

Original

Prevencción de la adhesión bacteriana a la superficie de materiales protésicos de reparación herniaria mediante el uso de soluciones antisépticas: estudio *in vitro**Preventing bacterial adhesion to the surface of hernia repair mesh materials through the use of antiseptics: in vitro study*Bárbara Pérez-Köhler^{1,3}, Javier Toledano¹, Claudia Mesa-Celler^{1,3}, Marta Rodríguez^{1,3}, Gemma Pascual^{2,3}, Juan M. Bellón^{1,3}

¹Departamento de Cirugía, Ciencias Médicas y Sociales. Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, Madrid (España). ²Departamento de Medicina y Especialidades Médicas. Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, Madrid (España). ³Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Madrid (España)

Resumen

Introducción: La impregnación de prótesis de reparación herniaria con soluciones antisépticas antes del implante podría reducir la incidencia de infecciones posoperatorias. El objetivo de este trabajo fue la comparación *in vitro* de la efectividad de soluciones de clorhexidina y polihexanida para el pretratamiento de prótesis reticulares de polipropileno ante contaminaciones causadas por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Escherichia coli*.

Material y métodos: Se analizó la actividad antibacteriana de soluciones de clorhexidina (0.05 %) y Prontosan (polihexanida 0.1 %) en presencia de 10⁸ UFC de *S. aureus* ATCC25923, *S. epidermidis* ATCC35984 y *E. coli* ATCC25922 (difusión en agar, viabilidad). Se sumergieron fragmentos de mallas Surgipro (1 cm²) en estas soluciones y se cultivaron durante 24 horas en placas de agar contaminadas. Se midieron los halos de inhibición y se determinó la adhesión bacteriana a la superficie protésica (sonicación, microscopía electrónica de barrido). En todos los ensayos se empleó solución salina como control.

Resultados: La viabilidad de las tres cepas bacterianas disminuyó drásticamente con ambos antisépticos ($p < 0.001$). Comparativamente, la clorhexidina produjo halos más amplios que Prontosan ($p < 0.01$). Las prótesis impregnadas con clorhexidina evitaron completamente la adhesión bacteriana a su superficie, mientras que las tratadas con Prontosan estaban parcialmente contaminadas en sus extremos, especialmente con *E. coli*. Los materiales de control se encontraron fuertemente colonizados por las tres cepas bacterianas.

Conclusiones: Al contrario que la clorhexidina, el tratamiento profiláctico de mallas de polipropileno mediante impregnación con Prontosan no es suficiente para garantizar una protección total de la superficie protésica, a pesar de la buena actividad antibacteriana ejercida por esta solución.

Abstract

Introduction: Soaking prosthetic mesh materials for hernia repair in antiseptic solutions prior to the implantation could reduce the incidence of postoperative infections. The aim of this study was to compare *in vitro* the effectiveness of chlorhexidine and polyhexanide antiseptic solutions in the pretreatment of a reticular polypropylene mesh under contamination challenged by *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli*.

Material and methods: The antibacterial activity of chlorhexidine (0.05%) and Prontosan (0.1% polyhexanide) against 10⁸ CFU of *S. aureus* ATCC25923, *S. epidermidis* ATCC35984 and *E. coli* ATCC25922 was assessed (agar diffusion test, viability). Fragments (1 cm²) of the Surgipro mesh were soaked in these solutions and cultured for 24 h onto contaminated agar plates. The inhibition zones were measured and the bacterial adhesion to the mesh surface was determined (sonication, scanning electron microscopy). Saline solution served as control in each assay.

Results: The viability of the three bacterial strains dramatically decreased with both antiseptics ($p < 0.001$). Chlorhexidine developed wider inhibition halos compared to Prontosan ($p < 0.01$). Meshes soaked in chlorhexidine fully avoided the bacterial adhesion to their surface, whilst the Prontosan-dipped materials were partially contaminated along the borders, especially when challenged with *E. coli*. All the control meshes were strongly contaminated with all these bacteria.

Conclusions: Contrary to chlorhexidine, the prophylactic soaking of polypropylene meshes in Prontosan does not provide a full protection of the materials surface, despite the appropriate antibacterial activity exerted by this antiseptic solution.

Recibido: 01-06-2017

Aceptado: 07-07-2017

Palabras clave:

Adhesión bacteriana; Antisépticos; Clorhexidina; Polihexanida; Polipropileno; Recubrimiento antibacteriano.

Key words:

Bacterial adhesion; Antiseptics; Chlorhexidine; Polyhexanide; Polypropylene; Antibacterial coating.

* Autor para correspondencia. Dr. D. Juan Manuel Bellón Caneiro. Departamento de Cirugía, Ciencias Médicas y Sociales. Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá. Campus Universitario. Ctra. Madrid-Barcelona, Km 33.6. Alcalá de Henares, 28871 Madrid (España). Teléfono: +34 91 885 45 56 / Fax: +34 91 885 48 85 Correo electrónico: juanm.bellon@uah.es

2255-2677/© 2017 Sociedad Hispanoamericana de Hernia. Publicado por Arán Ediciones, S.L. Todos los derechos reservados.
<http://dx.doi.org/10.20960/rhh.46>

INTRODUCCIÓN

En cirugía general, la reparación de defectos herniarios con implante de materiales protésicos representa uno de los procedimientos quirúrgicos más frecuentes^[1]. Según se estima, en EE. UU. se llevan a cabo unas 800 000 reparaciones anuales de hernia inguinal y 400 000 reparaciones de hernia ventral o incisional^[2,3]. Entre las posibles complicaciones posquirúrgicas que puedan presentarse, la infección destaca por ser una de las principales causas del fracaso del implante^[4]. Las infecciones del sitio quirúrgico y del material protésico incrementan las tasas de morbimortalidad y a menudo conllevan nuevas intervenciones quirúrgicas, con lo que se prolonga el ingreso hospitalario del paciente y se aumentan los recursos económicos necesarios para su tratamiento^[5,6].

