

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE OSSOS DE CÃES CONSERVADOS POR LONGO PERÍODO DE TEMPO NA GLICERINA A 98% À TEMPERATURA AMBIENTE, OBJETIVANDO A ENXERTIA ÓSSEA¹

Marco Antonio Gioso²
 Nilson Roberti Benites³
 Gabriela Kämpf⁴

Gioso MA, Benites NR, Kämpf G. Análise microbiológica de ossos de cães conservados por longo período de tempo na glicerina a 98% à temperatura ambiente, objetivando a enxertia óssea. *Acta Cir Bras* [serial online] 2002 Jul-Ago;17(4). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>.

RESUMO - Objetivo: Verificar crescimento de microorganismos em amostras de glicerina e ossos armazenados durante nove anos. **Métodos:** Realizou-se a análise microbiológica da epífise e da medula de ossos conservados na glicerina a 98%, bem como da própria glicerina que os contém. **Resultado:** O crescimento microbiano observado não foi estatisticamente significativo. **Conclusão:** A glicerina é um excelente meio para conservação de tecido ósseo por longo período de tempo.

DESCRIPTORIOS - Microorganismos. Glicerol. Ossos. Cão. Fratura. Medula. Epífise.

INTRODUÇÃO

A enxertia óssea de ossos homólogos na ortopedia veterinária é um meio seguro e de eleição na reposição de perdas e falhas ósseas em fraturas ou ressecções amplas. Para o procedimento cirúrgico de enxertia é necessário que os ossos para implante sejam previamente retirados do animal doador, sob rigorosa assepsia e preservados num meio adequado. Sabe-se que a glicerina é reconhecidamente um meio viável para esta finalidade, obtendo-se bons resultados na conservação de ossos e tecidos. Este trabalho visou pesquisar o crescimento de microorganismos no tecido ósseo e/ou na glicerina que o contém, armazenada durante um longo período de tempo, e identificá-los caso houvesse crescimento nos meios de cultura. Este estudo é fundamental para comprovar a viabilidade da implantação de bancos de ossos em hospitais veterinários, tendo em vista a enxertia óssea.

Fraturas de ossos em membros locomotores são freqüentes em pequenos animais. Fraturas cominutivas ou multifragmentares são os traumatismos que apresentam maior dificuldade de tratamento. Em geral, a osteossíntese nesses casos não apresenta boa evolução pós-operatória. No entanto, a enxertia óssea na ortopedia veterinária tem sido uma alternativa segura e de eleição na reposição de perdas e falhas ósseas¹. Para

isso torna-se necessário que os implantes homólogos sejam previamente retirados do animal doador e preservados em meio adequado².

Porém, há uma série de fatores limitantes na obtenção dos implantes ósseos: devido à grande variação dos tamanhos dos esqueletos dos animais, as possibilidades de se encontrar um doador que seja compatível com a conformação física do animal receptor diminui consideravelmente^{2,3}; também é difícil obter ossos de cães doadores imediatamente para a cirurgia de enxertia, pois é necessária a remoção total de perióstio e restos teciduais aderidos ao osso para que não haja rejeição ao implante⁴, procedimento que atrasaria consideravelmente o início da cirurgia. Além disso, é preciso que o método de preservação seja viável, de fácil utilização, baixo custo e que seja acessível a clínicas e ambulatórios cirúrgicos de pequenos animais⁴.

As intervenções cirúrgicas oncológicas, devido às suas ressecções amplas, freqüentemente tornam necessário o uso de osso para transplantação. O transplante autólogo poderia ser substituído por osso conservado, o que condiciona o cirurgião a previamente armazenar o osso preservado e transplantável, sendo a glicerina pura um bom método de manutenção deste tecido. Porém, não se sabia ainda se era possível manter durante

longo período de tempo os ossos conservados na glicerina, e além disso não se sabiam quais microorganismos eventualmente poderiam desenvolver-se nas amostras armazenadas por longos períodos de tempo^{2,3}.

