observa una placa de acero inoxidable inoculada con *S. aureus*, la cual fue un blanco realizado para saber si las probetas se habían colonizado o no.

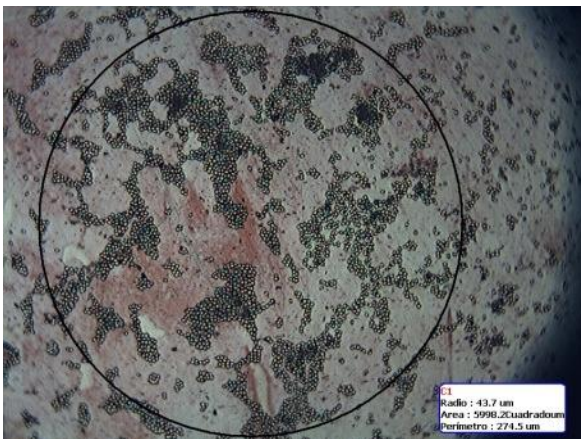


Figura 2. Placa de cobre colonizada con levaduras.

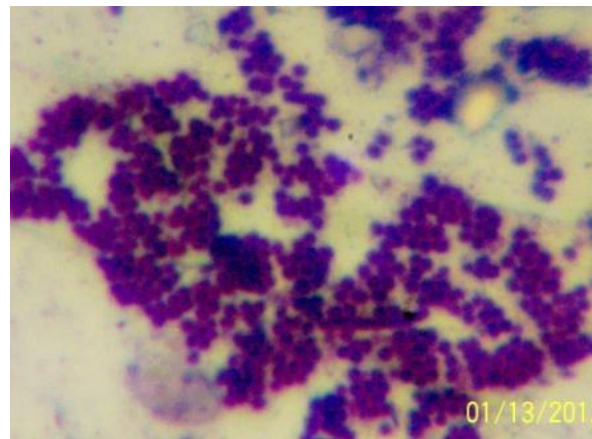


Figura 3. Placa de acero inoculada con *S. aureus*.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Experiencias con levadura

Lo que se pudo apreciar en los ensayos con levaduras fue que los metales más electronegativos adsorben más rápidamente mayor número de levaduras, y en la medida que se desciende en la escala de electronegatividad la cantidad de levaduras adheridas es menor y el tiempo necesario para que se adhieran es mayor.

Con esto se puede llegar a pensar que la fuerza impulsora de la interacción entre los microorganismos y la superficie de los metales es la carga eléctrica, ya que las levaduras son eléctricamente negativas y son atraídas como en una pila por el metal electropositivo.

Esto llevó a una nueva hipótesis, teniendo en cuenta que el material del que nosotros nos ocupamos es acero inoxidable 316 L y que es más electronegativo que el Al, el Mg o el Zn, y que se inocula con facilidad, si se forma una pila entre el acero inoxidable inoculado y otro metal más electronegativo se generará una corriente del negativo al positivo, pero si se conectan ambas placas la corriente es inversa y lo que era positivo se hace negativo. Esto significa que si la placa está inoculada por ser electronegativa, luego con carga negativa debería expulsar las levaduras (o bacterias) y hacerlas migrar de la placa inoculada.

Luego de las experiencias realizadas se llegó a enunciar el siguiente principio: “ Dada dos placas enfrentadas dentro de un líquido electro conductor, una electro positiva, y otra electro negativa respecto de la anterior, generando una diferencia de potencial entre ambas, donde la electronegativa está inoculada con un microorganismo (levaduras o bacterias) y la electropositiva está totalmente estéril, enfrentadas a una distancia determinada y se conectan por fuera creando un cortocircuito, entonces los microorganismos que están en la superficie contaminada pasarán a la superficie estéril hasta quedar la placa totalmente libre.

Lo observado es que el sistema desarrollado funciona, y si la placa 1 está suficientemente pulida quedará totalmente limpia luego de un tiempo característico de cada modelo. En el caso que se haya formado biofilm, éste se elimina durante el evento o se transforma en una especie de barro seco (Figura 4).

3.2 Experiencias con *S. aureus*

En cuanto a los resultados de validación con *S. aureus*, el resultado fue similar y se logró limpiar las probetas contaminadas. En la probeta perfectamente pulida luego del primer enjuague se dejaron de contabilizar UFC, lo que indica que rápidamente las bacterias fueron expulsadas. En la probeta con defectos metalmecánicos la reducción de las UFC fue más lenta, pero luego de 4 enjuagues ya no se pudieron determinar las UFC.

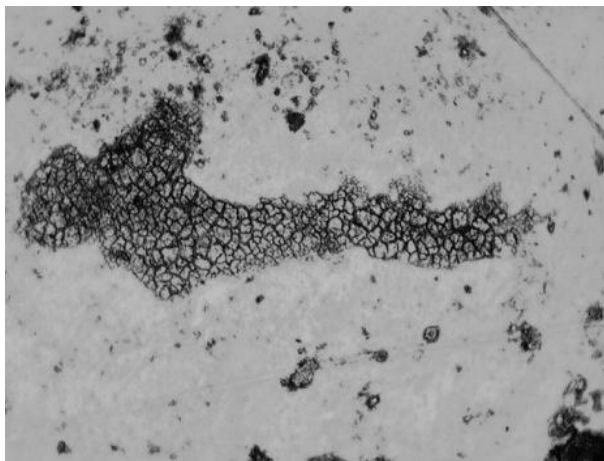


Figura 4. Biofilm transformado en barro.

