

DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE CONTAMINAÇÃO NOS ALOENXERTOS DE PELE DO BANCO DE TECIDOS.

DETERMINATION OF THE PREVALENCE OF CONTAMINATION ON SKIN ALLOGRAFT TISSUE BANK.

Renata Oliveira da Conceição¹, André Oliveira Paggiaro¹⁻², Cesar Isaac¹, Eugênio Polo¹, Silvana Autran¹, Viviane Fernandes de Carvalho², Rolf Gemperli¹

Submetido: 15/06/2015

Aprovado: 10/07/2015

RESUMO

Introdução: Aloenxertos cutâneos são o padrão ouro no tratamento de grandes queimados, sendo fundamental garantir que estejam livres de contaminação. **Objetivo:** Determinar a prevalência de contaminação microbiológica dos aloenxertos do Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas, e propor a criação de índices de controle microbiológico. **Método:** Estudo retrospectivo, transversal, realizado através da análise de prontuários de doadores de pele entre 2012 e 2014. **Resultados:** Foram analisados 31 prontuários. A prevalência de contaminação encontrada foi de 43% por Gram positiva, 19,1% por Gram negativa e 4,8% por fungos. Com base nesses dados foram criados seis índices de avaliação de qualidade. **Conclusão:** Encontrou-se uma taxa de contaminação de 38,2% na fase de captação e de 28,7% na fase de processamento. Esses dados permitiram a elaboração de seis indicadores de controle microbiológico, que propiciam a elaboração de ações corretivas e preventivas de controle de infecção.

DESCRIÇÕES: Aloenxertos; Glicerol; Banco de Tecidos; Controle de Qualidade; Análise Microbiológica.

ABSTRACT

Introduction: Skin Allografts are considered gold standard treatment for major burns. For patient security, tissues must be free of contamination. **Objective:** This paper aims to determine the contamination rate of skin allografts in ICHC Tissue Bank and establish microbiological quality controls. **Method:** A retrospective, cross-sectional study analyzed skin donors records between 2012- 2014. **Results:** We analyzed 31 donors, and 10 were excluded. The infection rate was 43% Gram positive, 19,1% Gram negative and 4.8% fungi. Considering this results, six quality infections index were created. **Conclusion:** The Skin Tissue Bank had 38.2% rate of contamination in retrieval phase and 28.7% in process phase. These data allowed the development of six microbiological index, which enable the development of corrective and preventive politics for infection control.

DESCRIPTORS: Allografts; Glycero; Tissue Banks; Quality Control; Microbiological Analysis

¹ Banco de Tecidos do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

¹⁻² Banco de Tecidos do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo e Universidade Guarulhos.

¹ Banco de Tecidos do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

¹ Banco de Tecidos do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

¹ Banco de Tecidos do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

² Universidade Guarulhos.

¹ Banco de Tecidos do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

INTRODUÇÃO

Os aloenxertos cutâneos são tecidos de doadores de uma mesma espécie, porém com diferente constituição genética¹. Desde 1950, eles são utilizados para o tratamento de grandes queimados², sendo considerado padrão ouro em situações de escassez de áreas doadoras de enxertos autógenos³. Entretanto, o seu transplante não é completamente isento de riscos, tendo como principal desvantagem a possibilidade de ser um potencial veículo transmissor de doenças infectocontagiosas^{4, 5}.

Para redução desta ameaça foram criadas instituições denominadas Bancos de Tecidos⁶⁻⁸, que atuam desde a captação até a distribuição do material, seguindo normatizações rígidas que asseguram qualidade e segurança ao receptor⁹.

Estas normatizações exigem maior tempo de conservação do biomaterial, até que todas as etapas de segurança sejam cumpridas. O Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas – São Paulo (Banco de Tecidos – ICHC) adotou a glicerolização como forma de preservação da pele¹⁰. Este método apresenta com vantagens: o baixo custo, a redução da antigenicidade, o prolongamento do período de integração^{10,11} e a redução da carga microbiológica do material, destruindo alguns tipos de bactérias e vírus contaminantes¹²⁻¹⁴.

Embora a glicerolização provoque um efeito sinérgico de descontaminação, não pode ser considerado um meio de esterilização, pois já foram isoladas cepas bacterianas e virais em tecidos mantidos por longo tempo em glicerol⁴. Desta forma, o Banco de Tecidos - ICHC tem como preocupação o controle microbiológico do material processado, realizando uma rígida seleção de doadores e coletando amostras dos aloenxertos para cultura de bactérias e fungos,

tanto na fase de captação como no final do processamento.

