



Técnicas de manipulación/preservación para tejidos blandos: Descontaminación, descelularización, liofilización

Dra. Marisa Pérez, Dr. Vicente Mirabet, Dra. Elba Agustí

Banco de Células y Tejidos de la Comunidad Valenciana



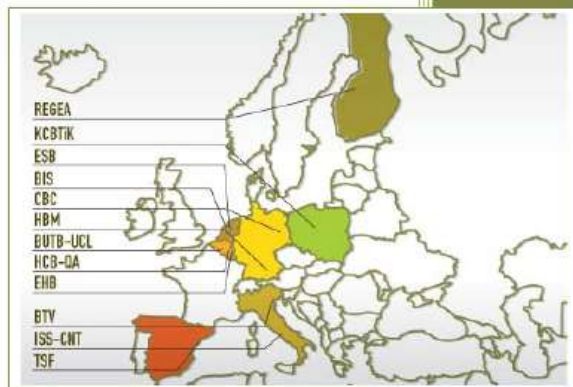
**Gestión de la Autosuficiencia
de Tejidos (Módulo II):
Procesamiento de Tejidos**

14-15 de Noviembre 2019
(Palma de Mallorca)

[INSCRIPCIÓN](#)

EURO-GTP

Euro GTP Guidance



European Union Project in the
framework of the Public Health
Program

Agreement number:

2007 207

Coordinator:

Transplant Services Foundation

Contaminación: inclusión accidental o crecimiento de microorganismos dañinos (bacterias, hongos, levaduras, virus, priones, protozoos) o sus toxinas o subproductos.

Contaminación: inclusión accidental de impurezas de naturaleza química o microbiológica, o sustancia extraña, durante el procesamiento, toma de muestras, envasado, almacenamiento o transporte.

Descontaminación: proceso que reduce el nivel de carga microbiana hasta eliminar el riesgo de transmisión de la infección.

Desinfección: proceso que elimina la mayoría de los microorganismos patógenos, pero no necesariamente destruye todas las formas microbianas, como esporas.

Esterilización: proceso que elimina todos los microorganismos, incluyendo un elevado número de endosporas bacterianas. SAL 10^{-6} .

DESINFECCIÓN

- **Nivel alto:** destrucción de virus, bacterias vegetativas, hongos, micobacterias y algunas, pero no todas, esporas bacterianas.
- **Nivel intermedio:** destrucción de micobacterias, bacterias vegetativas, esporas fúngicas y algunos virus no lipídicos.
- **Nivel bajo:** eliminación de la mayoría de las bacterias (excepto micobacterias y esporas bacterianas) y virus (excepto algunos no lipídicos), y algunos hongos.

Spaulding Classification. 1972



Centers for Disease Control and Prevention
CDC 24/7: Saving Lives, Protecting People™



**UN TEJIDO HUMANO PARA TRASPLANTE NUNCA
TENDRÁ LA CONSIDERACIÓN DE PRODUCTO
ESTÉRIL SI NO HA SIDO SOMETIDO A UN
PROCESO DE ESTERILIZACIÓN DEBIDAMENTE
VALIDADO.**

CONTAMINACIÓN-FACTORES DE RIESGO

CONTAMINATION OF BONE ALLOGRAFTS

ANALYSIS OF INCIDENCE AND PREDISPOSING FACTORS

R. L. M. DEJKERS, R. M. BLOEM, P. L. C. PETIT,
R. BRAND, S. B. W. VEHEMEYER, M. R. VEEN

J Bone Joint Surg [Br] 1997;79-B:161-6.

Table II. The effect of various factors on the relative risk of graft contamination with *low* pathogenic organisms (see Table I) estimated by odds ratios

Factors	Contamination of grafts*		Logistic regression†		
	No	Yes	Odds ratio	95% CI	p value
Traumatic cause of death					0.39
No (n = 158)	767	802	(1)		
Yes (n = 42)	176	197	1.3	0.7 to 2.2	
Preceding procedure					0.27
No (n = 100)	490	461	(1)		
Organ (n = 58)	263	326	0.9	0.5 to 1.5	
Heart valve (n = 42)	190	212	1.5	0.9 to 3.1	
Time since death					0.002
Per 1 hr increase			0.93	0.9 to 1.0	
Team members					0.001
3 (n = 5)	34	13	(1)		
4 (n = 90)	456	391	1.6	1.2 to 2.5	
5 (n = 90)	387	483	2.4		
6 (n = 15)	66	112	3.7		
Procurement duration					0.42
Per 1 hr increase			1.3	0.7 to 2.5	
Type of graft					0.004
Humerus	84	97	(1)		
Radius	18	6	0.4	0.1 to 1.2	0.29
Femur	320	313	0.9	0.6 to 1.4	0.81
Tibia	190	204	1.0	0.6 to 1.6	0.68
Fibula	150	126	0.8	0.5 to 1.2	0.36
Pelvis	65	73	1.1	0.6 to 2.0	0.30
Achilles tendon	87	145	1.6	1.3 to 3.4	0.004
Blood contamination‡					0.85
No (n = 160)	755	814	(1)		
Yes (n = 26)	121	112	0.9	0.6 to 1.6	
Antibiotic rinse					0.02
No (n = 50)	191	260	(1)		
Yes (n = 150)	752	739	0.5	0.2 to 0.8	

