

# Scientific Evidence

## INACTIVACIÓN DE LA CARGA VIRAL EN BIOMATERIALES HETERÓLOGOS DE ORIGEN EQUINO

Evaluación de la eficacia del proceso de producción Bioteck en la inactivación de la carga viral en sustitutos óseos y membranas de origen heterólogo.

El injerto óseo es un procedimiento común en cirugía regenerativa. Como alternativa al uso de tejido óseo autólogo u homólogo, se pueden utilizar sustitutos óseos heterólogos (de origen animal), que a menudo se utilizan junto con membranas protectoras, también heterólogas. Los sustitutos óseos heterólogos tienen una morfología y composición mineral similares a las del tejido humano y presentan otras ventajas entre las que cabe mencionar la amplia disponibilidad y un precio no excesivo. Al igual que para los tejidos homólogos (derivados de donantes humanos), la ausencia de posibles contaminaciones microbianas y virales también debe ser garantizada para los tejidos de origen animal. A esto se añade, solo para los biomateriales heterólogos, la eliminación de posibles antígenos. Bioteck, para la producción de sus sustitutos óseos y membranas utiliza el exclusivo proceso enzimático Zymo-Teck, que logra eliminar el riesgo antigénico de los tejidos de origen animal, manteniendo la temperatura de procesamiento siempre por debajo de 60 °C.

Una de las fases iniciales de Zymo-Teck prevé el uso de peróxido de hidrógeno en concentraciones controladas, un tratamiento que logra inactivar los microorganismos. La esterilización terminal por irradiación beta (electrones acelerados) garantiza la esterilidad del producto. Mientras que la ausencia de posibles contaminaciones bacterianas o fúngicas es verificada por la validación del proceso de esterilización (obligatoria por ley y realizada de acuerdo con normas internacionales específicas), la evaluación de la efectiva inactivación viral debe realizarse por separado. El estudio descrito en este ficha<sup>1</sup> tiene como finalidad comprobar la eficacia del tratamiento con peróxido de hidrógeno y de la esterilización terminal con rayos beta en la inactivación de posibles contaminaciones virales del tejido animal de origen.

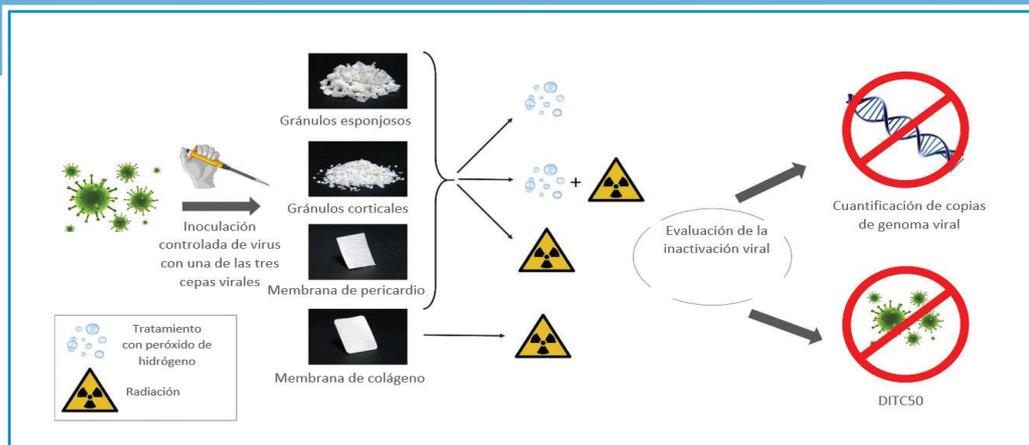
1. Cusinato, Pacenti, et al. Effectiveness of hydrogen peroxide and electron-beam irradiation treatment for removal and inactivation of viruses in equine-derived xenografts. *J Virol Methods*, 232, 39-46 (2016).

### Materiales

El estudio publicado en 2016 en el *Journal of Virological Methods*<sup>1</sup>, ha probado la eficacia de los tratamientos con peróxido de hidrógeno y/o de irradiación con electrones acelerados en la inactivación y en la reducción de la carga viral en los siguientes biomateriales de origen equino: gránulos de hueso cortical y de hueso esponjoso (Bio-Gen/Osteoplant, Bioteck), membrana de colágeno (Biocollagen, Bioteck) y membrana de pericardio (Heart, Bioteck).

Los sustitutos óseos en gránulos se obtienen mediante

la aplicación del exclusivo proceso de desantigenización Zymo-Teck, que emplea una mezcla de enzimas líticas a temperaturas controladas para eliminar los componentes antigénicos y, al mismo tiempo, preservar las propiedades físicas y morfológicas del tejido óseo inicial. La membrana Biocollagen se obtiene a partir de colágeno extraído del tendón de Aquiles mientras que la membrana Heart está hecha de pericardio y también es tratada con el proceso de desantigenización Zymo-Teck, que mantiene inalterada la estructura tridimensional.



**Fig. 1** - Esquema del protocolo seguido para determinar la eficacia de la inactivación de la carga viral en biomateriales heterólogos de origen equino con peróxido de hidrógeno y/o irradiación beta.

