



ORGANIZACIÓN NACIONAL DE TRASPLANTES
MASTER ALIANZA 2017
COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE A CORUÑA
UNIDAD DE TERAPIA CELULAR



**DESARROLLO DEL MÉTODO DE SCREENING MICROBIOLÓGICO PARA
LA SELECCIÓN DE TEJIDOS PROCESADOS, BASÁNDOSE EN LOS
MODELOS UTILIZADOS POR LOS BANCOS DE TEJIDOS EN ESPAÑA.**

Autor: Fernando Pagnussato
Biomédico
Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Brasil

Tutor: Jacinto Sánchez Ibañez
Médico
Coordinador Autonómico de Trasplantes de Galicia
Responsable Establecimiento de Tejidos CHUAC

Madrid, marzo de 2017.

1- Introducción y/o antecedentes	03
1.1- Bancos de tejidos	03
1.2- Distribución de los bancos de tejidos en España	06
1.3- Legislación Española	06
1.4- Legislación Europea	07
1.5- Donación de tejidos	08
1.6- Procesamiento de tejidos	09
1.7- Principios de las pruebas microbiológicas	11
2- Material y métodos	13
2.1- Membrana amniótica	13
2.2- Tejidos musculoesqueléticos	16
3- Resultados	19
3.1- Membrana amniótica	19
3.2- Tejidos musculoesqueléticos	20
3.2-1. Huesos	20
3.2-2. Tendones	21
3.2-2.1. Tendones rotulianos	21
3.2-2.2. Tendones de aquiles	22
4- Discusión y/o conclusiones	23
5- Bibliografía y fuentes de datos	24

1- Introducción y/o antecedentes

1.1- Bancos de tejidos

Un "banco de tejidos" es un término comúnmente usado para describir un establecimiento que procesa y almacena tejidos humanos para uso clínico fundamentalmente y en ocasiones para investigación médica.

El uso creciente de tejidos y células para su utilización clínica y la investigación requiere terminología que ayudará a distinguir entre establecimientos que recogen y almacenan tejidos y células para cada uno de esos propósitos. Dentro de Europa, los términos actualmente en uso son establecimientos de tejidos y biobancos, respectivamente.

El término "biobanco" se utiliza regularmente para las unidades que almacenan muestras biológicas humanas para su uso en la investigación. En la actualidad no existe una definición internacionalmente aceptada de biobanco, pero el término se utiliza generalmente para aquellas colecciones de material biológico humano (sangre, tejidos, células, otros fluidos corporales, DNA, RNA, etc.) e para fines de investigación. En su glosario, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) define un biobanco como "una colección de material biológico y los datos e información asociados almacenados en un sistema organizado para una población o un gran subconjunto de una población.

En USA, el término "biorepository" se prefiere al biobank (biobanco). Por ejemplo, según el glosario del Instituto Nacional del Cáncer, un depósito biológico es: "una instalación que obtiene, cataloga y almacena muestras de material biológico, tales como orina, sangre, tejido, células, DNA, RNA y

proteína, de Humanos, animales o plantas para el laboratorio de investigación. Si las muestras son de personas, la información médica correspondiente también puede ser almacenada conjuntamente con las muestras para su posterior utilización junto con un consentimiento por escrito de la persona

Tras la publicación de la Directiva 2004/23 / CE relativa a los tejidos y las células de la UE, el término «establecimiento de tejidos» sustituyó en Europa a la clásica denominación de banco de tejidos, El establecimiento de tejidos se define como “banco de tejidos o unidad de un hospital u otro organismo donde las actividades de transformación, almacenamiento o distribución de tejidos y células humanos”. También puede ser responsable de la obtención o de los controles microbiológicos de los tejidos y células. En el campo de la tecnología de reproducción asistida (ART), el término establecimiento de tejidos se refiere a los laboratorios de los centros o clínicas de ART y a los bancos de gametos. Estos centros o clínicas a menudo también incluyen unidades clínicas en las que los pacientes son tratados.

En Estados Unidos, la Asociación Americana de Bancos de Tejidos (AATB) utiliza el término banco de tejidos para "una entidad que proporciona o participa en uno o más servicios que involucran tejido de personas vivas o fallecidas para propósitos de trasplante". Estos servicios incluyen igualmente evaluar la idoneidad de los donantes, la obtención, el procesamiento, el almacenamiento, el etiquetado y la distribución de tejidos.

En Brasil se utiliza el término banco de multitejidos para establecimientos de salud que, con la infraestructura física, equipamientos, técnicas y recursos humanos, tienen competencia sobre la detección de donantes, entrevista familiar, exámenes clínicos, físicos y sociales de los donantes de tejidos.

También son responsables de la extracción, identificación, transporte al banco, evaluación, procesamiento, envasado, almacenamiento y distribución de los tejidos del origen humana para uso terapéutico. Los bancos también pueden distribuir tejidos para investigación, docencia, capacitación, control de calidad o validación de procesos.

Algo también a tenerse en cuenta es que existen muchas diferencias entre el trasplante de órganos e los implantes de tejidos:

- El trasplante de órganos, en la mayoría das veces, es la única opción para el receptor, por eso salva vida. En general, en el caso de los tejidos humanos, puede existir una alternativa, como en vez de una valvula cardiaca humana utilizar una mecánica
- En el caso de los donantes de órganos, el tiempo desde la parada cardiaca hasta la extracción de los órganos (isquemia caliente) es cero en el caso de los donantes en muerte encefálica. En cambio en el caso de la extracción de los tejidos puede pasar hasta 24 horas si el cuerpo se ha mantenido a 4°C.
- Los órganos hay que implantarlos en un corto espacio de tiempo desde su extracción (isquemia fría), en el caso de los tejidos pueden permanecer en cuarentena hasta años, en función del método de almacenamiento escogido.
- Por todo ello, cuando se si la selección del donante de órganos permite algún margen de maniobra, asumiendo cierto riesgo, en el caso del donante de tejidos, el tiempo que hay para extraerlos, su almacenamiento y la posibilidad de otras opciones obliga a que el

receptor de un tejido se le someta a un riesgo lo mas reducido posible, obligando a una selección estricta del donante de tejidos

1.2- Distribución de los bancos de tejidos en España

Según los datos disponibles de la Organización Nacional de Trasplantes (ONT), actualmente en España hay 75 establecimientos de tejidos en 33 provincias para una población estimada de 46.524.943 personas.