* 57 of 1999 grafts were contaminated with high pathogenic organisms; these were not included in this analysis

† with random-effect to account for graft-within-donor structure; all estimated effects (expressed by the odds ratios) are adjusted for each other in a multivariate analysis

‡ blood sampling not performed for 14 donors; = 140 grafts

CONTAMINACIÓN-FACTORES DE RIESGO

- **EXTRACCIÓN:**

- ✓ Donante con infección activa
- ✓ Donación previa de órganos
- ✓ Número de miembros y experiencia del equipo
- ✓ Instalaciones y material quirúrgico
- ✓ Toma de muestras

- **PROCESAMIENTO:**

- ✓ Formación del personal
- ✓ Instalaciones y material
- ✓ Toma de muestras

- **ALMACENAMIENTO:**

- ✓ Integridad de los recipientes

- **TRASPLANTE:**

- ✓ Protocolos de descongelación, lavado o rehidratación
- ✓ Número de miembros y experiencia del equipo
- ✓ Instalaciones y material quirúrgico

DESINFECCIÓN

Solución de Antibióticos: hay tantos protocolos diferentes como bancos de tejidos.

- ✓ El propio tejido adquiere cierto potencial antimicrobiano al absorber estos productos.

A la hora de diseñar una combinación de antibióticos hay que asegurar una cobertura de amplio espectro y sinergismo antimicrobiano, evitando antagonismos.



Cardiovascular tissue banking in Europe

T.M.M.H. de By¹, R. Parker¹, E.M. Delmo Walter², R. Hetzer^{1,2}

¹Foundation of European Tissue Banks, Berlin; ²Deutsches Herzzentrum Berlin.

HSR Proceedings in Intensive Care and Cardiovascular Anesthesia 2012; 4(4): 251-260

Bancos de tejidos: 17

Origen: Europa

Combinaciones de antibióticos: 17

Temperatura de incubación: entre 2 y 37°C

Tiempo de incubación: entre 2 y 72 horas

International Heart Valve Bank Survey: A Review of Processing Practices and Activity Outcomes

Wee Ling Heng,¹ Helmi Albrecht,² Paul Chiappini,³
Yeong Phang Lim,¹ and Linda Manning³

