

Substanciación de la dosis de radioesterilización para aloinjertos de hueso: Reporte Preliminar

Enma Castro⁽¹⁾ ecastro@ipen.gob.pe; Kety León⁽¹⁾ kpleon@yahoo.com

(1) Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN). Dirección General de Promoción y Desarrollo Tecnológico - Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

Resumen

Las muestras de hueso se obtuvieron del Banco de Tejidos "Rosa Guerzoni Chambergó". El lote de procesamiento estuvo conformado por 35 unidades. Para validar la dosis de esterilización se seleccionó la norma ISO/TR 13409:1996. La irradiación se llevó a cabo en el equipo Gammacell-220. Los sistemas dosimétricos utilizados para entregar y medir las dosis suministradas fueron Fricke (ASTM E1026-95) y etanol clorobenceno (ASTM E1538-99). Las pruebas de esterilidad y de recuento total se realizaron de acuerdo a la norma ISO 11737- Parte 1 y Parte 2 (1995). La carga microbiana promedio encontrada a partir de los recuentos totales fue de 15 UFC/ítem. Se aislaron cocos Gram (+) de las muestras de hueso no tratadas. La dosis de verificación fue de 3.2927 kGy. Las pruebas de esterilidad arrojaron valores negativos para todas las muestras estudiadas. Los procedimientos del procesamiento de los aloinjertos de hueso permitieron obtener cargas microbianas < de 1000 UFC/ítem, que unido al número de unidades por lote de procesamiento permitieron la aplicación de la ISO/TR 13409:1996. La dosis de 25 kGy, fue substanciada como dosis esterilizante para aloinjertos de hueso.

1. Introducción

Desde 1998 el IPEN esteriliza por radiación gamma los aloinjertos de hueso que producen los bancos de tejidos en el Perú. Dichos materiales estériles, son muy útiles para la práctica médica ya que se utilizan como relleno para defectos óseos así como también para tratar enfermedades traumáticas o congénitas que comprometen el sistema esquelético, igualmente se utilizan en caso de defectos del maxilar o para tratar defectos periodontales, entre otros. Los aloinjertos óseos que se producen en nuestro país pueden ser liofilizados o congelados a muy baja temperatura (-80°C) y para su aplicación médica requieren estar estériles. El agente esterilizante utilizado es la radiación gamma, proveniente de una fuente de Co-60 y la dosis de esterilización que se ha venido aplicando es la universalmente aceptada de 25 kGy. Por otro lado, en la actualidad, se están implementando sistemas de la calidad tanto en IPEN como en los Bancos de Tejidos que aplican la radiación gamma para esterilizar los materiales que producen, con la finalidad de ofrecer a la población peruana materiales para injertos de calidad comprobada y clínicamente seguros. Para ello, los procesos que se llevan a cabo en los bancos de tejidos así como los que se realizan en IPEN, se enmarcan dentro de los lineamientos que establecen las Normas ISO

9001: 2000; ISO IEC 17025: 1999; Estándares Internacionales del OIEA para la Operación de Banco de Tejidos, 2002 (IAEA International Standards for Tissue Banking: 2002) y el Código de Práctica del OIEA para la Esterilización por Radiación de Aloinjertos, de Tejidos: Requerimientos para la Validación y Control de Rutina, 2002 (Code of Practice for the Radiation Sterilization of Tissue Allografts: Requirements for Validation and Routine Control). En la actualidad, en IPEN, se ha iniciado la aplicación de este último documento para radioesterilizar los aloinjertos de tejidos. Uno de los requisitos básicos del Código de Práctica del OIEA es la validación de la dosis de radioesterilización. Para ello se pueden elegir substanciar (validar) la dosis de esterilización de 25 kGy, según la norma ISO/TR 13409 Sterilization of Health care products- Radiation sterilization-Substantiation of 25 kGy as a sterilization dose for small or infrequent production batches. Los requisitos para aplicar esta norma establecen que el número de unidades en el lote de producción sea menor de 1000, que la población microbiana en los aloinjertos de hueso presente una Distribución Estándar de la Resistencia (SDR) y que los niveles de carga microbiana por aloinjerto no superen las 1000 UFC. Por otro lado, para aplicar esta norma se requiere: tener acceso a un laboratorio competente de microbiología, realizar las pruebas microbiológicas de acuerdo a la

norma ISO 11737 Part 1 and Part 2 "Sterilization of medical devices-Microbiological methods"; acceso a una fuente de irradiación de Co-60 capaz de entregar dosis precisas y exactas desde 1 kGy.