A garantia da qualidade implica em assegurar baixas taxas de contaminação em todas as fases de manipulação, mesmo considerando que alguns fatores como o tipo de doador e de preservação possam afetar a prevalência da flora contaminante. Pianigiani et al.¹⁵ referem uma taxa de contaminação de 26,55% (22,68 % de bactérias e 5,39% em fungos), confirmando que a pele criopreservada e proveniente de doadores multitecidos têm maiores índices de micro-organismos.

A análise das taxas de prevalência de contaminação é fundamental para pontuar eventuais falhas nos processos, permitindo o estabelecimento de ações corretivas e/ou preventivas para o gerenciamento do risco. Neste contexto, a criação de indicadores de controle de qualidade constitui um instrumento interessante que facilita a identificação de falhas. O “sistema de indicadores” é uma ferramenta útil para quantificar o desempenho, além de avaliar e monitorar a qualidade de um processo¹⁶.

Assim, neste trabalho foi realizado o estudo de prevalência de contaminação dos aloenxertos de pele do Banco de Tecidos – ICHC no período entre 2012 a 2014, e a partir destes dados, propôs-se a criação de indicadores de qualidade para gestão dos riscos ligados a contaminação dos aloenxertos cutâneos.

MÉTODO

Trata-se de um estudo documental, retrospectivo, transversal com abordagem quantitativa, realizado pela análise de prontuários de doadores de pele do Banco de

Tecidos do ICHC. Aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Nº CAAE 42751915.5.0000.0068).

O estudo foi baseado na análise dos resultados de exames microbiológicos das biópsias de pele dos doadores. Para isso foram selecionados os prontuários com todas as folhas preenchidas e no qual o controle microbiológico, foi realizado por meio de biópsias de pele tanto no momento da captação como no fim do processamento. Obrigatoriamente todas as culturas (bactérias aeróbias, anaeróbias e fungos) devem ter chegado a um resultado final conclusivo, ou seja, sem crescimento bacteriano ou com a identificação do micro-organismo contaminante. Foram excluídos: os prontuários em que os

dados não estavam completamente preenchidos; doadores em que o controle microbiológico foi realizado por swab; prontuários em que a biópsia só foi realizada em um momento único, ou na captação ou no processamento; prontuários em que as culturas tiveram resultados inconclusivos em qualquer fase de processo (captação ou processamento).

Os dados foram analisados por meio de análise descritiva simples. As informações obtidas foram tabuladas com as seguintes variáveis: ano (2012-2014) e percentual de contaminação (cultura de bactérias aeróbia, anaeróbia e fungos), na captação e no processamento.

O cálculo do percentual de contaminação foi dado pela razão entre o resultado da microbiologia (classificada por Gram positiva, Gram negativa e fungos) e o número total de captações (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Cálculo para porcentagem de contaminação na fase: captação. São Paulo, 2012-2014.

CAPTAÇÃO		
$\frac{\text{Microbiologia captação Gram +}}{\text{Nº total captação}} \times 100$	$\frac{\text{Microbiologia captação Gram -}}{\text{Nº total captação}} \times 100$	$\frac{\text{Microbiologia captação Fungos}}{\text{Nº total captação}} \times 100$
% CONTAMINAÇÃO	% CONTAMINAÇÃO	% CONTAMINAÇÃO

Tabela 2. Cálculo para porcentagem de contaminação na fase: processamento. São Paulo, 2012-2014

PROCESSAMENTO		
$\frac{\text{Microbiologia processamento Gram +}}{\text{Nº total captação}} \times 100$	$\frac{\text{Microbiologia processamento Gram -}}{\text{Nº total captação}} \times 100$	$\frac{\text{Microbiologia processamento Fungos}}{\text{Nº total captação}} \times 100$
% CONTAMINAÇÃO	% CONTAMINAÇÃO	% CONTAMINAÇÃO

Os resultados foram comparados entre grupo (captação e processamento) e resultado da microbiologia. Os dados obtidos foram

utilizados para o desenvolvimento de índices de qualidade do controle microbiológico do Banco de Tecidos – ICHC.

RESULTADOS

Neste estudo foram selecionados 31 prontuários de doadores de pele, entre 2012 e

2014. Destes, 10 (32,3%) foram excluídos de acordo com os critérios de exclusão pré-estabelecidos. Assim, para análise dos resultados microbiológicos das biópsias de pele realizadas na fase de captação e processamento, foram utilizados 21 prontuários, representando (67,7%) do total de prontuários disponíveis.

