



**ANALISIS, SELECCIÓN Y DETERMINACION DE LA
EFICACIA DE DESINFECTANTES PARA EL
PROCESAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS DE
ORIGEN BOVINO**

**Farm. Mariano Pugliese
Trabajo Integrador Final
Especialización en Esterilización
Año 2019**

**Departamento de Ciencias Farmacéuticas
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba**

TUTORAS:

Prof. Dra. Paulina Laura Páez

Prof. Dra. Cecilia Sobrero

COMISIÓN EVALUADORA:

Esp. Farm. Capra Valeria

Esp. Farm. Lizarraga Rosario

Prof. Dr. Aiassa Virginia

Dedicada a Melany, Héctor, Éliida, Luciano y Germán.

“No permitas que el tiempo
que puedas tardar
en cumplir un sueño,
te obligue a dejarlo.
Después de todo, el tiempo seguirá pasando.”

Agradecimientos...

A la Facultad de Ciencias Químicas por la posibilidad de poder continuar nuestra formación.

Al Departamento de Ciencias Farmacéuticas por permitirme el espacio para desarrollar este trabajo y a todos los que forman parte del mismo.

Al Colegio de Farmacéuticos de Córdoba por la beca para el cursado de la Especialidad en Esterilización.

Al Laboratorio de Hemoderivados, por facilitarme los insumos y materiales necesarios para el desarrollo del TIF.

A las personas con que compartí estos años de cursando de la especialidad, profes, compañeros, y todos los que formaron parte de este hermoso aprendizaje, sin ellos hubiera sido difícil llegar hasta aquí.

A Pauli, verdaderamente afortunadas son las personas que tienen la posibilidad de encontrarte, de inmenso corazón, colmada de paciencia, y siempre una sonrisa por más caos que existiera. Siempre estaré agradecido por cada segundo que destinaste para conmigo. Ojalá todas las personas tengan la fortuna de encontrarse con una Pauli en sus vidas.

A Ceci, tu energía positiva y alegría será difícil de encontrar y olvidar, pero tengo la fortuna de verte todos los días en el laboratorio, así que no me preocupo por eso. Tu calidad como profesional te distingue, pero tu enorme corazón te hace inmensa. Gracias por tanta paciencia, consejo. Sin tu guía esto hubiera sido imposible de finalizar.

A las mejores investigadoras que puedan existir, Meli, Vivi, Sil, Ara, Gaby, Iva, nada hubiera sido lo mismo sin ustedes.

A los instructores de las prácticas, cada tarde compartida era un nuevo aprendizaje y crecimiento para nuestra profesión.

A mis compañeros de todos los días del laboratorio del Laboratorio Hemoderivados, en especial al departamento de ensayos físicos y físico-químicos.

A mis compañeros del Hospital Infantil Municipal.

A mi gran amigo Diego que todas las tardes me incentivaba a finalizar el trabajo, gracias por absolutamente todo, detrás de tus chinchas, existe un tipo de enorme corazón.

A Miriam y Lourdes, increíbles y maravillosas personas que esta profesión me permitió conocer.

A mi familia postiza, Jorge, Patri, Uli, Marta y Mario. Ustedes fueron parte de todos estos años, siempre estaré agradecido con ustedes.

A mis padres, son las personas que más admiro en esta vida, gracias por todas las posibilidades que me dieron. Cuan afortunado soy de tenerlos, los amo con todo mi corazón.

A mis hermanos, infaltables sus llamados preguntando como estoy, cuando voy y el dale termina así festejamos, ustedes también están siempre presentes en mi corazón.

A Mechita, mi compañera incondicional, gracias por acompañarme en este camino, por enseñarme a ser perseverante y por cada palabra de incentivo para finalizar, por tu paciencia, enorme corazón y alegría diaria.

RESUMEN

La intención del ser humano por reparar partes del cuerpo dañadas o defectuosas por otras sanas, se conoce desde hace muchos años. La evolución de la tecnología médica hizo que esto fuera posible; sin embargo, muchas veces los investigadores e industrias se encuentran imposibilitados debido a diferentes factores como son la falta de disponibilidad, falta de procedimientos, conocimientos sobre su manipulación, conservación que hace que el material no se encuentre disponible en las condiciones adecuadas. Si bien existen en el mercado innumerables materiales y combinaciones de ellos para la utilización como implantes, ya se sabe que el implante osteocondral es quien resulta como una alternativa que otorga mejores resultados.

La posibilidad de la utilización de materiales de origen bovino para suplantar la falta de disponibilidad del tejido osteocondral humano, resulta una alternativa altamente confiable cuando se le aplican los tratamientos correspondientes. La utilización de estos tejidos denominados Xenoinjerto (tejido transferido entre dos individuos de diferentes especies), sobre el Autoinjerto (trasplante de tejido llevado de una zona anatómica a otra de esa misma persona) y el Aloinjerto (tejido transferido entre individuos de la misma especie) ha demostrado tener beneficios considerables.

De todos los materiales posibles, se consideró que por su amplia disponibilidad y fácil acceso, el tejido osteocondral bovino podría resultar en una interesante posibilidad para obtener un tejido de la calidad adecuada para su utilización como implante; en este sentido, este trabajo podría resultar como una alternativa potencial de transferencia para el procesamiento del tejido humano.

En el presente trabajo, se determinó la eficacia de diferentes desinfectantes (alcohol etílico 70 y 96°, peróxido de hidrógeno 10% y acetona) variando el tiempo de contacto con el tejido biológico (10 y 20 min) y así poder seleccionar el procedimiento o alternativa que otorga mejores resultados en cuanto a la eliminación de restos de tejido indeseado como así también la eliminación de microorganismos.

Como resultado del presente trabajo, se obtuvo que el alcohol etílico de 96° durante 20 min, es el tratamiento que otorga los mejores resultados logrando una reducción del 95,2 % de los microorganismos totales presentes en la muestra de tejido osteocondral, cuando éste se sometió al procedimiento de lavado frente a microorganismos de referencia.

Luego se comprobó la eficiencia del procedimiento propuesto sometiendo al tejido osteocondral al tratamiento, logrando valores de recuento microbiano aceptables posteriores al tratamiento, ya que luego de la siembra y posterior incubación, no se observó crecimiento microbiano. Por lo tanto, el uso del alcohol etílico al 96° durante 20 min se propone como una de las posibles alternativas para la limpieza y desinfección del tejido osteocondral bovino, que podría ser utilizado también en el procesamiento de tejido osteocondral humano.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	9
2.1 Objetivo general	9
2.2 Objetivo específico	9
3. MATERIAL DE ESTUDIO	10
3.1 Tejido osteocondral	10
3.2 El Hueso	10
3.3 El Tendón	13
3.4 El Cartílago	14
3.5 Desinfectantes	15
3.5.1 Niveles de desinfección	17
3.5.2 Mecanismo y sitio de acción de lo desinfectantes	18
3.5.3 Condiciones de un desinfectante ideal	19
3.5.4 Factores que afectan la actividad de los desinfectantes	19
4. METODOLOGÍA	22
4.1 Medios de cultivos	22
4.1.1 Preparación y observación en medios de cultivos líquidos	23
4.1.2 Preparación y observación en medios de cultivos sólidos	24
4.2 Observación microscópica de los microorganismos	24
4.3 Coloraciones	25
4.3.1 Utilidad de la coloración diferencial	26
4.3.2 Descripción de la tinción de Gram	26
4.3.3 Procedimientos de la tinción de Gram	27
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	29
5.1 Materiales, tejido osteocondral	29
5.2 Determinación de la carga microbiana en el tejido osteocondral bovino	29
5.2.1 Observación microscópica de microorganismos presentes en el tejido osteocondral	31
5.3 Evaluación de la actividad de desinfectantes	31
5.3.1 Neutralizante utilizado	33

5.4 Descripción y desarrollo del test “in – use”	34
5.5 Análisis estadístico	35
6. RESULTADOS	36
6.1 Estudio microbiológico	36
6.1.1 Resultado de la tinción de microorganismos	36
6.1.2 Evaluación de la actividad de tratamientos de desinfección propuestos	38
6.2 Selección del desinfectante	45
6.3 Modificaciones macroscópicas en la estructura y propiedades biomecánicas del tejido osteocondral	48
6.4 Posibles condiciones de almacenamiento y período de conservación del producto luego del proceso de lavado y desinfección.	49
7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	50
8. PROYECCIONES PARA EL TRATAMIENTO DE TEJIDO OSTEOCONDRALE HUMANO	53
9. BIBLIOGRAFÍA	55

ABREVIATURAS

ANMAT	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATCC	American Type Culture Collection
ATS	Agar Tripteína Soya
BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
C ₂ H ₅ OH	Etanol
C ₃ H ₆ O	Acetona
CIM	Concentración inhibitoria mínima
COT	Cirugía Ortopédica y Traumatología
CTS	Caldo Tripteína Soya
DE	Desviación estándar
EMB	Agar eosina azul de metileno
h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
I ₂	Yodo
INCUCAI	Instituto Nacional Central Único Coordinador de Ablación e Implante
KI	Yoduro de Potasio
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

T	Temperatura
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
°C	Grados centígrados

1. INTRODUCCION

El ser humano, siempre ha estado interesado en reemplazar partes del cuerpo. La posibilidad de sustituir un órgano enfermo por otro sano es uno de los eventos más sobresalientes del siglo XX en el campo de la medicina. Este logro es resultado de una larga serie de investigaciones desde diferentes horizontes.¹

Los esfuerzos del hombre por conservar la anatomía, se remonta desde su origen en la tierra. Las razones en un principio estaban influenciadas principalmente por las creencias místico-religiosas, pues los antiguos creían en la vida después de la muerte. Gracias a su inquietud por preservar los cadáveres, es que hoy podemos admirar sus grandiosas momias egipcias, mayas, peruanas, entre otras. Existe en las mitologías de las más importante civilizaciones antiguas: greco-romana, china, hindú, azteca, maya, egipcia ejemplos de seres humanoides con partes de animales o de su propio cuerpo multiplicado. Es una expresión evidente de la imaginación y sueño del hombre de poder injertar partes de animales o de su mismo cuerpo, en otro ser humano, con un fin curativo o simplemente buscando mejores condiciones físicas.²

El esfuerzo en el desarrollo científico ha llevado a crear lo que hoy conocemos como cirugía experimental.³

La historia del trasplante, se menciona que existía mucho antes de los confines terapéuticos, tiene sus inicios en el siglo III cuya imagen quedó plasmada en el óleo “Milagro de San Cosme y San Damián”. Estos hermanos médicos nacidos en Cilicia, le injertaron al *Fray Justiniano*, al parecer afectado por un tumor en una de sus piernas, la de un esclavo etíope recién fallecido (figura 1). A pesar de esto, la historia comenta que estas prácticas se desarrollaban en Oriente, AC, pero se carece de veracidad por falta de datos comprobables. Los casos científicamente comprobados surgen recién en el siglo XIX, acompañados de otros avances médicos que permiten su desarrollo. La historia nos lleva a 1879, cuando MacEwen utilizó un fragmento autólogo tibial para tratar una pseudoartrosis infectada en el húmero de un niño. Desde entonces, se utilizaron fragmentos provenientes de osteotomías o amputaciones.⁴



Figura1. “EL MILAGRO DE SAN COSME Y SAN DAMIÁN”, FERNANDO DEL RINCÓN, MUSEO DEL PRADO. Como se mencionó anteriormente, la imagen retrata el momento en que los hermanos San Cosme y San Damián le implantan a *Fray Justiniano* afectado por un tumor en una de sus piernas, la de un esclavo etíope recién fallecido. 4

Josef Horak, en 1914, fue el primer cirujano que publicó el uso de hueso procedente de cadáver para reconstruir una resección de un osteosarcoma. El mismo, hablaba de que es necesario que el recién muerto (el donante) esté completamente sano y no contenga ninguna sustancia infecciosa que pueda pasar al receptor.^{4, 5}

La osteotecnia, se refiere a las diferentes técnicas para la preparación y conservación de piezas óseas, ya sea para su uso didáctico en los laboratorios de anatomía o para fines demostrativos, como lo es en museos o universidades y se basa principalmente en la obtención, limpieza y blanqueado del material óseo.⁶

Con el desarrollo de las ciencias médicas hoy es una realidad realizar injerto de tejidos, y el reto está, en la disponibilidad de ellos, debido a su alta demanda y dificultad de obtención. La regeneración ósea es la técnica de elección para reparar defectos óseos, empleándose como tratamiento complementario para la colocación de implantes osteointegrados.⁷

Aún no existe un sustituto de hueso ideal. En la mayoría de los casos, estos materiales resultan ser productos caros, lo que no permite que estén al alcance de todas las personas.

En la actualidad hay un gran número de sustitutos de injertos óseos, fundamentalmente en combinación de elementos, son los llamados composite. Estos se clasifican según su base, en: de factores de crecimiento, de células, de polímeros y de cerámicas.⁸

Los biomateriales, los cuales pueden ayudar a resolver este déficit, son materiales naturales o sintéticos que pueden estar en contacto con los tejidos vivos por períodos largos sin causar efectos adversos en el organismo. Los biomateriales sintéticos más utilizados hoy son de tres tipos: metales, cerámicas y algunos polímeros. Las biocerámicas y los biopolímeros funcionan mejor que los metales para reparar y reconstruir tejidos enfermos o dañados del cuerpo humano. Además, por su interacción con los tejidos, pueden clasificarse en tres tipos: bioinertes, bioactivas y bioabsorbibles.⁹

Se estima que cada siete años tenemos un esqueleto nuevo, ya que las células llamadas osteoclastos se encargan de deshacer el hueso viejo y los osteoblastos de producir el nuevo hueso. El tejido óseo es el único que se regenera sin dejar cicatriz, pero su regeneración se va haciendo más lenta conforme avanza la edad.⁷

Los huesos están formados por una parte orgánica y otra inorgánica. Ésta última está formada por la cerámica natural hidroxiapatita, la cual se va pegando a fibras de colágeno y va formando la matriz ósea.¹⁰

Después de la sangre, el hueso y sus derivados (tejido osteocondral) es el tejido humano que se emplea con más frecuencia como donación. La obtención del hueso puede ser a través de donantes cadavéricos o donantes vivos, el modo de procesamiento puede variar según sea su origen.¹¹

Los injertos óseos se pueden clasificar en corticales y esponjosos.⁵

El uso de aloinjertos resulta en una herramienta terapéutica imprescindible en cirugía ortopédica y traumatología. La sustitución de tejido óseo ya sea hueso, cerámicas, polímeros o combinación de ellos según sus capacidades para la formación de hueso se clasifica en: Osteogénesis, Osteoinducción, Osteoconducción y Osteopromotor.¹²

Los injertos óseos según su origen se clasifican en:

- Autoinjerto: Trasplante de hueso llevado de una zona anatómica a otra.
- Aloinjerto: Hueso transferido entre individuos genéticamente diferentes de la misma especie.
- Isoinjertos: Se componen por tejido tomado de un individuo genéticamente relacionado con el individuo receptor.