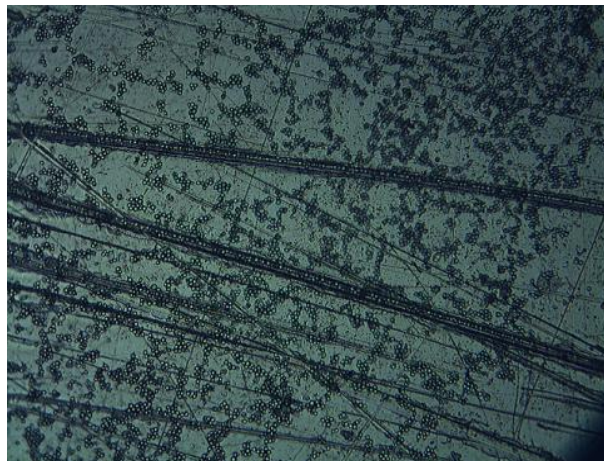


Figura 5. Placa de acero rayada y colonizada con levaduras.

La pila de migración bacteriana constituye un principio que puede ser aplicado e incluso extrapolado a otras formas y no necesariamente en forma de taxativa. Por supuesto que al ser una primera parte del trabajo, aun se debe estudiar y legislar el rol que juegan todas las variables en este fenómeno.

La migración se logra con mayor eficiencia cuanto más lisas son las superficies y menos defectos metalmecánicos tengan las probetas [4].

Los defectos dificultan la migración de bacterias total puesto que las traban mecánicamente (Fig. 5). En un entorno de tiempo la cantidad que migra o la superficie limpiada es proporcional al tiempo. La migración es también proporcional a la diferencia de potencial que se genere entre los metales.

El objetivo de este trabajo fue en un principio verificar la influencia de los distintos materiales con la inoculación bacteriana, aquí se podría citar a An y Fridman [5] en su trabajo de mecanismos de adhesión bacteriana a las superficies, no obstante nosotros nos inclinamos por ver la colonización como función de la electronegatividad del material.

Otros autores han estudiado el tema de la adherencia superficial de bacterias, Arnold y Bailey [6] se refieren a la morfología superficial del acero y su relación con la inoculación de bacterias, llegando a la conclusión que en las superficies más pulidas es la que menos bacterias adsorben.

En nuestro trabajo observamos que a la placa se adhieren más bacterias en tanto sea electronegativa, entonces se planteó la idea de hacer una pila con otra placa más electropositiva dentro de un medio conductor (solución fisiológica estéril) y ponerlas en cortocircuito para cambiar la polaridad de las placas. Este efecto genera una migración de bacterias desde la placa colonizada hacia la otra placa hasta la limpieza total de la primera.

4. CONCLUSIONES

En este trabajo se estudió experimentalmente la migración bacteriana en un sistema para nosotros denominado Pila de Migración Bacteriana (PMB). Los resultados mostraron que es posible hacer migrar bacterias de una placa colonizada a otra estéril si se aplica el principio de PMB.

Es sabido que las infecciones producidas en prótesis metálicas en nuestra zona son importantes, con los graves problemas que esto causa. Pensamos que si se pudiera llevar este principio a una aplicación práctica y comprobar su eficiencia, entonces puede usarse para desinfectar prótesis sin necesidad de su extracción o generar con el efecto PMB un sistema para evitar la contaminación de la prótesis durante la cirugía.

Como complemento científico a este artículo, se entiende que falta aún una legislación del comportamiento de las variables y también desarrollar junto al equipo de traumatología del hospital un sistema práctico de aplicación de este fenómeno.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración de la Gobernación de la Provincia de Entre Ríos en la financiación de este proyecto y a la Facultad regional Paraná de la U.T.N. por el apoyo logístico y de infraestructura.

REFERENCIAS

1. M. Giladi, Y. Porat, A. Blatt, Y. Wasserman, E. Kirson, E. Dekel and Y. Palti, "Microbial Growth Inhibition by Alternating Electric Fields", *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, Vol. 52 (2008), p. 3517-3522
2. S. Pickering, R. Bayston and B. Scammel, "Electromagnetic augmentation of antibiotic efficacy in infection of orthopedic implants", *The journal of Bone and Joint Surgery*, Vol. 85 (2003), p. 588-93.
3. A.E. Khoury, K. Lam, B. Ellis and JW Costerton, "Prevention and control of bacterial infection associated with medical devices", *ASAIO Journal*, Vol. 38 (1992), p. 174-178.
4. M. Spector, L. Peretti, F. Salas, G. Romero, L. Iglesias, "Conducción Bacteriana en Prótesis", *Anales SAM/CONAMET*, 2013.
5. Y.H. Na and R.J. Friedman, "Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surface", *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 43 (1998), p. 338-348.
6. 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.