



## **ADVIES VAN DE HOGE GEZONDHEIDSRAAD nr. 8763**

### **Inactivatie en securisatie van weefsels en cellen ten overstaan van bacteriën, virussen of prionen**

#### **Deel II: bacteriën en fungi**

September 2014

#### **EXECUTIVE SUMMARY**

In dit deel bespreken we de risico's verbonden aan de overdracht van bacteriën en fungi door middel van weefsel- en celtransplantatie. We belichten vooreerst de microbiologische classificatie en typeringsmechanismen.

Historisch worden bacteriën geklasseerd op basis van hun fenotypische eigenschappen zoals morfologie, biochemische kenmerken, serotypering en gevoeligheidspatroon. Vele van deze karakteristieken zijn slechte parameters voor genetisch verwantschap, maar zij geven beschrijvende informatie voor het herkennen van taxa. Daarnaast kunnen bacteriën ook analytisch geklasseerd worden, gebruik makend van chemische celbestanddelen. MALDI-TOF is hiervan een recente toepassing die in vele laboratoria geïntroduceerd raakt. De meest preciese methode om bacteriën te klasseren is de analyse van hun genetisch materiaal. Dit kan met technieken zoals DNA hybridisatie, rRNA similarity analyse, AFLP DNA fingerprinting...

Om tot een identificatie te komen van een bacterie als horend tot een genus en species, kan men gebruik maken van cultuurgebaseerde, immunologische, biochemische assays of nucleïnezuurtechnieken. Een diepere karakterisatie van micro-organismen kan zeer nuttig zijn voor epidemiologische typering. Ook hier nemen moleculaire technieken een steeds groter aandeel in.

Vanuit klinisch oogpunt kan men een onderscheid maken tussen commensalen, pathogenen en opportunistische pathogenen. Volgens het schade-respons model van Casadevall worden 6 verschillende klassen van pathogenen onderscheiden naargelang het resultaat ('de gastheerschade') van de interactie tussen gastheer en micro-organisme.

Ook komen algemene principes aan bod die van belang zijn voor een goed microbiologisch onderzoek, met name: transportmaterialen, transportomstandigheden, testspecimens, kweekmedia en -methoden.

Het nemen van de geschikte stalen voor microbiologisch onderzoek is essentieel. Biopsies zijn het meest representatief, maar de afname hiervan is niet steeds mogelijk.

De wattendrager of wisser heeft als nadeel dat er soms zeer geringe hoeveelheden materiaal opgenomen en ook afgegeven worden. Bij cultuur wordt in optimale omstandigheden ten hoogste 10 % van de op de wisser aanwezige kiemen teruggevonden. Bovendien sterven bacteriën snel af op watten, door uitdroging, oxidatie en door toxische stoffen in het katoen. Een betere bescherming voor de leefbaarheid van aërobe en zeker voor anaërobe bacteriën bieden de transportbodems (volgens Stuart of Amies). Recent is er een nieuw type swab ontwikkeld, de Eswab® (Copan), die een betere staalcollectie toelaat en ook efficiënter bacteriën weer lost dan

de conventionele Dacron of kunstzijden wissers. Punctievloeistoffen kunnen gecollecteerd worden in een spuit en zoals bloed overgebracht worden in een vloeibare voedingsbodem. Transport van specimen naar het microbiologisch laboratorium moet zo snel mogelijk gebeuren om (in het bijzonder voor weefselstalen) de leefbaarheid van delicate micro-organismen te vrijwaren, en overgroei door snelgroeende micro-organismen te voorkomen. Indien dit snel transport niet mogelijk is, dienen alle specimen in afwachting hiervan koel bewaard te worden (4°C), uitgezonderd deze die reeds op een voedingsbodem geënt zijn. Met betrekking tot weefsels en cellen zijn bloed, punctievloeistoffen en weefsel/celmateriaal de meest courante staalsoorten die een laboratorium te verwerken krijgt.

Om een bloedstaal af te nemen dient men door de huid het bloedvat aan te prikken. Bij elke bloedname dient een strenge asepsie in acht genomen te worden omdat de huid steeds gekoloniseerd is met commensale flora die het bloedstaal kan bijbesmetten. Omdat er bij bacteriëmie slechts 1 tot 100 kiemen per 100 ml bloed aanwezig zijn, dient er bij volwassenen (kinderen) ten minste 30 tot 40 ml (2 tot 5 ml) bloed afgenomen te worden, en verdeeld over twee hemocultuurflessen (aëroob en anaëroob).

Weefselfragmenten bekomen via biopsie dienen steeds vochtig gehouden te worden om uitdroging te voorkomen. Best ent men dit fragment in toto in een cultuurmedium (thioglycolaat of Wilkins Chalgren broth bv).