- Xenoinjerto: Hueso transferido entre dos individuos de diferentes especies.

El autoinjerto o autólogo, se conoce que es el injerto que otorga mejores resultados, el mismo presenta ventajas y desventajas en cuanto a su utilización.^{13,14}

- *Ventajas del tejido autólogo*

- Se reduce el riesgo de rechazo.
- Aumenta las posibilidades de curación.

- *Desventajas del tejido autólogo*

- Implicar una doble cirugía para el paciente con todos los riesgos que esto conlleva.
- Mayor dolor.
- Pérdida de sangre.
- Riesgos de infección, así como de trombosis.
- Fractura del hueso de donde se toma el injerto.
- Alteración de un hueso funcional sano.

También presenta la limitante de la disponibilidad de este tejido, ya que se puede requerir mucho más de lo que se puede obtener, especialmente cuando el paciente es un niño.¹²

Debido a estas dificultades, la búsqueda se orienta a encontrar un material alternativo que cumpla con todos los requisitos de biocompatibilidad establecidos y que además esté ampliamente disponible.

Como se mencionó anteriormente, si el material de los implantes se obtiene de individuos de especie diferente a la receptora, a los implantes se les conoce como implantes xenogénicos o xenoimplantes. Un material que se ha propuesto para la realización de xenoimplantes es el tejido osteocondral bovino.^{4, 7, 13}

Al tejido que se le ha retirado toda la materia orgánica quedando únicamente conformado por la matriz y su estructura desproteínizada se lo

conoce como implante anorgánico y ha resultado ser útil en el campo de los implantes xenogénicos. Cumple con los requisitos de biocompatibilidad por no contener material orgánico, estar formada de hidroxiapatita, estructura de colágeno y una estructura porosa adecuada.^{3, 10}

El implante anorgánico presenta cohesividad y fuerza estructural alta, su disponibilidad en tiempo y cantidad es elevada.^{13, 14}

Cuando se trata de remediar problemas óseos como los causados por defectos congénitos o los resultantes de infecciones, lesiones traumáticas, ligamentarias o resección de tumores óseos, se emplean injertos o implantes. La utilización de derivados de tejidos óseos humanos y bovinos procesados industrialmente se presenta como alternativa de aceptable respuesta biológica por parte del paciente. Comercialmente, existen diferentes propuestas en cuanto a su composición, calidad y costo (figura 2).



Figura 2. En las imágenes, se pueden observar distintos tipos de implantes y de diferente composición, en la primer imagen se observa implante de rodilla y de cadera de titanio.¹⁶ En la segunda imagen rectángulos de implante bovino una vez finalizado el proceso de limpieza y blanqueamiento.¹¹ En la tercer imagen un perno dentario implantado y en la última imagen se observa una placa en T de titanio implantada en una muñeca, sujeta con 5 tornillos del mismo material, con su imagen radiográfica frontal y lateral.⁹

En un futuro se empleará la ingeniería de tejidos, campo que se está desarrollando con mucha velocidad en todo el mundo y que aún no se aplica a gran escala por su alto costo, dificultad de obtención de tejido y falta de conocimiento en cuanto a la donación de tejido osteocondral por parte de la población.^{11, 13}

La regeneración ósea es la técnica de elección para reparar defectos óseos, empleándose como tratamiento complementario para la colocación de implantes osteointegrados; es la conexión directa, estructural y funcional entre el hueso vivo

bien organizado y la superficie del sustituto implantado que será capaz de absorber las fuerzas provenientes de las funciones propias del sistema del paciente.¹³

En la actualidad los injertos de tejido osteocondral bovino, en particular el hueso esponjoso, son de mucha ayuda ya que promueven la curación por osteoinducción y osteoconducción, facilitando y acelerando el proceso de recuperación. Cuentan con todas las características esenciales de un material de implante como resistencia mecánica y osteoblastos vivos.¹⁵

La osteoinducción es el proceso por el cual las células osteoprogenitoras son persuadidas y estimuladas por medio de factores de crecimiento y diferenciación para formar hueso nuevo. Mientras que la osteoconducción consiste en el reclutamiento y la migración de células osteogénicas y nuevos capilares a través de una matriz tridimensional para su regeneración.^{1, 13}

En el caso de defectos óseos, ya sea por alguna injuria o por enfermedad, el hueso xenogénico, usualmente de origen bovino, se ha convertido en una alternativa para este reemplazo por su bajo costo y facilidad de obtención.^{5, 13}

Con el advenimiento de la implantología, tanto la traumatología como la odontología, han debido enfrentarse a la problemática de la reabsorción ósea post extracción y a la consecuente falta de tejido para la colocación de implantes osteointegrados (contacto estable entre el hueso viable y remodelado con la superficie del implante, sin la interposición de tejido conectivo u otra materia que no sea tejido óseo). La oseointegración es, por tanto, la conexión directa, estructural y funcional entre el hueso vivo bien organizado y la superficie del sustituto implantado que será capaz de absorber las fuerzas provenientes de las funciones propias del sistema estomatognático. La oseointegración es un proceso de cicatrización natural bajo el siguiente principio biológico: si no hay circulación no hay vida, si no hay circulación no hay cicatrización.⁹

Diversas patologías, en el campo de la odontología y más recientemente en la traumatología e incluso en el plano estético, requieren de materiales de soporte para la sujeción de distintos tipos de prótesis e incluso para relleno de cavidades óseas. La complejidad, el alto costo de instalaciones y equipamientos y la necesidad de recursos humanos calificados necesarios para realizar

correctamente los procesos productivos a fin de transformar hueso humano y bovino en un insumo para la salud, y encuadrar dichos procesos en los marcos regulatorios vigentes quizás hayan conspirado para que en el plano profesional prosperen prácticas y usos reñidos con la seguridad biológica de la actividad así como con la moral, la ética y la ley. A ello debiera sumarse la poca disponibilidad de tejido humano destinado a tal fin así como la multiplicidad de actores intervinientes en todos los eslabones de la cadena que va desde la obtención de tejido humano hasta la distribución y uso del mismo.¹⁶

La obtención de material osteocondral bovino para su posterior aplicación como implantes, ya sea en seres humanos o animales, tiene asociado como todo procedimiento médico, un cierto grado de riesgo para el paciente. Lo cual hace necesario brindar un producto que sea de calidad apropiada, seguro y eficaz.

El desarrollo, evaluación, selección y validación de técnicas de limpieza, desinfección y conservación del material a implantar, como así también la conservación de su estructura y propiedades biomecánicas, resulta de vital importancia para la compatibilidad del implante y el receptor/paciente de dicho injerto.

Si bien, los más utilizados son los aloinjertos y xenoinjertos, se encuentran en desarrollo alternativas sintéticas conocidas como sustitutos óseos, pero sus propiedades y ventajas son muy discutidas.^{3, 13}

El tejido ideal debe ser biocompatible, biodegradable, osteoconductor y osteoinductor con una estructura similar al hueso, de bajo costo, fácil uso y calidad apropiada.¹⁰

Todo material de implantación debe desencadenar una reacción fisiológicamente posible con los tejidos que lo rodean. Es fundamental conocer los procesos biológicos normales que se desencadenan en la regeneración y las características físicas, mecánicas y biológicas propias de cada material.³

Para que un material pueda ser empleado como implante, se requiere que cumpla con una serie de requisitos marcados en normas nacionales, disposición 3266/2013 ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica) – Buenas Prácticas de Fabricación de Productos Médicos.⁶

El presente trabajo pretende desarrollar, comparar y seleccionar técnicas de lavado y desinfección de tejido bovino que permitan obtener un material osteocondral que pueda ser utilizado como implante, que cumpla con las especificaciones de ANMAT y con los requerimientos de especificidad estipulados por la ASTM (American Society for Testing and Materials)¹⁷, demostrando que sus valores son comparables con un xenoinjerto comercial de uso internacional de referencia desde el análisis microbiológico y establecer directrices útiles para el procedimiento de limpieza y desinfección, para obtener un injerto óptimo para su utilización en la práctica clínica.

El injerto de origen bovino, resulta ser altamente compatible y se presenta como una de las opciones viables para su utilización como material implantable en seres humanos y animales. Además con el desarrollo de este trabajo, se podrían proyectar los procedimientos evaluados para el procesamiento de tejido osteocondral de origen humano. Asimismo, cabe destacar que el conocimiento de las propiedades de tamaño de partícula y nivel de porosidad, también permiten conocer mejor el producto y sus posibles interacciones entre el tejido a implantar y el posible receptor.¹³

El tejido osteocondral bovino presenta las propiedades y características necesarias para su utilización como implante, por tal motivo, el presente trabajo podría aportar beneficios importante para obtener un producto médico de calidad. Además de los beneficios anteriormente mencionados, se plantea la posibilidad de poder aplicar los resultados obtenidos para su evaluación en implantes de origen humano, lo cual resulta una propuesta interesante con una potencial alternativa de aplicación en el futuro.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Diseñar, analizar, seleccionar y optimizar el procedimiento de lavado de tejido osteocondral de origen bovino comparando diversos desinfectantes, tal que resulte eficiente en la eliminación de elementos indeseables en el implante (microbiológicamente apto y minimizando la inmunogenicidad del receptor), sin afectar las propiedades biomecánicas del hueso tendón y cartílago.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar la carga microbiana inicial del tejido osteocondral bovino.
- Seleccionar el método de lavado más eficiente variando las concentraciones de acetona pura, peróxido de hidrógeno 10% y etanol (70° y 96°) y el tiempo de contacto con el material de origen bovino utilizados respecto a la reducción de material indeseable y de la carga microbiana presente en las muestras analizadas.
- Evaluar la efectividad del proceso de lavado seleccionado en las condiciones de trabajo mediante la utilización del test “*in-use*”.
- Evaluar las modificaciones macroscópicas en la estructura y propiedades biomecánicas del tejido osteocondral.
- Proponer condiciones de almacenamiento y período de conservación del producto luego del proceso de lavado.

3. MATERIALES DE ESTUDIO

3.1 Tejido osteocondral

El término osteocondral, hace referencia a los elementos que integran las articulaciones que permiten la movilidad de una determinada parte del cuerpo. A dicho término lo componen el tejido óseo, tendones y cartílagos.

3.2 El hueso

El esqueleto es una estructura dinámica, constituida por huesos. Cada hueso es un órgano ya que está formado por diversos tejidos: óseo, cartilaginoso, conectivo denso, epitelial, otros que generan sangre, adiposo y nervioso.¹²⁻¹⁸

Su principal función es la de dar sostén a tejidos blandos y apoyo a los músculos esqueléticos. Otorga protección a los órganos internos y en conjunto con los músculos posibilitan el movimiento.¹⁸

Tiene una matriz abundante, y células muy separadas entre sí. Los componentes principales son: 25% de agua; 25% de fibras proteínicas; 50% de sales minerales cristalizadas.⁸

Según su forma, los huesos se clasifican en dos grupos principales: huesos largos (que son tubulares, constan de diáfisis y epífisis, tiene hueso compacto en la diáfisis y hueso esponjoso en el interior de las epífisis, por ejemplo: el húmero del brazo) y huesos cortos (que son cuboidales, tiene tejido esponjoso salvo en su superficie, por ejemplo: huesos del tarso y del carpo).¹⁹

El hueso es un tejido duro, resistente y firme que forma parte del sistema esquelético. Está compuesto por tejidos blandos y tejidos duros estructurados de la siguiente forma (figura 3):

- La epífisis es la porción del hueso situada en los extremos del hueso largo. Está formada por un tejido esponjoso en el centro y por una capa delgada de hueso compacto en su periferia.¹²
- La diáfisis es la porción central del hueso largo, constituido por tejido óseo compacto, tiene forma cilíndrica y alargada y está

localizada entre las dos epífisis, unidas entre sí mediante la metáfisis.¹²

- La metáfisis es la zona que une los extremos del hueso largo con la porción central. Esta zona está ocupada en la infancia y en la adolescencia por un tejido cartilaginoso llamado cartílago de crecimiento, mediante el cual el hueso se desarrolla de forma longitudinal.¹²
- El cartílago articular se trata de un tipo de cartílago hialino. Es una capa de tejido elástico y resistente que recubre los extremos óseos e impide su roce para evitar el desgaste.¹²
- El periostio es una membrana de tejido conectivo; la cual está innervada por terminaciones nerviosas nociceptivas y posee vascularización. Es una capa fibrosa y resistente, que cubre el hueso por su superficie externa excepto en los lugares de inserción de ligamentos, tendones, y en las superficies articulares. Se encuentra unido al hueso por fibras de colágeno llamadas fibras de Sharpey.¹²
- El endostio es una membrana de tejido conjuntivo que recubre la cavidad medular. Esta membrana contiene las células formadoras de hueso, llamadas osteoblastos.¹²
- La cavidad medular es el espacio interno existente en la porción de la diáfisis y donde se alberga la médula ósea amarilla, que contiene adipocitos. Esta cavidad está recubierta por el endostio.¹²

Las células que lo componen encargadas de la regeneración y crecimiento del mismo, son:

- Células osteógenas: son células madre, no especializadas, con capacidad de división; sus células hijas son los osteoblastos; se localizan en la porción interna del periostio y del endostio.¹⁸
- Osteoblastos: son las células que construyen los huesos; sintetizan los componentes de la matriz del tejido óseo e inician en proceso de calcificación (sufijo blasto indica células que secretan matriz).¹⁸

- Osteocitos: son las células maduras principales del tejido óseo; derivan de los osteoblastos que quedan atrapados en la matriz; intercambian nutrientes con la sangre (sufijo cito indica células constituyentes de los tejidos).¹⁸
- Osteoclastos: son células muy grandes, formadas por la fusión de 50 monocitos, ubicadas en el endostio; producen destrucción del hueso por medio de enzimas lisosómicas para permitir el desarrollo, crecimiento, mantenimiento y reparación normales del hueso (sufijo clasto indica destrucción).¹²⁻¹⁸

La dureza del hueso depende de las sales minerales orgánicas cristalizadas que contiene, y su flexibilidad depende de las fibras colágenas. Los huesos no son completamente sólidos, ya que tienen muchos espacios. Según el tamaño y distribución de estos espacios, las regiones de un hueso se clasifican en compactas y esponjosas. En general el hueso compacto constituye el 80% del esqueleto, y el esponjoso el 20% restante.¹⁸

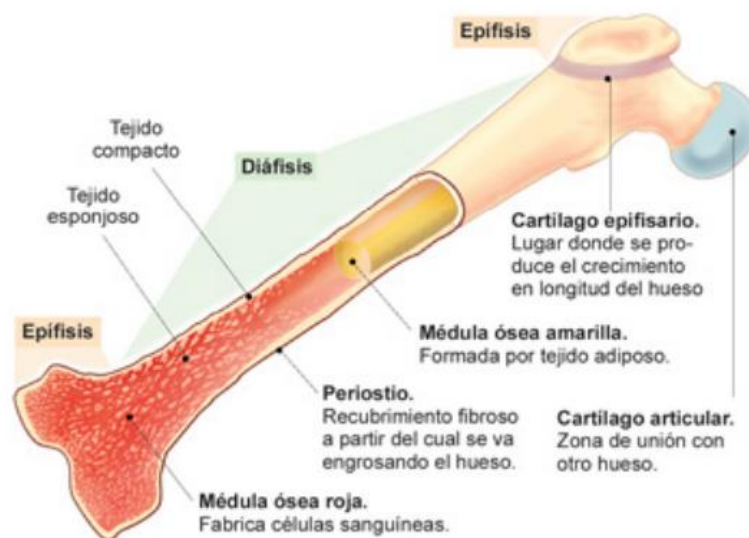


Figura 3. Estructura y composición ósea de un hueso largo.¹²

3.3 El tendón

Los tendones son tejido conectivo fibroso no especializado de colágeno denso tendinoso, que une los músculos a los huesos. Pueden unir también los músculos a estructuras como el globo ocular.¹²

Los tendones sirven para mover el hueso o la estructura, mientras que los ligamentos son el tejido conectivo fibroso que une los huesos entre sí y generalmente su función es la de unir estructuras y mantenerlas estables (en la ruptura de un ligamento, el mismo se reemplaza por tendón, el cual con el tiempo y la recuperación pertinente, adquiere funcionalidad y características de ligamento).¹⁹

Tienen la función de insertar el músculo esquelético en el hueso, conectándolos y permitiendo que el músculo transmita la fuerza de la contracción muscular al hueso para producir un movimiento. Esta conexión permite que los tendones modulen pasivamente las fuerzas durante la locomoción, proporcionando estabilidad adicional sin trabajo activo. Sin embargo, en las últimas dos décadas, hay mucha investigación que se centra en las propiedades elásticas de algunos tendones y su capacidad para funcionar como resortes.¹²

No todos los tendones deben cumplir el mismo papel funcional. Algunos tendones realizan una función posicional como los que hay alrededor de los dedos al escribir y otros que actúan como resortes para hacer que la locomoción sea más eficiente, almacenando energía elástica que se liberará posteriormente.¹²⁻¹⁸

Las propiedades mecánicas del tendón dependen de su diámetro y de la orientación de la fibra de colágeno. Las fibrillas de colágeno son paralelas entre sí y están estrechamente empaquetadas, pero muestran una apariencia ondulada debido a ondulaciones planas, o rizos, en una escala de varios micrómetros (figura 4). Mientras que las fibrillas de colágeno permiten que los tendones resistan el esfuerzo de tracción, los proteoglicanos les permiten resistir el esfuerzo de compresión. Estas moléculas son muy hidrofílicas, lo que significa que pueden absorber una gran cantidad de agua y, por lo tanto, tienen una alta probabilidad de hinchamiento.¹⁹

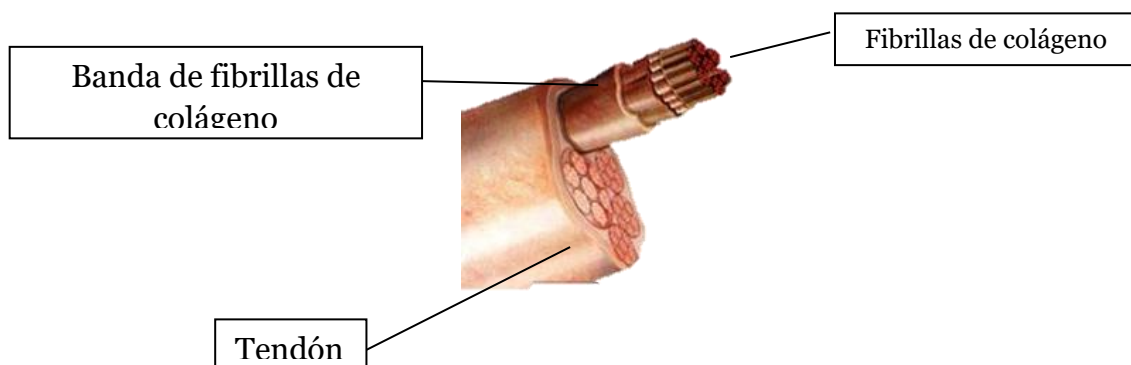


Figura 4. Estructura y composición de un tendón.¹⁹

3.4 El cartílago

El tejido cartilaginoso, o cartílago, es un tipo de tejido conectivo especializado, elástico, carente de vasos sanguíneos, formados principalmente por matriz extracelular y por células dispersas denominadas condrocitos. La parte exterior del cartílago, llamada pericondrio, es la encargada de brindar el soporte vital a los condrocitos (figura 5).¹²

El cartílago se encuentra revistiendo articulaciones, en las uniones entre las costillas y el esternón, como refuerzo en la tráquea y bronquios, en el oído externo y en el tabique nasal. También se encuentra en embriones de vertebrados y peces cartilaginosos.¹⁹

Los cartílagos sirven para acomodar las superficies de los cóndilos femorales a las cavidades glenoideas de la tibia, para amortiguar los golpes al caminar y los saltos, para prevenir el desgaste por rozamiento y, por lo tanto, para permitir los movimientos de la articulación. Es una estructura de soporte y da cierta movilidad a las articulaciones.¹⁹

El cartílago es una forma avascular de tejido conjuntivo constituida por fibras extracelulares alojadas en una matriz que contiene células localizadas en pequeñas cavidades. La cantidad y la clase de fibras extracelulares de la matriz varían dependiendo del tipo de cartílago.¹²

En las áreas que soportan peso o en las que tienden a soportar fuerzas de tracción, la cantidad de colágeno es considerablemente mayor y el cartílago es prácticamente inextensible. Por el contrario, en las áreas en las que la carga de peso y la tensión son menores, el cartílago contiene fibras elásticas y menos fibras de colágeno.¹⁹

Las principales funciones del cartílago son:

- Soporte de partes blandas.
- Aportación de superficies lisas de deslizamiento para las articulaciones óseas.
- Capacidad de desarrollo y crecimiento de los huesos largos.

Existen 3 tipos de tejido cartilaginoso:

- Cartílago Hialino
- Cartílago Fibroso o fibrocartílago
- Cartílago Elástico

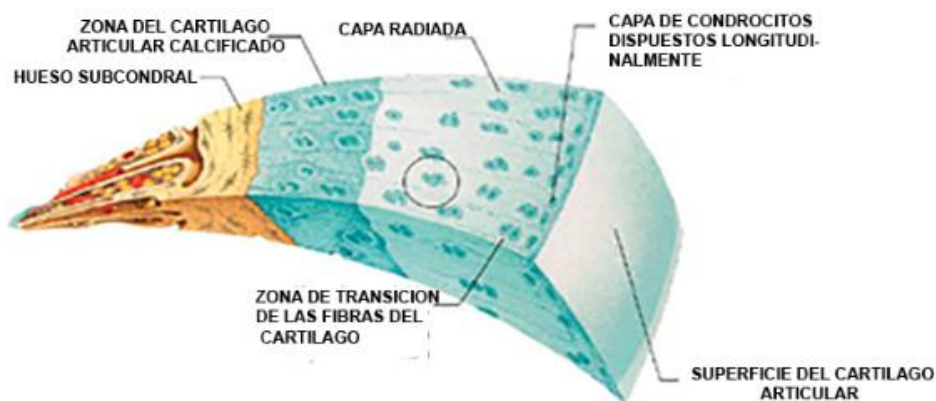


Figura 5. Estructura y composición del cartílago.¹⁹

3.5 Desinfectantes

Los microorganismos son la forma de vida más difundida en la naturaleza. Su presencia tiene efectos positivos y negativos para la vida del hombre, por lo cual, su control es fundamental para evitar que esos efectos produzcan

consecuencias indeseables, para la salud, el medio ambiente y los bienes que hacen a la calidad de vida del ser humano.²⁰

El mencionado control se puede realizar por medios físicos o químicos, los cuales deben ser específicos para la acción deseada y no deben producir efectos colaterales indeseados. Según el grado de detención del crecimiento microbiano, los agentes químicos y físicos, pueden clasificarse según su acción sobre los microorganismos:

- Desinfección: privación total de gérmenes patógenos en superficies inertes (mesadas, pisos, aparatos, instrumentos).
- Antisepsia: creación de un medio no conveniente para los microorganismos que destruye o impide el desarrollo de los mismos. Se aplica a tejidos vivos (creación del campo quirúrgico).
- Asepsia: privación total de todos los gérmenes, patógenos o no.
- Esterilización: acción que produce la muerte de todo organismo (patógenos y saprófitos), incluyendo sus formas de resistencia (esporas). Se obtiene por métodos físicos (calor seco, calor húmedo bajo presión, etc.) o métodos químicos (óxido de etileno, etc.).
- Limpieza: remoción de materia orgánica y suciedad de los objetos. Se realiza con agua, detergente y acción mecánica. Es anterior a los procedimientos de desinfección y esterilización.
- Germicida: aplicado a los agentes que destruyen las bacterias, este término es a su vez sinónimo de bactericida. Más amplio es el término microbicida porque se refiere a la acción destructiva contra los distintos microorganismos (hongos, bacterias, parásitos y virus).
- Bacteriostasis: impide el desarrollo bacteriano.
- Desinfectante: son aquellas sustancias capaces de destruir en 10 a 20 min los gérmenes depositados sobre un material de diversa naturaleza, alterando lo menos posible el sustrato donde residen y abarcando en esa destrucción todas las formas vegetativas, hongos y algunos virus. Son potentes microbicidas, pero hasta cierto punto tóxico e irritante para los

tejidos vivos, por lo que se aplican preferentemente en superficies ambientales y objetos contaminados.

- **Antisépticos:** son sustancias que se oponen a la existencia o desarrollo de gérmenes sobre la piel o mucosa, heridas, etc.
- **Conservador o preservador:** son sustancias que se evitan para la contaminación bacteriana en bebida, alimento o producto biológico o farmacéutico.

3.5.1 Niveles de desinfección

◦ Desinfectantes de bajo nivel

No son capaces de destruir en un periodo breve de tiempo esporas bacterianas, micobacterias y todos los hongos y/o virus no lipídicos o de pequeño tamaño. El tiempo de contacto mínimo para una desinfección de bajo nivel es de 10 min.²¹

◦ Desinfectantes de nivel intermedio

No eliminan necesariamente las esporas bacterianas, pero inactivan bacterias vegetativas. El tiempo de contacto mínimo para una desinfección de nivel intermedio con estos desinfectantes es de 10 min.²¹

◦ Desinfectantes de alto nivel

Inactivan todas las formas vegetativas de los microorganismos, pero no destruyen toda forma de vida microbiana, puesto que no siempre eliminan todas las esporas. La mayoría requiere un tiempo de unos 20 min para ejercer una acción desinfectante de alto nivel; algunos precisan para destruir las esporas bacterianas un tiempo de contacto prolongado (entre 6 y 10 h, según el desinfectante). La limpieza inicial del objeto es fundamental para que la desinfección sea eficaz, ya que muchos desinfectantes pierden total o parcialmente su actividad en presencia de materia orgánica.²¹

3.5.2 Mecanismo y sitio de acción de desinfectantes

- **ALCOHOLES** (etílico e isopropílico): junto con los fenoles, metales pesados y sus sales, inhiben o matan bacterias porque desnaturalizan las proteínas bacterianas. Tienen poder deshidratante. Son compuestos de actividad bactericida y bacteriostática con respecto a formas vegetativas. Posee acción tuberculicida, fungicida y virucida, pero no destruye esporas bacterianas. Los alcoholes de cadena corta tienen un efecto nocivo mayor que los de cadena larga. El alcohol absoluto tiene un poder bactericida casi nulo, en cambio el alcohol diluido al 70° en agua presenta una óptima actividad bactericida. Un frotado vigoroso de 1 minuto en las manos ha demostrado ser el más efectivo método para la antisepsia de las mismas.