Journal of Transplantation
Volume 2013, Article ID 163150, 11 pages

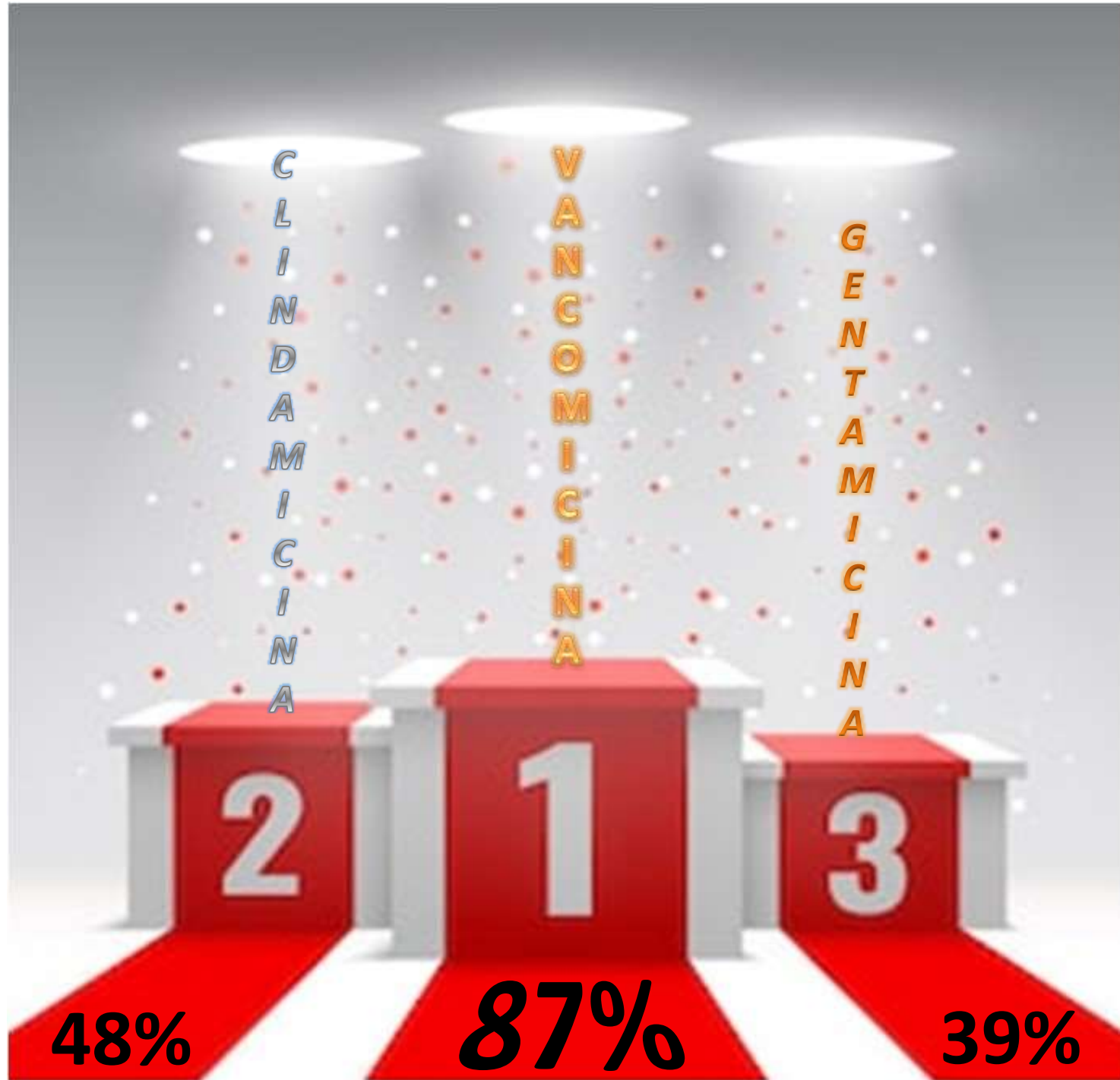
Bancos de tejidos: 17

Origen: Europa (11) y USA (6)

Combinaciones de antibióticos: 17

Temperatura de incubación: entre 2 y 37°C

Tiempo de incubación: entre 2 y 24 horas



POLIMIXINA
CEFOXITINA
26%

DESINFECCIÓN/ESTERILIZACIÓN-AGENTES QUÍMICOS

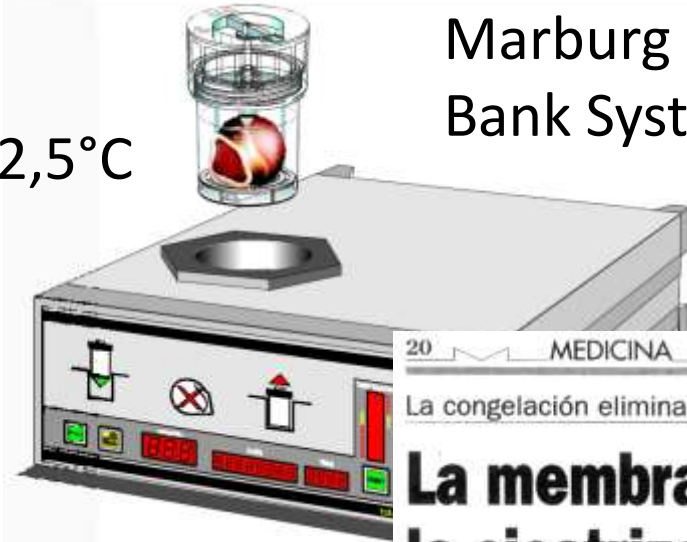
ALCOHOLES	ALDEHÍDOS	COMPUESTOS DE CLORO	YODÓFOROS
Acohol etílico 70° Alcohol isopropílico	Formaldehído Paraformaldehído Glutaraldehído Calgocide 14 Cidex Vespore	Clorhexidina Hipoclorito sódico Clorox Cloramina T Purex	Betadine Povidona
Nivel Intermedio	Nivel Intermedio-Alto	Nivel Intermedio	Nivel Bajo-Intermedio