Bij de isolatie van micro-organismen worden vier soorten voedingsbodems gebruikt: universele voedingsbodems, selectieve voedingsbodems, aanrijkingsbodems en specifieke voedingsbodems. De universele vaste en vloeibare bodems zijn zeer rijke media die tot doel hebben groei mogelijk te maken van een uitgebreid gamma micro-organismen en zij zijn dus eveneens geschikt voor culturen van cellen en weefsels. De meest universele algemene vaste bodem, is de *bloedagar* die groei toelaat van de meeste medisch belangrijke bacteriën en fungi. Universele vloeibare voedingsbodems, zoals Tryptic Soy Broth of thioglycolaat bouillon, worden meestal gebruikt om kleine hoeveelheden bacteriën (vooral uit punctievloeistoffen of op wattendragers) een kans te geven om uit te groeien, omdat hierin een groter inoculum kan aangebracht worden. Wilkins Chalgren anaerobic broth en thioglycolaat zijn voorbeelden van vloeibare media waarin door de aanwezigheid van o.a. hemine en vitamine K naast aërobe, ook anaërobe bacteriën kunnen groeien.

Bloed en beenmerg worden gekweekt in aërobe en/of anaërobe hemocultuurflessen. Deze hemocultuurflessen worden geïncubeerd in automatische microbiële detectiesystemen. In deze systemen is er een continue monitoring van microbiologische groei in de flessen. Het gebruik van vloeibare media (bv. thioglycolaat) heeft het voordeel sensitiever te zijn, moeilijker kweekbare micro-organismen die niet groeien op vaste agarplaten te kunnen isoleren, anaërobe bacteriën te kweken, en residuele inhibitorische substanties (bv. antibiotica) te verdunnen tot subinhibitorische hoeveelheden. Mogelijke nadelen verbonden aan vloeibare media zijn dat sneller groeiende micro-organismen met grotere zekerheid gedetecteerd worden dan trager groeiende organismen, er geen kwantitatieve beoordeling van de microbiële groei mogelijk is en de grotere gevoeligheid van deze techniek aan vals positieve resultaten. Selectieve bodems worden gebruikt om bepaalde groepen micro-organismen te laten groeien, terwijl andere groepen onderdrukt worden. Voor de isolatie van gisten en schimmels is de Sabouraud-glucose-agar met chloramfenicol een ideaal medium.

De meeste medisch belangrijke micro-organismen groeien optimaal bij een temperatuur van ongeveer 36°C. Fungi worden vaak zowel op 36°C als op kamertemperatuur (22-25°C) geïncubeerd. Daar waar de meeste medisch belangrijke bacteriën groeien binnen de 48 uur is de incubatieduur voor de meeste klinisch relevante fungi isolaten langer. Aërobe en facultatief anaërobe micro-organismen groeien goed in normale omgevingscondities. Bepaalde micro-organismen hebben een verhoogde CO<sub>2</sub>-concentratie (5-10 %) nodig om hun

groei te starten. Strikt anaëroben groeien niet in aanwezigheid van zuurstof. Een anaërobe atmosfeer wordt bekomen in een afgesloten zuurstofvrij systeem.

In het laboratorium test men de 'biologische gevoeligheid' van een micro-organisme *in vitro*. Dit duidt aan welke de kleinste concentratie van een antibioticum is die het micro-organisme kan beletten te groeien: de minimale inhiberende concentratie (MIC). Om de MIC van een antibioticum te bepalen laat men in de praktijk de micro-organismen groeien op gestandaardiseerde voedingsbodems met verschillende concentraties van het antibioticum, meestal duploverdunningen of duploveelvouden uitgaande van een concentratie van 1 mg/ml. Zowel het *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) als EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) heeft geijkte procedures die gebruikt kunnen worden voor de gevoeligheidsbepaling van micro-organismen.

In dit deel wordt eveneens een overzicht gegeven van de gepubliceerde case reports met transmissie van bacteriën en fungi door middel van weefsel- en celtransplantatie.

Via muskuloskeletale allogreffes werden transmissies beschreven van Grampositieve aërobe micro-organismen zoals *Staphylococcus* spp., *S. pyogenes*, Gramnegatieven, zoals *Pseudomonas aeruginosa* en *Serratia marcescens*, maar ook letale infecties met *Clostridium* spp. (Grampositieve anaërobe sporulerende bacteriën). In de jaren '50 werden ook enkele transmissies van *Mycobacterium tuberculosis* via riballogreffes beschreven.