La presente investigación tiene por objetivo validar la dosis de 25 kGy, que actualmente se aplica para esterilizar los aloinjertos de tejidos, verificando la posibilidad de aplicar para este fin, la norma ISO TR 13409. Así, esta investigación forma parte de un trabajo más completo que implica la total aplicación del Código de Práctica del OIEA acorde con los lineamientos de la implementación de sistemas de la calidad para la esterilización de aloinjertos de tejidos.

2. Método Experimental

Los aloinjertos de hueso fueron proporcionados por el Banco de Tejidos "Rosa Guerzoni Chambergo" del Instituto de Salud del Niño. El tejido fue procurado de acuerdo a la norma "Estándares Internacionales del OIEA para la Operación de Banco de Tejidos: 2002" (IAEA International Standards for Tissue Banking: 2002). De un donante, varón de 22 años, se procuró parte de la cresta iliaca y columna vertebral. Las pruebas serológicas realizadas demostraron que el tejido estaba libre de HIV, Hepatitis C y B, y Sífilis. Luego del procesamiento, se obtuvieron 35 unidades entre chips y cuñas las cuales fueron liofilizadas. Posteriormente fueron empacadas individualmente al vacío con triple empaque y transportados al IPEN, al laboratorio de Irradiación de Productos Médicos (LIPM).

La aplicación de la norma ISO/TR 13409 se realizó en concordancia con las etapas que a continuación se enumeran:

- **Etapa 1:** Establecimiento del tamaño de la muestra para las pruebas
Siendo el tamaño del lote de producción 35 aloinjertos de hueso, de la norma, Tabla 1: Tamaños de la muestra de prueba para la realización de la determinación de la carga microbiana y el experimento de la dosis de verificación (Test sample sizes for performance of bioburden determination and verification dose experiment), se estableció trabajar con 10 muestras para la determinación de carga microbiana y 10 muestras para la dosis de verificación (DV)

- **Etapa 2:** Obtención de muestras de unidades del producto
Para esta investigación el banco de tejidos proporcionó 20 unidades de chips de 1cc
- **Etapa 3:** Determinación de la carga microbiana promedio

En esta parte de la investigación se realizaron recuentos totales (técnica de filtración por membrana) según la Norma ISO 11737-1 1995. Sterilization of Medical Devices – Microbiological Methods – Part 1: Estimation of populations of microorganisms on products. Los equipos que se utilizaron fueron: Autoclave Raypa AES-75 Dry, Estufa Incubadora VWR Scientific, Balanza toploading Mettler 682B, Agitador magnético Stuart Scientific, Baño maría Tecam, Shaker Orbital Labline, Agitador de tubos Fisher y Flujo Laminar Envair.

Se determinó, la Porción de Item de la Muestra (Sample Item Portion) SIP = 1 y luego se realizaron las 10 pruebas de recuento total establecidas en la etapa 1. Se emplearon membranas de acetato de celulosa, de 47 mm de diámetro y 0,45µm de poro. Las muestras se incubaron a 30°C durante 72 horas. Los medios de cultivo utilizados fueron Agar Plate Count, Merck y Caldo Casoy, Merck.

Se elaboraron registros de las pruebas realizadas.

- **Etapa 4:** Establecimiento de la dosis de verificación (DV)
Se estableció la dosis de verificación (DV) de acuerdo a la fórmula $DV = I + [S \times \log(\text{carga microbiana promedio del SIP})]$; donde I es el intercepto y S es la pendiente de la recta; (Norma ISO/TR 13409:Tabla 2: Valores I y S para el cálculo de la dosis de verificación).

- **Etapa 5:** Realización del experimento de la dosis de verificación
Se procedió a irradiar 10 aloinjertos a la DV encontrada. Las 10 muestras se incubaron durante 14 días a 37 °C. El medio de cultivo que se empleó fue caldo Casoy, Merck. Las irradiaciones se llevaron a cabo en el Gammacell 220, Nordion Canada, fuente de irradiación gamma con 24, 000 Ci de actividad.