La incidencia de la infección protésica varía en función de la patología herniaria, estando por debajo del 1 % en reparaciones de hernia ventral^[3] o en torno al 3-4 % en hernia inguinal^[7]. En el caso de hernias incisionales, las tasas de infección oscilan entre el 1-3 % en reparaciones laparoscópicas, y pueden alcanzar valores de hasta el 13-15 % en cirugías abiertas^[3,8].

La contaminación del material protésico se puede propiciar en el mismo momento de su implante, ya que existe el riesgo de que microorganismos presentes en el medio ambiente, la piel y mucosas del paciente o las manos del personal sanitario penetren en el lecho quirúrgico a través de la herida^[9]. Cuando esto sucede, las bacterias interactúan con la superficie del material protésico y los tejidos circundantes, para adherirse posteriormente a ellos y desencadenar la infección.

Una infección protésica puede agravarse si las bacterias que se encuentran adheridas al implante tienen la capacidad de desarrollar una estructura denominada *biofilm* o biopelícula. Los *biofilms* son complejas comunidades de microorganismos fuertemente anclados al sustrato y protegidos por una cápsula de polisacáridos y componentes de matriz extracelular producida por las propias bacterias^[10]. Está bien demostrado que la presencia de *biofilms* en el implante reduce la efectividad de los fármacos antibióticos y la acción de las células del sistema inmune^[11], con lo que se dificulta sustancialmente el tratamiento de la infección y se aumenta el riesgo de fracaso del implante^[7,12].

En la práctica clínica es frecuente el uso de profilaxis antibiótica como estrategia para evitar el desarrollo de infecciones protésicas, ya sea por vía sistémica, ya mediante la inmersión de la prótesis en soluciones antibióticas instantes previos a su implante^[13,14]. A pesar de ser prácticas habituales, el uso abusivo de antibióticos se asocia con la aparición de nuevas cepas bacterianas resistentes a la acción de estos fármacos^[15], de modo que resulta imperativo reducir su utilización al mismo tiempo que se buscan alternativas viables. En este sentido, los agentes de tipo antiséptico están recibiendo cada vez más atención, al tener una buena actividad antimicrobiana y un menor riesgo de aparición de resistencias bacterianas en comparación con los antibióticos^[4].

Dentro del amplio abanico de antisépticos disponibles, la clorhexidina destaca por ser uno de los más utilizados. En clínica, este antiséptico se emplea con frecuencia para la desinfección de la piel y el lavado de dispositivos quirúrgicos tales como catéteres^[9]. Además, se ha utilizado junto con un compuesto argéntico

en el diseño del primer material protésico de reparación herniaria con propiedades antimicrobianas que cuenta con la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. (FDA) para su uso en humanos^[16].

La polihexanida es una forma polimerizada de la clorhexidina. Este antiséptico es muy utilizado en la desinfección de heridas quirúrgicas y el lavado de vendajes, lentes de contacto y otros dispositivos médicos^[17]. Su mecanismo de acción es muy similar al de la clorhexidina: ambos antisépticos interactúan con los fosfolípidos de la membrana bacteriana, con lo que aumenta su fluidez y su permeabilidad, procesos que suponen la pérdida de la integridad de membrana y la consiguiente destrucción del microorganismo^[18]. Además de su actividad biocida, se ha sugerido que la polihexanida promueve el cierre de heridas^[19], de modo que la utilización de este antiséptico en el recubrimiento protésico podría tener un doble efecto, evitando la contaminación bacteriana y favoreciendo la cicatrización.

En estudios previos, nuestro grupo ha demostrado la eficacia de la clorhexidina para el recubrimiento profiláctico de mallas protésicas, ya sea mediante la inmersión en soluciones acuosas del antiséptico^[20,21] o con el diseño de recubrimientos poliméricos liberadores del fármaco^[22]. Sin embargo, hasta el momento actual no existen datos publicados sobre la posible aplicación de la polihexanida en este tipo de materiales. Por este motivo, el objetivo del presente trabajo ha sido evaluar la efectividad de una solución acuosa de polihexanida como tratamiento profiláctico de prótesis reticulares de polipropileno, comparando su actividad frente a la ejercida por la clorhexidina en un modelo de contaminación *in vitro* causado por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Escherichia coli*, tres tipos de microorganismos estrechamente relacionados con las infecciones asociadas a implantes de reparación herniaria.

MATERIAL Y MÉTODOS

Soluciones antibacterianas

Se han utilizado las siguientes soluciones estériles:

- CHX: Solución de digluconato de clorhexidina (Santa Cruz Biotechnology, Texas, EE. UU.) diluido al 0.05 % en agua destilada estéril.
- Prontosan: Solución acuosa comercial (B. Braun, Melsungen, Alemania) que contiene polihexanida al 0.1 % y undecilenamidopropil betaína al 0.1 %.
- Control: Solución salina de cloruro sódico diluido al 0.9 % en agua destilada estéril.

Microorganismos

Las bacterias empleadas proceden de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España). Se utilizaron las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (Sa), *Staphylococcus epidermidis* ATCC35984 (Se) y *Escherichia coli* ATCC25922 (Ec) a una concentración experimental de 10⁶ UFC/mL (UFC: unidad formadora de colonia). Con el fin de evitar posibles contaminaciones cruzadas entre los microorganismos, todos los ensayos se llevaron a cabo de forma independiente para Sa, Se y Ec.

Preparación de los inóculos bacterianos

Las bacterias, conservadas en crioviales, fueron descongeladas e incubadas en placas de agar de lisogenia (LB) durante 24 h a 37 °C. Para cada cepa bacteriana se aisló una colonia con un asa de siembra, que se trasladó a un tubo con 25 mL de caldo LB y se incubó durante toda la noche a 37 °C. Pasada la incubación, se midió la absorbancia del cultivo a 600 nm de longitud de onda con un espectrofotómetro Ultrospec 3100 Pro (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido). Utilizando solución salina estéril, los cultivos se diluyeron hasta alcanzar una absorbancia equivalente a un inóculo 10^8 UFC/mL. Para alcanzar la concentración deseada de 10^6 UFC/mL, se prepararon dos diluciones decimales seriadas, empleando solución salina estéril.