Diversas técnicas têm sido desenvolvidas no intuito de se tornar possível a conservação dos tecidos ósseos por longos períodos de tempo. Dentre estas, a conservação em glicerina tem merecido destaque pois, além de ser um método acessível economicamente, não é necessário empregar a autoclavagem e tampouco o congelamento, técnicas que causam danos ao tecido ósseo, e prejudicam a formação de calo ósseo no pós-cirúrgico; além disso, não foi observada diferença considerável quanto ao crescimento de microorganismos na glicerina a 98% autoclavada e “in natura”, num período igual ou menor a 24 meses⁴, tampouco rejeição do organismo ao meio conservante na evolução pós-operatória.

OBJETIVO

Verificar o crescimento bacteriano e fúngico das epífises e da medula de ossos conservados na glicerina a 98%, bem como da própria glicerina que os contêm. Fazer a identificação dos microorganismos eventualmente encontrados em cada amostra. Analisar a viabilidade da implantação de um banco de ossos de cães conservados na glicerina à temperatura ambiente.

MÉTODOS

Amostra

Metacarpos (MC) e metatarsos (MT) de cães clinicamente saudáveis, removidos cirurgicamente de modo totalmente asséptico, estocados em frascos estéreis e preenchidos com solução de glicerina a 98%, conservados à temperatura ambiente e em ambiente fresco e seco, durante o período de nove anos. Os tubos de ensaio contendo os ossos estavam armazenados em recipiente cirúrgico de alumínio, e dispostos em 24 tubos contendo um osso cada, preenchidos com glicerina de modo que o osso esteja totalmente coberto, tampados com algodão; três tubos totalmente preenchidos com glicerina, sem nenhuma amostra de osso (pois foram utilizados em casos cirúrgicos), tampados com algodão; e três tubos contendo pequena quantidade de glicerina, não tampados com algodão (os ossos foram utilizados em casos cirúrgicos).

Há que se ressaltar que o algodão utilizado não era hidrofóbico, o que permitiu que parte da glicerina fosse absorvida por ele; isto permitiu maior contato com o meio externo e possibilitou, em tese, a contaminação das amostras.

Para referir-se a cada um dos grupos, foram utilizadas as seguintes siglas: **Tgo** (tubos fechados contendo fragmentos ósseos preservados na glicerina); **Tg** (tubos fechados preenchidos com glicerina que não contêm os fragmentos ósseos); **Tgc** (tubos preenchidos parcialmente pela glicerina e sujeitos à contaminação (abertos).

Análise Microbiológica

Três meios de cultura foram eleitos para se cultivar microorganismos: Agar-Sangue, Sabouraud e BHI. As placas de Agar-Sangue foram divididas em dois grupos: o primeiro, cultivado em meio aeróbico, e o segundo, cultivado em meio anaeróbico. As placas de ambos os procedimentos foram semeadas de forma semelhante.

Todas as placas que sofreram os procedimentos aeróbico e anaeróbico permaneceram na estufa a 37° C. As placas que sofreram procedimento anaeróbico foram dispostas em jarra de anaerobiose, com sachê gerador anaerobiose, cujo conteúdo reage com o oxigênio do meio produzindo água e tornando conseqüentemente a atmosfera anaeróbica. Somente as placas de Sabouraud permaneceram à temperatura ambiente, não foram à estufa. A leitura das placas e de seus respectivos meios de enriquecimento foi feita a cada 24 horas, por até cinco leituras consecutivas. A cada leitura, a jarra foi aberta e o gerador de anaerobiose substituído.

RESULTADOS

Ossos – Medula e Epífise

Ágar-Sangue em aerobiose: Medula: detectou-se crescimento de colônias bacterianas em duas das 24 placas: **tgo2** e **tgo11**. As duas amostras foram ressemeadas. Não houve crescimento de bactérias após a ressemeadura em ambas as amostras. A amostra **tgo11** foi ressemeada mais uma vez, e novamente microorganismos não foram identificados. **Epífise:** houve crescimento bacteriano em uma das 24 placas; uma colônia de *Staphylococcus* na placa **tgo3** foi identificada por Gram. **Ágar Sangue em anaerobiose:** Não foi verificado crescimento microbiano em medula, epífise e glicerina. **BHI:** Não foi verificada a turvação do meio em amostras de medula, epífise e glicerina. **Sabouraud:** Não foi verificado crescimento de colônias de fungos em medula, epífise e glicerina.