Huidallogreffes geven minder duidelijk aanleiding tot infecties. Twee patiënten die een acellulaire dermale greffe geïmplanteed kregen voor duraplastie, raakten geïnfecteerd met *Propionibacterium acnes* en 1 patiëntje overleed aan sepsis na applicatie op diep dermale brandwonden van een glycerolgepreserveerde kadaverallogrefte gecontamineerd met *Pseudomonas aeruginosa*.

Via cornea transplantaties werden eveneens *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium* spp., gram-negatieven zoals *Pseudomonas* spp. en *Klebsiella pneumoniae*, *Candida* spp., *Aspergillus* spp., en *Cryptococcus neoformans*, overgedragen. Deze publicaties betreffen meestal cornea's verwerkt volgens de koude bewaarmethode en ondanks de aanwezige antibiotica blijken bacteriën te kunnen overleven in dit bewaarmedium.

Er werden geen case reports teruggevonden van infectie transmissie via tympano-ossiculair greffes.

Bacteriële endocarditis tengevolge van de implantatie van gecontamineerde hartkleppen heeft een hoge mortaliteit. *Mycobacterium tuberculosis* werd in de vroege periode van weefseltransplantaties overgedragen via homogreffes, wat met de huidige selectiecriteria hoogstwaarschijnlijk niet meer zou voorkomen. *Candida albicans* werd eveneens gerapporteerd als oorzaak van post-transplant endocarditis.

Over de jaren hebben weefselbanken verscheidene interdisciplinaire benaderingen ontwikkeld voor de screening van kadaverdonoren op aanwezigheid van infectieuze agentia, maar ook voor de screening van weefsels en greffes afgeleid van deze donoren. Routinematig worden microbiologische culturen genomen van kadavers of levende donoren op het tijdstip van weefsel/celprelevatie. Microbiologische screening van weefsels is een onderdeel van een groep testen en procedures (medische voorgeschiedenis, serologie,...) met de bedoeling de kans te reduceren op het processen/verwerken van weefsels/cellen met infectieuze agentia.

Deze microbiologische culturen geven een idee over een mogelijke bacteriëmie bij donoren die na screening van het medische dossier en de fysische toestand niet bacteriëmisch beschouwd werden en ze identificeren weefsels die op het ogenblik van prelevatie gecontamineerd werden met bacteriën of fungi. De resultaten van deze culturen beïnvloeden de verdere processing van deze weefsels (preprocessing).

Na prelevatie kunnen de volgende stalen worden afgenomen: wissers en/of destructieve weefselfragmenten, bloed of beenmerg.

De meest toegepaste methode voor het nemen van culturen van botten, kraakbeen en pezen zijn katoenen wissers om zowel het oppervlak, en eventueel het medullair kanaal van lange beenderen af te strijken. Verschillende auteurs hebben echter de lage sensitiviteit van wissers aangetoond.

Ook aan het gebruik van residueel allogreffemateriaal zijn nadelen verbonden ondanks de hogere gevoeligheid van deze staalsoort. Vaak wordt weefsel in de nabijheid van de greffe gebruikt voor cultuur. Dit begeleidend weefsel is niet steeds indicatief voor de micro-organismen aanwezig op de allogrefte zelf en is vaak klein (*sampling error*) restafval. Een andere optie is het gecombineerd gebruik van de wisser met residuele fragmenten voor microbiologische controle. De rol van *postmortem* hemoculturen als indicatoren voor sepsis en weefselcontaminatie is controversieel. Noch hemoculturen, noch beenmergaspiraten zijn betrouwbare vervangmethoden voor de cultuur van gepreleveerde weefsels; maar hun gecombineerd gebruik met weefselculturen, kan een complementaire diagnostische waarde betekenen voor de donorevaluatie.

In de weefselbank literatuur is bovendien geen uniformiteit te vinden betreffende de cultuurmedia, incubatie duur en incubatie omstandigheden: van 48 u tot meer dan 14 dagen incubatie, aëroob en/of anaëroob...

Bepaling van de bioburden kan belangrijk zijn voor de verdere verwerking van een weefsel. Verschillende (minder en meer complexe) methoden kunnen hiervoor gebruikt worden.

*Treponema pallidum* is een Gram-negatieve spirocheet die niet gekweekt kan worden op cultuurmedia. Daarom kunnen we zijn aanwezigheid in donoren enkel bevestigen door middel van bloedtesten die (niet)-treponemale antistoffen opsporen.

Na de verwerking van de weefsels, met een eventuele spoeling in een antibiotische oplossing, worden net voor de steriele verpakking opnieuw stalen (wissers en/of weefselfragmenten) genomen voor microbiologische controle. Men kan verwachten dat antibiotica residu's enig bacteriostatisch effect uitoefenen in het cultuurmedium. Antibiotica bevattende oplossingen kunnen eventueel in een voldoende hoeveelheid cultuurmedium gebracht worden om de residuele antibiotica te verdunnen.

