

Análisis de efectividad de dispositivo emisor de ultrasonido en placa obturadora contra infecciones bacterianas

Ricardo Mastachi Torres; Z. Jezabel Guzmán-Zavaleta
Universidad Iberoamericana Puebla, México
ricardo.mastachi@anxech.com

Resumen

El paladar hendido es una de las malformaciones craneofaciales más comunes del mundo. Los problemas que le provocan al paciente no se solucionan sólo con una cirugía para reconstruir el paladar, ya que más de un 80% de los pacientes sufren pérdida auditiva debido a infecciones bacterianas generadas en el paladar. Para disminuir este tipo de complicaciones, se propone el uso de un emisor de ultrasonido (US) encapsulado en una placa obturadora palatina. El principal objetivo del dispositivo es ser auxiliar para la eliminación de bacterias mediante el fenómeno de cavitación en la saliva del paciente que debilita la pared celular bacteriana. Este documento presenta el diseño del dispositivo y la evaluación de su efectividad in vitro.

Palabras clave: Ultrasonido, eliminación de bacterias, paladar hendido, placa obturadora.

Introducción

El paladar hendido es una afección craneofacial en la cual el techo de la boca (paladar) no se une correctamente durante la gestación. Se trata de una malformación congénita muy común. En 2003, se reportaron 9.6 casos nuevos diariamente en todo el mundo, lo que representó entre 0,8 y 1,6 nuevas incidencias por cada 1000 nacimientos [1]. En particular, es la anomalía craneofacial más común en México, donde entre 2003 y 2009 se informó una media de 1,510 casos anuales [2], alrededor de 1:750 nacidos vivos por año.

Los pacientes con paladar hendido requieren tratamientos reconstructivos funcionales y estéticos. Un tratamiento en neonatos es el uso de un moldeador nasopalveolar prequirúrgico, o comúnmente llamada placa obturadora [3]. Sin embargo, antes y después de algún tratamiento quirúrgico, son frecuentes las infecciones orales, que entre otras consecuencias, causan pérdida de audición a largo plazo [4] e implican complicaciones en el habla. Por lo tanto, existe la necesidad de prevenir infecciones bacterianas, previniendo también sus consecuencias directas.

Una solución factible para matar bacterias es mediante ultrasonido (US), que ya se usa en la industria como instrumento de esterilización [5] y como auxiliar para la eliminación de biopelículas [6], [7]. Es por ello que se examina el uso de un dispositivo emisor de US encapsulado en una placa obturadora, con el objetivo de ya sea debilitar la biopelícula o bien, lograr la eliminación de las bacterias.

En este documento se presentan los resultados preliminares de esta investigación. Específicamente, en esta versión se presenta el diseño del experimento in vitro para valorar la resistencia de las bacterias ante el dispositivo propuesto. Se prevé contar con los cultivos bacterianos y los resultados del experimento en la primera semana de mayo de 2018.

Objetivo general

Verificar el funcionamiento del prototipo para eliminar bacterias en un experimento *in vitro*.

Objetivos específicos

Diseñar un experimento que permita medir la reducción de una población de bacterias usando el dispositivo emisor de ultrasonido.

Analizar los resultados del experimento para determinar la frecuencia de aplicación de US diaria que sería necesaria para prevenir infecciones.

Justificación

Los pacientes con paladar hendido tienen complicaciones físicas y funcionales que se agravan con infecciones bacterianas. Actualmente, los pacientes neonatos son tratados con antibióticos y cuidados de higiene basados en una limpieza local con gaza, siendo acciones altamente intrusivas.

Por esta razón se propone el desarrollo de un dispositivo no intrusivo ni químico auxiliar en la eliminación de bacterias en la boca de los pacientes. Esto permitirá además, prevenir el desarrollo de infecciones en los pacientes que son riesgos previos a una cirugía reconstructiva del paladar que provoquen la disminución en la audición de los pacientes.

Este tipo de dispositivos no intrusivos tiene una alta demanda que no ha sido adecuadamente satisfecha, además que tiene un alto potencial para ser utilizado en otro tipo de aplicaciones, por ejemplo, en higiene bucal cotidiana.