- **AGUA OXIGENADA**: su mecanismo principal es la limpieza mecánica producida por el desprendimiento de oxígeno (O_2) en forma de gas. Es un agente oxidante cuya acción como antiséptico no es muy eficaz y disminuye considerablemente en presencia de catalasa. Actualmente, el peróxido de hidrógeno se está utilizando como desinfectante de materiales inanimados como lentes de contacto, implantes quirúrgicos, equipos de plásticos, superficies o descontaminante de gabinetes biológicos. Las soluciones con concentración del 6 % hasta el 25 % son esterilizantes.

- **ACETONA**: la acetona es un líquido incoloro, de olor característico agradable, volátil, altamente inflamable y sus vapores son más pesados que el aire. Se obtiene como subproducto en la fermentación por medio de la cual se obtiene alcohol butílico; por oxidación de isopropanol; por ruptura de hidroperóxido de cumeno en la cual se obtiene, además, fenol; por destilación de acetato de calcio; por destilación destructiva de madera y a partir de oxidación por cracking de propano. Es utilizada como disolvente de grasas, aceites, ceras, hules, plásticos, lacas y barnices. Se usa en la manufactura de algunos explosivos, rayón, películas fotográficas, elaboración de removedores de pinturas y barnices, purificación de

parafinas, en la deshidratación y endurecimiento de tejidos, en la extracción de algunos productos vegetales y animales y como materia prima en una gran variedad de síntesis en química orgánica. Por otra parte, junto con hielo y dióxido de carbono sólido, se puede utilizar para enfriar a temperaturas muy bajas.

3.5.3 Condiciones de un desinfectante ideal

1. Activamente bactericida en altas diluciones.
2. No venenoso ni irritante para el hombre.
3. Activo a temperatura ambiente.
4. Rápido en su acción.
5. Que no se afecte por materia orgánica.
6. No corrosivo ni capaz de deteriorar o teñir la piel, objetos, etc.
7. Inodoro e insípido.
8. Soluble en agua.
9. Buen agente humedecedor.
10. Económico.
11. Estable por largos períodos.
12. Que posea ciertas propiedades disolventes, puesto que debe penetrar en la capa lipídica de los gérmenes.

3.5.4 Factores que afectan la actividad de los desinfectantes

- Carga microbiana: a mayor número de bacterias se requerirá una mayor concentración del agente.
- Tiempo de acción: dependerá del desinfectante. Se debe recordar que la desinfección es un fenómeno gradual, que requiere de un determinado tiempo para ejercer su acción.
- Temperatura: la efectividad de la desinfección normalmente se incrementa con el aumento de la temperatura, este efecto es más marcado en algunos agentes que en otros. Por lo general, la temperatura se

incrementa en una progresión aritmética, mientras que la efectividad de muerte lo hace en progresión geométrica.

- **Concentración:** la efectividad de un desinfectante esta en relación con su concentración o sea que variaciones en la concentración del mismo afectan crucialmente la efectividad de su acción. Sin embargo, la relación no siempre es directa, por ejemplo, el alcohol al 70° es más efectivo sobre la piel que el alcohol al 95°, por lo que se debe trabajar a las concentraciones correctas a las que cada desinfectante es más efectivo.
- **pH:** los cambios de pH no solo afectan la actividad del desinfectante, sino también el rango de crecimiento de células bacterianas. Por ejemplo, un pH de 6 a 8 es óptimo para el desarrollo de células bacterianas, el cual declina fuera del mismo.

Por otro lado, el grado de ionización de los desinfectantes ácidos o básicos depende del pH, siendo algunos compuestos activos en forma de anión y otros como catión.

- **Formulaciones:** la correcta formulación puede ser crucial para el uso efectivo de los desinfectantes. Por ejemplo, el poder de penetración y efectividad de algunos agentes como, la clorhexidina y compuestos de amonio cuaternario pueden ser mayores en alcohol al 70° que en soluciones acuosas.

Los fenoles son poco solubles en agua y en soluciones concentradas o emulsiones, por lo que son preparados comerciales como jabones para de esta forma aumentar la actividad de los mismos.

- **Factores físico-químicos:** la acción de un desinfectante químico comprende además de la absorción por la pared de la célula bacteriana, la penetración a través de membrana celular en el citoplasma, seguida de una reacción con los sustituyentes celulares, frecuentemente proteínas.
- **Interacción de la materia orgánica:** la influencia de materia orgánica sobre la eficiencia de un desinfectante es de gran importancia. Materiales tales como: sangre, u otros fluidos humanos como pus, leche, restos de alimentos o proteínas coloidales si se encuentran presentes en cantidades pequeñas reducen la efectividad de los desinfectantes en varios grados.

- Naturaleza, número y localización de los microorganismos: la eficacia de un desinfectante depende de la naturaleza y número de microorganismos contaminantes y en especial de la presencia o ausencia de esporas bacterianas, las que son mucho más resistentes que las correspondientes células bacterianas a la acción de los germicidas.

4. METODOLOGÍA

4.1 Medios de cultivo

Un medio de cultivo es un sustrato o una solución de nutrientes que permite el desarrollo de microorganismos. En las condiciones de laboratorio para realizar un cultivo, se debe sembrar sobre el medio de cultivo elegido las muestras en las que los microorganismos van a crecer y multiplicarse para dar colonias.²²

Los microorganismos son los seres más abundantes de la tierra, pueden vivir en condiciones extremas de pH, temperatura y tensión de oxígeno, colonizando una amplia diversidad de nichos ecológicos. Entre los requerimientos más importantes para su desarrollo están el carbono, el oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono e hidrógeno. Muchas bacterias sin embargo necesitan del aporte extra de factores de crecimiento específicos en forma de suero, sangre y extracto de levadura entre otros.²⁰

Los medios de cultivo utilizados en el desarrollo del presente trabajo, fueron:

- Agar soya tripticaseína o agar soya tripticasa es un medio de cultivo sólido, no selectivo y nutritivo. Se designa con las letras TSA por sus siglas en inglés Trypticase Soya Agar. Está compuesto por tripteína, peptona de soya, cloruro de sodio y agar-agar. Por su alto poder nutritivo es ideal para el cultivo de microorganismos moderadamente exigentes y no exigentes. El medio sin suplementos adicionales no es recomendable para cultivos primarios, pero es muy útil para subcultivar cepas puras y mantenerlas viables, entre otros usos.²⁰
- Agar manitol salado (medio de Chapman): posee una alta concentración de sal, permitiendo solamente el crecimiento de microorganismos tolerantes a ella, lo que lo hace un medio selectivo. Desarrollan en este medio las bacterias halófilas (estafilococos). La degradación del manitol, con formación de ácido, es indicativa de la presencia de *Staphylococcus aureus* por lo que es un medio diferencial. *Staphylococcus epidermidis* no fermenta el manitol.²⁰

Agar EMB (Levine): es un medio selectivo y diferencial. En este medio, desarrollan bacilos Gram negativos. Las bacterias Gram positivas resultan inhibidas en su crecimiento gracias a los colorantes presentes en la formulación (eosina, y azul de metileno). Los microorganismos que fermentan la lactosa, producen un cambio en el pH, virando el indicador ácido-base (eosina).²⁰

4.1.1 Preparación y observación en medios de cultivo líquidos

Para la obtención del medio de cultivo líquido (Caldo Tripteína Soya- CTS), se siguieron los pasos de las instrucciones del fabricante, en donde se pesaron 30 g del polvo en un litro de agua destilada, se llevó a temperatura hasta ebullición con agitación hasta disolver completamente el polvo. Se dejó enfriar y se fraccionó en frascos menores, se taparon con torundas de algodón y papel y se llevaron a autoclavar a 121 ° C durante 15 min.²³

Luego las muestras del tejido osteocondral, fueron colocadas en contacto con CTS para determinar la aparición o no de turbidez, las muestras se llevaron a la estufa de cultivo durante 24 h a 37 °C.

Finalizado el tiempo de cultivo se analizaron las muestras para determinar si se observaba alguna de las siguientes reacciones.

1. Enturbiamiento en toda la masa del cultivo.
 2. Desarrollo formando grumos que se depositan en el fondo del tubo dejando el resto del líquido transparente.
 3. Desarrollo en la superficie formando un velo o película.
 4. Puede observarse aparición de color en el medio de cultivo debido a la síntesis de pigmentos difusibles.
- Durante el desarrollo de nuestros ensayos, se observó enturbiamiento en toda la masa del cultivo (durante la aplicación de la técnica de turbidez).

4.1.2 Preparación y observación en medios de cultivo sólidos

Posteriormente, se procedió a sembrar las muestras en medio de cultivo sólido, para esto se utilizó ATS, el cual también fue preparado siguiendo las instrucciones del fabricante, (se pesaron 40 g de ATS comercial deshidratado y se disolvió en un litro de agua destilada. Se llevó a una fuente de calor hasta su ebullición con agitación para ayudar a la disolución del medio y se dejó hervir por 1 o 2 min. Posteriormente, se esterilizó el medio en autoclave. Finalizado el proceso de esterilización, se distribuyó en placas de Petri estériles, se dejó solidificar, se invirtió la placa y almacenó a 4-8 °C hasta su uso). Una vez obtenidas las placas, se sembraron y se llevaron a la estufa de cultivo durante 24 h a 37 °C para el recuento de microorganismos aerobios totales.²³

Colonias: es muy importante el estudio macroscópico de la colonia cuando se cultiva a la bacteria en la superficie de un medio sólido; de la multiplicación de cada germen se origina una colonia formando una masa de millones de gérmenes observables a simple vista. La morfología de la colonia deriva de cada célula pero es una característica de la masa celular. Las características que se observan y se analizan de cada colonia son: ²¹

- Tamaño: uniforme para cada especie o tipo, las dimensiones varían desde muy pequeñas o apenas visibles, hasta unos centímetros de diámetro.
- Consistencia: blanda, seca o viscosa.
- Forma: depende del borde y del espesor. El borde puede ser liso, entero, ondulado, aserrado, etc. El espesor depende de la elevación pudiendo ser chatas, elevadas, convexas, cónicas, crateriformes, etc.

4.2 Observación microscópica de los microorganismos

El tamaño de la mayoría de las células bacterianas es tal que resultan difíciles de ver con el microscopio óptico. La principal dificultad es la falta de contraste entre la célula y el medio que la rodea, y el medio más simple de aumentar el contraste es la utilización de colorantes. Éstos pueden emplearse

para distinguir entre tipos diferentes de células o para revelar la presencia de determinados constituyentes celulares, tales como flagelos, esporas, cápsulas, paredes celulares, centros de actividad respiratoria, etc.²⁴

La morfología de los microorganismos puede examinarse de dos formas:

- a) observando microorganismos vivos sin colorear (en fresco).
- b) observando células muertas teñidas con colorantes.

El examen en fresco de los microorganismos permite conocer algunas de sus características (morfología, tamaño, movimiento, etc.). Sin embargo, las microorganismos vivos son casi incoloros y no se pueden visualizar fácilmente al microscopio óptico cuando se encuentran en suspensión, de ahí que se utilicen colorantes para incrementar su contraste con el entorno que los rodea y de esta forma hacerlos visibles.²⁴

Los métodos de tinción son de gran utilidad, pero deben usarse siempre con precaución, ya que pueden conducir a errores. Las moléculas de colorante forman en ocasiones precipitados o agregados que parecen estructuras celulares auténticas, pero que son formaciones completamente artificiales inducidas por el mismo colorante. Tales estructuras se denominan artefactos, y deben tomarse precauciones para tener la seguridad de que no nos estamos equivocando al creer que un artefacto es una estructura realmente existente.²⁴⁻²⁵

4.3 Coloraciones

El principal procedimiento de coloración empleado en microbiología es la tinción de Gram. Es uno de los métodos de coloración diferencial más importante para las bacterias, ya que divide a éstas en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas, según las diferencias estructurales en la pared, que permiten retener o no uno de los colorantes. La capacidad de retener este colorante es extremadamente limitada en la naturaleza, ya que la mayoría de las células animales y vegetales son Gram negativas. También se pueden encontrar otras tinciones como la coloración simple, otros tipos de coloración diferencial y coloraciones especializadas.²⁶

4.3.1 Utilidad de la coloración diferencial

Coloración diferencial, utilizada para demostrar las propiedades tintoriales de todos los tipos de bacterias.²⁶

4.3.2 Descripción de la tinción de Gram

Las células fijadas al calor sobre un portaobjetos se tiñen, primero con una solución de cristal violeta y luego son lavadas para retirar el exceso de colorante. En este estado, todas las células, tanto las Gram positivas como las Gram negativas, están teñidas de violeta.

El portaobjetos se cubre entonces con una solución de yodo-yoduro potásico. El ingrediente activo es aquí el I_2 ; el KI simplemente hace soluble el I_2 en agua. El I_2 entra en las células y forma un complejo insoluble en agua con el cristal violeta. De nuevo tanto las células Gram positivas como las Gram negativas se encuentran en la misma situación.

Se lleva a cabo después la decoloración, usando una mezcla de alcohol-acetona, sustancias en las que es soluble el complejo I_2 -cristal violeta. Algunos organismos (Gram positivos) no se decoloran, mientras que otros (Gram negativos) lo hacen. La diferencia esencial entre esos dos tipos de células está por tanto en su resistencia a la decoloración; esta resistencia se debe probablemente al hecho de que en el caso de bacterias Gram negativas, la mezcla de alcohol/acetona es un solvente lipídico y disuelve la membrana exterior de la pared de la célula (y también puede dañar la membrana citoplásmica a la que se une peptidoglicano). La delgada capa de peptidoglicano es incapaz de retener el de complejo cristal violeta-yodo y la célula se decolora.

Las células Gram positivas, a causa de sus paredes celulares más espesas (tienen más peptidoglicano y menos lípido), no son permeables al disolvente, provocando que el de complejo cristal violeta-yodo quede atrapado dentro de la pared celular. Después de la decoloración las células Gram positivas son todavía violeta, pero las Gram negativas son incoloras. Para poner de manifiesto las células gramnegativas se utiliza una coloración de contraste. Habitualmente es

un colorante de color rojo, como la safranina o la fucsina básica. Después de la coloración de contraste las células Gram negativas son rojas, mientras que las Gram positivas permanecen violeta.²⁷

4.3.3 Procedimiento de la tinción de Gram

1- Preparación de extendidos:

Se utilizaron portaobjetos limpios y desengrasados. Según el origen de nuestras muestras, podemos diferenciar la preparación de los extendidos en 2 grupos:

- A partir del crecimiento microbiano en medios sólidos o líquidos. Para el desarrollo de este trabajo, se utilizó un cultivo sólido. Se colocó en el portaobjeto una gota de solución fisiológica en la que se emulsionó la muestra que ha sido recolectada mediante el uso de ansa del medio de cultivo en que se encontraba.