Bijkomend kan men culturen nemen tijdens de implantatie van de greffe, om de eventuele rol van de greffe bij post-transplantinfecties beter te evalueren.

Noteer ook dat elke weefselbank conform de Europese Directive 2004/23/EG over procedures dient te beschikken om de link tussen de getransplanteerde receptor(en) en de donor te behouden. Op deze manier kunnen, in het geval van een nevenwerking (bv allogrefte gerelateerde infectie), alle receptoren die weefsel van dezelfde donor ontvangen hebben, getraceerd worden.

De preventieve middelen om transmissie van bacteriën/fungi maximaal te vermijden omvatten onder meer de donor selectiecriteria (medisch dossier, klinisch onderzoek, serologische testen...), maar ook een risico-analyse van mogelijke punten van contaminatie. Deze risico-analyse zal ook gebruikt worden bij de verwerking van weefsels/cellen al dan niet in clean room omstandigheden.

Wanneer een potentiële weefsel/celdonor gescreend wordt, moet het medisch dossier geanalyseerd worden op *algemene exclusiecriteria* zoals vermeld in het Koninklijk Besluit van 2008/ *Klinische* (tekens van sepsis bv.) en *fysische evidentie* (genitale ulcera, lymfadenopathieën bv.) voor relevante overdraagbare ziektes wordt nagegaan.

Voor het opstellen van een risico-analyse betreffende de contaminatie van allogreffes werd het meeste onderzoek uitgevoerd op musculoskeletaal weefsel.

De volgende potentiële risicofactoren werden beschreven voor contaminatie van musculoskeletale allogreffes bij prelevatie met micro-organismen van lage pathogeniciteit: het aantal personen die meewerken tijdens de prelevatie procedure, het type greffe, tijd sinds overlijden, fysische manipulatie (bacteriële translocatie), prelevatie in het mortuarium versus operatiezaal. Als risicofactoren voor micro-organismen met hoge pathogeniciteit werden

beschreven: trauma als doodsoorzaak, positieve hemoculturen, voorafgaandelijke orgaanprelevatie en de lokatie van de weefselprelevatie, type donor: kadaverdonoren.

Andere risicofactoren voor contaminatie van huidallogreffes zijn de methode van ontharing (clipper versus scheermesje), en het type desinfectans.

Hartkleppen en cornea allogreffes worden gedecontamineerd in antibiotica cocktails. De incubatietemperatuur van deze cocktails is een belangrijke factor voor de efficiëntie van decontaminatie.

Weefselallogreffes kunnen gecontamineerd worden tijdens de processing door omgevingslucht en oppervlaktes, door het personeel, door gecontamineerde reagentia, chirurgische instrumenten, processing materiaal, materiaal gebruikt tijdens de transplantatie operatie, of een pseudocontaminatie in het microbiologisch laboratorium.

Al deze factoren kunnen gebruikt worden om contaminatie van greffes te controleren bij zowel prelevatie als processing.

Om het risico op infectietransmissie bij de cel/weefseltransplantatie voor patiënten zo klein mogelijk te houden, is het noodzakelijk om met een effectief kwaliteitsmanagement systeem te werken. Dit systeem includeert uitgebreide testen op donorbloed en weefsels/cellen, maar moet ook andere controlemaatregelen includeren om de veiligheid en efficaciteit te garanderen. Deze kwaliteitsnormen worden uitgeschreven in procedures en zijn gebaseerd op de karakteristieken die zowel de veiligheid van de patiënt aangaan als het behoud van de klinische effectiviteit van het product.

Naar het voorbeeld van de farmaceutische industrie is het clean room concept gaandeweg overgenomen door weefselbanken. In het verleden werden weefsels verwerkt in een fysische omgeving gelijkend op een operatiezaal.. Vandaag is de regel voor weefselinstellingen het gebruik van gespecialiseerde processingkamers met een luchtkwaliteit van EU GMP klasse A (ISO graad 5) tijdens de verwerking van weefsel dat geen microbiële inactivatie meer zal ondergaan. De achtergrond omgeving zal minstens overeenkomen met GMP-klasse D (KB 2009).

Tot slot worden in dit deel een reeks agentia met decontaminerende/desinfecterende of steriliserende werking besproken met beschikbare evidentie wat betreft hun effectiviteit en toxiciteit in de decontaminatie van weefsels/cellen. Tevens worden enkele preservatietechnieken kort aangehaald.

Processing van botweefsel start meestal met het *mechanisch verwijderen* van restend bloed, weke weefsels, periosteum en beenmerg. Deze handeling reduceert zeker het risico op infectieransmissie.