Los dosímetros empleados fueron Fricke y Etanol clorobenceno, elaborados según las normas ASTM E1026-95 y ASTM E1538-99 respectivamente. La dosimetría Fricke se realizó en aire y en producto, utilizando un total de 35 dosímetros. El peso de los aloinjertos de hueso en la cámara de

irradiación fue de 500 g. Las lecturas de absorbancia de los dosímetros Fricke luego de irradiados se realizaron en el Espectrofotómetro Perkin Elmer, UV VIS, Lambda 2. A modo de control, se colocó un dosímetro de etanol clorobenceno al irradiarse los 10 aloinjertos de hueso a la dosis de verificación encontrada y la conductividad se midió en el oscilótulador OK-302/1 Radelkis. Se elaboraron registros de las pruebas realizadas

3. Resultados

Los resultados de los recuentos fueron los siguientes:

NUMERO DE UNIDADES DEL LOTE: 35	
TAMANO DE MUESTRA: 10	
SIP = 1	
RECuento DE AEROBIOS MESOFILOS	
Nº de Aloinjerto	Ufc
1	9
2	11
3	13
4	18
5	15
6	8
7	25
8	16
9	13
10	22
TOTAL	150

La dosis de verificación (DV) se determinó como sigue:

$$DV = 0,67 + (2.23 \times \log 15)$$

$$0.67 + (2.23 \times 1.1760)$$

$$DV = 3.2927 \text{ kGy}$$

Los resultados del experimento con la dosis de verificación arrojaron en las 10 pruebas de esterilidad negativo.

La lectura del dosímetro de etanol clorobenceno fue de 3.5 kGy, valor en el rango indicado por la norma $DV \pm 10\%$

La dosimetría Fricke arroja los siguientes resultados: tasa de dosis en el irradiador en aire, 18,50 kGy/hr; densidad del producto en el irradiador, 0.141 g/cc. Tasa de dosis mínima y máxima en el producto 14.3089 kGy/hr y 23.0538 kGy/hr respectivamente. Asimismo, se generó documentación de la calidad, la misma que incluyó formatos, procedimientos normalizados de operación, instrucciones de trabajo y registros.

4. Discusión

Los resultados obtenidos, permiten aplicar la norma ISO TR 13409 para validar la dosis de esterilización de los aloinjertos de hueso del lote que se utilizó para realizar este trabajo ya que:

- El número de unidades del lote de producción fue de $35 < 1000$ items.
- La carga microbiana promedio de 10 muestras estudiadas fue de 15 UFC/ item < 1000 UFC/ item.
- Los resultados de la prueba de esterilidad son adecuados, ya que las 10 muestras estudiadas arrojaron resultados negativos, cumpliendo la norma que permite como mínimo un resultado positivo de 10 muestras evaluadas.
- El valor práctico de la dosis de verificación se encuentra en el rango especificado por la norma, es decir, $\pm 10\%$ de la DV

5. Conclusiones

- La dosis de 25 kGy entregada a los aloinjertos de hueso se ha validado mediante la norma ISO 13409: 1996, tal como lo estipula el Código de Práctica del OIEA.
- Se ha ejecutado parte inicial del trabajo que involucra la aplicación total del Código de Práctica del OIEA para la esterilización de aloinjertos de hueso en IPEN.
- La documentación de la calidad generada, permite una mejor trazabilidad del producto mejorando su calidad.
- Se han fortalecido las acciones que permitirán implementar un sistema de la calidad para la irradiación de aloinjertos de hueso

Bibliografía

1. ISO/TR 13409. 1996. Sterilization of health care products – Radiation sterilization – Substantiation of 25 kGy as a sterilization dose for small or infrequent production batches.
2. Code of practice for the Radiation Sterilization of Tissue Allografts: Requirements for Validation and Routine Control. Boston USA 2002.
3. ISO 11737-1 1995. Sterilization of Medical Devices – Microbiological Methods – Part 1: Estimation of populations of microorganisms on products.

4. ISO 11737-2: 2000 Sterilization of medical devices- Microbiological methods- Part 2: Tests of sterility performed in the validation of a sterilization process.
5. ISO 11137- 1995. Sterilization of Health Care Products - Requirements for validation and routine control – Radiation Sterilization.
6. Nather, A. The Scientific Basis of Tissue Transplantation. Advances in Tissue Banking Vol 5, World Scientific, 2001.
7. Phillips, G. O. Radiación y Operación de Banco de Tejidos, 2001.