A tabela 3 mostra os resultados das culturas microbiológicas realizadas no momento da captação e processamento, entre 2012 e 2014. Considerando o total de 42 análises microbiológicas a taxa de prevalência encontrada foi de 21,5% por Gram positivo, 9,6% por Gram negativo e 2,4% por fungos.

Tabela 3. Resultados da cultura microbiológica dos aloenxertos de pele. São Paulo, 2012-2014.

Nº Doador/ Ano	Captação	Processamento
	Cultura Aeróbia, Anaeróbia e Fungos Resultado	Cultura Aeróbia, Anaeróbia e Fungos Resultado
006/2012	Negativa	Negativa
007/2012	Negativa	Negativa
008/2012	Negativa	Negativa
009/2012	Negativa	Negativa
010/2012	Negativa	Negativa
011/2012	<i>Escherichia coli</i> G-	<i>Staphylococcus capitis</i> G+
012/2012	Negativa	Negativa
001/2013	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Bacillus sp</i> G-	<i>Bacillus sp</i> G-
002/2013	Negativa	<i>Staphylococcus epidermidis</i> G+
003/2013	<i>Enterococcus faecalis</i> G+	<i>Staphylococcus epidermidis</i> G+
004/2013	Negativa	Negativa
005/2013	<i>Propionibacterium acnes</i> G+	Negativa
009/2013	Negativa	Negativa
010/2013	<i>Staphylococcus epidermidis</i> G+	Negativa
011/2013	Negativa	Negativa
001/2014	<i>Staphylococcus epidermidis</i> G+	Negativa
002/2014	<i>Staphylococcus epidermidis</i> G+	<i>Staphylococcus epidermidis</i> G+
003/2014	Negativa	Negativa
004/2014	Negativa	Negativa
005/2014	<i>klebsiella pneumoniae</i> G-	<i>Candida Albicans</i>
007/2014	Negativa	Negativa

Por meio destes dados e com a utilização das tabelas 1 e 2 quantificou-se o percentual de contaminação nas fases de captação e processamento entre os anos 2012 e 2014, considerando a quantidade de captação (100%) em relação aos perfis de prevalência de

contaminação por fase (captação e processamento) e classificação do micro-organismo (bactéria Gram positiva, Gram negativa e fungos), apresentados nas figuras 1 e 2.

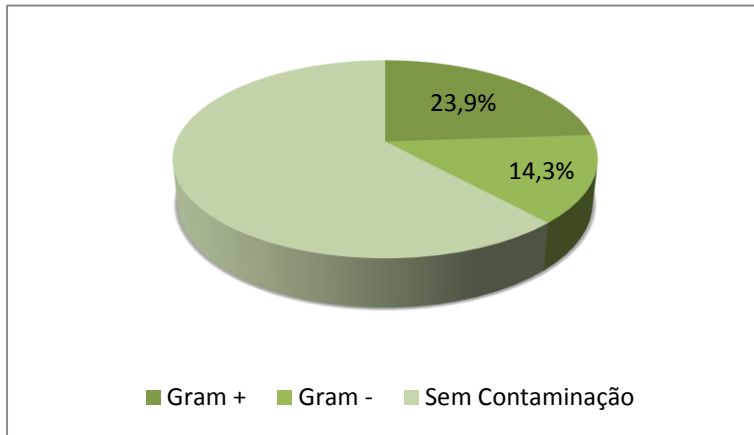


Gráfico 1. Prevalência de contaminação na fase de captação dos aloenxertos de pele do Banco de Tecidos – ICHC. São Paulo, 2012-2014.