OXIDANTES	COMPUESTOS FENÓLICOS	COMPUESTOS DE AMONIO CUATERNARIO
Peróxido de Hidrógeno Ácido Peracético Trifectant Virkon S Oxy-Sept	One- Stroke Environ Pheno-Tek II Tek-Trol Lysol	Hi-Tor Roccal DiQual Parvosol Zepharin
Nivel Intermedio-Alto	Nivel Bajo-Intermedio	Nivel Bajo

DESINFECCIÓN/ESTERILIZACIÓN-TEMPERATURA

Marburg Bone
Bank System

82,5°C



Autoclave



20 MEDICINA

La congelación elimina el riesgo de transmisión de agentes infecciosos

La membrana amniótica favorece la cicatrización en la conjuntiva

Determinados procesos oculares presentan problemas de cicatrización que pueden solventarse con el empleo de membrana amniótica, con la que ~~se ha demostrado~~ ~~del Hospital~~

posee una experiencia de 100 casos. El especialista destaca las ventajas del procedimiento cuando se utiliza en las indicaciones concretas y asegura que la congelación elimina el riesgo de contagiar patógenos.

Protocolo de
Hospital Universitario
de A Coruña

- Lavado con agitación (10 min a 60°C)
- Centrifugación (15 min a 1.500 g)
- Pasteurización (90 min a 60°C)

ESTERILIZACIÓN-GASES

- Óxido de Etileno
- Plasma de Gas (Peróxido de Hidrógeno)
- Dióxido de Carbono Supercrítico
- Vapor a Baja Temperatura y Formaldehído

El **plasma de gas** se define como un cuarto estado de la materia que consiste en nubes de iones, electrones y neutrones creados por la aplicación de un campo eléctrico o magnético.

Un fluido **supercrítico** es una sustancia que se encuentra en condiciones de presión y temperatura superiores a su punto crítico (temperatura y la presión más elevadas a las que una sustancia puede existir como gas y como líquido en equilibrio).



DESINFECCIÓN/ESTERILIZACIÓN-RADIACIÓN

- Partículas gamma o haz de electrones.
- Ultravioleta.
- Microondas: 2 min a 800w .



ESTERILIZACIÓN-OTROS

BIOCLEANSE®
TISSUE STERILIZATION PROCESS



¿DESINFECCIÓN?/¿DESCONTAMINACIÓN?-LAVADO A PRESIÓN

¿Y la liofilización?



Guide to the quality
and safety of
TISSUES AND CELLS
for human application

El lavado puede ser utilizado para reducir la carga microbiana (pag 130).

TOMA DE MUESTRAS

Table 2.6.1.-3. – *Minimum number of items to be tested*

Number of items in the batch*	Minimum number of items to be tested for each medium, unless otherwise justified and authorised**
<i>Parenteral preparations</i> – Not more than 100 containers – More than 100 but not more than 500 containers – More than 500 containers	10 per cent or 4 containers, whichever is the greater 10 containers 2 per cent or 20 containers (10 containers for large-volume parenterals) whichever is less
<i>Ophthalmic and other non-injectable preparations</i> – Not more than 200 containers – More than 200 containers – If the product is presented in the form of single-dose containers, apply the scheme shown above for preparations for parenteral administration	5 per cent or 2 containers, whichever is the greater 10 containers
<i>Catgut and other surgical sutures for veterinary use</i>	2 per cent or 5 packages whichever is the greater, up to a maximum total of 20 packages
<i>Bulk solid products</i> – Up to 4 containers – More than 4 containers but not more than 50 containers – More than 50 containers	Each container 20 per cent or 4 containers, whichever is the greater 2 per cent or 10 containers, whichever is the greater
* If the batch size is not known, use the maximum number of items prescribed. **If the contents of one container are enough to inoculate the 2 media, this column gives the number of containers needed for both the media together.	

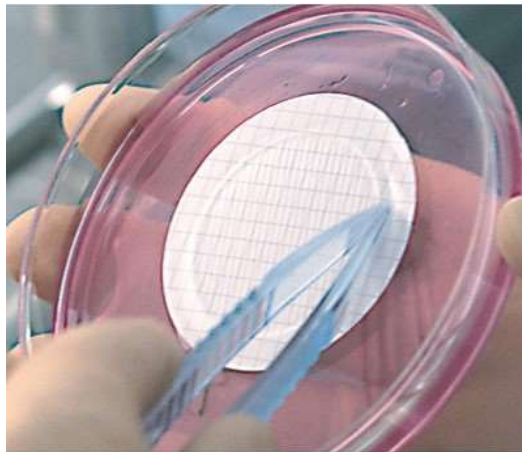
European Pharmacopoeia 8th Edition, chapter 2.6.1. Sterility, pp. 175–178.