Control de la concentración bacteriana

Para determinar el número real de bacterias presentes en cada inóculo 10^6 UFC/mL, se realizaron cuatro diluciones decimales con solución salina estéril y se sembraron 100 μ L de cada una de ellas en placas de agar LB, extendiendo la gota por toda la superficie del agar. Tras 24 h de incubación a 37 °C, se realizó el recuento de las colonias crecidas en la superficie del agar y determinar así el número total de bacterias viables en cada inóculo.

Determinación de la actividad antibacteriana de las soluciones antisépticas

Para evaluar la efectividad de los antisépticos, se aplicó una variación del test de difusión en agar. Utilizando torundas, se contaminaron en césped 15 placas de agar LB para cada inóculo 10^6 UFC/mL. En el centro de las placas se perforó un pocillo de 8 mm de diámetro, que fue rellenado posteriormente con 100 μ L de las diferentes soluciones antisépticas testadas ($n = 5$ por grupo experimental). Las placas se incubaron durante 3 días a 37 °C. Cada 24 h, estas se extrajeron del incubador y se fotografiaron con una cámara calibrada. Las fotografías se utilizaron para medir el diámetro de los halos de inhibición desarrollados por los antisépticos mediante el programa de análisis de imagen ImageJ (Instituto Nacional de Salud de EE. UU.; disponible en el enlace <<http://imagej.nih.gov/ij/>>).

Viabilidad bacteriana

Se llevaron a cabo ensayos de viabilidad bacteriana utilizando un test colorimétrico con alamarBlue (AbD Serotec; Bio-Rad Laboratories Inc., California, EE. UU.). Para ello, se introdujeron volúmenes de 2 mL de caldo líquido LB en placas de 6 pocillos y se inocularon con las correspondientes cepas bacterianas. Seguidamente, los cultivos contaminados se trataron con 100 μ L de las distintas soluciones antisépticas o la solución control, y se incubaron durante 24 h a 37 °C. Finalizada la incubación, se añadió a cada cultivo un 10 % de reactivo alamarBlue y las placas se incubaron nuevamente durante 5 h a 37 °C. Se tomaron diversas alícuotas de 100 μ L de cada cultivo para medir la absorbancia a

570 y 600 nm, utilizando un lector de microplaca iMark (Bio-Rad Laboratories Inc.). Como blanco, se utilizó un volumen de caldo LB sin contaminar y con un 10 % de reactivo alamarBlue. En total, se analizaron 6 pocillos por cada tipo de antiséptico y cepa bacteriana. Los datos recogidos se analizaron con un software diseñado por el fabricante, disponible en la red a partir del siguiente enlace: <<http://www.abdserotec.com/colorimetric-calculator-fluorometric-alamarblue.html>>. Los resultados se expresaron como el porcentaje medio de viabilidad de cada tipo bacteriano, en presencia o ausencia de los antisépticos a testar.

Recubrimiento de prótesis con las soluciones antisépticas

El material protésico seleccionado fue Surgipro™ (PP; Covidien, Massachusetts, EE. UU.), una prótesis reticular de polipropileno de alta densidad utilizada en la reparación de defectos de pared abdominal. Bajo condiciones estériles, la prótesis se cortó en fragmentos de 1 \times 1 cm. Utilizando la metodología descrita anteriormente, se contaminaron en césped 24 placas de agar con cada cepa bacteriana. En el centro de cada una de las placas se colocó un fragmento de PP previamente sumergido en la solución antiséptica correspondiente ($n = 8$ por grupo de estudio), y las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Finalizada la incubación, las placas se fotografiaron con una cámara calibrada para medir los halos de inhibición, y los fragmentos protésicos se utilizaron para evaluar la adhesión bacteriana a su superficie mediante sonicación ($n = 5$) y microscopía electrónica de barrido ($n = 3$).

Sonicación

Tras cumplirse las 24 h de incubación y fotografiar las placas de agar, los fragmentos protésicos se recogieron y lavaron cuidadosamente con solución salina estéril, con el fin de eliminar las bacterias no adheridas a la superficie del material. Seguidamente, se trasladaron a tubos estériles con 10 mL de agua peptonada (solución salina que contiene 0.1 % de peptona bacteriológica) y se sometieron a un pulso de sonicación de 40 KHz durante 10 min, empleando un baño de ultrasonidos Branson 3800-CPXH (Branson Ultrasonics, Connecticut, EE. UU.). Para cuantificar el número de bacterias desprendidas de la superficie protésica, se prepararon 6 diluciones decimales seriadas a partir del líquido sonicado, y se llevó a cabo un recuento en placa de agar siguiendo la metodología descrita previamente. El nivel mínimo de detección se estableció en 1×10^2 UFC/mL.

Microscopía electrónica de barrido

Tras la incubación, los fragmentos protésicos se sumergieron en una solución fijadora de glutaraldehído al 3 % durante 2 h. A continuación, se lavaron con búfer Millonig (pH = 7.3) y se deshidrataron mediante incubaciones de 15 min en una serie de etanoles de concentración ascendente (30 %, 50 %, 70 %, 90 % y 100 %). Las muestras deshidratadas se desecaron con un equipo Polaron CPD7501 (Fisons Instruments, Ipswich, Reino Unido), se metalizaron con oro-paladio y se visualizaron con un microscopio

electrónico de barrido Zeiss DSM950 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania).