1.3- Normativa española

El Real Decreto-ley 9/2014, de 4 de julio, establece las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos

y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos. Dicho Real Decreto lo que hace es trasladar a la legislación nacional la legislación europea que es de obligado cumplimiento para los países de la Union Europea

También es de aplicación la Orden SSI/2057/2014, de 29 de octubre, por la que se modifican los anexos III, IV y V del Real Decreto-ley 9/2014.

1.4- Legislación Europea

Los bancos de tejidos en Europa están sometidos a la Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 31 de marzo de 2004, que establece normas de calidad y de seguridad para la donación, obtención, evaluación, procesamiento, preservación, almacenamiento y distribución de células y tejidos humanos, y que comentábamos es de obligado cumplimiento dentro de la Union Europea

Posteriormente, la Directiva 2006/17/CE de la Comisión, de 8 de febrero de 2006, por la que se aplica la Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a determinados requisitos técnicos para la donación, la obtención y la evaluación de células y tejidos humanos.

En 24 de octubre de 2006, la Directiva 2006/86/CE de la Comisión aplica la Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a los requisitos de trazabilidad, la notificación de las reacciones y los efectos adversos graves y determinados requisitos técnicos para la codificación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos.

Ya la Directiva (UE) 2015/565 de la Comisión, de 8 de abril de 2015 modifica la Directiva 2006/86/CE en lo relativo a determinados requisitos técnicos para la codificación de células y tejidos humanos.

Y por fin, la Directiva (UE) 2015/566 de la Comisión, de 8 de abril de 2015 por la que se aplica la Directiva 2004/23/CE en lo que se refiere a los procedimientos de verificación de la equivalencia de las normas de calidad y seguridad de las células y los tejidos importados.

1.5- Donación de tejidos

Para garantizar niveles elevados de calidad y seguridad durante el proceso de obtención de tejidos, es recomendado que se establezca un sistema de calidad en la organización responsable de la obtención o en el establecimiento de tejidos encargado del proceso. Este sistema de calidad debe garantizar una formación adecuada de todo el personal involucrado, así como procedimientos operativos estándar escritos (SOP) que requieren documentar todas las etapas del proceso. Los profesionales de la obtención deben tomar medidas para asegurar que se han tomado todas las medidas de seguridad y calidad. La obtención de tejidos sólo puede tener lugar después de haberse cumplido los requisitos obligatorios de:

- los datos de información del donante y consentimiento de su familia para la donación.
- Evaluación de la historia clínica y del riesgo médico social.
- Evaluación física del donante.

- Realizar las pruebas de screening de los donantes necesarias para excluir la posibilidad de transmisión de enfermedades infecciosas causadas por bacterias, hongos, virus.

La extracción del tejido en sí, es extremadamente crítica debido al riesgo de contaminación por microorganismos. Los resultados que se encuentren en los exámenes microbiológicos posterior al procesamiento van a estar condicionados al cumplimiento o no de los protocolos durante la fase de extracción.

Es ampliamente reconocido que el frotis (swab) no es un método eficaz de muestreo de la superficie de los tejidos y que las pequeñas áreas obtenidas por las muestras con frecuencia no son representativas, aunque en el momento de la extracción ayudan a tener una visión del estado microbiológico del donante. Los métodos de determinaciones microbiológicas, el método usado etc, deben ser validados para demostrar la representatividad de la muestra y la idoneidad de los métodos seleccionados.

Por otro lado, los resultados de hemocultivos pueden ser herramientas muy útiles para ayudar a la determinación de la bacteriemia en los donantes de tejidos, si no se aplican métodos de esterilización secundarios.

1.6- Procesamiento de tejidos

El procesamiento de tejidos son todas las operaciones que intervienen en la preparación, manipulación, conservación y empaquetado de los tejidos o células destinados a la aplicación humana. El almacenamiento se produce en varias etapas desde la obtención hasta el uso clínico y debe ser controlado y

documentado para asegurar que las propiedades requeridas de los tejidos o células se mantienen durante el almacenamiento y que se evita la contaminación cruzada o la pérdida de trazabilidad.

La oportunidad de procesar tejidos y células supone grandes ventajas para un sistema sanitario. Los objetivos del procesamiento incluyen:

- a. Facilitar y optimizar el uso clínico aprovechando al máximo los tejidos donados para que puedan ser implantados en el mayor número posible de pacientes.
- b. Conservar las propiedades requeridas del material biológico, haciendo posible el almacenamiento extendido para un uso futuro;
- c. Reducir el riesgo de transmisión de enfermedades o reacciones adversas mediante la eliminación de aquellos elementos que no son necesarios para el éxito del trasplante, aplicando métodos de descontaminación, o inactivación o incluso la esterilización en circunstancias donde la viabilidad celular no es necesario para asegurar la no presencia de microorganismos.

El procesamiento incluye una serie de actividades tales como (pero no limitadas a) el corte, triturado, moldeado, centrifugación, inmersión en soluciones antibióticas o antimicrobianas, esterilización, irradiación, separación, concentración o purificación de células, filtración, liofilización, conservación de glicerol y criopreservación.