Alcances

El presente trabajo abordará un experimento con el prototipo, un piezoeléctrico encapsulado en resina y poliuretano de baja densidad, sobre varios cultivos de bacterias orales. En el estudio se usará un prototipo estéril y otro no estéril, encendido y apagado, para verificar que los cambios en la población de bacterias sean causado por el ultrasonido y nada más.

Los resultados experimentales presentados en este documento forman parte del proyecto que abarca el diseño (caracterización de US y el prototipos) y construcción de un dispositivo adecuado que cumpla las normas requeridas por las aplicaciones médicas.

Limitaciones

Este documento evalúa la efectividad del prototipo en una fase experimental in vitro. Por lo que los resultados del control in vivo se presentarán en un trabajo futuro.

Los resultados de las fases experimentales ayudarán a caracterizar adecuadamente el dispositivo US por lo que el diseño del mismo aún no se considera finalizado.

Así mismo hemos limitado la presentación de resultados en este documento a la evaluación de la efectividad del dispositivo ante bacterias orales comunes.

Marco teórico

El fenómeno físico que se aprovecha en este proyecto es la propagación de ondas sonoras en un medio acuoso a 40 kHz de frecuencia. A estas ondas se les denomina ultrasonido [8].

En ocasiones, cuando las ondas mecánicas portan la energía suficiente, pueden lograr expandir y contraer el medio (normalmente agua) con tanta fuerza que se crean burbujas microscópicas de vapor. Estas burbujas estallan inmediatamente liberando energía y radicales libres. A esta acción se le llama cavitación [9]. Así, cuando las bacterias se encuentran en un medio en cavitación, éstas serán sometidas a esfuerzos cortantes que las llegará a destruir.

Este fenómeno se ha investigado desde el siglo pasado y ha sido utilizado como un método de limpieza de superficies [5], para limpiar material quirúrgico y alimentos como mariscos [10] y frutas [5]. Otros estudios recientes han estudiado la eficiencia y viabilidad de usar US para eliminar bacterias en humanos, desde distintos acercamientos [6]. Uno de los más populares es el uso de US de baja intensidad y alta frecuencia para modificar el comportamiento de las bacterias y facilitar la función de antibióticos [7]. Además se ha demostrado la eficacia del uso del ultrasonido en la limpieza de biopelículas bacterianas [6].

En este estudio se busca obtener un resultado antibiótico por medio de la cavitación inducida por ultrasonido. La aplicación principal del aparato propuesto es matar las bacterias presentes en la boca de pacientes con paladar hendido. En este tipo de pacientes, la fisura del paladar es altamente propensa a almacenar una gran cantidad de bacterias que comúnmente ocasionan infecciones [11]. Una complicación de este problema es que, a través de la Trompa de Eustaquio, las infecciones viajan al oído causando otitis y pérdida auditiva [3]. Por ejemplo, en [12] se mostró que alrededor del 80% de los pacientes con paladar hendido presentan algún grado de pérdida auditiva. Al no escuchar, los pacientes tienen problemas del habla, que pueden derivarse en otros problemas psicológicos que acompañan al paciente en su crecimiento [13].

El US es el fenómeno físico propuesto para eliminar las bacterias en la boca de pacientes con paladar hendido ya que se ha demostrado que bajo un ambiente controlado no daña el tejido celular [14], pero sí las bacterias de menores dimensiones [9].

Debido a que el problema es reducir el riesgo de infecciones que conducen a la pérdida de la audición, que es causada por la otitis, las bacterias que se estudian son las relacionadas con la otitis que presentan los pacientes con paladar hendido. La bacteria que se estudiará está determinada por los trabajos de [13], [15] y [16], que mencionan a *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* como la principal bacteria involucrada en la otitis. *Streptococcus pneumoniae* tiene un diámetro entre 0.5 y 1.25 micrómetros [17]. Los glóbulos rojos de la sangre son las células humanas más pequeñas en volumen, y pueden ser seis veces más grandes que estas bacterias [18]. Sin embargo, también será importante observar otras bacterias que comúnmente causan otras infecciones en pacientes con paladar hendido como *Staphylococcus aureus* [19].

Un paciente con infecciones orales no es adecuado para la cirugía reconstructiva, por lo que otras bacterias como *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis* y *Streptococcus salivarius* [20] también son interesantes de incluir en el estudio.

Metodología

Para la elaboración de éste proyecto se sigue la metodología *Stage-Gate* denominada Procesos para el Desarrollo de Dispositivos Médicos [21]. Dicha metodología consta de 5 etapas y 4 compuertas.