Análisis estadístico

Los datos recopilados en los diferentes ensayos fueron sometidos a un análisis estadístico completo, utilizando el programa informático GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, California, EE. UU.). Los datos se representaron como el valor de la media \pm el error estándar de la media. El método estadístico utilizado fue el análisis de la varianza de una vía (ANOVA) con el test de Bonferroni para comparaciones múltiples, estableciéndose un nivel de significación de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Control de la concentración bacteriana en los inóculos

El recuento en placa de agar permitió determinar la concentración bacteriana presente en cada uno de los inóculos utilizados. La dosis media de microorganismos fue de 1.80×10^6 UFC/mL para Sa, 1.32×10^6 UFC/mL para Se y 1.28×10^6 UFC/mL para Ec.

Eficacia de las soluciones antisépticas

Mediante el test de difusión en agar se comprobó que tanto CHX como Prontosan desarrollaban halos de inhibición frente a Sa, Se y Ec. Estos halos se mantuvieron estables durante todo el tiempo de estudio, sin que se produjera una disminución en su diámetro ni surgieran nuevas colonias en su interior (fig. 1). Al medir el tamaño de estas zonas de inhibición se observó que, con independencia de la cepa contaminante, el diámetro medio de los halos producidos por CHX fue significativamente mayor que los desarrollados por Prontosan ($p < 0.01$).

Efecto de los antisépticos en la viabilidad bacteriana

De forma similar a las observaciones previas, la presencia de soluciones antisépticas en los cultivos de Sa, Se y Ec provocó una drástica disminución en la viabilidad de dichas bacterias (tabla I). Para cada cepa, los valores de viabilidad registrados en los grupos control fueron significativamente inferiores a los obtenidos en presencia de CHX ($p < 0.001$) o Prontosan ($p < 0.001$). La toxicidad ejercida por estos antisépticos fue similar, obteniéndose valores de viabilidad bacteriana equivalentes en todos los casos. Al analizar los resultados entre cepas, se observó una mayor sensibilidad

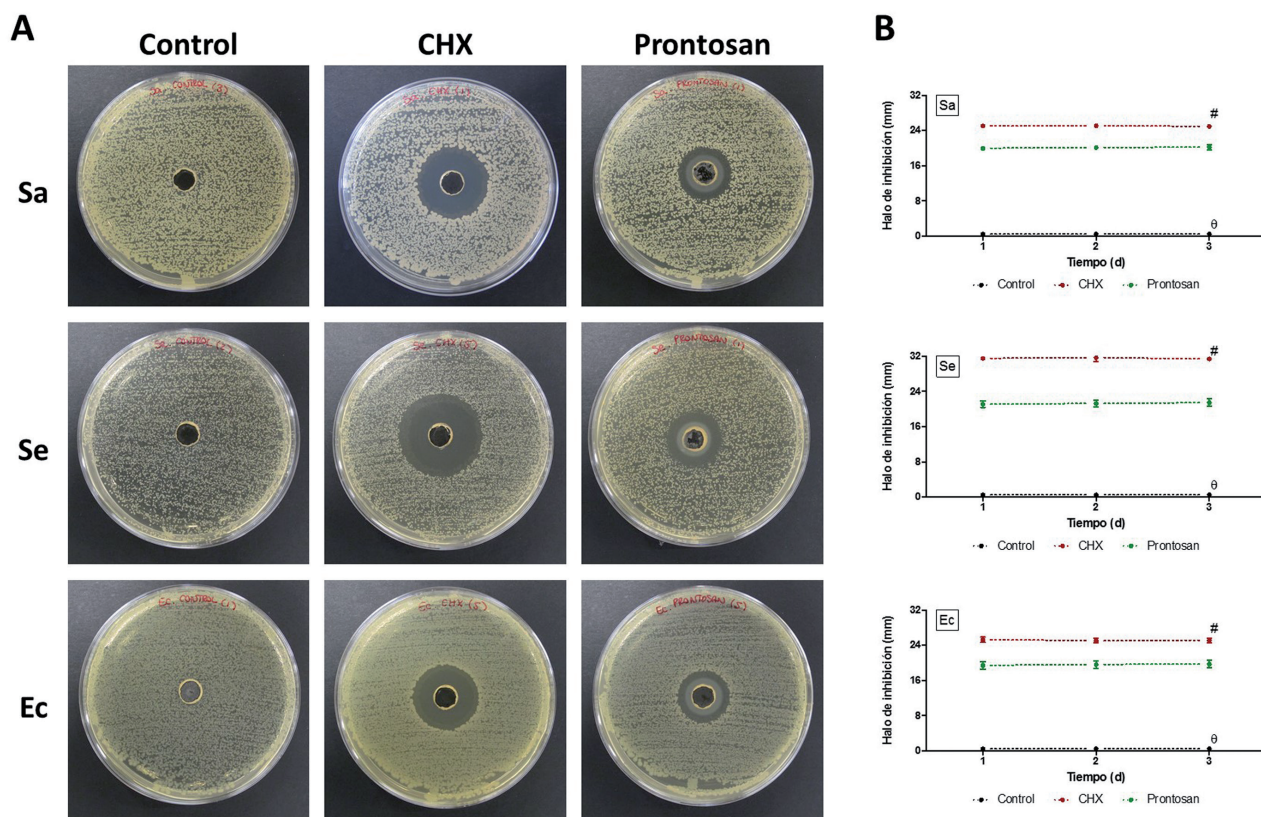


Figura 1. Test de difusión en agar. **A)** Imágenes macroscópicas de las zonas de inhibición desarrolladas por los antisépticos CHX y Prontosan, tras 72 h de la contaminación bacteriana. **B)** Comportamiento de los halos de inhibición a lo largo del tiempo. #: CHX vs. Prontosan ($p < 0.01$); θ : control vs. antisépticos ($p < 0.001$) (test estadístico: ANOVA + Bonferroni).