Aunque comporta grandes beneficios, el procesamiento también puede introducir riesgos. Los riesgos potenciales incluyen contaminación microbiana del medio ambiente o contaminación cruzada de otros tejidos o células, errores

en la identificación o etiquetado o que el propio procesamiento dañe al propio tejido obligando a su descarte.

Por estas razones, todos los procesos necesarios deben llevarse a cabo dentro de un sistema integral de gestión de calidad, deben ser documentados en procedimientos operativos estándar (SOP) y deben ser completamente validados para demostrar que la calidad y eficacia del producto final no se ha visto comprometida y que no se ha riesgos secundarios como la contaminación cruzada durante el procesamiento.

1.7- Principios de las pruebas microbiológicas

Se debe hacer todo lo posible para disponer de muestras microbiológicas representativas tanto del donante como del propio tejido. Es ampliamente reconocido que el frotis no es un método eficaz de muestreo de tejidos y que las pequeñas muestras de tejido con frecuencia no son representativas. Los métodos de muestreo y prueba deben ser validados para mostrar la representatividad de la muestra y la idoneidad de los métodos seleccionados. Existen varios procedimientos para asegurar el control microbiológico, tales como los métodos de descontaminación secundarios (antibióticos, o métodos fisicoquímicos). Algunos procedimientos de esterilización estándar, tales como esterilización por calor o filtración estéril, no son aplicables para preparaciones de tejidos y células en términos de esterilidad, pero si como procesos de descontaminación secundarios. Si se pretende aplicar métodos fisicoquímicos, estos procedimientos deben adaptarse al tipo de tejido o células y deben ser validados. La eficacia de un procedimiento de descontaminación o inactivación debe validarse para los microorganismos pertinentes en el tejido o en la

preparación celular en sí y no sólo en una solución acuosa. Algunos microorganismos pueden sobrevivir al tratamiento con antibióticos, pero no son detectados por pruebas microbiológicas debido a errores de muestreo (falsos negativos), y pueden recuperarse cuando las condiciones cambian.

Después de completar todos los pasos de procesamiento, se deben testar las muestras del producto final, si es posible, y los medios de cultivo de tejidos o células, soluciones de almacenamiento o conservantes que se hayan utilizado si procede. En casos excepcionales, si no es factible el muestreo del producto final, se puede utilizar una solución de almacenamiento de tejidos o de medio de cultivo celular, o de lavado para el examen microbiológico del producto final.

En la mayoría de los tejidos y células, incluidas las preparaciones que han sido descontaminadas, se procesan utilizando métodos de procesamiento abiertos. El procesamiento abierto es cualquier etapa de procesamiento en la cual los tejidos y células están expuestos a un medio ambiente en cualquier etapa entre la adquisición y el envasado, aunque se lleve a cabo bajo los requerimientos que marca la ley. En la Unión Europea los tejidos se tienen que procesar bajo un ambiente clase A (campana de flujo laminar), dentro de un entorno como mínimo clase D. Se pueden procesar bajo otro entorno si las características del tejido no permiten realizarlas en ese entorno o se usa un método de esterilización debidamente validado

En general, debe reducirse cualquier riesgo de contaminación del medio ambiente o consumibles utilizados durante el procesamiento abierto. Se espera que los requisitos para el muestreo y las pruebas microbiológicas sean los más estrictos en estas situaciones, y se deben mantener las condiciones asépticas durante la adquisición, el transporte y todo el proceso de fabricación.

Si el procesamiento abierto tiene lugar sin esterilización terminal, el muestreo y la evaluación microbiológica deben incluir el material de partida, la solución de transporte y las soluciones utilizadas para lavar tejidos y células (Farmacopea Europea, 2.6.1.). Además, el producto final debe ser probado para asegurar la calidad y la seguridad para el uso clínico

Para cada procedimiento, las pruebas aeróbicas y anaeróbicas deben realizarse en condiciones de incubación apropiadas para la detección de bacterias y hongos ambientales y clínicos, así como de células o tejidos (levaduras y mohos).

	Medio de cultivo	Temperatura de incubación	Período de incubación
Aerobios	Agar chocolate	20–25 °C	14 días
Anaerobios	Agar Schaedler con 5% de sangre de carnero	30–35 °C	14 días
Hongos	Agar Sabouraud con Gentamicina y Chloramphenicol	30–35 °C 25–30 °C	15 días (cresc. rápido) 20 días (cresc. lento)