U.S. Pharmacopeia, USP 36, chapter ,71. Sterility tests.

Muestra representativa $\cong 10\%$

TOMA DE MUESTRAS

- Frotado con hisopo.
- Fragmento tisular.
- Filtrado de soluciones (desinfectante, lavado, crioprotectora).



En el mejor de los casos, solo el 40% del total de los resultados positivos para el cultivo del tejido completo se correlacionaron con cultivos positivos también para el hisopado.

TABLE 1. Quantitative Discrepancies Between Culturing Samples by Means of Complete Culturing in BHI-Medium and by Means of Culturing Material Obtained by Swabbing

Fragmento de Peroné <i>Group 1</i>	<i>Group 3</i>		Hisopado Cortical y Medular <i>Group 2</i>		<i>Total</i>
	<i>Positive Outcome</i>	<i>Negative Outcome</i>	<i>Positive Outcome</i>	<i>Negative Outcome</i>	
Positive Outcome	27	42	7	62	69
Negative Outcome	0	6	0	6	6
Total	27	48	7	68	75

CLINICAL ORTHOPAEDICS AND RELATED RESEARCH
Number 300, pp. 259-263
© 1994 J. B. Lippincott Company

M. REMMELT VEEN, M.D., ROLF M. BLOEM, M.D., PH.D., AND PIETER L. C. PETIT, M.D.

Sensitivity and Negative Predictive Value
of Swab Cultures in Musculoskeletal
Allograft Procurement

Método	Ventajas	Inconvenientes
Calor	Simple, rápido, eficaz, alta penetración, sin residuos tóxicos.	Puede alterar las propiedades estructurales con temperaturas elevadas.
Radiación con partículas gamma	Alta penetración, eficaz, fácil de controlar, sin residuos tóxicos, baja temperatura	Puede alterar las propiedades estructurales con dosis elevadas, larga duración.
Radiación con haz de electrones	Fácil de controlar, sin residuos tóxicos, baja temperatura.	Puede alterar las propiedades estructurales con dosis elevadas, se requiere un acelerador de electrones, baja capacidad de penetración.
Radiación ultravioleta	Bajo coste, rápida, baja temperatura, , sin residuos tóxicos.	Puede alterar las propiedades estructurales con exposición larga, eficacia baja.
Gas plasma	Baja temperatura, rápido, seguro.	Puede alterar las propiedades estructurales, especies reactivas residuales.
Gas óxido de etileno	Eficaz, baja temperatura.	Puede alterar las propiedades estructurales, residuos tóxicos, inflamable, explosivo, carcinogénico.
Ácido peracético	Eficaz, baja temperatura.	Puede alterar las propiedades estructurales, entorno residual acidificado.
Etanol	Baja temperatura, bajo coste, simplicidad, sin residuos tóxicos, rápido, reduce tensión superficial.	Poca eficacia, puede alterar las propiedades estructurales.
Yodo	Baja temperatura, no altera las propiedades estructurales, rápido.	Puede afectara a las propiedades biológicas.
Dióxido de carbono supercrítico	Sin residuos tóxicos, inocuo, eficaz, no altera las propiedades biológicas ni estructurales.	
Antibióticos	Simplicidad, baja temperatura, bajo coste, presencia residual.	Poca eficacia, presencia residual.
Aldehídos	Simplicidad, bajo coste	Generan un colágeno reticulado que es más rígido, menos remodelable e incluso puede dar lugar a respuestas inmunológicas.

DESINFECCIÓN/ESTERILIZACIÓN-GESTIÓN DE RIESGOS

Carga microbiana

Grado de patogenicidad

Estatus del paciente receptor

Propiedades biológicas

Propiedades biomecánicas



Todos los procedimientos utilizados deben ser validados para garantizar que cumplen con la función asignada sin alterar las propiedades biológicas y biomecánicas que hacen al tejido clínicamente eficaz.





Señale la afirmación correcta:

- ☐ Un tejido descontaminado está desinfectado.
- ☐ Un tejido desinfectado está descontaminado.
- ☐ Las dos anteriores son válidas.
- ☐ Ninguna de las dos primeras es válida.

**Muchas
Gracias por
Vuestra
Atención**