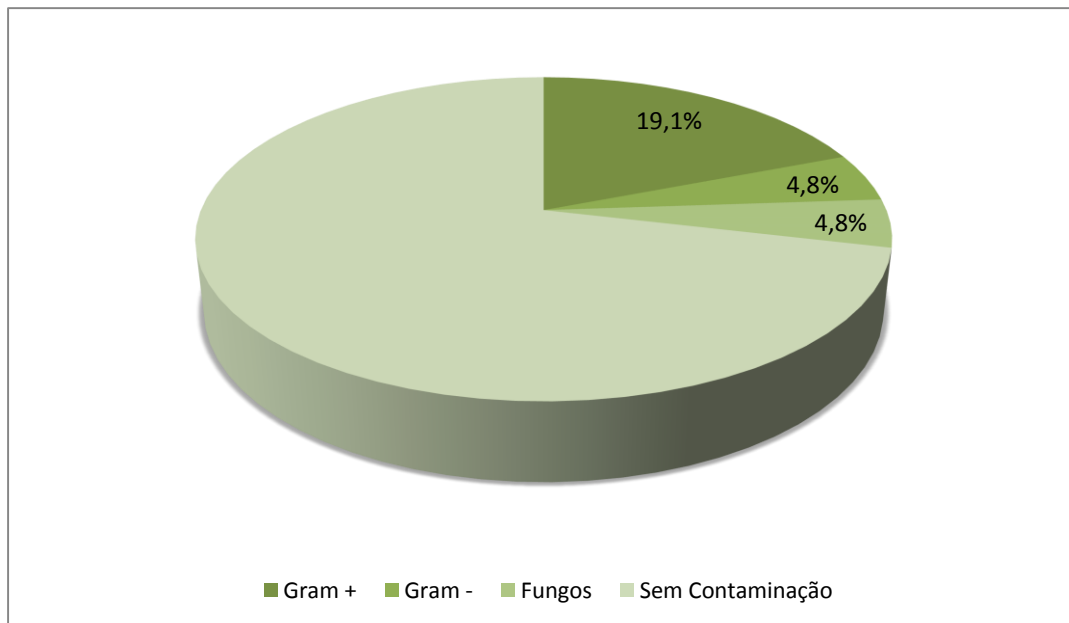


Gráfico 2. Prevalência de contaminação na fase de processamento dos aloenxertos de pele do Banco de Tecidos – ICHC. São Paulo, 2012-2014.

A partir desses dados, foram estabelecidos indicadores de qualidade para gestão dos riscos ligados a contaminação dos aloenxertos cutâneos. Para isso, criou-se uma tabela na qual foi definido e separado seis

índices, distribuídos conforme as etapas (captação e processamento), e classificação quanto aos micro-organismos presentes (bactéria Gram positiva, bactéria Gram negativa e fungos) (Tabela 4).

Tabela 4. Índices de avaliação de qualidade – controle microbiológico. São Paulo, 2014.

Indicador (Índice)	Objetivo	Fórmula	Possíveis causas → Ações	Metas
CCG+ – Contaminação na captação por bactéria Gram +.	Avaliar e quantificar a contaminação na captação por bactéria Gram +.	<u>Microbiologia captação Gram +</u> X 100 Nº total captação	Falha de assepsia captação, de esterilização do material, da montagem da mala → Reorientação da equipe, revisão do Checklist	Sem contaminação
CCG- – Contaminação na captação por bactéria Gram -	Avaliar e quantificar a contaminação na captação por bactéria Gram -.	<u>Microbiologia captação Gram -</u> X 100 Nº total captação	Crítérios de seleção → Reorientação da equipe, revisão do Checklist	Sem contaminação
CCf – Contaminação na captação por microrganismo Fungos	Avaliar e quantificar a contaminação na captação por microrganismo Fungos	<u>Microbiologia captação Fungos</u> X 100 Nº total captação	Crítérios de seleção, falha de assepsia captação, de esterilização do material, da montagem da mala → Reorientação da equipe, revisão do Checklist	Sem contaminação
CPG+ – Contaminação no processamento por bactéria Gram +	Avaliar e quantificar a contaminação no processamento por bactéria Gram +.	<u>Microbiologia processamento Gram +</u> X 100 Nº total captação	Falha de assepsia processamento, de esterilização do material → Reorientação da equipe, revisão do Checklist	Sem contaminação
CPG- – Contaminação no processamento por bactéria Gram -	Avaliar e quantificar a contaminação no processamento por bactéria Gram -.	<u>Microbiologia processamento Gram -</u> X 100 Nº total captação	Falha de assepsia processamento, de esterilização do material → Reorientação da equipe, revisão do Checklist	Sem contaminação
CPf – Contaminação no processamento por microrganismo Fungos	Avaliar e quantificar a contaminação no processamento por microrganismo Fungos	<u>Microbiologia processamento Fungos</u> X 100 Nº total captação	Falha de assepsia processamento, de esterilização do material → Reorientação da equipe, revisão do Checklist	Sem contaminação

Diante destes resultados foram estabelecidas metas para avaliar a eficácia dos controles microbiológicos e definir as possíveis causas e ações corretivas.

