

## **Tesina del Máster Alianza 2013**

**Valoración del método de screening microbiológico y técnica de procesamiento del tejido osteotendinoso, en el Banco de Tejidos de la Coruña, con vistas a su aplicación en el BANTEC Ecuador.**

**Autor: Dr. Christian Luis Paz Soto**

**Tutor: Dr. Antón Fernández García**

**Dr. Jacinto Sánchez Ibáñez**

**España, A Coruña**

**2013**

## **DEDICATORIA**

Quiero dedicar este trabajo a Dios, amigo de largas jornadas, a mis Padres y Suegros por su preocupación y ayuda, a mi Esposa María Paola y mi hija Doménica razón de esfuerzo y perseverancia. Y a todas y cada una de las personas que creen en mí.

Quiero hacer un agradecimiento especial, a la Dra. Diana Almeida y el Dr. Fernando Orbe, ya que con su gran ayuda y Fe en mis capacidades, han hecho posible un paso más en mi carrera.

## AGRADECIMIENTO

Como ustedes saben este tipo de trabajos, es el esfuerzo tesonero y mancomunado de un equipo, que supo brindarme todo su apoyo y afecto, en cada parte del mismo. Gracias de todo corazón por hacerme sentir como en familia y parte del Banco de tejidos. Un agradecimiento especial al Dr. Jacinto Sánchez, Maestro y Amigo incansable durante todo este tiempo. Y no puedo dejar de lado el gran esfuerzo del equipo de trabajo del Banco de Tejidos de la Coruña muchas gracias.

Esther Rendal

Olvido Fernández

Inmaculada Miguez

Teresa Bermúdez

También quiero agradecer al Dr. Luis García por sus consejos, al Equipo de trabajo de la OCT.

Dr. Antón Fernández García

María Valentina López

Carmen Ferreiro

Un reconocimiento especial al Dr. Rafael Matesanz, a todo el grupo de la ONT y el Master Alianza, por darnos la oportunidad, de formar parte de este grupo selecto de coordinadores hospitalario, para así mejorar nuestros programas de donación.

Christian Luis Paz Soto

## ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN.....	4
2.- OBJETIVOS.....	14
3.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
4.- RESULTADO.....	16
5.- DISCUSIÓN Y/O CONCLUSIONES.....	20
6.- BIBLIOGRAFÍA.....	24

## INTRODUCCIÓN

Los Trasplantes y los Banco de Tejidos Humanos han experimentado un crecimiento impresionante, desde la creación del primer Banco de Tejidos de la Marina de los EEUU en el año de 1949 y posteriormente en los años 50 en países Europeos como Checoslovaquia, Polonia y Reino Unido, en España, la primera institución de esta clase que se tiene noticia, es el Banco de Huesos del Hospital Provincial de Madrid, creado por el profesor Sanchís Olmos en 1953, es decir, muy poco tiempo después de la creación del primer banco a nivel mundial. Dos años más tarde, se creó por Orden Ministerial, el Banco Nacional de Huesos, como una Sección del Instituto de Hematología y Hemoterapia. En él se preservaban, además de injertos óseos humanos, tejido óseo de origen bovino.

A partir de entonces se han ido creando multitud de bancos de tejido osteotendinoso, el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (1984), de la Clínica Universitaria de Navarra (1987) y del Hospital Clínic de Barcelona (1988). El 30 de Noviembre de 1994 se fundó la Asociación Española de Bancos de Tejidos. Pocos meses después, en Febrero de 1995, se creó el Banco de Tejidos Humanos del Hospital de A Coruña.

Inicialmente cada banco de tejido óseo desarrolló su propia metodología para el procesamiento de los aloinjertos que obtenía, no siendo hasta 1979 cuando el Grupo Musculo esquelético de la Sociedad Americana de Bancos de Tejidos, desarrolló la primera guía de procedimiento, con la finalidad de unificar criterios y conseguir unos estándares mínimos para asegurar la seguridad y efectividad de los aloinjertos

osteotendinosos. Aparecieron después actualizaciones de aquella guía (1991) así como manuales técnicos (AATB, 1992). Con objetivos similares se crean en Europa la Sociedad Europea de Bancos de Tejidos (EATB, 1991) y la Sociedad Europea de Trasplante Musculo esquelético (EAMST, 1992), publicando sus respectivos estándares en 1992.