Glicerina

Ágar-Sangue em aerobiose: Foi observado crescimento de nove colônias puntiformes, brilhantes

e amarelas em placa **Tgc 29**; como de costume, realizou-se o procedimento de Gram, constatando-se a presença de bacilos gram positivos. Cabe dizer que este tubo encontrava-se aberto, sem fragmento ósseo, com glicerina em pouca quantidade e portanto sujeito à contaminação. **Ágar-Sangue em anaerobiose**: Não foi verificado crescimento microbiano em medula, epífise e glicerina. **BHI**: Não foi verificada a turvação do meio em amostras de medula, epífise e glicerina. **Sabouraud**: Não foi verificado crescimento de colônias de fungos em medula, epífise e glicerina.

Cálculos

Calculou-se a porcentagem de placas que continham microorganismos sobre o número total de placas, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1 - Porcentagens de isolamento de microorganismos das 30 amostras de glicerina, dentre elas 24 que continham fragmentos ósseos (Tgo) e seis que continham somente glicerina (Tg e Tgc).

	n	n'	%
Glicerina	30	1	0,00333%
Medula	24	2	0,08333%
Epífise	24	1	0,04166%

Onde

n = número considerado de amostras

n' = número de amostras onde houve isolamento microbiano

% = porcentagem (n/n)

Estes resultados demonstram que não há diferença estatisticamente significativa para $P < 0,05$.

Para a quantidade total de amostras (n=24) foi calculado o índice de concordância Kappa⁵:

Tabela 2 - Concordância de resultados entre as amostras de epífise e glicerina, analisada pelo índice de concordância Kappa.

Epífise	Glicerina	Positivo	Negativo	Total
Positivo	0	0	0	
Negativo	1	23	24	
	1	23	24	

Índice Kappa: 0,9583

Concordância: ótima

Tabela 3 - Concordância de resultados entre as amostras de medula e glicerina, analisada pelo índice de concordância Kappa.

Medula	Glicerina	Positivo	Negativo	Total
Positivo	0	0	0	
Negativo	2	22	24	
	2	22	24	

Índice Kappa: 0,9167

Concordância: ótima

Tabela 4 - Concordância de resultados entre as amostras de medula e epífise, analisada pelo índice de concordância Kappa.

Epífise	Medula	Positivo	Negativo	Total
Positivo	0	1	1	
Negativo	2	21	23	
	2	22	24	

Índice Kappa: 0,9167

Concordância: ótima

É preciso salientar que o cálculo de concordância através do índice Kappa foi calculado baseando-se no número de amostras de glicerina que continham osso (n=24). As amostras sem osso (n=6) foram semeadas com a finalidade de comparação com as amostras que continham ossos, e portanto não foram consideradas no cálculo.

DISCUSSÃO

Os índices de concordância Kappa mostram-nos que a concordância é ótima para todos os grupos de comparação. Este é um excelente resultado, visto que somente com a semeadura da glicerina já é possível avaliar-se a viabilidade do tecido ósseo. Isto significa que se o osso não estiver contaminado quando de sua estocagem, pode-se utilizar somente a cultura da glicerina para se avaliar a presença de microorganismos em medula e epífise, poupando-nos do trabalhoso procedimento de coleta de material de epífise e serragem do osso para coleta de medula óssea. Sobretudo, a simples manipulação dos ossos, por mais cuidadosa que seja, sempre introduz microorganismos contaminantes nas amostras. Questionou-se quais microorganismos desenvolver-se-iam eventualmente nas amostras conservadas por longo período de tempo⁶; pelo presente trabalho soube-se que o crescimento de microorganismos nas amostras conservadas há nove anos não é estatisticamente significante.