DISCUSSÃO

Os aloenxertos cutâneos são um importante recurso para o tratamento dos pacientes com extensas queimaduras, principalmente devido à escassez de áreas doadoras para autoenxertia¹. Devido à imunossupressão destes indivíduos⁵ é necessário garantir que os aloenxertos estejam livres de qualquer contaminação e evitar a possibilidade de transmissão de doenças³. Para isso são realizados vários controles de triagem dos doadores. Já no momento da oferta da doação realiza-se uma criteriosa avaliação

sobre seu histórico clínico, social e exames sorológicos. Nas etapas seguintes (captação e processamento) coletam-se biópsias do material com o intuito de realizar exames de avaliação microbiológica. Ainda assim, a contaminação pode ocorrer pela presença da microbiota do doador, do ambiente de coleta ou por falha em algum momento do processo de captação e preparo da pele.

Neste estudo observou-se uma taxa de contaminação de 38,2% na fase de captação e de 28,7% na fase de processamento do tecido. Pianigiani et al.¹⁵ referiram uma taxa de contaminação geral (captação +processamento) de 26,5%, sendo que o maior índice encontrado foi nos doadores vivos. Esta discrepância pode ser explicada pela diferença de amostra entre os dois estudos,

provavelmente com uma maior casuística, a experiência do grupo de trabalho aumenta provocando uma redução natural das taxas de contaminação.

Dentre os micro-organismos isolados nos aloenxertos de pele do Banco de Tecidos – ICHC encontrados 14,3% de contaminação por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Candida albicans*, e 24% por *Staphylococcus epidermidis*, semelhante aos resultados encontrados por Pirnay et al.¹⁹ em culturas microbiológicas de pele de 14 dias.

Verificou-se também que alguns micro-organismos presentes no momento da captação em alguns doadores (Tabela 3), não foram mais encontrados após o processamento. Presume-se que isto ocorreu devido à ação descontaminante do glicerol. Este resultado corrobora com os achados de Verbeken et al.²⁰ que observaram a ação antibacteriana do glicerol a 85% quando empregado na preservação de aloenxertos de pele.

Em relação à contaminação por fungos encontrada no doador 05/2014, pode-se perceber que na fase de captação foram isoladas cepas *Klebsiella sp* (Gram-), e após o processamento, ocorreu apenas o crescimento de *Candida albicans*. Provavelmente, na cultura inicial pós-captação existiam muitas cepas de bactérias Gram negativas (*Klebsiella sp*) que impediam/competiam com o crescimento fúngico. Após o contato com o glicerol, o contato com esta substância provocou uma destruição bacteriana e os fungos finalmente foram isolados em cultura. Provavelmente, este indivíduo era multicolonizado e deveria ter sido melhor avaliado na fase de seleção e triagem de doadores.

Uma vez verificada a contaminação seja na captação e/ou processamento, todo o lote de aloenxerto de pele deve ser esterilizado. No Banco de Tecidos do ICHC adotamos a irradiação como mecanismo de esterilização complementar seguindo metodologia internacional²¹. Os aloenxertos contaminados por bactérias Gram positivas são irradiados em temperatura ambiente visando uma redução da carga microbiana (*bioburden*), que são definidos pelo nível de garantia de esterilidade (SAL). Para assegurar esse processo é necessário que a dose de irradiação alcance o SAL de 10^{-6} .

Os lotes em que foram encontradas bactérias Gram negativas são obrigatoriamente descartados, por liberarem fatores pirogênicos após sua destruição por efeito radioativo. Em relação aos fungos depende do tipo isolado e da sua radioresistência, a maior parte deles apresenta baixa resistência, entretanto aqueles muito resistentes são descartados por necessitarem de altas doses de radiação, causando destruição tecidual¹⁹.

Diante destes resultados, foi possível a criação de indicadores de qualidade (Tabela 4) para garantir o controle microbiológico. Foram elaborados seis índices, três para cada fase (captação e processamento), conforme a classificação do micro-organismo (Gram positivo, Gram negativo e fungos). A finalidade da utilização destes índices é identificar os níveis de contaminação do tecido nas diferentes fases de processamento, buscando reduzir estes números a metas previamente estabelecidas.

Os índices de controle microbiológico permitem a identificação de eventuais falhas nos processos, possibilitando o estabelecimento de ações corretivas e/ou preventivas. Neste

contexto, a criação dos indicadores de controle de qualidade constituiu um instrumento útil para análise dos riscos e rastreabilidade de todo processo¹⁸.