Actualmente existe Banco de Tejidos en la mayoría de los países, lo cual proporciona grandes posibilidades terapéuticas.

La creciente demanda en la utilización de tejidos para trasplante, va de la mano con los avances técnicos y científicos, que no hacen más que facilitar los sistemas de control de los procesos, que se dan, desde la donación hasta su posterior trasplante, además se debe asegurar la calidad y la bioseguridad de todos los tejidos.

Este proyecto va encaminado a la valoración de los distintos métodos de screening microbiológicos y de pasteurización utilizados por el Banco de Tejidos de A Coruña desde el año 2003 al 2012, para su posterior implementación en el BANTEC Ecuador, que consta con procesamiento, mantenimiento de corneas y membrana amniótica, haciéndose necesario la ampliación en el procesamiento de Tejido Musculo esquelético.

Los Bancos de Tejidos son unidades que trabajan conjuntamente con los Organismos Nacionales de Trasplantes y Hospitales Trasplantadores, su funcionamiento es complejo por lo que se necesita un equipo multidisciplinario, que está a cargo de la obtención, procesamiento, mantención e implantación de los tejidos. Además participa, en la elaboración de protocolos, de procesamientos de tejidos, conforme lo dicta la ley

y los controles de calidad.

Para la selección del donante se debe realizar una exhaustiva revisión de la historia clínica del donante, una entrevista familiar completa en busca de hábitos inadecuados que contraindique la misma, valoración física y de laboratorio integra del donante.

Hay que tener en cuenta los criterios de exclusión del donante como son:

- La existencia de enfermedades sistémicas, neurológicas de origen indeterminado
- Presencia de factores de riesgo para HIV o Hepatitis
- La exposición a sustancias tóxicas.
- Riesgo de transmisión de enfermedades tumorales

A demás de los criterios de selección del donante de tejido musculo esquelético:

- Edad  $\leq$  a 65 años
- No enfermedades musculo esqueléticas ni reumáticas
- No presentar lesiones traumáticas del hueso a extraer

Una vez realizado los pasos anteriores, se procede a la extracción de los diferentes componentes anatómicos, que deben ser obtenidos en quirófano, bajo técnicas estrictas normas de asepsia. El equipo extractor debe seguir una serie de normas como doble guante, cambiando de guante externo con cada injerto y usar hoja de bisturí nueva con cada injerto. El Banco del CHUAC sigue las normas recomendadas de la AATB en el sentido de que debiera existir una muestra biológica, representativa en el momento de la extracción, mediante hisopado de toda superficie del injerto extraído.

Posteriormente los tejidos son enviados individualmente dentro de tres bolsas de polietileno, cerradas con abrazaderas plásticas y enviados a 4° C al Banco, concomitantemente con los tejidos se envía toda la información sobre el donante. El personal del banco revisa la integridad de los contenedores de los tejidos y la información sobre el donante, los injertos pasan al congelador de cuarentena de -80°C para su preservación hasta obtener todos los resultados de laboratorio y cultivos.

Todos los tejidos son procesado con técnicas estériles, bajo campana de flujo laminares en salas que disponen de filtrado de aire y presión positiva, material quirúrgico y de laboratorio estéril.

La técnica actualmente utilizada en el Banco de Tejidos de A Coruña para el procesamiento de tejidos, ha sufrido varias depuraciones a lo largo de su validación e implementación, anteriormente se realizaba un hisopado al final del procesamiento del hueso en el banco, luego un filtrado del último suero de lavado posterior al procesamiento del hueso en el banco y actualmente se realiza hisopado en la extracción quirúrgica, procesamiento del hueso, lavado bajo agitación mecánica enérgica en incubadora orbital, centrifugación, pasteurización y filtrado del último suero de lavado del tejido, mejorando notablemente la calidad y la biovigilancia de los injertos.