2- Secado del extendido:

Se colocaron los portaobjetos en posición horizontal sobre la corriente de aire caliente de un mechero.

3- Fijado del extendido:

A la llama: fue el utilizado durante el desarrollo de este trabajo, se efectuó pasando 3 veces el lado del portaobjeto que no tenía la preparación sobre la llama del mechero.

4- Técnica de coloración:

- Se cubrió el extendido con cristal violeta para Gram y se dejó actuar por 1 min.
- Se lavó con agua corriente durante 10 segundos.
- Se cubrió con Lugol y se dejó actuar durante 1 min.
- Se lavó con agua corriente durante 10 segundos.
- Se cubrió con decolorante para Gram. Se dejó decolorar durante 15 segundos.
- Se lavó con agua corriente durante 10 segundos.
- Se cubrió con safranina para Gram y se dejó actuar por 2 min.
- Se lavó con agua corriente durante 10 segundos.
- Se secó el extendido en estufa durante 20 min.

Se llevaron los extendidos a un microscopio óptico, se le agregó una gota de aceite de inmersión y se observaron las muestras con un aumento de 100x para la lectura de los porta objetos a la máxima apertura de luz.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizó material de origen bovino, obtenido de un establecimiento que cuenta con las correspondientes habilitaciones de SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria) para su funcionamiento y comercialización.

5.1 *Material, tejido osteocondral*

Los ensayos fueron realizados con muestras de tejido bovino. Para los correspondientes al hueso propiamente dicho, se seleccionó la tibia bovina por sus características morfológicas y fisiológicas, utilizando solamente la diáfisis del mismo (zona alargada del hueso, también denominada caña).

Para los ensayos que corresponden a tendones y cartílagos se trabajó con los que se obtienen de la articulación a nivel de la rodilla y tobillo del animal por encontrarse en cantidad sobre estas zonas.

El tamaño de las muestras analizadas, presentaban un tamaño inferior a 5 cm³.

El procesamiento de los tejidos se realizó de acuerdo a la disposición 3266/2013 de la ANMAT la cual establece las buenas prácticas de fabricación de productos médicos, brindando al desarrollo de las actividades, las condiciones ambientales necesarias para poder llevar a cabo las diferentes actividades propuestas, esto incluye aspectos relevantes como manipulación en condiciones adecuadas BPM (Buenas Practicas de Manipulación), técnicas microbiológicas, condiciones de trabajo específicas, elementos y materiales específicos.⁸

5.2 *Determinación de la carga microbiana en el tejido osteocondral bovino*

La determinación de la carga microbiana de los tejidos osteocondrales, se realizó en forma directa, sin tratamiento previo del material, donde luego de la preparación de los medios correspondientes, se realizó, sobre el tejido, un

hisopado a las diferentes muestras (hueso, tendón y cartílago), se sembraron las placas y fueron colocadas a incubar en la estufa de cultivo durante 24 h a 37 °C.

Por otra parte, se realizó un homogeneizado (se colocó el tejido osteocondral en contacto con agua) de cada una de las muestras, en donde se tomó 100 µl del homogeneizado y se sembró en placas de ATS, las cuales fueron llevadas a estufa de cultivo para incubar durante 24 h a 37 °C.

Luego de la incubación de las placas, se realizó una observación macroscópica y se realizaron picos de flauta de las colonias morfológicamente diferentes. Los picos resultantes fueron llevados a estufa durante 24 h a 37 °C con su correspondiente identificación. Cada una de las muestras se analizó mediante tinción de Gram y en medios de cultivos selectivos y diferenciales (Agar manitol Salado y Levine).

Para evidenciar la presencia de microorganismos en el tejido osteocondral analizado se utilizaron 2 metodologías:

1- Recuento en placa: es un método de recuento de células viables (célula capaz de dividirse y originar descendencia). Se cuentan las células de una muestra que son capaces de formar colonias cuando se inoculan en un medio de cultivo sólido adecuado. Hay 2 modalidades de siembra: en profundidad y en superficie, la desarrollada en el trabajo fue la segunda y que consiste en colocar un volumen de la muestra (100 µl) sobre la superficie de la placa que contiene el medio y se extiende con la ayuda de una espátula de Drigalsky. Una vez inoculadas, las placas se incubaron en estufa de cultivo durante 24 h a 37 °C.²⁸

Se realizó recuento en placa por técnica de microgota en la cual se sembraron 10 µl de muestra.

También se realizó siembras para determinar crecimiento selectivo y diferencial, para ello, se utilizó (Chapman) y agar con eosina y azul de metileno. Se sembraron 2 placas, en donde una contenía AMS y en la otra EMB, se dejó incubar durante 24 h a 37 °C y se analizaron los resultados.

5.2.1 Observación microscópica de microorganismos presentes en el tejido osteocondral

Se procedió a realizar la observación microscópica de microorganismos presentes en la superficie del tejido osteocondral. Para ello, se realizó la técnica de tinción de Gram, anteriormente descrita, para las 3 muestras de tejido osteocondral bovino, es decir para hueso, cartílago y tendón. Obtenido el extendido, se observó al microscópico óptico con aumento de 100x.

5.3 Evaluación de la actividad de desinfectantes

Desinfectantes propuestos para el tratamiento de las muestras

Los tratamientos propuestos son con diferentes agentes desinfectantes ácidos y básicos a dos tiempos de contacto distintos:

- Etanol 70° en contacto durante 10 y 20 min (C_2H_5OH 96°).
- Etanol 96° en contacto durante 10 y 20 min (C_2H_5OH 70°).
- Peróxido de Hidrogeno 10% en contacto durante 10 y 20 min (H_2O_2).
- Acetona en contacto durante 10 y 20 min (C_3H_6O).

Se realizó una prueba de desafío entre los diferentes tratamientos propuestos y así poder determinar la eficacia de los mismos (tabla 1). Mediante este ensayo se obtuvo información importante acerca de la eficacia del proceso, de la preparación de las muestras y las soluciones, de las posibles condiciones de almacenamiento y se estimó el posible período de utilización y conservación del material. Para la evaluación de la actividad de los desinfectantes y antisépticos se aplicó el método de suspensión cuantitativa de la Unión Europea BS EN 1276.

- 1- Los productos se evaluarán en tres concentraciones incluyendo la concentración de uso recomendada y otras dos experimentales para su posterior comparación.
- 2- Luego del tiempo de contacto (10 ó 20 min), se agregó 1 mL de la muestra a 8 mL de neutralizante y 1 mL de agua.

3- Luego de 5 min de neutralización, se realizaron las siguientes diluciones de las muestras tratadas con el desinfectante en (CTS): 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} . Para ello se colocó 0,9 mL de CTS en un tubo eppendorf y agrego 0,1 mL de la muestra (dilución 1/10). De esta solución se tomó 0,1 mL y se colocó en un nuevo tubo eppendorf que contenía 0,9 mL de CTS (dilución 1/100). A partir de esta solución se tomó 0,1 mL y colocó en un nuevo tubo eppendorf que contenía 0,9 mL de CTS (dilución 1/1000). Se sembró 0,1 mL de cada dilución y de la muestra sin diluir en placas de ATS.

4- Paralelamente se efectuaron los siguientes controles:

CONTROL A: 9 mL de agua + 1 mL de suspensión bacteriana. Se realizó una dilución 1/1000 en CTS. Se sembró 0,1 mL en medio sólido (ATS).

CONTROL B: 8 mL del neutralizante + 1 mL de agua + 1 mL de suspensión bacteriana. Se realizó una dilución 1/1000 en CTS. Se sembró 0,1 mL en medio sólido (ATS).

Este control permite evaluar si el neutralizante posee actividad inhibitoria.

CONTROL C: Se colocaron 0,8 mL de agua + 0,2 mL del desinfectante en un tubo de ensayo. Se le agregó 8 mL del neutralizante. Luego de 5 min de contacto a temperatura ambiente, se colocó 1 mL de la suspensión bacteriana. Luego de 5 min se realizó una dilución 1/1000 en CTS. Se sembró 0,1 mL en medio sólido (ATS).

Este control permite evaluar si el desinfectante ha sido neutralizado.

5- Se incubó durante 24 h a 37 °C.

Tabla 1. Condiciones ensayadas en el Método de suspensión cuantitativa de la Unión Europea BS EN 1276.

	A1	A2	A3
Concentración de la solución (H₂O/desinfectante) mL	0,05/8,95	0,1/8,9	0,2/8,8
cepa <i>S. aureus</i> ATCC 29213 1,5 - 5 x 10⁸ UFC/mL (Cultivo de 18 h)	1 mL	1 mL	1 mL

A1: contiene 8,95 mL de agua + 0,05 mL del desinfectante/antiséptico + 1 mL de la suspensión bacteriana.

A2: contiene 8,90 mL de agua + 0,1 mL del desinfectante/antiséptico + 1 mL de la suspensión bacteriana.

A3: contiene 8,8 mL de agua + 0,2 mL del desinfectante/antiséptico + 1 mL de la suspensión bacteriana.

La suspensión bacteriana utilizada, se obtiene de la cepa *S. aureus* ATCC 29213, se preparó una solución correspondiente al 0,5 de la escala de McFarland por densitometría.

Para que una determinada concentración del desinfectante sea bactericida, tiene que producir una reducción de 10^5 en el recuento bacteriano (5 log).

Para que el neutralizante sea efectivo, el recuento bacteriano en el control C no debe ser inferior al 50 % del recuento del control A.

5.3.1 Neutralizante utilizado

La preparación y utilización del neutralizante fue para demostrar la actividad del desinfectante, es por ello, que se comparan los controles con las soluciones problemas, en donde los controles no presentan actividad desinfectante, debido a que el neutralizante inhibe su actividad microbicida. En cambio en las muestras problema, debido a la ausencia del neutralizante, los agentes desinfectantes propuestos mantienen su actividad. Por lo tanto, la diferencia en el recuento de las muestras controles y problema, será el resultado de la actividad biocida de los desinfectantes ensayados.

Formula de preparación:

- 15 mL Tween 80.
- 3,125 mL Bisulfito de Sodio al 40%.
- 1,961 gr de Tiosulfato Sódico.
- c.s.p 250 mL diluyente (CTS).

Las placas fueron rotuladas (Hueso – Tendón – Cartílago) y se las dividió en cuartiles.

En cada siembra se colocaron 10 µl de muestra, los ensayos se realizaron por triplicado.

El análisis de crecimiento/inhibición microbiana posterior a los tratamientos propuestos se determinó de la siguiente manera:

- 1- Recuento de UFC/mL en el lugar de siembra de microgota, en cada cuartil de la placa.
- 2- Cálculo del promedio del recuento en cada cuartil (recuento por triplicado).

Una vez realizado los ensayos y los controles correspondientes, se seleccionó el desinfectante de mayor actividad antimicrobiana, el cual fue utilizado para las pruebas sobre el tejido osteocondral bovino.

5.4 Descripción y desarrollo del test “in-use”

A continuación se realizó el *test “in – use”*, en donde se sumergió el material osteocondral en tres recipientes diferentes, se utilizaron frascos estériles, para evitar contaminación externa y se trabajó en condiciones de esterilidad, se realizó la prueba en el tejido osteocondral bovino con el tratamiento seleccionado de acuerdo a los resultados obtenidos del punto 5.3, para ello se realizaron una serie de soluciones que se describen a continuación:

1. Tejido osteocondral + buffer fosfato (10 mL).
Se lo deja en contacto por 60 min (figura 14).
2. Tejido osteocondral + buffer fosfato (90 mL Buffer + 10 mL de suspensión bacteriana correspondiente al 0,5 de la escala de McFarland).
Se lo deja en contacto durante 60 min (figura 15).

3. Tejido osteocondral (del paso 2) + alcohol 96° (100 mL del desinfectante durante 20 min).

Una vez finalizado el tiempo mencionado, se realizan 6 diluciones (1 en 10) en donde se coloca 0,9 mL de CTS y 0,1 mL de la suspensión en contacto con el tejido osteocondral. Luego de esta solución, se toma 0,1 mL y se lo agrega a 0,9 mL de CTS, así sucesivas veces hasta llegar a las 6 diluciones.

Luego se sembraron las 6 muestras en una placa de Petri, por la técnica de la microgota y se colocaron en estufa durante 24 h a 37 °C, (como se describe en el punto 5.3).

Luego se procedió al recuento de UFC/mL para determinar la efectividad del desinfectante bajo estudio.

5.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron realizados por triplicado en tres ensayos independientes. Se calculó la media y desviación estándar de los valores obtenidos en cada ensayo. Los gráficos representan los resultados expresados como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realizó utilizando el test de *t de Student* con un nivel de significancia del 95%. Un $*p < 0,05$ fue considerado significativo

6. RESULTADOS

6.1 Estudio microbiológico

En la naturaleza, la mayoría de los microorganismos no se encuentran aislados, sino integrados en poblaciones mixtas. Para llevar a cabo el estudio de estos microorganismos y de sus propiedades, es necesario intentar separar unos de otros y trabajar con especies aisladas, obteniendo cultivos axénicos o puros.²⁴

Un cultivo axénico o puro es aquel que contiene un sólo tipo de microorganismo y que procede de una sola célula; el crecimiento de ésta origina, en medio sólido, una masa de células fácilmente visible que recibe el nombre de colonia.²⁹

Para obtener cultivos puros a partir de una población microbiana mixta, se utilizan las denominadas técnicas de aislamiento. En un principio, Lister utilizó diluciones seriadas en medio líquido con esta finalidad, pero la presencia de contaminación, es decir, de microorganismos no deseados, dificultó el aislamiento. La escuela de Robert Koch introdujo los medios sólidos, complementados con agar, y las placas de Petri en Bacteriología, permitiendo así la separación física de las colonias sobre la superficie del medio de cultivo o en el interior del mismo. El aspecto de las colonias sirve para diferenciar distintas especies microbianas.²⁴

6.1.1 Resultado de la tinción de microorganismos.

Una vez obtenido los extendidos y luego de haber realizado los pasos correspondientes de la tinción de Gram (Figura 6), se obtuvieron los portaobjetos con las muestras para su observación al microscopio óptico.