En este documento presentamos la etapa de análisis del prototipo, con un experimento *in vitro* realizado de la siguiente manera.

Diseño experimental:

El objetivo del experimento es medir la efectividad del piezoeléctrico encapsulado para eliminar bacterias. Dividimos el experimento en dos fases: A) eliminación de bacterias con muestras salivales de personas sin infección visible, B) eliminación de bacterias con muestras tomadas de pacientes que presentan infección. En este documento se presentan las pruebas de la fase A.

Para tal efecto, se requieren 10 cultivos bacterianos (en cajas petri), donde uno ellos es de control o blanco, tres cultivos se reservan para las pruebas con la cápsula esterilizada emitiendo ultrasonido, otros tres con la cápsula sin esterilizar emitiendo ultrasonido y los tres restantes con la cápsula apagada (véase la Fig. 1).

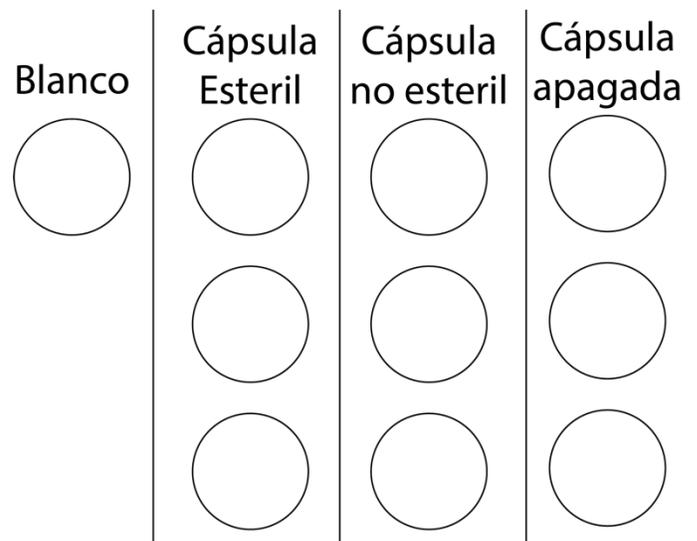


Fig. 1. Diagrama del experimento.

El experimento mide en cada cultivo, los cambios en colonias bacterianas, con o sin la emisión de ultrasonido. Se realiza con las siguientes etapas:

1. Realizar el cultivo sobre el medio estéril. Las cajas petri se esterilizan y posteriormente se almacena la muestra en una incubadora a 35° durante 6 días para permitir el crecimiento de las colonias. El cultivo se incuba en Agar nutritivo.
2. Colocar la cápsula sobre una zona de la caja petri con bacterias
3. Incubar nuevamente por 2 días
4. Analizar los cambios en los cultivos

Prototipo del dispositivo emisor de ultrasonido:

El prototipo está conformado por dos componentes: el controlador, que genera pulsos cuadrados a 40 kHz, y el emisor, que recibe los pulsos y los transforma en ondas sonoras. La importancia de separar el prototipo en dos dispositivos radica en la conveniencia para poder reemplazar los emisores de ultrasonido en caso de contaminación.

El dispositivo controlador genera las ondas cuadradas con el uso de un microcontrolador con el *firmware* de la plataforma *Open Source Arduino* [22]. La salida digital del microcontrolador se dirige a un transistor bipolar para amplificar la señal, de 0 a 20 volts. Este dispositivo cuenta con una pantalla de cristal líquido que sirve de interfaz con el usuario y le permite saber si se está emitiendo US y por cuánto tiempo. También tiene un botón para comenzar a emitir US, y un puerto hembra de 3.5 mm comúnmente usado en audio donde se conectará el emisor de US. Por último, en éste dispositivo se encuentra un sensor de vibraciones a la misma frecuencia, 40 kHz,

que servirá para verificar el funcionamiento adecuado del emisor de US.

Por otro lado, el dispositivo emisor está conformado por un piezoeléctrico, un cable con un puerto macho y una carcasa de plástico diseñada en CAD y fabricada con una impresora tridimensional de estereolitografía en resina fotosensible (ver Fig. 2 y 3).



Fig. 2. Modelo diseñado en CAD para encapsular el piezoeléctrico.