2- Material y métodos

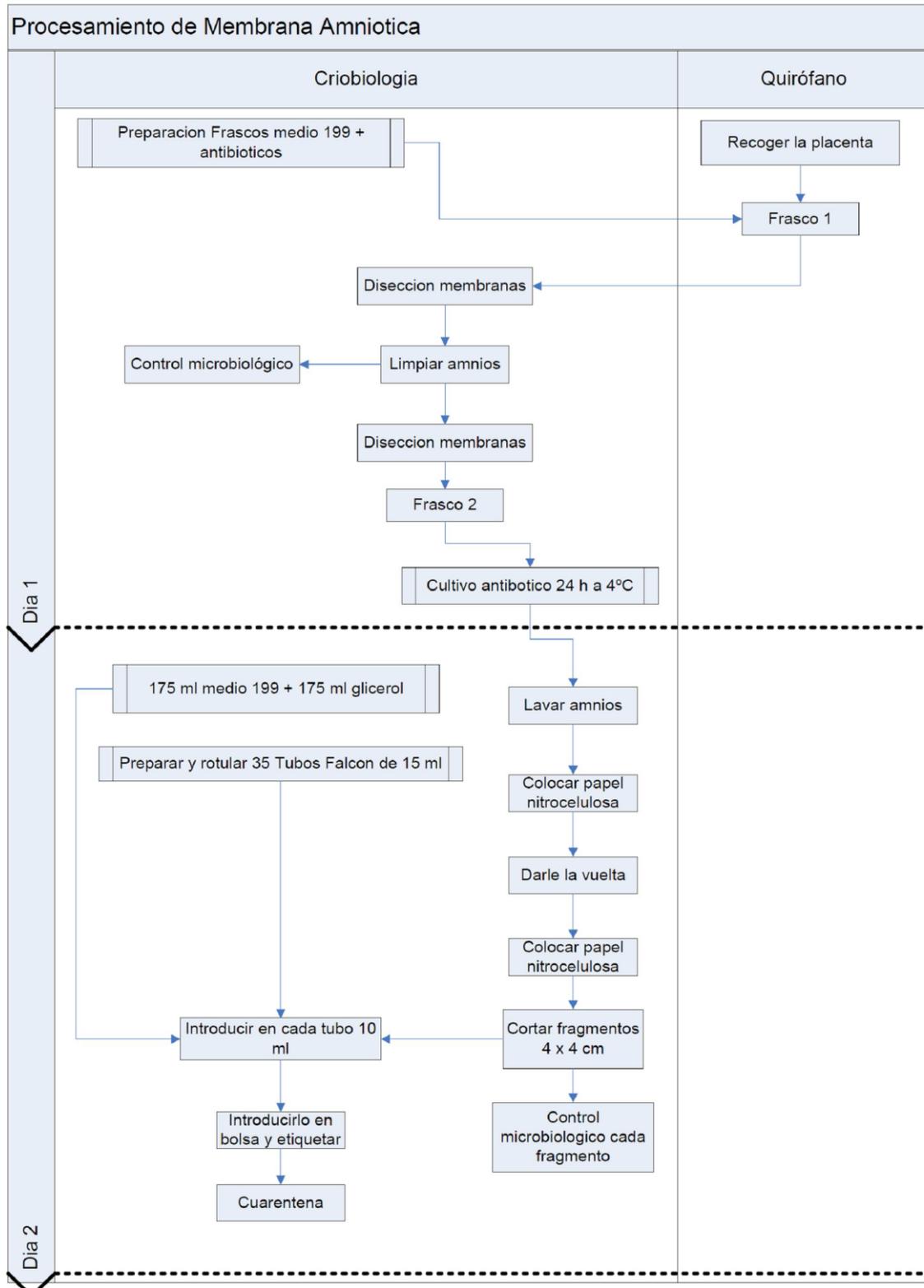
2.1- Membrana amniótica

Después de la vestimenta quirúrgica para acceder al área de procesado, el personal instrumentista se lavará, según técnica aséptica con lavado quirúrgico de manos y poniéndose bata estéril y doble par de guantes. Montará la campana de flujo laminar y ordenará en el área de trabajo todo el material necesario. En la fase I, realizará la técnica de separación de las membranas, el amnios se limpiará con solución salina hasta que quede sin restos hemáticos.

Un fragmento de amnios de 0.5 x 0.5 será utilizará para control microbiológico introduciéndolo en un criotubo de 1.8 ml, para su envío posterior al Servicio de Microbiología (fragmento de tejido del amnios, en seco, preincubación antibiótica). Se introduce el amnios en un contenedor de recogida de muestras de 250 ml y se añade medio 199 más antibióticos hasta que el amnios quede totalmente cubierto por la solución. Se guarda el amnios empaquetado en la nevera, donde se mantendrá durante un período de 24 horas a aproximadamente 4°C (Tiempo isquemia fría no superior a 12 horas).

En la segunda fase tras la descontaminación antibiótica se procederá antes de acceder al área de procesado a utilizar vestimenta quirúrgica. La persona que va a procesar se lavará, según técnica aséptica de lavado quirúrgico de manos, y posteriormente utilizará bata estéril y doble par de guantes. Montará la cámara de flujo laminar y ordenará en el área de trabajo todo el material necesario. En la fase II, se colocará en dos gradillas 35 tubos falcon de 15 ml y rotularlos con el código de congelación correspondiente, colocar 10 ml de solución de criopreservación en cada uno de ellos. El amnios será lavado con solución fisiológica 3 veces. Posteriormente se prepararan en parches de 4x4 cm. Antes de introducir cada parche en un tubo falcon se obtendrá un pequeño fragmento de 1 x 1 mm para control microbiológico que será introducido en un criotubo rotulando este con el nº del parche. Una vez que el fragmento esta introducido en su respectivo tubo, se finaliza el procedimiento con el empaquetado en su respectiva bolsa. Se procede a almacenar las bolsas con los tubos falcon en el congelador de cuarentena a temperatura de aproximadamente -80°C.

Los controles microbiológicos de cada uno de los fragmentos obtenidos se envían al Servicio de Microbiología para estudio de aerobios, anaerobios y hongos. (ver diagrama de flujo)