Esta técnica, para ser validada e implementada tuvo que pasar, los siguientes requerimientos:

- Segura desde el punto de vista de la transmisión de enfermedades infecciosas o de otra naturaleza



- Efectiva desde el punto de vista biológico
- Reproducible
- Superior a otros métodos conocidos
- Eficiente desde el punto de vista de la relación costo/beneficio

Esta técnica no solo permite la esterilización de los injertos sino también la eliminación de material hemático (sangre y medula ósea), proteico y lipídico del tejido osteotendinoso, ya que se ha demostrado en varios estudios que la remoción, de estos elementos mejoran el comportamiento biológico del injerto. La técnica fue objeto de la tesis doctoral del Dr. Luis García, traumatólogo responsable del banco de tejido osteotendinoso del Complejo Hospitalario universitario de A Coruña

## **PROCESAMIENTO DE TEJIDO OSTEOTENDINOSO.**

Los aloinjertos osteotendinosos son portadores de elementos celulares y humorales susceptibles de producir una reacción inmunitaria huésped contra injerto en el receptor. El contenido celular del injerto sufre fenómenos de necrosis isquémica desde el momento de su extracción o desde el momento del fallecimiento del donante; la duración de la isquemia y su carácter de fría o caliente determina cambios irreversibles en el interior del injerto en una doble vertiente: por una parte se produce deterioro de la matriz orgánica e inactivación de factores osteoinductores, por otra parte los fenómenos de necrosis favorecen la contaminación de los injertos. Todos estos fenómenos altamente nocivos para la calidad e incluso la supervivencia del injerto necesitan de la presencia de “agua libre en el interior del tejido. Que es uno de los

principales objetivos del procesamiento de los aloinjertos osteotendinosos. Los métodos de almacenamiento de los injertos osteotendinosos son:

- **Ultracongelación:** Por debajo de  $-80^{\circ}$  no existe agua libre en el estroma tisular (las moléculas de  $H_2O$  están inmobilizadas en forma de cristales de hielo). La ultracongelación es un excelente medio de preservación de injertos osteotendinosos.
- **Liofilización:** Aplicación de un procedimiento de congelación-deshidratación (sublimación del contenido en agua desde partículas de hielo sólido a vapor de agua). La deshidratación desde la fase de hielo sólido previene también la desnaturalización proteica que puede producirse durante el proceso de congelación aislado.
- El tercer método para inmobilizar el agua libre es la inmersión en fluidos con muy elevada concentración de solutos.

La incorporación de los aloinjertos osteotendinosos se consigue a través de mecanismos de osteoconducción y osteoinducción.

Desde el punto de vista de los fenómenos de osteoinducción, lo más importante es la preservación de la matriz ósea, compuesta por fibras colágenas y otras proteínas (proteínas de adhesión celular, osteocalcina, BMPs, etc.).

Desde el punto de vista de los fenómenos de osteoconducción, lo importante es mantener intacta la matriz ósea mineralizada, esto es, la estructura física del tejido óseo.

Existe evidencia de que la eliminación de ciertos componentes de la matriz orgánica de los aloinjertos mejora sus propiedades biológicas:

1. La eliminación del contenido en lípidos (Figura 1), material abundante especialmente en áreas metafiso-diafisarias, mejora la incorporación de los aloinjertos.



**Figura 1**

Grasa y médula ósea obtenidos tras la centrifugación de un cuerpo vertebral

2. La presencia de grasa en el interior de los aloinjertos puede dificultar la impactación de fragmentos de tejido esponjoso para relleno de cavidades.
3. La eliminación del contenido en proteínas libres disminuye el riesgo de transmisión de enfermedades vehiculadas por priones.
4. La reducción del contenido celular disminuye la capacidad inmunogénica de los aloinjertos y reduce la posibilidad de transmisión de patógenos intracelulares.

Por otra parte, la aplicación de bajas dosis de calor (hasta 60° C y hasta 10 horas) destruye bacterias y virus patógenos sin alterar las propiedades mecánicas ni la efectividad clínica.