La bacterias Gram positivas se observan de color violáceo, mientras que las bacterias Gram negativas se observan de color rosado-rojizo.

Como se mencionó anteriormente, una vez obtenido el extendido, se lo cubrió con aceite de inmersión y se observó al microscópico óptico, con un

objetivo de 100X para la lectura de los portaobjetos, se utilizó la máxima apertura de luz (Figura 7).

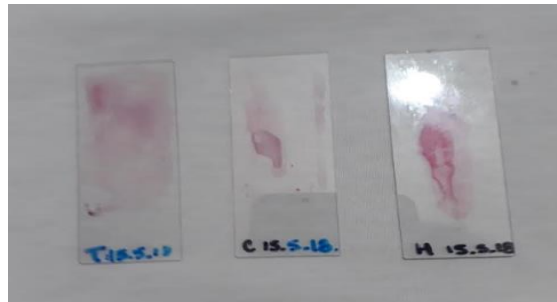


Figura 6. Extendidos resultantes de la Tinción de Gram de las 3 muestras biológicas bovina (de izquierda a derecha: Tendón – Cartílago – Hueso).



Figura 7. Imagen de microscopia óptica representativa de los microorganismos presentes en las muestras de tejido osteocondral luego de la Tinción de Gram. Amento 1000x.

Resultados de la tinción

En las 3 muestras analizadas, los resultados observados son los siguientes:

- Hueso: cocos Gram positivos y cocos Gram negativos; bacilos Gram positivos y bacilos Gram negativos.
- Tendón: cocos Gram positivos y cocos Gram negativos; bacilos Gram positivos y bacilos Gram negativos.
- Cartílago: cocos Gram positivos y cocos Gram negativos; bacilos Gram positivos y bacilos Gram negativos.

Los microorganismos denominados cocos, presentan una forma redondeada, mientras que los bacilos presentan una estructura alargada.

Analizando la figura 7, los cocos Gram positivos son los que se observan redondos y de color lila. Los cocos Gram negativos se observan redondos y de color rosado. Mientras que los bacilos Gram positivos son alargados y de color lila y los bacilos Gram negativos son alargados y de color rosa.

Los resultados son idénticos en las 3 muestras, esto se debe a que el tejido osteocondral se encontraba almacenado en el mismo lugar, por lo cual los microorganismos colonizadores son los mismos.

En cuanto a los resultados de las muestras que se sometieron a medios de crecimiento selectivo, arrojaron resultados negativos para *E. coli*, pero si se obtuvo crecimiento microbiano. En la placa de Chapman, el resultado para estafilococos también resulto negativo.

6.1.2 Evaluación de la actividad de tratamientos de desinfección propuestos

Luego de la aplicación de los tratamientos propuestos, continuamos por el recuento de colonias formadas en las placas. Estas colonias, son el resultado de la siembra por técnica de microgota, luego de su incubación, en donde las placas fueron divididas en cuatro partes y se sembraron los 10 μ L de la suspensión.

Los resultados positivos o negativos, variaron según la efectividad del tratamiento, como así también del tiempo en contacto como el tipo de desinfectante utilizado.

Para un recuento más sencillo, se trabajó con las cuatro últimas diluciones.

El control A (Ca), por no contener desinfectante, tendrá un 100% de crecimiento de microorganismos, lo cual nos servirá de referencia para los cálculos de inhibición.

El control B (Cb) contiene solo neutralizante, agua y la suspensión bacteriana, por lo cual, el crecimiento bacteriano debería ser semejante al control A (Ca).

El control C (Cc) contiene el desinfectante, por lo cual la reducción bacteriana debería ser considerable comparada con los controles A y B.

Las muestras A1, A2 y A3 son los tratamientos propuestos siguiendo los pasos de la norma descrita anteriormente en la tabla 1, en donde lo que varía, es la cantidad del desinfectante que se pone en contacto con la suspensión bacteriana que deseamos inhibir.

Los resultados obtenidos, muestran en todos los casos, una disminución en la concentración inicial de la carga microbiana, lo cual demuestra que los microorganismos son sensibles a los esquemas de desinfectantes propuestos, ya que la disminución del recuento de microorganismos posterior al tratamiento es de por lo menos 1×10^6 UFC/mL.

Luego de realizar el recuento de (UFC/mL) de muestra sembrada en las placas al finalizar cada uno de los respectivos tratamientos propuestos, se calculó el porcentaje de sobrevivencia.

Para esto, se calculó la diferencia entre las UFC/mL de la muestra control, es decir, muestra Ca que contenía 9 mL de agua + 1 mL de suspensión bacteriana, respecto al recuento de UFC/mL luego de la aplicación de los 8 tratamientos.

En la figura 8, se compara la actividad bactericida del alcohol 70° a dos tiempos diferentes. Las barras Ca, Cb y Cc son el resultado de los controles propuestos para determinar la carga bacteriológica inicial de las muestras a analizar y las barras A1, A2 y A3 son el resultado luego de la actividad inhibitoria del alcohol 70°. Analizando la capacidad bactericida de este desinfectante según el tiempo en contacto, se observa una efectividad levemente superior cuando el tratamiento con el desinfectante es de 10 min que con 20 min. Pero en ambos casos la disminución luego de los dos tratamientos es significativa con un $p < 0,05$.

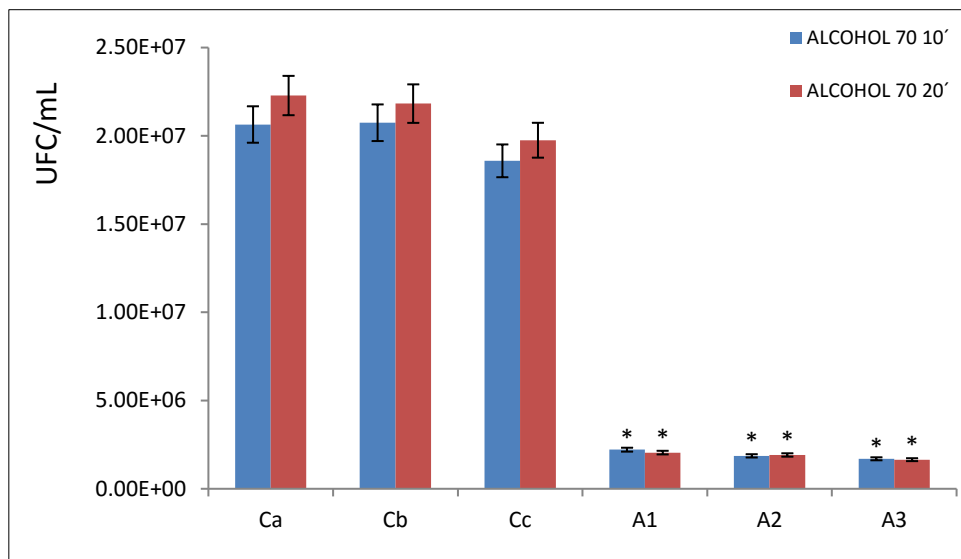


Figura 8. Recuento de UFC/mL luego de los controles y del tratamiento con alcohol étílico 70° durante 10 ó 20 min. * $p < 0,05$ respecto del control (Ca).

El análisis de la figura 9 se puede observar la actividad bactericida del peróxido de hidrogeno a dos tiempos diferentes (10 y 20 min). Las barras Ca, Cb y Cc son el resultado de los controles para determinar la carga bacteriológica inicial de las muestras a analizar y las barras A1, A2 y A3 son el resultado luego del recuento bacteriológico posterior al tratamiento con peróxido de hidrogeno. Analizando la capacidad bactericida de este desinfectante según el tiempo en contacto, se observa una efectividad levemente superior cuando el tratamiento con el desinfectante es de 10 min sobre el de 20 min, aunque la carga inicial en los controles, resulto ser mayor para el tratamiento de 20 min. En ambos tratamientos la disminución de la carga bacteriológica inicial de los controles respecto a las muestras tratadas es significativa para un $p < 0,05$.

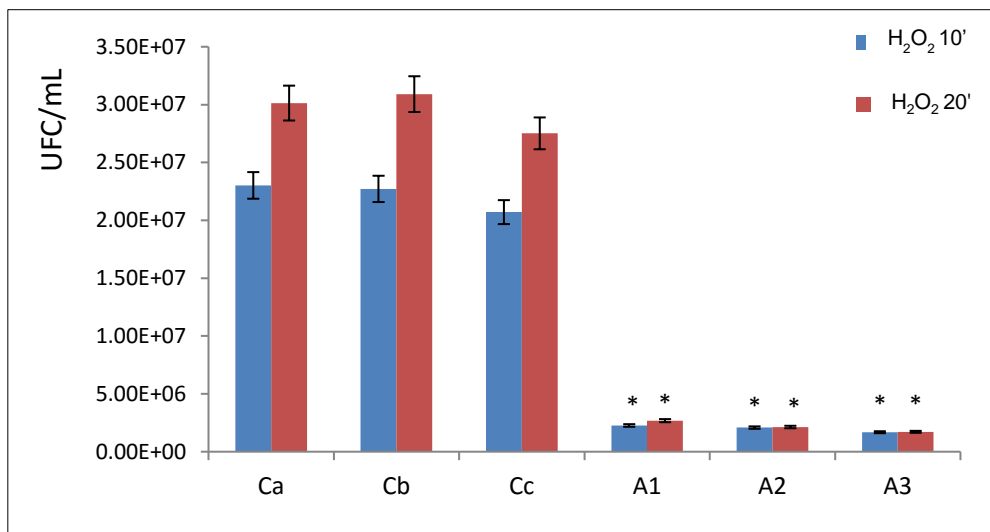


Figura 9. Recuento de UFC/mL luego de los controles y del tratamiento con peróxido de hidrógeno durante 10 ó 20 min. * $p < 0,05$ respecto del control (Ca).

En este caso, el tratamiento de las muestras se realizó con alcohol 96°. En la figura 10 se puede observar la actividad bactericida del alcohol 96° a los dos tiempos propuestos (10 y 20 min). Las barras Ca, Cb y Cc son el resultado de los controles iniciales para determinar la carga bacteriológica de las muestras a analizar y las barras A1, A2 y A3 resultan del recuento bacteriológico posterior al tratamiento con alcohol 96°. Analizando la capacidad bactericida de este desinfectante según el tiempo en contacto, se observa una efectividad superior cuando el tratamiento con el desinfectante es de 20 min sobre el de 10 min. Esta diferencia, en cuanto a la inhibición bactericida por el tiempo de contacto, es la que resulta mayor y más evidente respecto a la de los otros tratamientos con los desinfectantes propuestos. Así mismo, tanto a los 10 min como 20 min de tratamiento la disminución de la carga bacteriológica inicial respecto a las muestras iniciales de control es significativa para un $p < 0,05$.

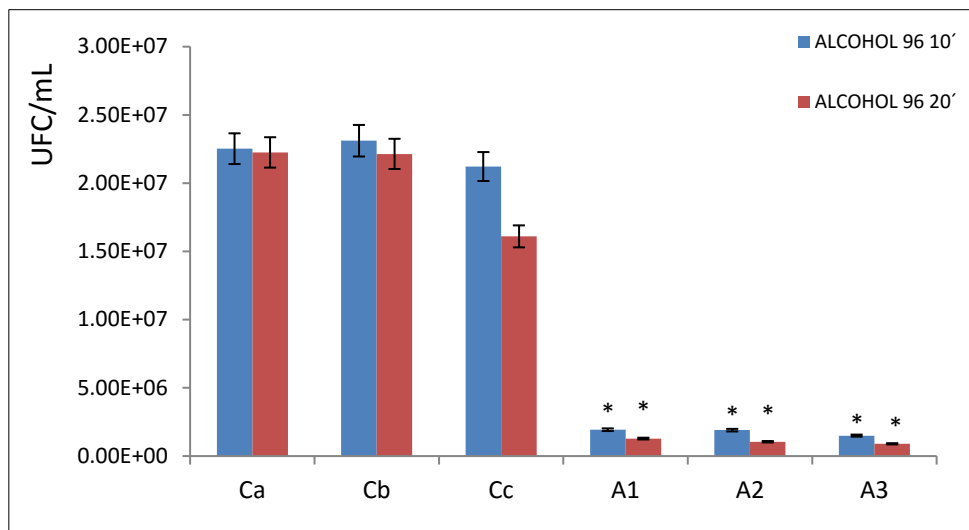


Figura 10. Recuento de UFC/mL luego de los controles y del tratamiento con alcohol etílico 96° durante 10 ó 20 min. * $p < 0,05$ respecto del control (Ca).

El análisis de la figura 11 se puede observar la actividad bactericida de la acetona pura, a dos tiempos diferentes (10 y 20 min). Las barras Ca, Cb y Cc son el resultado de los controles para determinar la carga bacteriológica inicial de las muestras a analizar y las barras A1, A2 y A3 son el resultado luego del recuento bacteriológico posterior al tratamiento con el solvente. Analizando la capacidad bactericida de la acetona pura según el tiempo en contacto con las muestras, se observa una efectividad levemente superior cuando el tratamiento de 10 min sobre el de 20 min, aunque la carga inicial en los controles, resulto ser mayor para el tratamiento de 20 min, por lo cual podría ser la causa de dicha diferencia. En ambos tratamientos (acetona pura 10 min y acetona pura 20 min) la disminución de la carga bacteriológica inicial de los controles respecto a las muestras tratadas es significativa para un $p < 0,05$.