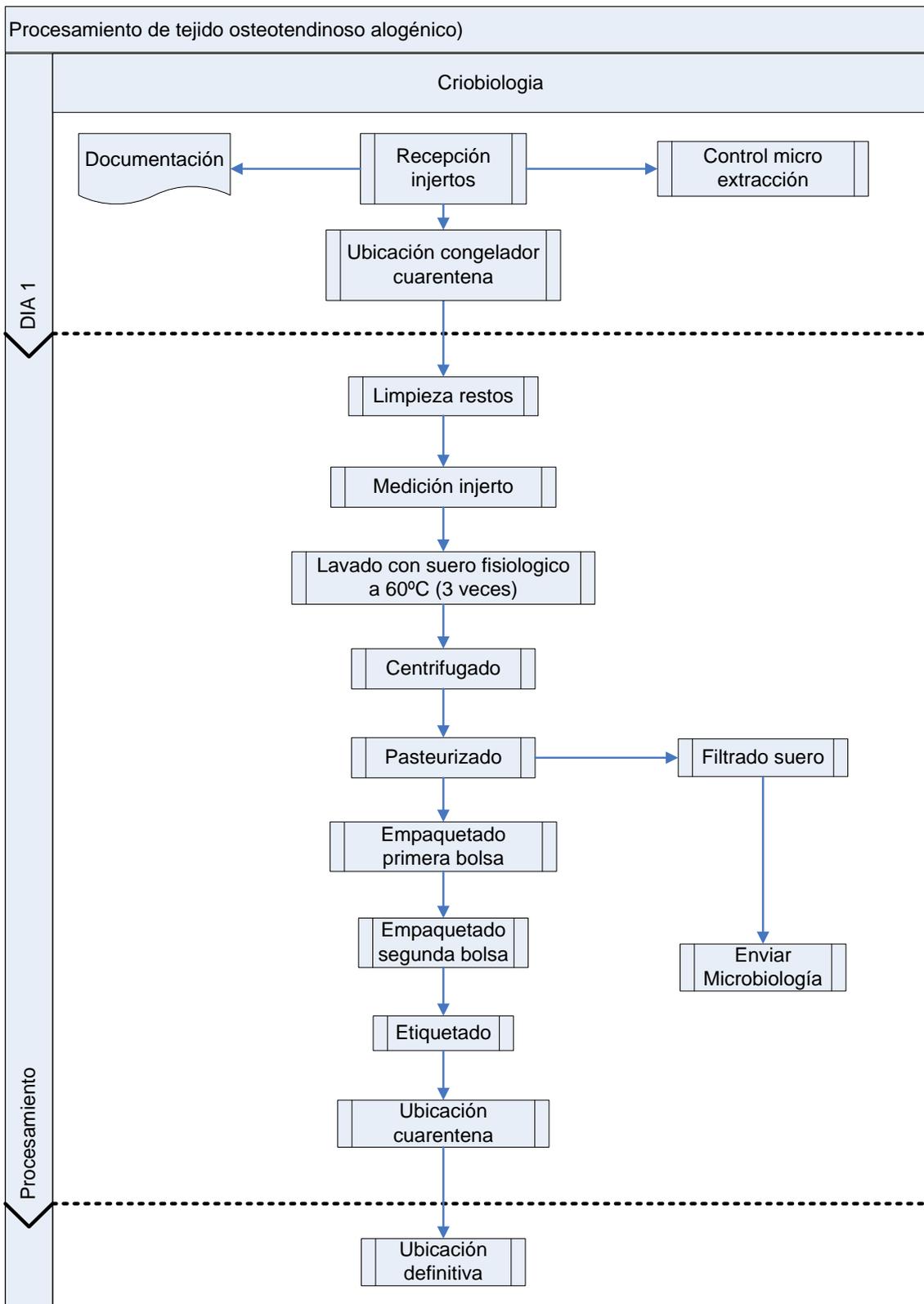


Cualquier resultado positivo tras el procesamiento obligará a descartar el tejido, y si el mismo resultado positivo aparece en un número significativo de muestras, se descartarán todos los fragmentos de ese donante

2.2- Tejidos musculoesqueléticos

Después de la vestimenta quirúrgica para acceder al área de procesado, el personal instrumentista se lavará, según técnica aséptica con lavado quirúrgico de manos y poniéndose bata estéril y doble par de guantes. Montará la campana de flujo laminar y ordenará en el área de trabajo todo el material necesario.

Realizará la técnica de limpieza de los tejidos, medición, centrifugación y pasteurización. Una vez terminado el proceso, se introduce cada aloinjerto en la primera bolsa retirándose el aire antes de su sellado . Se procederá al filtrado del suero fisiológico donde se mantuvo sumergido cada aloinjerto durante la pasteurización, el filtro se cortará en tres fragmentos: una muestra para aerobios (placa agar chocolate), otra para anaerobios (placa agar Schaedler) y la última para hongos (placa agar Sabouraud) y se envían las placas a microbiología (las de cada aloinjerto). (ver diagrama de flujo adjunto)



El resultado final del control microbiológico debe ser siempre negativo.

Cuando en el swab de la extracción se encuentra algunos de estos gérmenes se valida siempre y cuando el resultado final sea negativo:

- Staphylococcus spp (no aureus excepto S saprophyticus)
- Anaerobios del tipo Peptococcus, Propionibacterium spp., Peptostreptococcus
- Difteroides (Corynebacterium)
- Estreptococos no neumococos, grupo A
- Bacillus spp. No anthracis
- Lactobacillus spp.
- Micrococcus Staphylococcus coagulasa negativo
- Streptococos anginosus/milleri
- Streptococo viridans
- Propionibacterium acnes
- Staphylococcus epidermidis