Tabla I. Porcentaje de viabilidad de cultivos bacterianos en presencia de solución salina (control) o soluciones antisépticas

	Viabilidad bacteriana (porcentaje)		
	Control	CHXd	Prontosan
Sa ^a	100.00 ± 2.06	1.97 ± 0.39	2.17 ± 0.15
Se ^b	101.70 ± 1.75	3.70 ± 0.24	3.57 ± 0.20
Ec ^c	103.70 ± 3.40	3.53 ± 0.20	3.45 ± 0.44

Los valores corresponden a la viabilidad media ± el error estándar de la media.
 Abreviaturas: ^a*Staphylococcus aureus*; ^b*Staphylococcus epidermidis*; ^c*Escherichia coli*; ^dclorhexidina.

hacia los antisépticos en los cultivos de Sa en comparación con los de Se y Ec, tanto en el tratamiento con CHX ($p < 0.01$) como con Prontosan ($p < 0.05$).

Efecto de los antisépticos en el recubrimiento protésico

Tras la impregnación con CHX o Prontosan, las prótesis presentaron un comportamiento notablemente diferente en función

de la solución antiséptica con la que habían sido pretratadas. Mientras que los materiales recubiertos con CHX desarrollaron zonas de inhibición de amplitud adecuada frente a las tres cepas bacterianas, los halos formados por las mallas impregnadas con Prontosan fueron significativamente menores ($p < 0.001$) y presentaron diámetros prácticamente equivalentes al tamaño de los propios fragmentos protésicos. Este hecho fue especialmente evidente ante la contaminación con Ec, donde el límite de los halos de inhibición estaba en contacto directo con los extremos de las prótesis (fig. 2).

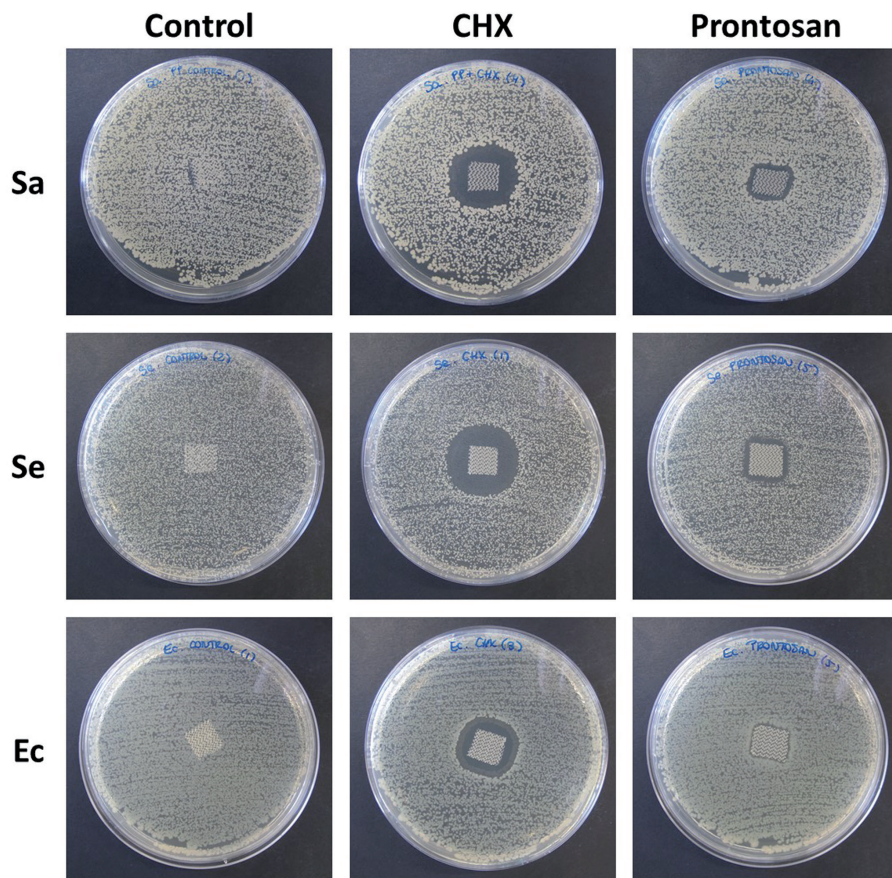


Figura 2. Eficacia de los recubrimientos protésicos. Imágenes macroscópicas de los halos de inhibición creados por las prótesis impregnadas en las soluciones antisépticas tras 24 h de la contaminación bacteriana.

Tabla II. Cuantificación de la adhesión bacteriana a la superficie de las prótesis recubiertas con solución salina (control) o soluciones antisépticas.

Prótesis recubiertas. Adhesión bacteriana (UFC/prótesis)			
Bacteria	Control	CHXd	Prontosan
Sa ^a	Media: 1.29 x 10 ⁹ Mínimo: 1.05 x 10 ⁸ Máximo: 2.03 x 10 ⁹	Media: 0 Mínimo: 0 Máximo: 0	Media: 1.13 x 10 ⁴ Mínimo: 0 Máximo: 5.50 x 10 ⁴
Se ^b	Media: 5.58 x 10 ⁸ Mínimo: 3.40 x 10 ⁷ Máximo: 1.57 x 10 ⁹	Media: 0 Mínimo: 0 Máximo: 0	Media: 2.00 x 10 ² Mínimo: 0 Máximo: 9.00 x 10 ²
Ec ^c	Media: 1.04 x 10 ⁸ Mínimo: 7.60 x 10 ⁷ Máximo: 1.34 x 10 ⁸	Media: 0 Mínimo: 0 Máximo: 0	Media: 8.29 x 10 ⁴ Mínimo: 6.00 x 10 ² Máximo: 3.91 x 10 ⁵

Los valores corresponden a la media, máximo y mínimo de la adhesión bacteriana a la superficie de las prótesis. Para cada cepa hay diferencias significativas entre el grupo control y los dos antisépticos ($p < 0.01$).