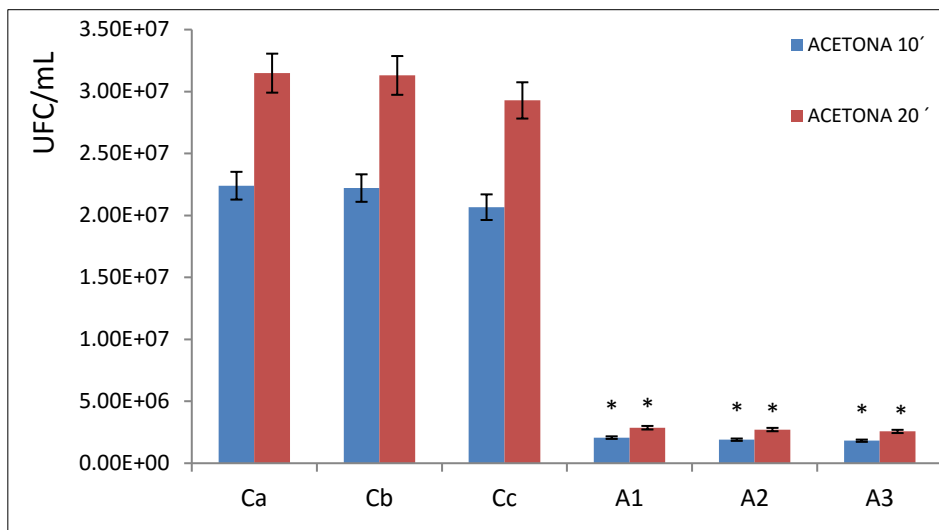


Figura 11. Recuento de UFC/mL luego de los controles y del tratamiento con acetona pura durante 10 ó 20 min. * $p < 0,05$ respecto del control (Ca).

Luego de los ensayos mencionados y análisis de las gráficas, las conclusiones parciales obtenidas hasta el momento, son que de los tratamientos propuestos, quienes lograron una mayor disminución de la carga bacteriana son: alcohol 70° 10 min, peróxido de hidrógeno 10 min, alcohol 96° 20 min y acetona pura 10 min.

Integrando los resultados obtenidos de las gráficas anteriores, en la figura 12 se muestran los 8 tratamientos desarrollados y como varía el recuento bacteriológico inicial (Ca), respecto al recuento de bacterias que sobreviven a medida que las concentraciones de desinfectante van creciendo (A1, A2 y A3) expresado en UFC/mL En todos los casos, la disminución resulta evidente y las gráficas muestran como el recuento disminuye luego del tratamiento con los desinfectantes ensayados.

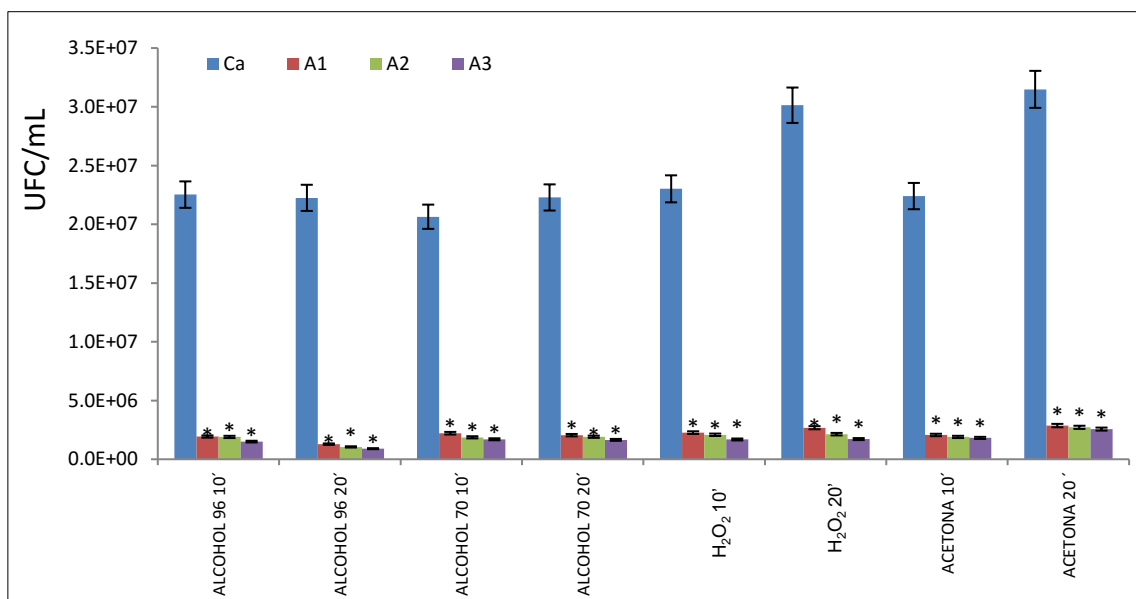


Figura 12. Se observa la sobrevida de los microorganismos en UFC/mL para cada tratamiento propuesto en su respectiva concentración y tiempo de contacto. La reducción en el recuento, denota la acción del desinfectante sobre la suspensión bacteriana. * $p < 0,05$ respecto del control Ca.

También, a partir de la figura 12, se puede observar que el tratamiento que presenta un recuento de UFC/mL menor, es el alcohol 96° cuando el tiempo de contacto es de 20 min, sobre los otros 7 tratamientos propuestos y desarrollados.

Tabla 2. Comparación de la efectividad de los 8 tratamientos propuestos (cada desinfectante en los 2 tiempos de contacto). Se calculó el porcentaje de inhibición y de sobrevida bacteriana.

	% SOBREVIDA	% INHIBICION	% TOTAL
ALCOHOL 96 10'	7,9	92,1	100
ALCOHOL 96 20'	4,8	95,2	100
ALCOHOL 70 10'	9,3	90,7	100
ALCOHOL 70 20'	8,4	91,6	100
H2O2 10'	8,7	91,3	100
H2O2 20'	7,2	92,8	100
ACETONA 10'	8,6	91,4	100
ACETONA 20'	8,6	91,4	100

Como puede observarse de la tabla 2 y figura 13, el tratamiento que luego de su aplicación y período de acción nos otorga un porcentaje de inhibición mayor, es el alcohol 96° cuando actúa durante 20 min. Por lo tanto, el tratamiento seleccionado para tratar las muestras de tejido osteocondral y realizar los ensayos en forma directa y analizar su efectividad es el alcohol 96° en un tiempo de acción de 20 min.

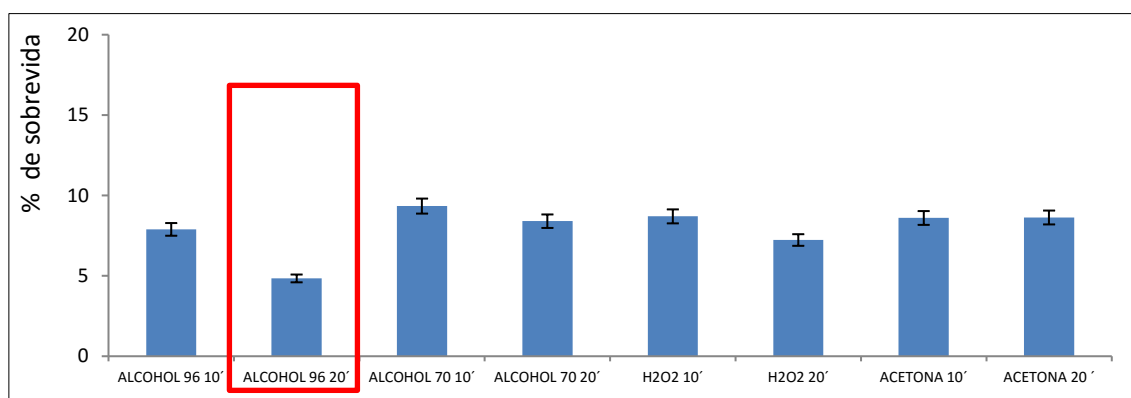


Figura 13. Porcentaje de sobrevida de los ocho tratamientos propuestos. De esta forma se visualiza rápidamente cuál de ellos otorga mejores resultados, en cuanto a menor es su porcentaje de sobrevida bacteriológica luego del recuento de UFC/mL de cada placa.

6.2 Selección del desinfectante

De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas de desafío individual con los desinfectantes propuestos, el alcohol al 96° durante 20 min de contacto con la solución bacteriana, fue quien arrojó una mayor inhibición de microorganismos.

Por lo tanto, fue el procesamiento que se seleccionó para tratar al tejido osteocondral bovino.

Una vez que al material se lo expuso a las soluciones anteriormente mencionadas (descripción test “*in-use*” punto 5.4), los resultados obtenidos, son los que se describen a continuación.

El agregado de buffer fosfato en el frasco estéril que contiene el tejido osteocondral como se observa en la figura 14, es para hidratar la muestra y darle el medio acuoso para continuar con el desarrollo del tratamiento.



Figura 14. Frascos estériles que contienen los 10 mL del buffer fosfato y la muestra de tejido osteocondral bovino (hueso, tendón y cartilago), el tiempo de contacto entre el buffer y el tejido fue de 60 min.

Posteriormente, se le agrega nuevamente una solución conformada por 90 mL de buffer fosfato y 10 mL de suspensión bacteriana correspondiente al 0,5 de McFarland, donde se utilizó la cepa *S. aureus* ATCC 29213. Las muestras de tejido osteocondral se dejan en contacto en esta solución durante 60 min, tiempo para que las bacterias puedan adsorberse sobre la superficie del tejido bovino como se observa en la figura 15.

Luego el tejido osteocondral, en los tres casos, se lo retiró de los frascos que los contenían y se lo colocó en un nuevo frasco estéril con el desinfectante seleccionado (alcohol 96°) durante el tiempo que otorgo mayor inhibición bacteriana en las pruebas de control, es decir durante 20 min.

Una vez finalizados los 20 min de contacto, se realizan las 6 diluciones anteriormente mencionadas (1/10, donde se colocó 0,9 mL de CTS y 0,1 mL de la solución en contacto con el tejido osteocondral.



Figura 15. El tejido osteocondral, luego de haber estado en contacto con la solución buffer fosfato, se lo sumerge en una nueva solución compuesta por 90 mL de buffer fosfato y 10 mL de una suspensión bacteriana de *S. aureus* ATCC 29213.

Posteriormente, como se observa en la figura 16, se sembraron las muestras correspondientes a cada una de las muestras tratadas, en una placa de Petri, por la técnica de la microgota y se colocaron en estufa de cultivo durante 24 h a 37 °C. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se procedió al recuento de UFC de cada placa y se calcularon las UFC/mL para determinar la efectividad del tratamiento propuesto.

Una vez finalizado el proceso de incubación de las placas de Petri, se continuó por su análisis y recuento bacteriano.

Como era de esperar, en la placa 1 de la figura 16, se observa un gran crecimiento bacteriano, ya que la solución que se sembró correspondía a la resultante del contacto directo del tejido osteocondral con 10 mL del buffer fosfato durante 10 min. Por lo cual el crecimiento bacteriano es muy marcado y se observa un gran número de UFC/mL producto de la presencia de bacterias en la muestra bovina desde su origen.

En la placa central (placa 2) de la figura 16, el desarrollo bacteriano corresponde a la siembra de la solución que se obtuvo como resultado del paso 2, es decir, 90 mL de buffer fosfato y 10 mL de la suspensión bacteriana en contacto con el tejido osteocondral durante 60 min. Como puede observarse en la figura, el crecimiento bacteriano es marcado y las UFC/ml disminuyen a medida que aumentan las diluciones.

En la placa 3 de la figura 16 se observa el crecimiento bacteriano producto de la siembra de la muestra obtenida del paso 3, (tejido osteocondral obtenido del paso 2 del tratamiento, es decir tejido sumergido en 100 mL de etanol 96° durante 20 min). Como puede verse, el crecimiento de UFC/ml es nulo, por lo cual el resultado del tratamiento propuesto resulta eficiente.

Por lo tanto, podemos concluir que el alcohol 96° en contacto con el tejido osteocondral durante 20 min nos otorga valores de desinfección aceptable para ser utilizado como agente de desinfección en el tratamiento de muestras biológicas para su posterior procesamiento y utilización como implante.

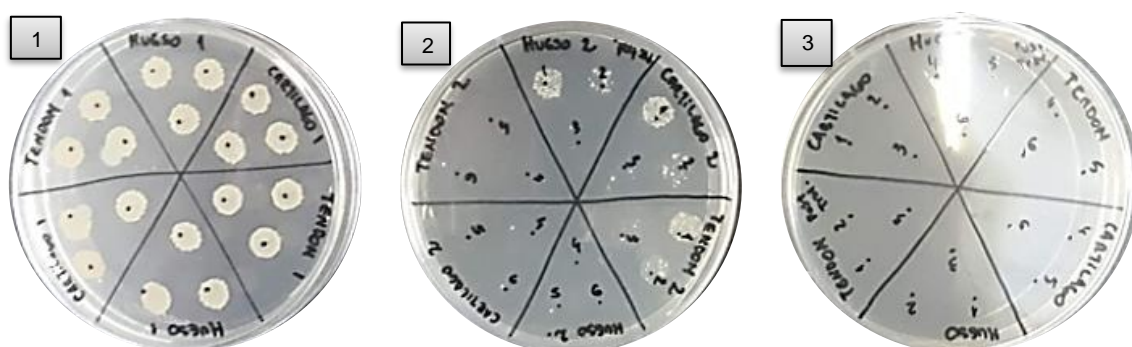


Figura 16. Imagen representativa de las placas luego de la siembra por técnica de microgota y posterior incubación en estufa de cultivo a la temperatura de 37 °C durante 24 h. En la placa 1 se sembró la solución que contenía buffer en contacto con el tejido osteocondral, es decir el paso 1. En la placa 2 se sembró la solución buffer más la solución bacteriana, es decir el paso 2 del tratamiento. En la placa 3 se sembró la solución que se obtuvo de colocar el tejido osteocondral pos contacto con la suspensión bacteriana y buffer con el alcohol 96° durante 20 min, es decir el paso 3 del tratamiento.