Lage druk pulse lavage blijkt efficiënt te zijn voor reductie van de bacteriële *load* op botten en hetzelfde geldt voor eenvoudig spoelen van corneas met water.

Voor wat de *chemische behandeling* betreft, bespreken we de performantie van peroxiden, chlorhexidine, hypochlorieten, alkylerende agentia, organische kwikantiseptica, alcoholen, jodium en jodoforen, oppervlaktespanningsverlagende middelen, antibiotica, biocleanse en superkritische CO<sub>2</sub>.

Beperkte studies beschreven de effecten van waterstofperoxide behandeling van botallogreffes. Alleszins is er geen ruime ervaring met dit product voor de decontaminatie van botten.

Perazijnzuur werd vooral getest voor de decontaminatie van huidallogreffes. Een concentratie van 0,1% perazijnzuur gecombineerd met glycerol 85 % heeft geen nadelige effecten op de biocompatibiliteitseigenschappen van huid. Microbiële groei wordt geremd in de huidgreffen na een behandeling van 90 min.

Gecombineerde behandeling van bot met antibiotica en perazijnzuur bij lage druk lijkt een steriliserend effect te hebben. Een gecombineerde behandeling PAA/ethanol bleek geen significante reductie te geven in osteoconductiviteit of osteointegratie van gedemineraliseerde botmatrix, maar beïnvloedt wel de biomechanische eigenschappen van gevriesdroog bot.

Hartkleppen konden onvoldoende gedecontamineerd worden met 0,1 % perazijnzuur, maar een concentratie van 0,21 % gedurende 30 min had wel voldoende (4 log<sub>10</sub> reductie) effect. Deze hogere concentratie heeft geen nadelige effecten op de morfologie van de hartkleppen.

Er is een significante reductie van de totale huidflora na behandeling met chlorhexidine 4 %, wat kan worden toegepast bij de prelevatie van huidallogreffes: de donor wordt grondig ontsmet met joodalcohol en chlorhexidine gluconaat.

Enkele studies toonden een goed effect van 2 - 4 % chlorhexidine gluconaat op pezen, fascia en bot. Deze behandeling heeft echter mogelijke nadelige effecten zoals bv. intra-articulaire reactieve synovitis en chondrolyse.

Natrium hypochloriet 0,5 % blijkt effectief als desinfectans voor huidallogreffes. Ook botallogreffes kunnen extra bewerkt worden met natriumhypochloriet 2 % tegen de mogelijke overdracht van prionenziektes, hoewel er geen zekerheid is over de penetratiecapaciteit van hypochloriet in bot. Van de alkylerende agentia wordt formaldehyde 2,7 – 4 % gebruikt voor de bewaring van gehoorbeentjes en trommelvlies, wat meteen ook een sterk biocide product is. Er is ook ervaring met glutaraldehyde 2 % behandeling van hartkleppen en venen, doch recente rapporten wijzen op een snelle degeneratie van de weefsels met deze behandeling.

Organische kwikantiseptica zijn niet geschikt voor de bewaring van botallogreffes omwille van de toxiciteit. Deze antiseptica (vnl Cialit) werden in het verleden wel eens toegepast voor de bewaring van ribkraakbeen en dura mater met goed resultaten: geen hogere incidentie van absorptie van de kraakbeengreffe en geen infecties onder de geïmplanteerde dura matergreffes.

Cialit werd vooral toegepast voor de bewaring van gehoorbeentjes (techniek van Marquet), met bewaring van de natuurlijke compliantie van de greffe en matige desinfectie.

Ethanol tast de osteoinductieve eigenschappen van extracellulaire botmatrix niet aan, maar wel de osteogene eigenschappen van gemineraliseerd corticaal bot. De penetratiecapaciteit van ethanol 70 % in de diepte van grote botallogreffes blijft echter een punt van onzekerheid. Ook bij de desinfectie van pezen wordt veelvuldig gebruik gemaakt van ethanol 70 %, zonder nevenwerkingen zoals synovitis. Sclera en gehoorbeentjes kunnen bewaard worden in ethanol 70 %.

Het jodofoor povidone-iodine 10 % bleek effectief in de decontaminatie van botten, met uitzondering van *Pseudomonas aeruginosa*, die overleefde. Ook de histologie van de botten blijft bij deze concentratie bewaard. Dit is echter niet het geval voor gedemineralseerde botmatrix, 1 % povidone-iodine tast de osteo-inductiviteit aan. Pezen lijken niet voldoende gedecontamineerd te worden met povidone-iodine 10 % gedurende 30 min.