Abreviaturas: ^a*Staphylococcus aureus*; ^b*Staphylococcus epidermidis*; ^c*Escherichia coli*; ^dclorhexidina.

En consonancia con estos hechos, la cuantificación de bacterias adheridas a la superficie protésica reveló la ausencia total de Sa, Se o Ec en los materiales impregnados con CHX. Por el contrario, el antiséptico Prontosan no fue capaz de evitar la adhesión de Sa y Se en el 60 % de los fragmentos utilizados, mientras que el 100 % de las mallas expuestas a Ec se encontraron contaminadas (tabla II). A pesar de ello, la adhesión bacteriana a los materiales impregnados con Prontosan fue significativamente menor que la observada en las prótesis de control, tanto en presencia de Sa ($p < 0.01$) como de Se ($p < 0.01$) y de Ec ($p < 0.01$).

Finalmente, las observaciones a microscopía electrónica de barrido confirmaron estos resultados (fig. 3). Con independencia de la cepa contaminante, todos los materiales impregnados en CHX presentaron una superficie libre de bacterias, mientras que en las prótesis recubiertas con Prontosan se pudo observar la presencia de colonias aisladas y dispersas, localizadas únicamente en los bordes externos de estos materiales. En el caso de los materiales utilizados como control, la totalidad de la superficie protésica se encontraba ocupada por bacterias. En la superficie de estos materiales, tanto Sa como Se y Ec se mostraron firmemente adheridas, formando densas capas que cubrían casi por completo los filamentos protésicos.

DISCUSIÓN

El uso local o sistémico de agentes antibióticos para combatir infecciones asociadas a implantes protésicos es una estrategia muy frecuente en clínica. Por desgracia, estos tratamientos no siempre resultan efectivos, a menudo debido a que los microorganismos han desarrollado *biofilms* sobre la superficie del implante, disminuyendo la actividad del fármaco sobre el territorio afectado^[7,11,12]. Además, el uso prolongado o abusivo de antibióticos puede provocar alteraciones genéticas y estructurales en las bacterias, propiciando la aparición de nuevas cepas resistentes^[23]. El incremento en el número y el tipo de microorganismos resistentes a la acción de antibióticos registrado en los últimos años es alarmante^[24], por

lo que resulta crítico encontrar alternativas que permitan luchar contra las infecciones protésicas minimizando el riesgo de crear resistencias.

Dentro de las distintas estrategias posibles, la prevención de la adhesión bacteriana a la superficie del implante parece ser una de las más lógicas, ya que evitar la colonización del material protésico dificultaría el desencadenamiento de la infección y favorecería la integración tisular del implante^[25]. La prevención de la adhesión bacteriana puede lograrse impregnando el material protésico con un compuesto antimicrobiano, bien mediante inmersión en el agente previo a su implante, bien con el diseño de recubrimientos poliméricos con liberación controlada de fármacos^[9].

El uso de agentes antisépticos podría resultar adecuado para este tipo de impregnaciones protésicas. Estos compuestos suelen tener mecanismos de acción no selectivos, de modo que su efecto bactericida no se asocia con la aparición de resistencias bacterianas^[4]. Con el fin de valorar *in vitro* su efectividad en el recubrimiento profiláctico de materiales protésicos de reparación herniaria, hemos seleccionado dos antisépticos de uso frecuente en clínica, CHX y polihexanida. Mientras que la solución de CHX se preparó mediante dilución en agua destilada, la polihexanida constituía el principio activo de una solución antiséptica comercial (Prontosan).

El efecto bacteriostático o bactericida de un antiséptico suele depender de la concentración a la que este se utiliza. De forma general, CHX y polihexanida presentan una actividad bacteriostática cuando se aplican a muy bajas concentraciones, inhibiendo el crecimiento bacteriano mediante la alteración del equilibrio osmótico de la bacteria. Según se incrementa la concentración, estos antisépticos ocasionan daños irreversibles en la estructura de la pared bacteriana haciendo que pierda su integridad, hecho que conlleva la destrucción del microorganismo^[17-19,26]. En nuestro estudio hemos demostrado la eficacia de las soluciones de CHX y polihexanida frente a los microorganismos testados. Estos agentes no solo desarrollaron amplios halos de inhibición, sino que su efecto se sostuvo en el tiempo, lo que sugiere un efecto bactericida por parte de ambos antisépticos.