6.3 Modificaciones macroscópicas en la estructura y propiedades biomecánicas del tejido osteocondral

El tejido osteocondral expuesto al proceso de lavado y descontaminación propuesto, luego de finalizado el tiempo especificado, no presento cambios físicos sobre su superficie ni en su coloración.

El tendón y cartílago bajo estudio, no sufrió alteración en su estructura, permaneció sin modificación la distribución de sus componentes, no se modificó su flexibilidad como así tampoco su tamaño. El tejido óseo no sufrió modificación, por el contrario, el lavado ayudó a “destapar” las cavidades internas llamadas trabéculas, eliminando restos de medula y vasos sanguíneos que conforman la estructura interna propia del hueso.³⁰

En los 3 casos, luego del contacto con el alcohol 96°, el material presentó una considerable reducción de su contenido graso, resultado de suma importancia a considerar este procedimiento para optimizar y facilitar el lavado del tejido.

6.4 Posibles condiciones de almacenamiento y período de conservación del producto luego del proceso de lavado y desinfección

Para el estudio de la conservación y almacenamiento del tejido osteocondral, se propone envasarlo en doble papel pouch, sellarlo y conservarlo en ultra freezer a una temperatura de -70 °C y realizar ensayos microbiológicos luego de 3, 6 y 12 meses posteriores al envasado.

La metodología a aplicar sería un test “*in-use*” del tejido como se mencionó y desarrolló durante el presente trabajo.

Estudios mencionan que hasta 5 años podría ser conservado el tejido osteocondral sin modificar su estructura, composición y parámetros microbiológicos si su temperatura de conservación permanece a -70 °C.³⁰⁻³¹

7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Tal como se describió al comienzo de este trabajo, desde hace cientos de años, el interés del hombre por remplazar parte del cuerpo dañado, por otro de la misma especie sano y en perfectas condiciones continúa siendo un desafío en la actualidad, se han realizado muchos avances y aciertos hasta el momento pero queda mucho por continuar descubriendo.

La dificultad por obtener piezas humanas para su procesamiento resulta uno de los factores de mayor dificultad, pese a las campañas realizadas, como así también la concientización de la población en la importancia que a esto se refiere. Por tal, motivo es que resulta de suma importancia que el material sea procesado de manera eficiente y eficaz, para garantizar la calidad y funcionalidad del implante, evitando cometer errores que nos obliguen al descarte del mismo. Es por ello, que el tejido de origen bovino, resulta una alternativa a este problema, ya sea para la obtención de implantes, como así también en el estudio del procesamiento del tejido biológico, ya que por sus características presenta comportamiento similar al tejido humano, permitiendo extrapolar los resultados y evitar cometer ciertos errores.

En cuanto a la selección del desinfectante, se puede concluir, que en todos los casos se observó una disminución de la carga microbiana, confirmando un efecto positivo sobre el material biológico. El que otorgó una mayor inhibición microbiana fue el alcohol 96°; de esta manera, se confirma lo afirmado por Obando Centeno, en su trabajo publicado en noviembre de 2018.³²

Si bien, está demostrado y comprobado que el alcohol 70° es el utilizado para la descontaminación de superficies ya que produce precipitación y desnaturalización de proteína y lesiona la membrana citoplasmática. Actúa por su poder bactericida sobre las formas vegetativas bacterianas de Gram positivas como de Gram negativas, es tuberculicida, fungicida y viricida, incluyendo CMV, VIH y VHB, pero no actúa sobre esporas. Este efecto se debe a que genera una deshidratación más lenta sobre la membrana de los microorganismos. La precipitación y desnaturalización de proteínas depende de la presencia de agua y materia orgánica presente.^{31, 32}

Por lo tanto, el motivo de los resultados obtenidos se deben al efecto de las diluciones que se requieren para la preparación de las muestras, haciendo que el desinfectante se diluya, por lo cual el alcohol etílico inicial al 96° hace que caiga dentro del rango de mayor efectividad (85% - 60%) lo que permite un efecto descontaminante mayor que el alcohol al 70° que por el proceso de preparación hace que su concentración disminuya a valores en donde su efectividad resulta difícil de demostrar (por debajo de 60%). Otro aspecto positivo y beneficioso que presenta el alcohol, es su rápida evaporación, su nulo poder residual y fácil eliminación, haciendo que no queden restos del mismo sobre el material biológico.^{21, 31, 32}

Por los aspectos analizados y la bibliografía disponible, podemos afirmar que mediante el lavado repetido de las muestras con alcohol etílico al 96° y trabajando bajo buenas prácticas de laboratorio, se puede garantizar la desinfección del material bajo esta técnica.

También, se recomienda el procesamiento mediante lavados alternativos entre los desinfectantes propuestos, ya que la acetona y el peróxido de hidrógeno, actúan como desengrasantes, eliminando la materia orgánica presente. Para la eliminación de los restos de solvente, se podrían realizar enjuagues con solución fisiológica y agua destilada.

Se finaliza el proceso con lavados de etanol 96° durante 20 min para luego su acondicionamiento y almacenamiento correspondiente, de esta forma se podrían garantizar las condiciones adecuadas en cuanto a la presencia de materia indeseable y calidad microbiológica.

El desinfectante propuesto, presenta la ventaja de cumplir con los requerimientos de un desinfectante ideal, ya que presenta actividad en diferentes diluciones, no es venenoso ni irritante para la persona que lo manipula (de todas maneras se debe tomar las precauciones de bioseguridad para preservar la salud de las personas involucradas en el proceso), presenta actividad a temperatura ambiente, resulta ser de acción relativamente alta, y también presenta cierto grado de resistencia a la presencia de materia orgánica.

Resulta de suma importancia controlar ciertos factores como: carga microbiana excesiva, temperaturas elevadas, disminución de su concentración producto de

diluciones, rango de pH fuera del recomendado, correcta manipulación y formulación, presencia de materia orgánica, factores físico-químicos y demás condiciones que pongan en riesgo el desinfectante resultando imposible garantizar completamente su condición de ideal.

8. PROYECCIONES PARA EL TRATAMIENTO DE TEJIDO OSTEOCONDRALE HUMANO

Como se describió al comienzo del presente trabajo, el tratamiento propuesto para el procesamiento de muestras de tejido bovino, podría ser potencialmente transferible al procesamiento de tejido humano e incluso que se encuentre al alcance de instituciones públicas, para que sean ellas las que le otorguen el uso y destino apropiado.

Luego de realizadas las investigaciones y análisis correspondiente, los beneficios que se pueden destacar con el desarrollo e implementación de este trabajo, son por ejemplo:

- Tener disponibles, protocolizadas y validadas técnicas que otorguen mejores resultados en el procesamiento de descontaminación y obtención de tejido osteocondral, demostrando que no afecta sus propiedades.
- Promover la capacitación, entrenamiento y manejo de herramientas de la calidad para el desarrollo de técnicas que permitan la obtención de un producto de calidad.
- Determinar si un proceso de esterilización final resulta necesario y que método resulta compatible con el material.
- Extrapolar técnicas descritas al tejido humano, que por su origen y metodología de obtención resulta difícil su estudio. Evaluar su potencial transferencia para su utilización en tejido osteocondral humano para la optimización o innovación, en los procesos que se llevan a cabo en los bancos de tejidos de huesos de nuestro país.
- Trabajo interdisciplinario entre profesionales de la salud involucrando diferentes áreas como la Odontología y la Veterinaria.
- Mejorar técnicas de limpieza para acceder a implantes que podrían ser utilizados por profesionales de la salud, con potencial aplicación de implantes en animales.
- Proporcionar un producto trazable, documentado que permite evidenciar conocimientos científico-técnicos. Reducir peligros y situaciones inesperadas.

- Informar y concientizar a la población sobre la importancia de la donación, y los diferentes usos y fines que se puede destinar.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. De la Garza C., Mendoza O.F., Galván R., Briseño R.A. y Álvarez E. (2004). Banco de hueso y tejidos: Alta tecnología disponible para los ortopedistas mexicanos. *Acta Ortopédica Mexicana*. 18(6):261-65.
2. Paloma D.R. y Zamora J.R. (2009). Técnica de conservación de hueso en peróxido de hidrógeno. *Medicina legal de Costa Rica*. 26(2): 117-23.
3. Sequeda L.G., Diaz J.M., Gutierrez S.J., Perdomo S.J. y Gomez O.L. (2012) Synthetic. hydroxyapatite obtaining using three different methods and characterization to use it as bone substitute. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*. 41(1): 50-66.
4. Donati D., Zolezzi C., Tomba P. y Vigano A. (2017). Bone grafting: historical and conceptual review, starting with an old manuscript by Vittorio Putti. *Acta Orthopaedica*. 78(1): 19-25.
5. San Julián M., Valentí A. (2006). Trasplante óseo. *Anales Sis. San Navarra*. 29 (2): 125-135.
6. Disposición 3266/2013 ANMAT - Buenas Prácticas de Fabricación de Productos Médicos.
7. Santos Coto C., Rubino Ruiz R., Rivas Hernández R., Fleites Marrero E. (2011). Uso del hueso bovino en la fusión cervical sin instrumentación. *Rev. Cubana. Ortop Traumatol*. 25 (1) 69-79.
8. Orozco Zapeda H. (2005). Perspectiva histórica del trasplante hepático. *Rev Invest Clin*. 57 (2): 124-128.
9. Hernandez J.A. (2006) Estudio morfológico comparativo de un hueso liofilizado fabricado en Chile y de un hueso comercial (bio-oss). Santiago – Chile.
10. López M.E., Echavarría A., Suárez R. y Herrera N. (2007). Fabricación y caracterización de una matriz tridimensional de hidroxiapatita macroporosa para aplicación en ingeniería de tejidos óseos. *Escuela de Ingeniería de Antioquia*. 7: 87-95.
11. Instituto Nacional Central Único Coordinador de Ablación e Implante (INCUCAI). Ministerio de Salud – Presidencia de la Nación. Disponible en: (<https://www.argentina.gob.ar/salud/incuca>).

12. Delgado Martinez A.D (2016). Cirugía Ortopédica y Traumatología (COT) (Medica Panamericana ed.), Universidad de Jaén, Lima.
13. Piña Barba M., Acevedo N., Palma Cortes R. y Lima E. (2006). Caracterización hueso bovino anorganico: Nukbone. Acta ortopedia Mexicana 20(4): 150-55.
14. Calvo R., Figueroa D., Díaz-Ledezma C., Vaisman A. y Figueroa F. (2011). Bone allografts and the functions of bone banks. Rev Med Chile 139 (5): 660-666.
15. Tortolini P. y Rubio S. (2012). Diferentes alternativas de relleno óseo. Av. Periodon Implantol 24 (3): 133-38.
16. Fidelio P.A. (2011). Tesis Maestría en Desarrollo y Formulaciones de Estrategias Publicas y Privadas, CEA UNC. “Lineamientos estratégicos para la Planta Procesadora de Tejidos Humanos del Laboratorio de Hemoderivados de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
17. ASTM (American Society for Testing and Materials) Normas Internacionales. Modulo Materiales. Disponible en (https://www.astm.org/america_latina/sp/index.html).
18. Tortora G.J y Derrickson B. (2013). “Sistema esquelético”, en “Principios de anatomía y fisiología”. Medica Panamericana ed.
19. Sepúlveda Saavedra J. y Soto Dominguez A. (2014). “Capítulos 5, 6 y 7” en “Atlas de Histología: Biología Celular y Tisular. Mcgraw Hill ed.
20. Guía de Trabajos Prácticos de Microbiología General y Farmacéutica. Año 2017. Departamento de Ciencias Farmacéuticas. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Págs 99-118.
21. Diomedi A., Chacon E., Delpiano L., Hervé B., Jemenao I., Medel M., Quintanilla M., Riedel G., Tinoco J. y Cifuentes M. (2017). Antisépticos y desinfectantes: apuntando al uso racional. Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud. Sociedad Chilena de Infectología. Rev. Chilena Infectol 34 (2): 156-174.
22. Picon M.C., Teisaire M.S. y Montero J.G. (2012). “Los microorganismos y sus asociaciones con animales invertebrados” (Guía de trabajos prácticos), Cátedra de Embriología y Anatomía Comparadas. Facultad de Ciencias Naturales

e I.M.L. Universidad Nacional de Tucumán. Reduca, Serie Microbiología, págs 55-62.

23. Prospecto para la preparación de medios de cultivo. Instrucciones para la preparación y utilización de medios de cultivo). Britania. Disponible en: (<https://www.britanialab.com/productos>).

24. Vega A.D., Faviero G.I., Escudero M.E., Lucero Estrada M., Caceres C.S. y Arismendi Sosa A.C. (2019). “Guía de trabajos prácticos Biología” en Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia – Universidad Nacional de San Luis.

25. Montoya Villafañe H.H. (2017). “Control de Microorganismos” en “Microbiología básica para el área de salud y afines”. Universidad de Antioquia ed. Colombia, págs. 203-230.

26. Schlegel H.C. (2013). “El crecimiento de los microorganismos” en “Microbiología General”. Omega S.A. ed. Barcelona, págs. 193-231.

27. Tortora G.J y Derrickson B. (2013). “Sistema esquelético” en “Principios de anatomía y fisiología”. Panamericana ed.

28. Instrucciones para la preparación y utilización de Kit de Tinción de Gram. Britania Lab. Buenos Aires, Argentina.

29. Proviotek – Productos y equipos biotecnológicos, S.A. de C.V. – Ensayos de viabilidad celular de Resazurina.

30. Murray P.R (2018). “Microbiología Médica Básica” primera edición, Elsevier, Barcelona, España, págs. 239-92.

31. Matus-Jiménez J., Flores-Fletes J.R. y Carrillo A. (2013). Protección de los tejidos cadavéricos expuestos a alta radiación gamma. Ortopédica Mexicana. 27(3) 182-189.

32. Obando Centeno J.C. (2018). Análisis de la adherencia epitelial alrededor de los pilares implantosoportados tras la utilización de diferentes protocolos de limpieza. Disponible en: (<http://hdl.handle.net/11268/7596>).