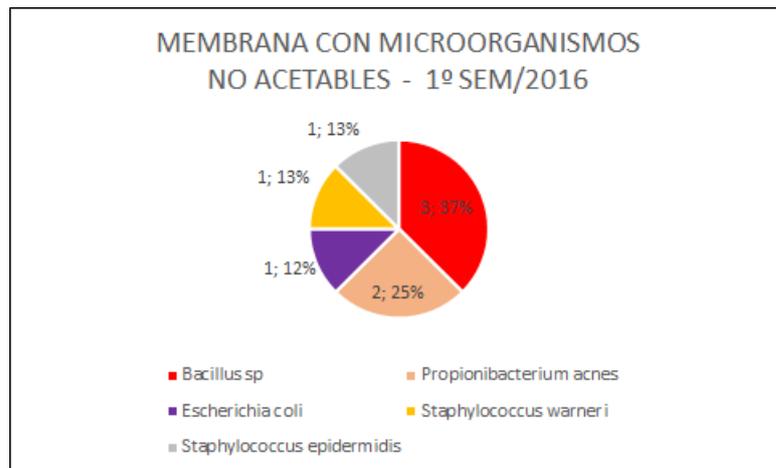
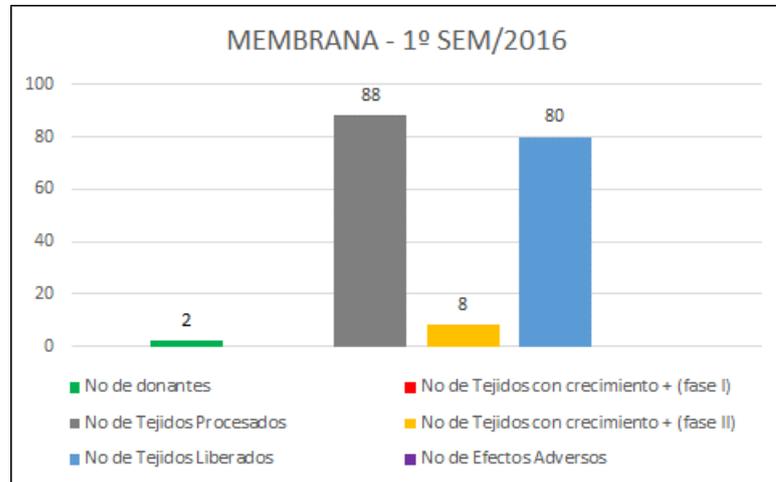
Pero si en el swab de la extracción se encuentra alguno de estos gérmenes, independientemente del resultado del cultivo final, se descartarán dichos fragmentos:

- Staphylococcus aureus
- Streptococcus pneumoniae
- Streptococcus pyogenes
- Salmonella spp
- Shigella spp
- En general todas las Enterobacteriaceae
- Pseudomonas aeruginosa
- Acinetobacter spp
- Stenotrophomonas maltophilia
- Burkholderia cepacia
- Enterococcus spp Clostridium spp
- Bacteroides spp
- Hongos (levaduras o filamentosos)
- Enterococcus spp
- Staphylococcus lugdunensis

Hay que tener en cuenta que la presencia de un gran porcentaje de gérmenes no patógenos durante la extracción también puede implicar el descarte de todos los tejidos, tras realizar una análisis de gestión de riesgos.

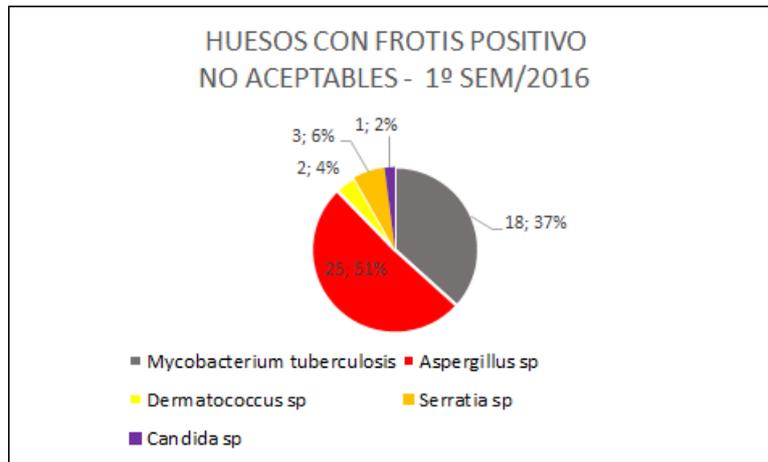
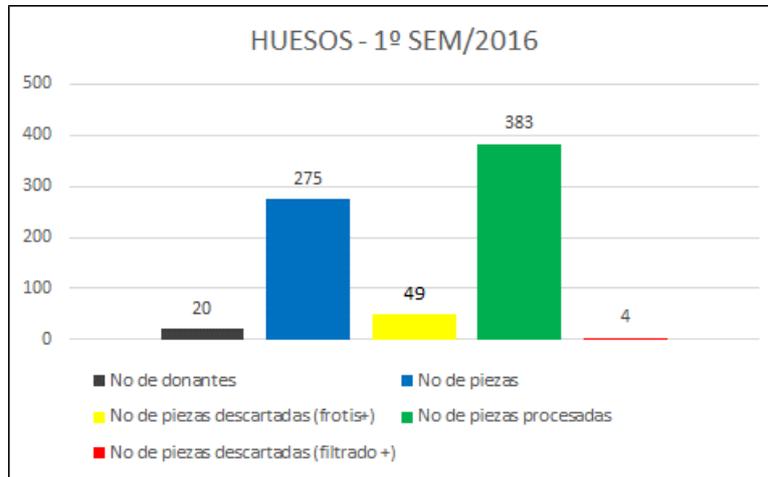
3- Resultados