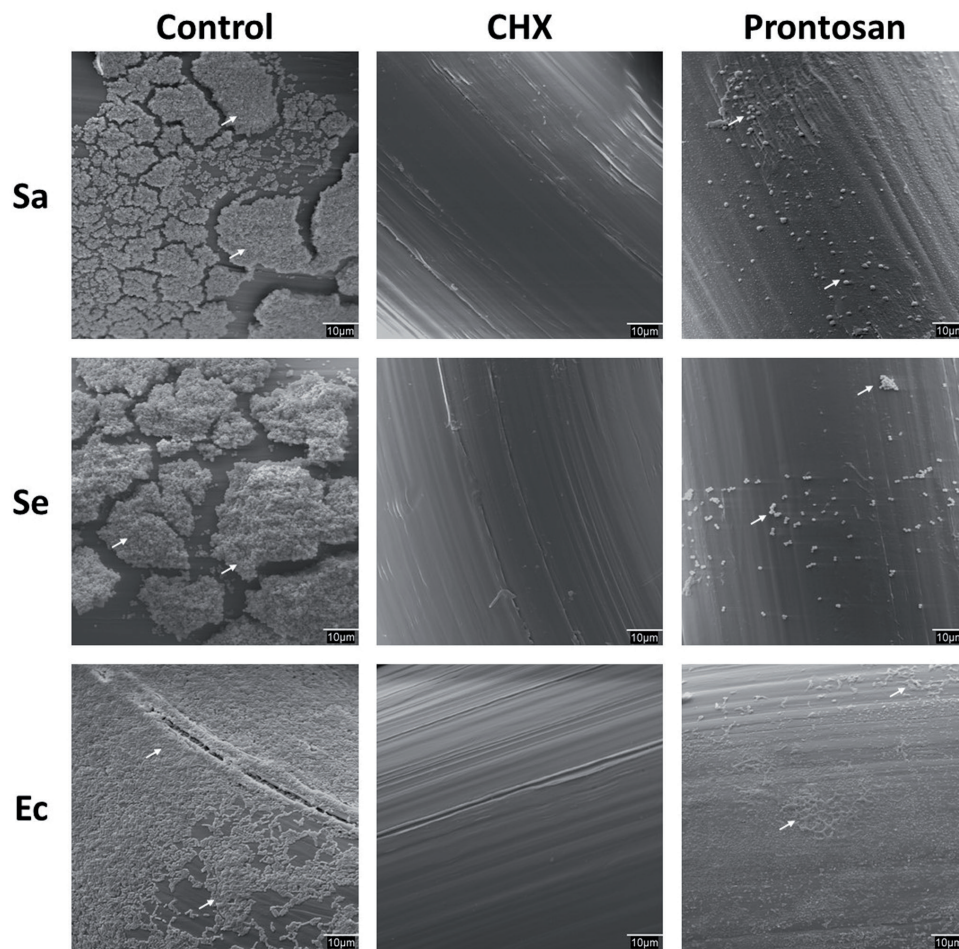


Figura 3. Adhesión bacteriana a la superficie protésica. Fotografías de microscopía electrónica de barrido (1.000x), en las que se observa una intensa colonización bacteriana (→) en los materiales del grupo de control, una leve presencia de bacterias en los grupos tratados con Prontosan y ausencia de contaminación en los materiales impregnados con CHX.

A pesar del buen rendimiento observado, CHX y polihexanida presentaron un comportamiento muy diferente a la hora de utilizarse en el recubrimiento profiláctico de materiales protésicos. La inmersión en CHX proporcionó a las prótesis una barrera efectiva que evitó la adhesión y la supervivencia bacteriana en su superficie, corroborando así los hallazgos previamente descritos por nuestro grupo^[20,21]. Por el contrario, los materiales impregnados con Prontosan no fueron capaces de evitar por completo la adhesión bacteriana, especialmente ante la contaminación provocada por *Ec*. No hemos encontrado evidencia previa sobre el uso de Prontosan en el recubrimiento profiláctico de implantes protésicos, aunque existen datos que sugieren un efecto positivo de este antiséptico. En un experimento *in vitro* que comparaba diversas soluciones de este tipo, Hirsch y cols. demostraron que la solución Prontosan tiene baja toxicidad celular y actúa eficazmente frente a diversos microorganismos grampositivos y gramnegativos^[27]. La efectividad de este antiséptico también se ha demostrado bajo condiciones *in vivo*, tras observarse que la irrigación con Prontosan reducía significativamente la carga bacteriana, en un modelo porcino de infección cutánea causada por *S. aureus* resistente a metilicina^[28].

Si bien los datos publicados sobre las aplicaciones de la solución Prontosan se centran en el lavado quirúrgico de heridas^[17], su componente activo principal (polihexanida) ha sido ampliamente estudiado con resultados prometedores. En un estudio comparativo que utilizaba diversos antisépticos, Kramer y cols. demostraron que la polihexanida provoca una menor toxicidad celular que la CHX, sugiriendo una mejor biocompatibilidad por parte de este antiséptico^[19]. Además, recientemente se ha demostrado que un recubrimiento de silicona provisto de polihexanida constituye una herramienta potencial para el control de las infecciones asociadas a dispositivos implantables^[29].

Junto con la polihexanida, la solución antiséptica Prontosan utilizada en este estudio contiene undecilnamidopropil betaína, un surfactante alcaloide que reduce la tensión superficial de la solución, hecho que podría facilitar la penetración del antiséptico al interior del *biofilm*^[30]. Este surfactante actúa de forma sinérgica con la polihexanida, permitiendo una mayor eficacia de la solución antiséptica^[31]. Aunque hemos podido comprobar su óptima actividad antibacteriana, esta solución por sí misma no es suficiente para garantizar la protección total del material protésico ante una contaminación bacteriana aguda. Su baja tensión superficial podría

ser una de las causas que expliquen este fenómeno, ya que esta propiedad acelera la difusión de la solución desde los bordes del material tratado hacia el lecho o sustrato, en este caso las placas de agar.

Es importante destacar que, al estar desarrollado bajo condiciones *in vitro*, los resultados del presente trabajo no pueden predecir cómo se comportarán estos materiales impregnados con antisépticos en condiciones experimentales *in vivo* y, por tanto, no son extrapolables al ámbito clínico. A la vista de los resultados obtenidos, consideramos que la solución antiséptica Prontosan tiene un uso muy limitado como agente profiláctico para la prevención de infecciones protésicas.

Dado el potencial que presenta la polihexanida, las limitaciones que hemos encontrado con el uso de este agente en solución acuosa podrían ser solventadas mediante el diseño de un recubrimiento polimérico provisto de polihexanida y con capacidad de liberar el fármaco de forma gradual, controlada y sostenida en el tiempo.

En resumen, los resultados de nuestro estudio indican que, a pesar de presentar una buena actividad antibacteriana, la inmersión de materiales reticulares de polipropileno en la solución antiséptica Prontosan no constituye una medida profiláctica eficaz, al quedar los bordes externos de los materiales recubiertos con este antiséptico expuestos a la contaminación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Isabel Cavanillas (B. Braun) el haber proporcionado la solución antiséptica Prontosan.