La revisión exhaustiva de la bibliografía acerca de las tendencias actuales en cuanto a procesamiento de aloinjertos osteotendinosos, en particular los trabajos de Lomas, Gálea y Yates, permitieron crear un nuevo diseño en este campo de actividad donde, como ya se ha mencionado con anterioridad, existen unas normas básicas de obligado cumplimiento (normativa legal), pero también un amplio margen de posibilidades de mejora biológica y microbiológica de los aloinjertos para uso clínico.

Teniendo en cuenta la evidencia científica actual que indica la conveniencia de eliminar ciertos componentes de la matriz orgánica, parece igualmente evidente la necesidad de desarrollar la metodología necesaria para conseguir dicha mejoría biológica sin que la manipulación añadida traiga como consecuencia un incremento de la contaminación. La consecución de este equilibrio no es fácil, pero la investigación científica en este campo debe avanzar en esa línea:

1. Eliminar en lo posible el contenido en lípidos del interior de los aloinjertos.
2. Eliminar en lo posible el contenido en proteínas libres del interior de los aloinjertos.
3. Eliminar el contenido celular del interior de los injertos.
4. Conservar la fracción proteica con capacidades osteoinductoras.
5. Conservar la estructura mineral tridimensional del tejido óseo.
6. Conseguir, al final del procedimiento, un tejido libre de microorganismos transmisibles al receptor.

Por este motivo los autores del Reino Unido (Lomas, Yates y Gálea) desarrollaron una cadena de procedimientos consecutivos, incluyendo varios lavados, dos centrifugados, baño ultrasónico, etc., trece pasos en total con una duración superior a 24 horas, para garantizar la eliminación más completa posible de los elementos considerados nocivos. La dificultad para contar con un número suficiente de huesos para estudio, hizo que el trabajo del Dr. Lomas incluyese sólo 6 cabezas femorales, del mismo modo que el trabajo de los Dres. Yates, Thompson y Gálea, realizado con 24 cabezas femorales para estudio y otras 9 como control.

La primera conclusión que extraemos de sus estudios es que, del conjunto de procedimientos empleados, unos son mucho más efectivos que otros en la eliminación del contenido lipídico-proteico-celular.

La segunda conclusión importante es que, empleando la misma metodología, el porcentaje de peso total eliminado varía entre 29,1 % y 54,7 %.

El segundo de los interesantes estudios mencionados es el de los Dres. Yates, Thompson y Gálea. En este trabajo los autores comprueban, confirmando el trabajo del Dr. Lomas, que el procedimiento crucial de la eliminación es la centrifugación del tejido óseo.

Los trabajos de Yates, Lomas y Gálea demostraron que es posible eliminar la práctica totalidad del contenido celular y humoral del interior de los aloinjertos osteotendinosos, aunque para ello deba aplicarse un conjunto de procedimientos ciertamente complejo y

prolongado en el tiempo.

En la práctica es difícil o imposible establecer unos estándares en cuanto al contenido tisular y celular de un segmento óseo, dada la variabilidad existente no sólo entre distintos individuos sino incluso entre distintos fragmentos óseos de un mismo individuo. Por otra parte, la propia estructura física de cada segmento tiene mucho que ver en la facilidad o dificultad del proceso: los aloinjertos de hueso esponjoso de estructura más abierta como los cuerpos vertebrales, permiten una remoción del contenido humoral y celular fácil y rápida, muy distinta de otros huesos, también de predominio esponjoso pero mucho más denso, como el que compone un cóndilo femoral.

## **OBJETIVO GENERAL.**

- Valoración del tipo de screening microbiológico al final del procesamiento.
- Valoración de la técnica de procesamiento Pasteurización y posterior filtrado.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Del 2003 al 2012 se ha extraído tejido osteotendinoso de 218 donantes, de los cuales 194 han sido validados y 24 descartados por hemocultivos positivos, de estos 194 donantes el equipo de extracción ha realizado la ablación de 3279 injertos, descartándose para este estudio 344 injertos que solapaban varias de las técnicas utilizadas, por motivo de validación del método actual, dándonos un total 2935 para nuestro estudio.

