

Aplicación del sistema de desantigenización enzimática sobre la reducción de elementos bacterianos en tejidos óseos humanos

N.A. Carlone, V.Tullio*, N. Mandras*, J. Roana*, S. Maggi***

**Universidad de Turín, Departamento de Salud Pública y Microbiología 'Bioteck Srl, Arcugnano (Vicenza), Italia*

Resumen

Los bancos europeos de tejidos recogen, procesan y conservan los tejidos óseos respetando protocolos operativos severos. Sin embargo, tales protocolos podrían no ser suficientes para garantizar la esterilidad completa de las piezas óseas, sobre todo cuando los períodos de almacenamiento son muy prolongados. Bioteck S.r.l. ha realizado un proceso de desantigenización enzimática que puede ser aplicado al tejido óseo proveniente de cualquier especie de mamífero, incluido el hombre. En este trabajo, el proceso U.B.T.T. (Universal Bone Tissue Treatment) de Bioteck ha sido probado sobre 30 muestras de cabezas femorales humanas, inoculadas con concentraciones altas de tres de las especies bacterianas que por lo común provocan la infección en las operaciones de cirugía ósea: *S. aureus*, *B. cereus* y *E. coli*. La carga bacteriana restante ha sido analizada mediante el método bioburden. Los resultados muestran que el proceso de desantigenización enzimática Bioteck elimina completamente la contaminación bacteriana de las muestras.

Palabras clave: aloinjerto, desantigenización enzimática

Introducción

BIOTECK S.r.l. fue fundada en 1995 a fin de aplicar procesos innovadores de desantigenización en los tejidos óseos humanos. El trasplante transferencia de tejido óseo entre especies genéticamente diferentes, requiere técnicas biológicas específicas, a fin de separar absolutamente el componente orgánico de aquel mineral. El proceso de desantigenización enzimática BIOTECK se basa sobre una mezcla de enzimas tipadas a fin de eliminar, selectivamente, los residuos orgánicos que puedan activar la reacción del sistema inmunitario. El sistema, actuando a 37°, no induce ninguna transformación en la apatita ósea, permitiendo que la parte mineral sea metabolizada por vía osteoclástica. Modificando oportunamente la mezcla de enzimas, el sistema puede ser aplicado a todas las especies de mamíferos existentes, incluido el hombre. En 2003 fue inaugurada en el establecimiento BIOTECK, la sección U.B.T.T. (Universal Bone Tissue Treatment), cuya finalidad es aplicar las técnicas de desantigenización a los tejidos óseos humanos de donadores. El servicio está dirigido a los bancos europeos de tejidos; sin embargo, si bien estos últimos trabajan respetando protocolos severos de recogida y conservación, no es totalmente posible garantizar la esterilidad absoluta de las piezas óseas tratadas, sobre todo cuando éstas permanecen almacenadas por períodos prolongados .

La finalidad del presente trabajo fue evaluar el grado de eficacia del sistema de desantigenización sobre cepas bacterianas presentes en las muestras, considerándolas como residuos orgánicos y, por lo tanto, incorporándolas como elemento a eliminar durante la desantigenización

Materiales y métodos

Han sido probadas 30 muestras de cabezas femorales humanas de 5 mm de diámetro tratadas con una solución antibiótica de amplio espectro y después congeladas. Tras la descongelación, las muestras han sido introducidas en una cápsula de Petri de 60 mm y sometidas a un ciclo de 4-5 lavados con 10 ml de solución fisiológica al 0,85% NaCl. El intervalo entre un lavado y el siguiente ha sido de alrededor de una hora. Simultáneamente, a partir de un cultivo bacteriano de 24 horas en terreno sólido, se sembraron en un caldo de Brain Heart Infusion (Merck KgaA Darmstadt, Alemania) algunas cepas certificadas, tales como *Staphylococcus aureus* ATCC 9241, *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Bacillus cereus* ATCC 9241. Los cultivos bacterianos fueron incubados a 37°C en aerobiosis durante 24 horas, a fin de obtener una concentración bacteriana inicial equivalente a 10^7 - 10^9 ufc/ml (To). Al concluir el ciclo de lavados en solución fisiológica, todas las muestras se inocularon con 250 µl de las diferentes suspensiones bacterianas y se incubaron en termostato a 37°C en aerobiosis durante 24 horas. Al mismo tiempo, se preparó un control de crecimiento (Pc) por cada microorganismo utilizado,

conteniendo sólo 5 ml de caldo.