REFERENCIAS

- Rutkow IM. Demographic and socioeconomic aspects of hernia repair in the United States in 2003. *Surg Clin North Am.* 2003;83:1045-51.
- Albino FP, Patel KM, Nahabedian MY, Attinger CE, Bhanot P. Immediate, multistaged approach to infected synthetic mesh: outcomes after abdominal wall reconstruction with porcine acellular dermal matrix. *Ann Plast Surg.* 2015;75:629-33.
- Montgomery A, Kallinowski F, Köckerling F. Evidence for replacement of an infected synthetic by a biological mesh in abdominal wall hernia repair. *Front Surg.* 2016;2:67.
- Veerachamy S, Yarlagadda T, Manivasagam G, Yarlagadda PK. Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: a review. *Proc Inst Mech Eng H.* 2014;228:1083-99.
- Falagas ME, Kasiakou SK. Mesh-related infections after hernia repair surgery. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11:3-8.
- Yabanoğlu H, Arer İM, Çalışkan K. The effect of the use of synthetic mesh soaked in antibiotic solution on the rate of graft infection in ventral hernias: a prospective randomized study. *Int Surg.* 2015;100:1040-7.
- Cobb WS, Carbonell AM, Kalbaugh CL, Jones Y, Lokey JS. Infection risk of open placement of intraperitoneal composite mesh. *Am Surg.* 2009;75:762-8.
- Dietz UA, Spor L, Germer CT. Management of mesh related infections. *Chirurg.* 2011;82:208-17.
- von Eiff C, Jansen B, Kohnen W, Becker K. Infections associated with medical devices: Pathogenesis, management and prophylaxis. *Drugs* 2005;65:179-214.
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15:167-93.
- Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR. Biofilm in implant infections: Its production and regulation. *Int J Artif Organs.* 2005;28:1062-8.
- Cobb WS, Paton BL, Novitsky YW, Rosen MJ, Kercher KW, Kuwada TS, et al. Intra-abdominal placement of antimicrobial-impregnated mesh is associated with noninfectious fever. *Am Surg.* 2006;72:1205-8.
- Sadava EE, Krpata DM, Gao Y, Novitsky YW, Rosen MJ. Does pre-soaking synthetic mesh in antibiotic solution reduce mesh infections? An experimental study. *J Gastrointest Surg.* 2013;17:562-8.
- Wiegering A, Sinha B, Spor L, Klinge U, Steger U, Germer CT, et al. Gentamicin for prevention of intraoperative mesh contamination: demonstration of high bactericide effect (in vitro) and low systemic bioavailability (in vivo). *Hernia.* 2014;18:691-700.
- Tambe SM, Sampath L, Modak SM. In vitro evaluation of the risk of developing bacterial resistance to antiseptics and antibiotics used in medical devices. *J Antimicrob Chemother.* 2001;47:589-98.
- Harrell AG, Novitsky YW, Kercher KW, Foster M, Burns JM, Kuwada TS, et al. In vitro infectability of prosthetic mesh by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Hernia.* 2006;10:120-4.
- Adriensen AE, Eberlein T. Assessment of a wound cleansing solution in the treatment of problem wounds. *Wounds* 2008;20:171-5.
- Horner C, Mawer D, Wilcox M. Reduced susceptibility to chlorhexidine in staphylococci: is it increasing and does it matter? *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:2547-59.
- Kramer A, Hübner NO, Assadian O, Mulder G. Polihexanide: perspectives on clinical wound antiseptics. *Skin Pharmacol Physiol.* 2010;23:1-3.
- Pérez-Köhler B, García-Moreno F, Bayon Y, Pascual G, Bellón JM. Inhibition of *Staphylococcus aureus* adhesion to the surface of a reticular heavyweight polypropylene mesh soaked in a combination of chlorhexidine and allicin: An in vitro study. *PLoS One.* 2015;10:e0126711.
- Pérez-Köhler B, García-Moreno F, Brune T, Pascual G, Bellón JM. Preclinical bioassay of a polypropylene mesh for hernia repair pretreated with antibacterial solutions of chlorhexidine and allicin: An in vivo study. *PLoS One.* 2015;10:e0142768.
- Pérez-Köhler B, Fernández-Gutiérrez M, Pascual G, García-Moreno F, San Román J, Bellón JM. In vitro assessment of an antibacterial quaternary ammonium-based polymer loaded with chlorhexidine for the coating of polypropylene prosthetic meshes. *Hernia.* 2016;20:869-78.
- Chaudhary AS. A review of global initiatives to fight antibiotic resistance and recent antibiotics' discovery. *Acta Pharm Sin B.* 2016;6:552-6.
- Taubes G. The bacteria fight back. *Science.* 2008;321:356-61.
- Gristina AG, Naylor P, Myrvik Q. Infections from biomaterials and implants: a race for the surface. *Med Prog Technol.* 1988-1989;14:205-24.
- Edmiston CE Jr, Bruden B, Rucinski MC, Henen C, Graham MB, Lewis BL. Reducing the risk of surgical site infections: does chlorhexidine gluconate provide a risk reduction benefit? *Am J Infect Control.* 2013;41:S49-55.
- Hirsch T, Koerber A, Jacobsen F, Dissemond J, Steinau HU, Gatermann S, et al. Evaluation of toxic side effects of clinically used skin antiseptics in vitro. *J Surg Res.* 2010;164:344-50.
- Davis SC, Harding A, Gil J, Parajon F, Valdes J, Solis M, et al. Effectiveness of a polyhexanide irrigation solution on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms in a porcine wound model. *Int Wound J.* 2017. doi: 10.1111/iwj.12734.
- Zhi Z, Su Y, Xi Y, Tian L, Xu M, Wang Q, et al. Dual-functional polyethylene glycol-b-polyhexanide surface coating with in vitro and in vivo antimicrobial and antifouling activities. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2017;9:10383-97.
- Cutting KF. Addressing the challenge of wound cleansing in the modern era. *Br J Nurs.* 2010;19:S24,S26-9.
- Bradbury S, Fletcher J. Prontosan® Made Easy. *Wounds Int.* 2011;2:1-6.