TRATAMIENTO CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	DITC <sub>50</sub>	HSV-1		H1N1		Cox-B1	
		% Inactivación viral	Reducción (logs)	% Inactivación viral	Reducción (logs)	% Inactivación viral	Reducción (logs)
Gránulos corticales	DITC <sub>50</sub>	100,00	4,64	100,00	6,00	100,00	6,47
	Copias	99,99	7,71	100,00	8,62	100,00	6,92
	ADN						
Gránulos esponjosos	DITC <sub>50</sub>	100,00	4,64	100,00	6,00	100,00	6,47
	Copias	100,00	8,81	100,00	8,62	100,00	6,92
	ADN						
Membrana de pericardio	DITC <sub>50</sub>	100,00	4,64	99,99	6,00	100,00	6,47
	Copias	99,99	4,54	99,99	4,58	99,98	3,69
	ADN						

**Tab. 1** - Inactivación viral después del tratamiento con peróxido de hidrógeno.

# INACTIVACIÓN DE LA CARGA VIRAL EN BIOMATERIALES HETERÓLOGOS DE ORIGEN EQUINO



## Resultados

Gránulos de hueso cortical y esponjoso, membranas de colágeno y de pericardio, todos de origen equino, fueron infectados con tres virus humanos diferentes análogos a patógenos equinos y que representan las diferentes clases virales existentes en la naturaleza: Coxsackievirus B1 (Cox-B1), virus de la gripe A subtipo H1N1, y virus del Herpes simplex tipo 1 (HSV-1). La selección de los virus y los análisis posteriores siguieron las directrices indicadas por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU.)<sup>2</sup>.

Los gránulos óseos y la membrana de pericardio fueron tratados con peróxido de hidrógeno durante 24 horas y/o esterilizados mediante irradiación con electrones acelerados. La membrana de colágeno fue sometida solo a irradiación para replicar correctamente el proceso de producción. Después de cada tratamiento (y combinación de tratamientos), la eficacia de la inactivación viral se evaluó mediante dos métodos: la cuantificación del número de copias de genoma viral residual a través de Quantitative Real-Time PCR (qPCR) y mediante el método conocido como DITC<sub>50</sub>, que evalúa la vitalidad del virus mediante el análisis de la capacidad de este último de infectar al menos el 50 % de las células puestas en contacto con el mismo (Figura 1).

El tratamiento con peróxido de hidrógeno condujo a la inactivación viral en todos los materiales comprendida entre el 99,98 % y el 100 % (Tabla 1). El tratamiento con solo radiaciones fue menos eficaz en la reducción del número de copias de genoma viral (entre 57,3 % y 96,90 %), pero igualmente eficaz en eliminar la infectividad viral (entre 99,99 % y 100 % en todos los biomateriales probados) (Tabla 2). Por último, la combinación de los tratamientos llevó a la inactivación de la carga viral a valores cercanos al 100 % para todos los materiales probados (Tabla 3).

La eficacia de los tratamientos siempre fue superior a los valores mínimos de seguridad indicados por las directrices de la FDA (DITC<sub>50</sub> menos  $\geq 4$  logs).

Los resultados de este estudio indican cómo el proceso de producción Bioteck es eficaz en la desactivación de potenciales agentes virales de biomateriales de origen animal y que, por tanto, pueden utilizarse teniendo la seguridad de la ausencia de contaminantes patógenos de cualquier tipo.

2. Food and Drugs Administration Guidance for Industry. Q5A Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin. Federal register.

TRATAMIENTO DE RADIACIONES DE RAYOS DE ELECTRONES		HSV-1		H1N1		Cox-B1	
		% Inactivación viral	Reducción (logs)	% Inactivación viral	Reducción (logs)	% Inactivación viral	Reducción (logs)
Gránulos corticales	DITC <sub>50</sub>	100,00	6,38	99,99	4,20	100,00	6,77
	Copias	80,89	0,71	89,68	0,99	84,79	0,82
	ADN						
Gránulos esponjosos	DITC <sub>50</sub>	100,00	6,38	99,99	4,20	100,00	6,77
	Copias	93,93	1,21	91,97	1,19	96,90	5,51
	ADN						
Membrana de pericardio	DITC <sub>50</sub>	100,00	6,38	100,00	6,47	100,00	6,77
	Copias	57,3	0,37	81,97	0,74	60,48	0,41
	ADN						
Membrana de colágeno	DITC <sub>50</sub>	100,00	6,38	99,99	4,20	100,00	6,77
	Copias	61,8	0,41	83,61	0,78	84,76	0,82
	ADN						

**Tab. 2** - Inactivación viral obtenida por irradiación beta.

TRATAMIENTO COMBINADO CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO E IRRADIACIÓN		HSV-1		H1N1		Cox-B1	
		% Inactivación viral	Reducción (logs)	% Inactivación viral	Reducción (logs)	% Inactivación viral	Reducción (logs)
Gránulos corticales	DITC <sub>50</sub>	100,00	6,47	100,00	6,47	100,00	6,87
	Copias ADN	100,00	8,90	100,00	8,75	100,00	6,67
Gránulos esponjosos	DITC <sub>50</sub>	100,00	6,47	100,00	6,47	100,00	6,87
	Copias ADN	100,00	8,90	100,00	8,75	100,00	6,67
Membrana de pericardio	DITC <sub>50</sub>	100,00	6,47	100,00	6,47	100,00	6,87
	Copias ADN	99,99	5,10	99,99	6,34	100,00	6,67

**Tab. 3** - Inactivación viral obtenida después del tratamiento combinado con peróxido de hidrógeno e irradiación beta.



Visite [www.bioteckacademy.com](http://www.bioteckacademy.com) para otras fichas clínicas y para acceder a literatura científica siempre actualizada.