Para obtención de los datos se utilizó los libros de registros y las historias de los donantes del Banco de Tejidos de la Coruña, y de la OCT de los años 2003 al 2012, se procesaron en una computadora Core i7, utilizando el sistema operativo Windows 7 Ultimate y el programa de estadísticas SPSS versión 20

El total de injertos estudiados son 2935, todos ellos cuentan con hisopado en la extracción distribuidos de la siguiente manera: 760 Hisopado en el Banco al final del procesamiento; 1194 Filtrado en el Banco y 981 /Pasteurizado Banco y más filtrado.

En el grupo de hisopado en el Banco cualquier resultado positivo, bien en la extracción o en el banco condicionaba su descarte. En el grupo del filtrado también cualquier resultado positivo tanto en la extracción como en el filtrado condicionaba su descarte.

En el grupo de filtrado tras la pasteurización, cualquier resultado positivo en el filtrado condicionaba su descarte, pero si en el hisopado de la extracción se encontraba algún germen contaminante como staphylococcus spp (no aureus, excepto S saprophyticus); anaerobios del tipo peptococcus, propionibacterium spp, peptostreptococcus; difteroides (corynebacterium); streptococos no neumococos grupo A; bacillus spp (no anthracis); lactobacillus spp; micrococcus; staphylococcus coagulasa negativo; streptococos anginosus/millieri; streptococo viridans; propionibacterium acnés y staphylococcus epidermidis y el resultado del filtrado era negativo el injerto se aceptaba para distribución de acuerdo a los resultados que se obtuvieron en la validación de la técnica.

Se comparan los diferentes métodos de screening microbiológico al final del procesamiento y la rentabilidad del método de pasteurizado y filtrado



## RESULTADOS

En la tabla 1 se encuentra el tipo de injertos, el número de cada uno y sus porcentajes.

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	cuerpo vertebral	1017	34,7	34,7	34,7
	Aquiles	138	4,7	4,7	39,4
	Medio HTH	337	11,5	11,5	50,8
	Tercio distal femur	71	2,4	2,4	53,3
	Tercio proximal tibia	77	2,6	2,6	55,9
	condilo	489	16,7	16,7	72,5
	meseta tibial	447	15,2	15,2	87,8
	costilla	2	,1	,1	87,8
	tibia entera	10	,3	,3	88,2
	Tercio medio tibia	23	,8	,8	89,0
	Tercio distal tibia	5	,2	,2	89,1
	Mitad distal femur	11	,4	,4	89,5
	Femur entero	18	,6	,6	90,1
	Mitad proximal tibia	13	,4	,4	90,6
	Tercio proximal femur	16	,5	,5	91,1
	Tercio medio femur	43	1,5	1,5	92,6
	cabeza femoral	1	,0	,0	92,6
	Mitad proximal femur	21	,7	,7	93,3
	metafisis	1	,0	,0	93,4
	cresta iliaca	188	6,4	6,4	99,8
	fascia lata	3	,1	,1	99,9
	hemidiafisis tibial	4	,1	,1	100,0
	Total	2935	100,0	100,0	

Los resultados de contaminación en el hisopado en la extracción tenemos que de los 2935 injertos, 2577 son negativos lo que supone 87.7% y 358 contaminados lo que supone 12.2%. Los gérmenes más frecuentemente encontrados fueron estafilococo coagulasa negativo 69.3%, le sigue propionibacterium acnés 7.5%, en la extracción se han determinado 26 clases distintas de gérmenes. Si los diferenciamos entre

contaminantes y patógenos observamos que los que podríamos denominar como contaminantes suponen el 91,6% de todos los resultados positivos, mientras que los patógenos fueron únicamente un 8,4 %. Los gérmenes más frecuentes encontrados en la extracción son los aerobios (88.8%), seguidos por los anaerobios (8.4%), siendo los menos frecuentes los hongos (2.8%).

Los resultados de contaminación en el hisopado en la extracción según tipo de injerto y germen tenemos, que el injerto más contaminado en la extracción es el fémur entero con un total de 18 piezas de las cuales, 13 son negativas que corresponden al 72.2% y 5 contaminadas que corresponde 27.8%.