Al concluir la incubación, dos muestras por cada microorganismo (Po) se sometieron a un lavado con 10 ml de solución fisiológica. Entonces, se evaluó la carga bacteriana del líquido de enjuague mediante el método de las diluciones duplicadas, al que siguió el recuento en placa sobre Nutrient Agar (Merck). La cantidad de bacterias que se adhirieron a la muestra ha sido expresada como ufc (unidades formadoras de colonias)/m¹ (método Bioburden). Se procedió de la misma manera para evaluar la concentración de los microorganismos presentes en las muestras Pc. Las muestras óseas restantes (Pd) fueron sometidas al proceso de desantigenización consistente en la extracción de proteínas y lípidos.

Al concluir la desantigenización, cada muestra Pd ha sido dividida en dos porciones: la primera fue lavada y el líquido de enjuague se analizó con el método Bioburden, mientras que la segunda fue irradiada a 25 KGray beta.

Al final de la esterilización, el producto fue analizado según la técnica Bioburden.

Resultados

La carga bacteriana que se adhirió a la muestra de hueso tras un período de 24 horas de incubación a 37°C (Po) fue de $2,09 \times 10^5$ ufc/m¹ para E.coli y B. Cereus, de $1,70 \times 10^6$ ufc/ml para E. coli de $5,52 \times 10^7$ ufc/ml para S.aureus respectivamente, respecto de la muestra de control de crecimiento (Pc) que, por el contrario, fue de $6,15 \times 10^7$ ufc/m¹ para B. Cereus, de $1,16 \times 10^8$ ufc/ml para E.coli y de $2,53 \times 10^9$ ufc/m¹ para S. aureus (Fig. 1).

Cabe destacar que tanto respecto al control (Pc), donde los microorganismos se encuentran en un entorno ideal de crecimiento, como respecto a la carga bacteriana inicial (To), la carga bacteriana que se adhiere al hueso (Po) resultó menor que un factor equivalente a 10^2 , manteniéndose en valores de 10^7 para S. aureus, 10^6 para E. coli y 10^7 para B. cereus, que corresponden a un contenido potencialmente infectivo.

En la Fig. 2 se indica la carga bacteriana tras el proceso de desantigenización. Nótese que después de este proceso, la cantidad de microorganismos presentes en el hueso tras la adherencia, se redujo radicalmente hasta una eliminación casi total de la carga bacteriana para los tres microorganismos probados. Asimismo, cabe remarcar, que la ausencia de crecimiento microbiano se mantiene también tras el proceso de radiación a 25 KGray beta (datos no mostrados).

Conclusiones

Los resultados obtenidos indican que el proceso de desantigenización impide la replicación bacteriana en el tejido óseo.

La explicación de este evento podría estar en la finalidad última de este proceso, es decir aquella de eliminar el componente orgánico (proteínas y lípidos) de la muestra. En efecto, la matriz orgánica es la fuente nutricia para los microorganismos y, al faltar, impide su replicación. La utilización posterior del proceso de esterilización mediante radiación a 25KGray beta puede ser útil para eliminar posibles contaminaciones que se producen durante la elaboración de la muestra. Ante tales consideraciones, el proceso de desantigenización puede ser considerado como un método de vanguardia en el ámbito de su sector de aplicación.

Fig. 1: Concentración bacteriana (T_0), carga bacteriana presente en los cultivos de control (P_c) y concentración bacteriana presente en las muestras después de la incubación durante 24 horas. La concentración bacteriana sobre las muestras después de la incubación es alrededor de 10^2 veces inferior a aquella inoculada inicialmente

Fig. 2: Concentración bacteriana presente en las muestras antes (P_0) y después (P_d) del proceso de desantigenización enzimática

Bioteck. El tratamiento Bioteck anula la carga bacteriana presente en la muestra.