Indien de concentratie povidone-iodine niet hoger is dan 5 mg/mL is er weinig toxiciteit op corneale fibroblasten, een volledige decontaminatie van cornea wordt hiermee echter niet bekomen. Voor vaatgreffen kan povidone-iodine niet toegepast worden.

Oppervlaktespanningsverlagende middelen (detergenten) hebben vooral een reinigende werking en kunnen niet als ontsmettingsmiddel worden beschouwd. Kiemen overleven in deze oplossingen.

Antibiotica worden veelvuldig toegepast in de decontaminatie van allogene weesels. Algemeen dient men op te merken dat antibiotica niet altijd effectief zijn aan de lage temperaturen (bv. 4°C) waarin ze meestal worden gebruikt. De incubatie van weefsels in antibiotica-oplossingen op lage temperatuur vrijwaart echter wel de viabiliteit van de weefsels.

Bij de decontaminatie van huidallogreffes worden vaak de volgende antibiotica gebruikt: penicilline en streptomycine, gentamicine, neomycine, kanamycine. Geen enkele studie kon aantonen dat er volledige decontaminatie van huidallogreffes kan bekomen worden met antibiotica behandelingen. Gelijkaardige resultaten werden bekomen bij studies op bot- en peesallogreffes: bacitracine, polymyxine B, rifampicine en cefalosporines werden allen uitgetest bij verschillende concentraties en incubatietijden. Geen enkele studie kon een volledige decontaminatie van bot/pezen aantonen. Bovendien is de penetratie van antibiotica in weefsel sterk afhankelijk van het type antibioticum.

Bij hartkleppen is er de bijkomende moeilijkheid dat de cellen viabel moeten blijven. Desinfectie wordt daarom uitgevoerd met lage dosis antibiotica samen met cryopreservatie om cellulair verlies te beperken. Strickett toonde voor hartkleppen de effectiviteit aan van de combinatie: 24 - 48 u incubatie op 4°C in weefselcultuurmedium met cefoxitine, lincomyine, polymyxine B en vancomycine +/- amfotericine B. O'Brien was de eerste die amfotericine B (een relatief toxisch antifungaal agens) volledig uit het desinfectieprotocol wegliet, aangezien gecryopreserveerde humane hartklepfibroblasten blootgesteld aan amfotericine B 42 % van hun viabiliteit verliezen. De residuele antibiotica weefselconcentraties zijn niet van die aard dat ze resulteren in systemisch toxische concentraties.

Voor vasculaire greffen wordt vaak hetzelfde decontaminatie protocol gebruikt als voor hartkleppen. Voor cornea's worden in de regel antibiotica gebruikt in het bewaarmedium dat op 4°C bewaard wordt.

We merken hier nogmaals op dat het van belang is zoveel mogelijk bacteriostase te vermijden bij de microbiologische controles van weefselculturen na antibiotica behandeling. Centrifugatie en enting van het sediment en actieve kool zijn hiervoor geschikte methodes.

BioCleanse® *Tissue Sterilisation Process* is een lage-temperatuur chemische sterilisatiemethode die ook micro-organismen diep in het bot zou doden. Er wordt gebruik gemaakt van niet nader bepaalde detergenten en steriliserende agentia die micro-organismen (en sporen) elimineren maar ook weefselsterkte en biocompatibiliteit vrijwaren. Ook mechanische componenten spelen mee in het sterilisatieproces, deze verwijderen bloed en lipiden.

Superkritische CO<sub>2</sub> heeft een grote 'solvent' capaciteit en een hoge diffusie capaciteit: ideaal om substanties uit poreuze matrices zoals botten te krijgen. Er is beperkte ervaring met de superkritische CO<sub>2</sub> procedure voor virale inactivatie, de eliminatie van lipiden, celresten en medullaire proteïnen. Structurele botkenmerken blijven met deze techniek bewaard.

Sterilisatie van allogreffes door middel van gas kan met ethyleenoxide, betapropiolacton, formaldehyde, waterstofperoxide en perazijnzuur. Betapropiolacton werd in de vroege periode van weefselbanking toegepast voor de sterilisatie van botten en hartkleppen, maar werd verlaten omwille van de toxiciteit van dit agens en het gebrek aan penetratie van het product in het bot enerzijds en de snelle klepdegeneratie van de behandelde hartkleppen anderzijds.

Ethyleenoxide is een gas met een hoog penetratievermogen. Hoewel ethyleenoxide in het verleden zeer vaak gebruikt werd voor de sterilisatie van musculoskeletale en botallogreffes, hebben de meeste weefselbanken het gebruik ervan stopgezet omwille van potentiële toxische gasresidu's in de weefsels. Veilige botallogreffes kunnen bekomen worden door een grondige spoeling van de botgreffes met gedesioniseerd water om vet, beenmerg en weke weefsels te verwijderen. Daaropvolgend voert men een koude cyclus ethyleenoxide sterilisatie uit om hoge temperaturen te vermijden en lyofiliseert en aëreert men de greffes.