Em 1951, foram realizados experimentos com um banco de ossos preservados em solução aquosa de Timerosal, afirmando ser este um método de preservação simples, barato e asséptico¹; cremos, todavia, que a glicerina também é um meio de preservação simples, barato e asséptico, tal como o Timerosal o era, e o substitui com sucesso. É possível armazenar o banco de ossos imersos em glicerina à temperatura ambiente, não sendo necessário o congelamento e outros métodos lesivos^{7,8,9}; esta é outra vantagem da utilização da glicerina, pois armazenando-se à temperatura ambiente não há formação de cristais intra e extracelulares, além de alterações eletrolíticas deletérias às células e potencialmente destrutivas à matriz óssea. Seu efeito asséptico na conservação de tecido ósseo deve-se particularmente às suas propriedades físicas¹⁰, e portanto não há problema quanto ao fenômeno da resistência bacteriana, assim como ocorre atualmente com o Timerosal.

A esterilização permanece como o maior problema na enxertia, sendo freqüente a contaminação bacteriana, fúngica e viral³; devido a este fato diversos autores estudaram a viabilidade do óxido de etileno como meio de conservação de fragmentos ósseos^{4,11,12,13,14,15}. Porém, sua viabilidade é questionável após 32 semanas de estocagem¹³, sendo que o período máximo de estocagem aceitável é de seis a 18 meses^{2,3}. Pelo presente trabalho pôde-se constatar que a glicerina é capaz de conservar o tecido ósseo por um prazo de nove anos de armazenamento (108 meses aproximadamente), superando o óxido de etileno neste aspecto. Levando-se em consideração que o número de amostras positivas para crescimento microbiano é estatisticamente muito pequeno em comparação com as amostras negativas, deve-se considerar, portanto, a glicerina como um excelente meio de conservação de tecido ósseo, mantendo o tecido isento de microorganismos por um período de até nove anos.

Em 1991 foi verificada a desidratação do implante conservado no óxido de etileno, levando à perda de suas propriedades mecânicas¹²; no presente trabalho, verificou-se que glicerina estocada por nove anos impediu o ressecamento da medula contida no osso, o que nos leva a crer que a glicerina realmente possui propriedade protetora das células como também atua como um meio impermeável à evaporação da água, desde que não esteja em contato direto com o tecido medular.

A utilização de fragmentos esterilizados por raios ionizantes é muito onerosa¹⁶; cremos desta forma que a glicerina é muito acessível economicamente, e pode ser utilizada facilmente por hospitais e clínicas veterinárias com a finalidade de se montar um banco de ossos.

Excelentes resultados na reparação de fraturas com fragmentos ósseos conservados na glicerina a 98% foram obtidos². Nosso trabalho confirmou a viabilidade da utilização da glicerina por longo período de tempo, fato que vem acrescentar mais uma vantagem à utilização da glicerina em detrimento das outras técnicas de conservação de ossos.

Cabe comentar que os ossos continham suas medulas ósseas ainda íntegras, após nove anos de armazenamento na glicerina, e que estas preenchem todo o canal medular do osso. A coloração era rósea-pálida e não houve ressecamento, sendo possível aspirar seu conteúdo por vácuo com seringa descartável.

Um achado curioso ocorreu nas placas de Ágar-Sangue semeadas com conteúdo de medula óssea: a descoloração circunscrita à área semeada, causada por lise de hemácias do meio de cultura de Agar-Sangue por substância constituinte da medula óssea.

Tomando-se por base os dados finais, após nove anos de estocagem de ossos em glicerina, pode-se observar que não houve diferença significativa ($P < 0,05$) para isolamento de microorganismos. Portanto, consideram-se as amostras como sendo estéreis, e a glicerina um excelente meio de armazenamento de tecido ósseo.

CONCLUSÃO

Pelo presente trabalho pudemos comprovar que a glicerina é um excelente meio de conservação de tecido ósseo, viabilizando a implantação de um banco de ossos de cães pelo período de até nove anos de armazenamento.

AGRADECIMENTOS

Priscilla Anne Melville, Médica Veterinária responsável pelo Laboratório de Doenças Infecciosas, Bacteriologia e Micologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro e bolsa concedida.