Los cuerpos vertebrales presentaron un resultado positivo en la extracción en un 11,1 %, frente al resto de injertos que fue de un 12,8 % con una  $p=0,19$ . En ambos casos el patrón de tipo de gérmenes fue similar.

El hisopado del banco al final del procesamiento arrojó un resultado positivo en tan solo un 1,4 % de los injertos, siendo en su totalidad gérmenes aerobios. En tan solo un caso el germen podría ser considerado como un patógeno. El germen más común fue estafilococo coagulasa negativo en un 72.7% seguido del estafilococo aureus en un 9.1%, encontrándose 4 gérmenes distintos. Todos los injertos que presentaron un hisopado en el banco positivo, el hisopado en la extracción fue negativo y en ningún caso de los injertos con hisopado positivo en la extracción tuvo un resultado positivo en el banco al final del procesamiento.

El filtrado del último lavado al final del procesamiento en el banco fue positivo en el 11% de los injertos (131 injertos). Los gérmenes más frecuentemente encontraron

fueron estafilococo coagulasa negativo en un 45.8%, seguido propionibacterium acnés en un 30.5% y corynebacterium en un 8.4%, en el filtrado final se han determinado 16 clases distintas de gérmenes. El grupo de los aerobios fue igualmente el más frecuente con un 64,1 %, seguido de los anaerobios con un 30,5 % y los hongos con un 5,3 %. El 92,4 % de los gérmenes encontrados se podrían clasificar como contaminantes y tan solo un 7,6 % como patógenos. Los resultados de contaminación según tipo de injerto y germen tenemos, que el injerto más contaminado en el filtrado banco es el fémur entero con un 70 %, contaminados. Las piezas largas fueron en general las que mostraron mayor nivel de contaminación: mitad de tibia proximal con un 57,1 %, fémur entero tercio distal de fémur con un 28,6 %; tercio proximal de fémur con un 25 %, seguid del tendón de Aquiles con un 22,6%.

Cuando analizamos los resultados obtenidos con el hisopado en la extracción y el filtrado en el banco vemos que un 77,9% de los injertos que tenían un resultado positivo en el filtrado, el hisopado en la extracción fue negativo. Y tan solo un 22,1% con resultado positivo en el filtrado habían tenido un resultado positivo en el hisopado de la extracción.

En filtrado del último lavado posterior a la Pasteurización obtuvo un resultado positivo en tan solo un 1,9%. El germen más frecuentemente encontrado fue el hongo con un 31.6%, seguido del estafilococo coagulasa negativo con un 26.3% y el corynebacterium con un 15.8%, en el filtrado del ultimo lavado posterior a la pasteurización se han determinado 7 clases distintas de gérmenes. El 63,2% de los resultados positivos eran gérmenes del tipo aerobio, un 5,3% anaerobios y un 31,6 % hongos. Todos los gérmenes encontrados se podrían clasificar como contaminantes, no se encontró

ningún patógeno Los resultados de contaminación según tipo de injerto y germen tenemos, que el injerto más contaminado en el filtrado posterior a la Pasteurización es mitad de fémur proximal con un 28.6% seguido por el fémur entero 25 %.

El 89,5 % de los injertos que presentaron un cultivo positivo en el filtrado tras la pasteurización tenían un hisopado en la extracción negativo y un 10,5% de filtrados positivos si presentaban también un hisopado positivo en la extracción. Dicho de otra manera, tan solo un 1,2 % de los injertos con un hisopado en la extracción positivo tenían igualmente un filtrado tras la pasteurización positivo.

Los resultados entre gérmenes en hisopado extracción comparado con germen hisopado banco no se ha determinado coincidencia, así mismo en la comparación germen en hisopado extracción y germen en el filtrado del ultimo lavado del proceso, de los 29 casos se han determinado 15 coincidencias distribuidas así 11 con estafilococo coagulasa negativo, 2 con propionibacterium acnés, 1 con micrococus y 1 con hongo penicilinum, en la comparación germen en hisopado extracción y filtrado del ultimo lavado posterior a la pasteurización de los 2 casos se han determinado 1 coincidencia con estafilococo coagulasa negativo.