3.1- Membrana amniótica



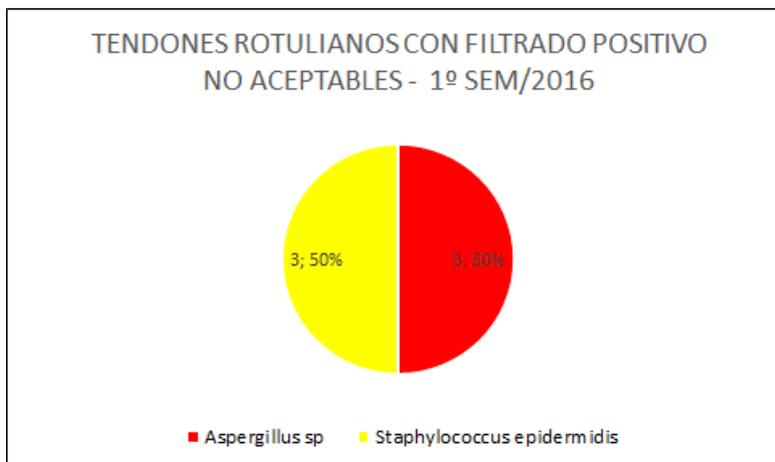
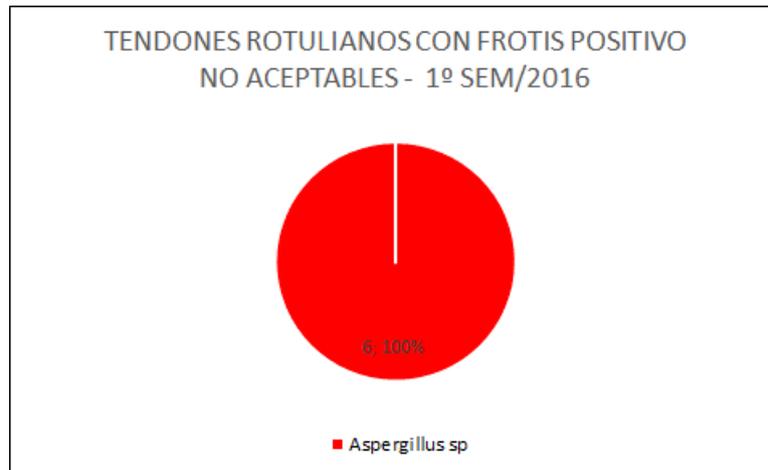
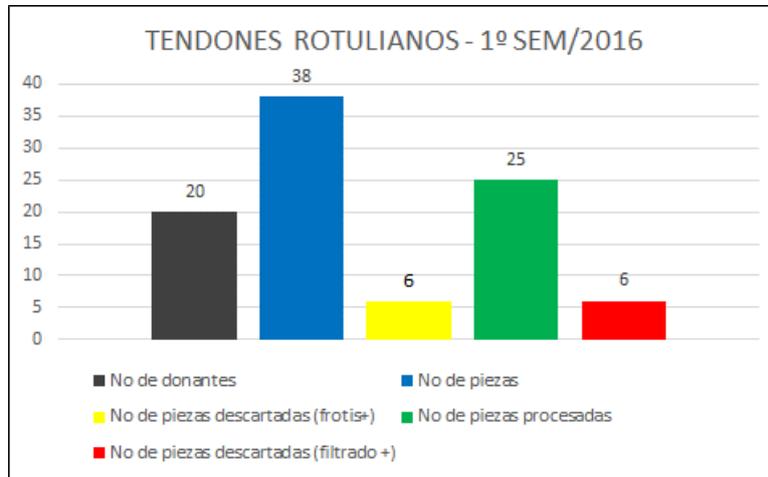
3.2- Tejidos musculoesqueléticos

3.2-1. Huesos

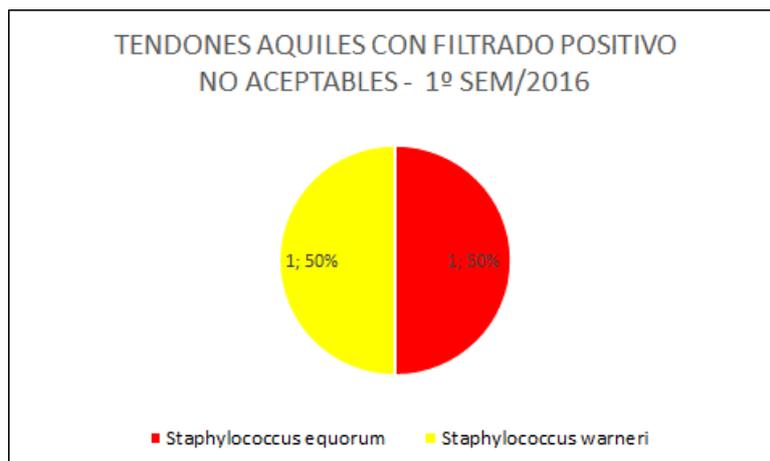
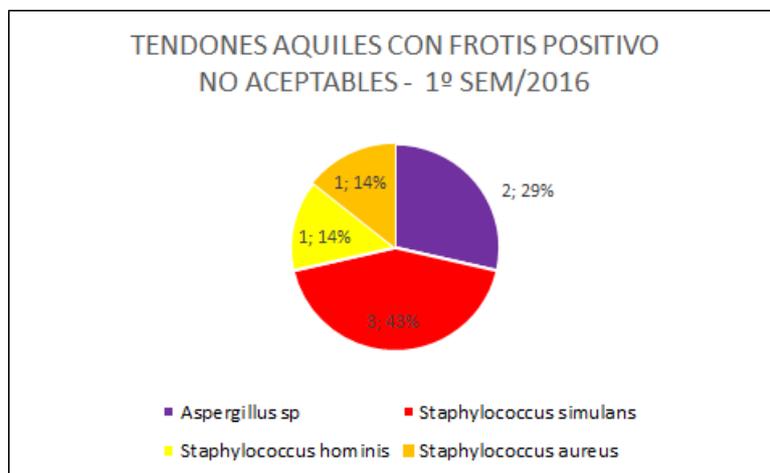
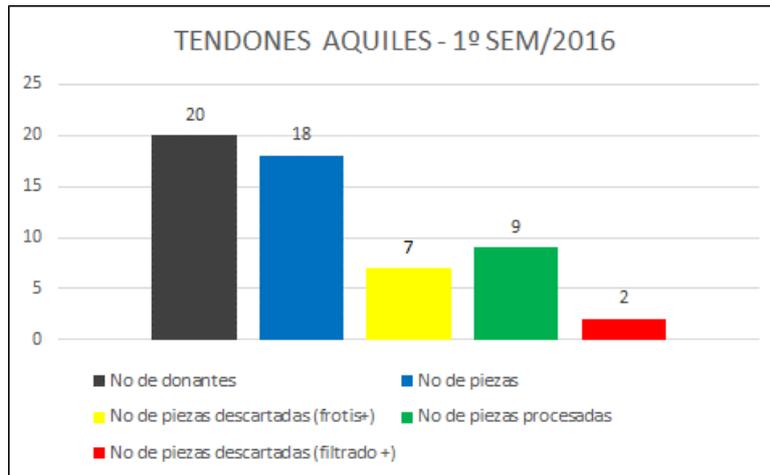