Heden is het gebruik ervan echter gedaald ten voordele van gammabestraling. Er zou een vertraagde incorporatie zijn van ethyleenoxide behandelde botten in gastheerbot, naast een depletie van de osteo-inductieve capaciteit en biomechanische eigenschappen. Studies omtrent de bewaring van osteo-inductieve eigenschappen van gedemineraliseerde botmatrix na ethyleenoxide behandeling zijn controversieel.

Ook ethyleenoxide behandelde pezen lijken aanleiding te kunnen geven tot ernstige chronisch synoviale effusie met inflammatie.

Een gecombineerde glycerol-ethyleenoxide behandeling van dermo-epidermale composieten heeft geen nadelige effecten op de morfologie van deze composieten. Omwille van de mogelijke schadelijke chemische residuen heeft deze methode echter geen doorbraak gekend voor huidallogreffes.

Formaldehyde in gasvorm heeft een slecht penetratievermogen, het wordt dan ook niet onder deze vorm toegepast op allogreffes. Ook voor waterstofperoxide en perazijnzuur in de gasfase werden geen toepassingen op allogreffes beschreven.

Sterilisatie met *fysische methodes* omvat hitte, Lobator sd-2 systeem, lage temperatuur plasma sterilisatie, UV stralen/pulsen, microgolven, gamma radiatie en E-beam sterilisatie.

Hitte sterilisatie is niet toepasbaar op huid en pezen want dit denatureert proteïnen, zoals collageen, en kan weke weefsels coaguleren. Hitte leidt ook tot necrose van botfragmenten, denaturatie van groeifactoren zoals proteoglycanen, waardoor gedemineraliseerde botmatrix zijn capaciteit tot botnieuwvorming of kraakbeenvorming verliest.

Een nieuwe techniek is het "Lobator sd-2 systeem" (Duitsland) vooral gebruikt voor de processing van femurkoppen met verwarming tot 80°C. Het is een gebruiksvriendelijk systeem met bactericide en antivirale effecten. Het "Lobator sd-2 systeem" zou een veilig en effectief systeem zijn voor de behandeling van allogene femurkoppen (< 60 mm diameter). De techniek zou de osteoinductieve eigenschappen, structuur en stabiliteit van het bot niet aantasten.

Plasma (vierde aggregatietoestand van materie) is samengesteld uit een wolk van ionen, elektronen en neutrale species. Sterilisatie met de STERRAD® 100 sterilizer maakt gebruik van lage-temperatuur gas plasma. Het gecombineerd gebruik van plasma en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> steriliseert producten snel zonder toxische residu's achter te laten. Deze techniek is microbicide op vegetatieve bacteriën (inclusief mycobacteriën), bacteriële sporen, gisten, fungi en virussen. Er konden geen schadelijke effecten aangetoond worden op de biomechanische eigenschappen van corticale botsegmenten na sterilisatie met H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plasma. De techniek is echter niet geschikt voor sterilisatie van gedemineraliseerde botmatrix door verlies van osteo-inductieve capaciteit.

Sterilisatie met UV stralen of pulsen is niet bestudeerd voor allogreffes. Intense lichtpulsen is een relatief nieuwe techniek om oppervlaktes/oplossingen te decontamineren. Deze methode is effectief tegen alle micro-organismen (bacteriën, fungi, sporen, virussen, protozoa en cysten). Men weet echter niet of er centrale penetratie is van het UV in massieve botallogreffes, bovendien zijn er collageenwijzigingen in botten en pezen behandeld met UV. Gedemineraliseerde botmatrix verliest zijn osteo-inductiviteit na blootstelling aan UV.

Een zeldzame toepassing werd in de literatuur beschreven betreffende sterilisatie met microgolven van gecontamineerde femurkopfragmenten. Twee minuten bestraling leek effectief te zijn voor decontaminatie van het bot, reductie van de biomechanische eigenschappen treedt op na 60 sec echter.