En los resultados de descarte por grupo de técnica, encontramos que en hisopado extracción - hisopado banco tenemos que de 760 injertos contaminados, 39 injertos fueron descartados lo que corresponde al 5.1% del total del grupo, de tal manera si estuviesen positivos alguna de las dos técnicas el injerto era objeto de descarte. En la técnica hisopado extracción - filtrado del ultimo lavado del proceso, de 1194 injertos contaminados, se descartaron 151 injertos que corresponde 12.6% del total del grupo,

a diferencia de la técnica anterior se descartaban solo los injertos que el cultivo salía positivo luego del filtrado o si en el hisopado se encontraba un germen patógeno de la lista antes descrita, en la técnica hisopado extracción – filtrado del ultimo lavado posterior a la pasteurización, de 980 injertos contaminados, se descartaron 21 injertos que corresponde al 2.1% del total del grupo, en este grupo se dio el menor descarte ya que si analizamos la técnica hisopado en la extracción – filtrado + pasteurización tenemos que del total de injertos contaminados 165 hubieran sido descartados solo por el hisopado en la extracción. De esta cifra 163 se realizó filtrado posterior y 2 fueron descartadas por gérmenes patógenos, de estos 163 injertos que se realizó filtrado más pasteurización se descartaron 2 por cultivos positivos es decir se validaron 161 injertos.

## **CONCLUSIONES:**

Según la AATB y la EATB, se aconseja disponer de una muestra microbiológica representativa en el momento de la extracción, siendo el hisopado el método más utilizado, pero no quiere decir que sea el mejor método, hay muchos estudios que analizan cuantos hisopados se debe realizar al momento de la extracción, sin llegarse a un consenso en cuanto a que número de hisopados habría que realizar para que sea una muestra real de todo el injerto. Otra técnica sería, tomar una muestra de tejido óseo y enviarla a laboratorio, pero no sería una muestra totalmente representativa de todo el tejido óseo en estudio.

Lo más importante es hacer un control microbiológico al final del procesamiento y tomar una decisión en función de si se dispone de métodos de decontaminación o métodos

de esterilización secundaria como puede ser la irradiación, lamentablemente este tipo de técnicas son costosas y de difícil disposición en todos los banco. Los bancos de tejidos deben minimizar al máximo el riesgo de transmisión de enfermedades a través de una selección cuidadosa, disponer de un método de procesamiento en condiciones que elimine al máximo los restos hemáticos y de celularidad y que asegure la ausencia contaminación cruzada.

Vemos que cuando se utilizó el hisopado como método de control microbiológico al final del procesamiento el porcentaje de contaminación fue llamativamente más bajo y no hubo ninguna correlación entre los gérmenes encontrados en el hisopado de la extracción y en el banco, lo negativo de esta técnica es que, si se encontraba algún germen contaminante o patógeno en cualquiera de las dos instancia era motivo de descarte ya que no se contaba con métodos de decontaminación o esterilización.

El siguiente método de screening microbiológico fue un filtrado del último lavado del injerto en el Banco. Vemos que en este grupo el porcentaje de positividad fue muy superior al utilizado con el hisopado y ya se encuentran cierta relación entre los gérmenes hallados en la extracción y en el filtrado. Este aumento en el porcentaje de positividad se debe a que es una técnica mucho más sensible y representativa de toda la superficie del injerto, como demuestra el estudio al haberse encontrado un mayor porcentaje de contaminación por hongos. Hoy en día debería ser la técnica de elección para el último control al final del procesamiento en todos los banco. Por contrapartida aumenta notablemente el descarte de los injertos si no hay un método secundario validado de esterilización.

Por ese motivo hace años que a raíz de la tesis Doctoral del Dr. Luis García, responsable del banco de tejidos osteotendinosos se sumó a esta técnica del filtrado la centrifugación y la pasteurización técnicas que permiten eliminar restos hemáticos, proteínicos y lipídicos, para disminuir el riesgo de transmisión de enfermedades y que permita recuperar injertos, que al no disponer de métodos de esterilización secundarios, se hubiera tenido que descartar con solo hisopado o solo filtrado. Lo negativo de esta técnica es que no se puede aplicar a los injertos tendinosos, ya que se alteraría la morfofisiología del mismo.