El diseño está realizado para que la cápsula pueda ser adherida a una placa obturadora.



Fig. 3. Piezoeléctrico emisor de ultrasonido introducido en la cápsula.

En este trabajo se utiliza el modelo del sensor piezoeléctrico HC-SR04 (ver Fig.4).



Fig. 4. Sensor ultrasónico de distancia del cual se extrajo el piezoeléctrico.

Resultados y discusión

Previo a la realización del experimento se verificó el funcionamiento del prototipo después de su encapsulación, en ambos componentes del dispositivo, mediante el testigo que verifica la emisión de ultrasonido. Se observó que el encapsulado aísla adecuadamente los líquidos de las terminales eléctricas, permitiendo la emisión de ultrasonido. Fue posible introducirlo a la autoclave sin sufrir daños.

Los resultados de la evaluación validarán la configuración del prototipo. De otra manera, deberá reajustarse la caracterización del dispositivo US (potencia, frecuencia y tiempo de exposición).

La fase experimental A se ha llevado a cabo de acuerdo al calendario presentado en la Tabla 1. Las Fig. 5-7, muestran respectivamente las cajas con los cultivos preparados y listos.



Fig. 5. Conjunto de cajas petri preparadas para incubación.



Fig. 6. Vista superior de una caja petri el día cero.

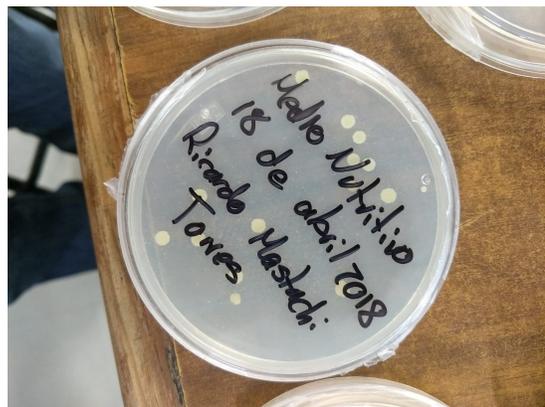


Fig. 7. Caja petri con bacterias al cuarto día de incubación.

Actividad	9/4/18 al 17/4/18	18/4/18 al 25/4/18	26/4/18	27/4/18 al 30/4/18
Preparación del prototipo				
Esterilización de las cajas				
Toma de muestra fase A				
Crecimiento de cultivo				
Colocación del dispositivo en cada caja				
Incubación y análisis				

Tabla 1. Calendario de actividades.

Conclusiones

Las pruebas realizadas al prototipo confirman la efectividad del encapsulado y del dispositivo para para emitir US. De acuerdo al calendario que debe seguir el proceso experimental, hemos cultivado satisfactoriamente las bacterias de la fase A, que se refiere a muestras salivales de personas sin infección aparente. Actualmente se esperan los resultados del análisis del uso del dispositivo US sobre las colonias.

Como trabajo futuro se encuentra la optimización del prototipo ajustando las variables de tiempo de exposición e intensidad del US, así como una serie de pruebas incluyendo in vivo. Adicionalmente, se analizarán las ventajas del acumulamiento de agua entre el piezoeléctrico y el paladar del paciente.

Referencias

- [1] I. Trigos Micoló and M. E. Guzmán y López Figueroa, "Análisis de la incidencia, prevalencia y atención del labio y paladar hendido en México," *Cirugía Plástica*, vol. 13, no. 1, pp. 35–39, 2003.
- [2] C. A. González-Osorio *et al.*, "Estudio ecológico en México (2003-2009) sobre labio y/o paladar hendido y factores sociodemográficos, socioeconómicos y de contaminación asociados," vol. 74, no. 6, pp. 377–387, 2011.
- [3] M. del Rosario Gutiérrez-Rodríguez, A. del Carmen Peregrino-Mendoza, M. E. Borbolla-Sala, and R. M. Bulnes-López, "Beneficios del tratamiento temprano con ortopedia pre-quirúrgica en neonatos con labio y paladar hendido," *Salud en Tabasco*, vol. 18, no. 3, pp. 96–102, 2012.
- [4] C. for D. Co. and Prevention, "Facts about Cleft Lip and Cleft Palate," June 27, 2017. [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/ncbddd/birthdefects/cleftlip.html>. [Accessed: 01-Mar-2018].
- [5] J. F. B. de São José, N. J. de Andrade, A. M. Ramos, M. C. D. Vanetti, P. C. Stringheta, and J. B. P. Chaves, "Decontamination by ultrasound application in fresh fruits and vegetables," *Food Control*, vol. 45, pp. 36–50, 2014.
- [6] M. Erriu *et al.*, "Microbial biofilm modulation by ultrasound: Current concepts and controversies," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 21, no. 1, pp. 15–22, 2014.
- [7] A. M. Rediske, N. Rapoport, and W. G. Pitt, "Reducing bacterial resistance to antibiotics with ultrasound," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 28, no. 1, pp. 81–84, 1999.
- [8] V. Gibbs, D. Cole, and A. Sassano, *Ultrasound physics and technology: how, why and when*. Churchill