REFERÊNCIAS

1. Reynolds FC, Oliver DR, Ramsey R. Clinical evaluation of the merthiolate bone bank and homogenous bone graft. *J Bone Jt Surg* 1951; 33: 873-7.
2. Pinto Jr HS. Utilização de enxertos ósseos homólogos preservados na reparação de fraturas cominutivas de ossos longos de cães [Tese – Mestrado]. FMVZ-USP; 1990.
3. Pinto Jr HS. Utilização de enxerto ósseo cortical homólogo preservado em tintura de iodo a 2% na reparação de fraturas cominutivas de ossos longos de cães [Tese - Doutorado]. FMVZ-USP; 1995.
4. Roe SC, Pijanowsky GJ, Johnson AL. Biomechanical properties of canine cortical bone allografts: effects of preparation and storage. *Am J Vet Res* 1988; 49(6): 873-7.

5. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33:159-74.
6. Marques A, Leite JBF, Marziona F, Giannotti FO, Moreira FA, Abrão FS, Gentil FC, Magrin J, Erlich DH. Osso homólogo conservado em glicerina: estudo experimental em cobaias. *Rev Paul Med* 1980; 95:14-9.
7. Bloomberg MS, Cring RL, Born F. Frozen diaphyseal bone allografts combined with external pin splintage in small animal orthopedic surgery. *J Am Anim Hosp Assoc* 1984; 20: 393-402.
8. Hart MM, Campbell ED, Kartub MG. Bone banking: a cost effective method for establishing community hospital bone bank. *Clin Orthop Res* 1984; 206: 295-300.
9. Schena CJ, McCurning DM. The use of fresh cortical and cancellous allografts in the repair of fractured femur in a dog: a case report. *J Am Anim Hosp Assoc* 1983; 19: 252-8.
10. Schneider U, Mazur, P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology* 1984; 21(1):68-73.
11. Johnson AL, Moutray M, Hoffman WE. Effect of ethylene oxide sterilization and storage conditions on canine cortical bone harvested for banking. *Vet Surg* 1987;16(6):418-22.
12. Johnson AL, Eurell JAC, Schaeffer DJ. Evaluation of canine cortical bone graft remodelling. *Vet Surg* 1992; 21(4): 293-8.
13. Phillips L, Parker RB, Bloomberg MS. Cortical bone allografts. *Comp Cont Educ Pract Vet* 1988;10(10):1167-76.
14. Tshamala M, Bree HV, Mattheeuws D. Biomechanical properties of ethylene oxide sterilized and cryopreserved cortical bone allografts. *Vet Comp Orthop Traumat* 1994; 7(1):25-30.
15. Wagner SD, Manley PA, Radasch RM, Haynes JS. Failure of ethylene oxide-sterilized cortical allografts in two dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 1994; 30:181-9.
16. Chadiou G, Bardet JF, Morin M. Résultats de l'utilisation dun nouveau greffon osseux (T650) em chirurgie orthopédique et traumatologique vétérinaire. *Prat Méd Chir* 1992; 27 (3):235-49.

Gioso MA, Benites NR, Kämpf G. Microbiology analysis of dog bones stocked for long period of time on glycerin 98% at room temperature, aiming allograft bone surgery. *Acta Cir Bras [serial online]* 2002 Jul-Aug;17(4). Available from URL: <http://www.scielo.br/acb>.

ABSTRACT - Objective: verify the microorganism growth in bone plus glycerin samples stocked for at least nine years. **Methods:** microbiology analysis of epiphysis and bone marrow stocked at glycerin 98% was done. **Results:** No statistically significant growth was verified. **Conclusion:** This result means that glycerin is an excellent bone conservation substance for long periods of stockage.

KEY WORDS - Microorganism. Glycerol. Bones. Dog. Fracture. Marrow. Epiphysis.

Conflito de interesse: nenhum
 Fonte de financiamento: FAPESP

Endereço para correspondência:

Marco Antonio Gioso
 Rua Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87
 05508-900 São Paulo - SP
 Tel.: (11) 3091-1205
 Fax: (11) 3091-1211
maggioso@usp.br

Data do recebimento: 16/04/2002
 Data da revisão: 03/05/2002
 Data da aprovação: 28/05/2002