Los resultados muestran que con la pasteurización y el filtrado posterior se pudieron recuperar para su distribución el 16,4% del total de injertos de ese grupo un total de 161 injertos que de no ser por esa técnica y al presentar un hisopado en la extracción positivo pudieron distribuirse para su uso clínico sin ningún problema hasta la fecha.

Los resultados encontrados en cualquier de los métodos utilizados muestran que la gran mayoría son gérmenes que podrían entrar dentro de la categoría de contaminantes.

La extracción de cuerpos vertebrales casi duplica el volumen de tejido esponjoso que se puede obtener en una extracción. Una de las razones que se usa para justificar su no extracción es casi al estar en la cavidad abdominal, y al haberse realizado previamente la extracción de los órganos existe la probabilidad de mayor contaminación en el momento de la extracción. El estudio realizado muestra todo lo contrario, no solo no se contamina más sino algo menos aunque esa diferencia no es estadísticamente significativa.

Concluimos que el análisis de esta tesina demuestra que al no contar con métodos secundarios esterilización por sus costos, se puede utilizar esta técnica de Hisopado en el momento de la extracción y Pasteurizado con un filtrado del lavado al final del procesamiento:

- ya que es de fácil aplicación
- segura desde el punto de vista de la transmisión de enfermedades infecciosas o de otra naturaleza
- efectiva desde el punto de vista biológico, superior a otros métodos conocidos y
- eficiente desde el punto de vista de la relación costo/beneficio,
- además permite mantener toda la capacidad biológica de los injertos.



## **BIBLIOGRAFÍA:**

1. Selección del donante VI Curso de control y gestión de la calidad de las actividades de obtención, evaluación, procesamiento, almacenamiento, distribución y aplicación de tejidos humanos 4-7 febrero 2013 Dr. Antón Fernández García.
2. Aspectos generales en el diseño de Salas Limpias, Manuel Fernández Product Manager, Diciembre 2010.
3. Biobancos función y legislación Dra. Nieves Doménech, Directora Biobanco 2013.
4. BOE 2 de diciembre de 2011 Sec.I. pág 128434
5. Estándares AEBT. edición 2008
6. Komender J, Marczyński W, Tylman D. Therapeutic effects of transplantation of lyophilized and radiation sterilized allogenic bone. Clin Orthop Rel Res 1990; 272: 38–49.
7. Urist MR. Proteína morfogenética en la generación y regeneración del hueso. Rev Ortop Traum 1990; 34: 240-52.
8. Van P, Thevelein J. Determinants of freeze tolerance in microorganisms, physiological importance and biotechnological applications. Adv Appl Microbiol 2003; 53: 129. .
9. Lomas R, Drummond O, Kearney JN. Processing of whole femoral head allografts: a method for improving clinical efficacy and safety. Cell and Tissue Banking 2000; 1: 193–200.

- 10.**Paulos L et al. Comparative material properties of allograft tissues for ligament replacement: effects of type, age, sterilisation and preservation. *Trans Orthop Res Soc* 1987; 12: 129.
- 11.**Galea G, Kearney JN. Clinical effectiveness of processed and unprocessed bone. *Transfusion Medicine* 2005; 15: 165–74.
- 12.**Yates P, Thomson J Galea G. Processing of whole femoral head allografts: Validation methodology for the reliable removal of nucleated cells, lipid and soluble proteins using a multi-step washing procedure. *Cell Tissue Bank* 2005; 6: 277–85.
- 13.**Memoria presentada para optar al grado de Doctor Luis Antonio García Rodríguez Mayo 2010.
- 14.**Protocolo de procesamiento de tejido osteotendinoso banco de Tejidos de la Coruña 2012
- 15.**Real Decreto 1301 del 10 Noviembre del 2006 BOE. Noviembre del 2006