- [9] Livingstone/Elsevier, 2009. S. Gao, G. D. Lewis, M. Ashokkumar, and Y. Hemar, "Inactivation of microorganisms by low-frequency high-power ultrasound: 2. A simple model for the inactivation mechanism," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 21, no. 1, pp. 454–460, 2014.
- [10] S. Condón-Abanto, C. Arroyo, I. Álvarez, S. Condón, and J. G. Lyng, "Application of ultrasound in combination with heat and pressure for the inactivation of spore forming bacteria isolated from edible crab (*Cancer pagurus*)," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 223, pp. 9–16, 2016.
- [11] J. L. Paradise, B. A. Elster, and L. Tan, "Evidence in Infants With Cleft Palate That Breast Milk Protects Against Otitis Media," *Pediatrics*, vol. 94, no. 6, 1994.
- [12] P. Sheahan, I. Miller, J. N. Sheahan, M. J. Earley, and A. W. Blayney, "Incidence and outcome of middle ear disease in cleft lip and/or cleft palate," *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, vol. 67, no. 7, pp. 785–793, Jul. 2003.
- [13] A. Carola, M. Ayala, D. Edith, and S. Vergara, "Factores de riesgo materno predominantes asociados con labio leporino y paladar hendido en los recién nacidos." [14] C. C. Church, E. L. Carstensen, W. L. Nyborg, P. L. Carson, L. A. Frizzell, and M. R. Bailey, "The Risk of Exposure to Diagnostic Ultrasound in Postnatal Subjects," *J. Ultrasound Med.*, vol. 27, no. 4, pp. 565–592, Apr. 2008.
- [15] K. Ryan, C. G. Ray, N. Ahmad, W. L. Drew, and J. Plorde, *Sherris Medical Microbiology*, 4th Editio. United States of America: McGraw-Hill, 2004.
- [16] V. PREADO J., "Conceptos microbiológicos de Streptococcus pneumoniae: BASIC MICROBIOLOGICAL ASPECTS," *Rev. Chil. infectología*, vol. 18, pp. 6–9, 2001.
- [17] K. Todar, "Streptococcus pneumoniae and pneumococcal pneumonia," *textbookbacteriology.net*, 2012. [Online]. Available: <http://textbookofbacteriology.net/S.pneumoniae.html>. [Accessed: 23-Apr-2018].
- [18] O. Linderkamp, P. Y. K. Wu, and H. J. Meiselmanrz6, "Geometry of Neonatal and Adult Red Blood Cells," *Pediatr. Res*, vol. 17, pp. 250–253, 1983.
- [19] D. Bogaert *et al.*, "Colonisation by Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus in healthy children," *Lancet*, vol. 363, no. 9424, pp. 1871–1872, Jun. 2004.
- [20] E. M. Arief, Z. Mohamed, and F. M. Idris, "Study of Viridans Streptococci and Staphylococcus Species in Cleft Lip and Palate Patients Before and After Surgery," *Cleft Palate-Craniofacial J.*, vol. 42, no. 3, pp. 277–279, May 2005.
- [21] J. B. Pietzsch, L. A. Shluzas, M. E. Paté-Cornell, P. G. Yock, and J. H. Linehan, "Stage-Gate Process for the Development of Medical Devices," *J. Med. Device.*, vol. 3, no. 2, p. 21004, 2009.
- [22] Y. A. Badamasi, "The working principle of an Arduino," in *2014 11th International Conference on Electronics, Computer and Computation (ICECCO)*, 2014, pp. 1–4.