CONCLUSÃO

Neste estudo constatou-se a taxa de prevalência de contaminação de 38,2% na fase de captação e de 28,7% na fase de processamento nos aloenxertos de pele do Banco de Tecidos – ICHC. Estes dados permitiram a elaboração dos indicadores de controle microbiológico, que servirão para garantir a qualidade, e aumentar a segurança em todos os aloenxertos de pele captados, processados, armazenados e liberados para o uso clínico.

REFERÊNCIAS

1. Hermans MH. Preservation methods of allografts and their (lack of) influence on clinical results in partial thickness burns. *Burns*. 2011;37(5):873-81.
2. Shuck JM. Use of homografts in burn therapy. *Surgical Clinics of North America*. 1970;50(6):1325-&.
3. Pianigiani E, Ierardi F, Fimiani M. Importance of good manufacturing practices in microbiological monitoring in processing human tissues for transplant. *Cell Tissue Bank*. 2013;14(4):601-7.
4. Monafo WW, Tandon SN, Bradley RE, Condict C. Bacterial contamination of skin used as a biological dressing. A potential hazard. *Jama*. 1976;235(12):1248-9.
5. Van Baare J, Ligtvoet EEJ, Middelkoop E. Microbiological evaluation of glycerolized cadaveric donor skin. *Transplantation*. 1998;65(7):966-70.
6. AATB Standards for Tissue Banking (13th Edition).
7. RDC Nº. 220 Regulamento técnico para o funcionamento de bancos de tecidos musculoesqueléticos e de bancos de pele de origem humana; (2006).
8. Pianigiani E, Ierardi F, Cherubini Di Simplicio F, Andreassi A. Skin bank organization. *Clin Dermatol*. 2005;23(4):353-6.
9. Kearney JN. Guidelines on processing and clinical use of skin allografts. *Clin Dermatol*. 2005;23(4):357-64.
10. Richters CD, Hoekstra MJ, van Baare J, du Pont JS, Kamperdijk EWA. Immunogenicity of Glycerol-Preserved Human Cadaver Skin In Vitro. *Journal of Burn Care & Research*. 1997;18(3).
11. Hettich R, Ghofrani A, Hafemann B. The immunogenicity of glycerol-preserved donor skin. *Burns*. 1994;20, (Suppl 1):S71-6.
12. Saegeman V, Ectors N, Lismont D, Verduyck B, Verhaegen J. Short- and long-term bacterial inhibiting effect of high concentrations of glycerol used in the preservation of skin allografts. *Burns*. 2008;34(2):205-11.
13. Vanbaare J, Buitenwerf J, Hoekstra MJ, Dupont JS. Virucidal effect of glycerol as used in donor skin preservation. *Burns*. 1994;20:S77-S80.
14. Marshall L, Ghosh MM, Boyce SG, Macneil S, Freedlander E, Kudesia G. Effect of glycerol on intracellular virus survival - implications for the clinical use of glycerol-preserved cadaver skin. *Burns*. 1995;21(5):356-61.
15. Pianigiani E, Ierardi F, Cuciti C, Brignali S, Oggioni M, Fimiani M. Processing efficacy in

relation to microbial contamination of skin allografts from 723 donors. Burns. 2010;36(3):347-51.

16.Saldias M, Alvarez I, Perez Campos H, Sanchez G, Acosta M. Quality management indicators for tissue banks: an operative model from the period of 2002-2007. Transplant Proc. 2009;41(8):3476-80.

17.Von Versen R, Monig HJ, Salai M, Bettin D. Quality issues in tissue banking: quality management systems - a review. Cell Tissue Bank. 2000;1(3):181-92.

18.Vicentino W, Rodriguez G, Saldias M, Alvarez I. Guidelines to implement quality management systems in microbiology laboratories for tissue banking. Transplant Proc. 2009;41(8):3481-4.

19.Pirnay JP, Verween G, Pascual B, Verbeken G, De Corte P, Rose T, et al. Evaluation of a microbiological screening and acceptance procedure for cryopreserved skin allografts based on 14 day cultures. Cell Tissue Bank. 2012;13(2):287-95.

20.Verbeken G, Verween G, De Vos D, Pascual B, De Corte P, Richters C, et al. Glycerol treatment as recovery procedure for cryopreserved human skin allografts positive for bacteria and fungi. Cell and Tissue Banking. 2012;13(1):1-7.

21.IAEA (2007) Radiation sterilization of tissue allografts: requirements for validation and routine control: a code of practice, Vienna, Austria: International Atomic Energy Agency.

22.Eastlund T. Bacterial infection transmitted by human tissue allograft transplantation. Cell Tissue Bank. 2006;7(3):147-66.