Gamma-irradiatie (een pakket van elektromagnetische energie – een foton) heeft een hoge penetratie capaciteit (incl. humane weefsels). Gammabestraling (Co<sup>60</sup>-bron) is zeer effectief tegen bacteriën bij doses van 15 tot 25 kGy. Voor de inactivatie van de meeste virussen is minstens 30 kGy (10 kGy = 1 Mrad) nodig. Deze dosis overstijgt mogelijk de routine aanbevolen dosis voor sterilisatie van botgreffes (10-35 kGy). De IAEA beveelt een dosis van 25 kGy aan om een SAL van 10<sup>-6</sup> te bekomen indien de bacteriële bioburden ongeveer 1.000 CFU per allogrefe bedraagt en indien er een standaard distributie van resistentie is. Gammastralen kunnen tot 30 cm diep penetreren in water (densiteit: 1 g/cm<sup>3</sup>). Dus huid, amnion, pericard en pezen kunnen met deze techniek gesteriliseerd worden. Als de gemiddelde densiteit van een greffe groter is, zoals voor een botgreffe bv. (2 g/cm<sup>3</sup>), is de aanvaardbare dikte van een corticale botgreffe blootgesteld aan gammastralen ongeveer 10-15 cm. Afhankelijk van de fysische toestand van de botallogreffes (temperatuur, gelyofiliseerd, diepgevrozen) verschilt de dosis waarbij er schade in de biomechanische eigenschappen van het bot optreden. Er kan ook gebruik gemaakt worden van protectieve agentia zoals propyleenglycol om de biomechanische eigenschappen van bot te vrijwaren tijdens bestraling. De effecten van bestraling op pezen en gedemineraliseerde botmatrix zijn contradictorisch in de literatuur. Gammabestraling van bot en weke weefsels zou de collageenstructuur veranderen, de tensiele sterkte reduceren, en bone morphogenetic proteïns inactiveren. Cornea en hartkleppen kunnen niet bestraald worden voor sterilisatie.

Voor huid is bestraling eveneens niet de ideale sterilisatie techniek, dit leidt tot een stijfheid van de huid en minder adherentie en dus lagere take-rate van de donorhuid.

Elektronen van een E-beam straler kunnen tot 8 cm diep penetreren in water (densiteit: 1 g/cm<sup>3</sup>). Met een gemiddelde densiteit van een botgreffe groter dan 2 g/cm<sup>3</sup>, is de aanvaardbare dikte van een corticale botgreffe blootgesteld aan electronenbeam stralen 3 cm. Er is geen cytotoxiciteit voor de botten behandeld met elektronen beam. Gammastralen daarentegen zijn (bij kamertemperatuur) toxisch voor osteoblast-like en fibroblast-like cellen.



Verschillende *preservatietechnieken* kunnen toegepast worden op de verschillende types allogreffes: vriezen, cryopreservatie, vriesdrogen, glycerolisatie.

Invriezen is een sinds lang gebruikte methode voor de bewaring van bot en collageen weefsel als enige preservatiemethode of alvorens te vriesdrogen. De aanbevolen vriestemperatuur voor langdurige bewaring (tot 5 jaar) van botten, pezen of kraakbeenallogreffes is minder dan -40°C. Invriezen reduceert de mechanische eigenschappen van ligamenten niet, maar heeft ook geen steriliserend effect. Cryopreservatie dient volgens een gevalideerde methode te verlopen (onmiddellijk invriezen of volgens een gecontroleerde invriestechneik). Voor huidallogreffes wordt deze techniek gebruikt in combinatie met glycerol als cryoprotectans, voor kraakbeen en chondrocyten met dimethylsulfoxide bv. De histologische veranderingen bij deze preservatietechniek zijn zonder effect voor de mechanische eigenschappen van het weefsel.

Vriesdrogen of lyofiliseren is een populaire methode om botallogreffes, maar ook collageen weefsel inclusief ligamenten, langdurig te bewaren op kamertemperatuur. Vriesdrogen is echter nadelig voor de mechanische stabiliteit en incorporatie van botgrefes, wat deze techniek minder geschikt maakt voor grote botgrefes en pezen. Vriesdrogen tast de osteoinductieve capaciteit van botweefsel niet aan. Vriesdrogen heeft geen steriliserend effect op het weefsel .

Tot slot kan men gebruik maken van glycerol, dat in hoge concentraties werkt als een chemisch lyofiliserend middel. Glycerol zou de structuur van weefsels en cellen bewaren en de antigeniciteit van het weefsel reduceren. Glycerol heeft beperkte en zeer traag werkende antimicrobiële en antivirale effecten. Voor de lange-termijnbewaring van (niet-levende) huidallogreffes kan men een glycerolisatie (glycerol 85 %) procedure hanteren. Verschillende bacteriële species hebben een verschillende gevoeligheid voor glycerol: Gram-negatieve micro-organismen worden sneller geëlimineerd uit glycerol-gepreserveerde huid dan Gram-positieve micro-organismen. Histologisch onderzoek toont slechts subtiele morfologische wijzigingen in glycerol gepreserveerde huid, die vermoedelijk geen effect hebben op de structurele integriteit van de greffe wanneer toegepast als wond dressing.