3.2-2. Tendones

3.2-2.1. Tendones rotulianos



3.2-2.2. Tendón de aquiles



4- Discusión y/o conclusiones

Las pruebas de control de la calidad de los injertos son fundamentales para garantizar a los equipos de implante que los injertos son viables y que se ha minimizado el riesgo de posible transmisión de enfermedades al paciente.

Durante la obtención o antes del procesamiento, se deben recoger muestras microbiológicas para establecer los niveles de contaminación inicial de los tejidos para ayudar a tomar una decisión durante la cuarentena con respecto a la viabilidad del material obtenido para su procesamiento posterior. Por ello las pruebas microbiológicas obtenidas durante la extracción son de gran ayuda.

Es ampliamente reconocido que el frotis no es un método eficaz de muestreo de tejidos y que las pequeñas muestras de tejido con frecuencia no son representativas. Muchas veces, un buen estudio de la historia clínica y social del donante conjuntamente con los resultados de los hemocultivos son la mejor herramienta para validación de esta donación. Validar el proceso de obtención de las muestras microbiológicas, garantizando la representatividad de la misma, garantizará una mayor fiabilidad a la hora de la interpretación de los resultados

Cuando analizamos los gráficos del procesamiento de membranas amnióticas y de los tejidos musculoesqueléticos se puede observar que la estandarización de las técnicas para la obtención de tejido, empaquetamiento, transporte, de vestimentas apropiadas, del correcto procesamiento ayudan en gran medida a reducir la contaminación de los injertos, pero no garantiza su esterilidad completa. Sólo con el empleo de las pruebas microbiológicas se puede evaluar, las tasas de infección del injerto en todas las fases del proceso. La tasa de

contaminación de los tejidos tras la obtención fue de 0% para la membrana amniótica, de un 18% para el tejido óseo, de un 16% para tendones rotulianos y de un 39% para tendón de aquiles. Por otro lado, la tasa de contaminación de los tejidos tras el procesamiento fue de 9% para la membrana amniótica, de un 1% para el tejido óseo, de un 24% para tendones rotulianos y de un 22% para tendón de aquiles.

El uso de la técnica de pasteurización post-procesamiento del tejido óseo ayuda a asegurar un método de descontaminación secundario fiable, que permite en el líquido final llevar a cabo un control microbiológico eficaz.

Como los tejidos tendinosos no se someten a dicho método, para no dañar las propiedades físicas de los injertos, las tasas de contaminación son ostensiblemente más altas

Durante el período analizado no ha habido ninguna reacción adversa en ningún receptor

5- Bibliografía y fuentes de datos

- The Guide to the quality and safety of tissues and cells for human application. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe (EDQM). 2th edition. 2015.
- OECD Glossary of statistical terms, available at <http://stats.oecd.org/glossary/detail.asp?ID=7220>, accessed 27 May 2015.
- National Cancer Institute, available at www.cancer.gov/dictionary?cdrid=561323, accessed 27 May 2015.
- American Association of Tissue Banks. Standards of tissue banking, 13th edition. McLean, USA: American Association of Tissue Banks; 2012.
- BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA nº 55, de 11 de dezembro de 2015. Diário Oficial da União, Brasília, 14 dez. 2015. Seção 1, p. 55-72.

- BRASIL. Portaria MS/GM 2.600, de 21 de outubro de 2009. Diário Oficial da União, Brasília, 30 out. 2009. Seção 1, p. 77-118.
- Organización Nacional de Trasplantes (ONT) <<https://reports.ont.es/Autorizaciones.aspx>> Acceso en 11/03/17.
- Instituto Nacional de Estadística. Avance de la Estadística del Padrón Continuo a 1 de enero de 2016 - Datos provisionales. Disponible en <<http://www.ine.es/prensa/np966.pdf>> Acceso en 10/03/17.
- Google My Maps. Disponible en <<https://www.google.com/maps>> Acceso en 14/03/17.
- Real Decreto-Ley 9/2014, de 04 de julio de 2014. España. Boletín Oficial Del Estado, Número 163, pág. 52716-52763.
- Orden SSI/2057/2014, de 29 de octubre de 2014. Boletín Oficial Del Estado, Número 268, pág. 90536-90538.
- Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 31 de marzo de 2004. Disponible en <<http://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2004/23/oj>> Acceso en 10/03/17.
- Directiva 2006/17/CE de la Comisión, de 8 de febrero de 2006. Disponible en <<http://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2006/17/oj>> Acceso en 10/03/17.
- Directiva 2006/86/CE de la Comisión, de 24 de octubre de 2006. Disponible en <<http://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2006/86/oj>> Acceso en 10/03/17.
- Directiva (UE) 2015/565 de la Comisión, de 8 de abril de 2015. Disponible en <<http://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2015/565/oj>> Acceso en 10/03/17.
- Directiva (UE) 2015/566 de la Comisión, de 8 de abril de 2015. Disponible en <<http://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2015/566/oj>> Acceso en 10/03/17.