

Aplicación del código de práctica del OIEA para la validación de la dosis de esterilización por radiación gamma en aloinjertos de hueso

Emma Castro ecastro@ipen.gob.pe

Instituto Peruano de Energía Nuclear. Dirección General de Investigación y Desarrollo Tecnológico, Laboratorio de Irradiación de Productos Médicos. Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

Resumen

En el Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN) se esterilizan aloinjertos de hueso para implantes, procesados en Bancos de Tejidos a dosis estándar de 25 kGy. Esta dosis ha sido validada mediante la norma ISO/TR 13409:1996, para los mismos fines de validación puede aplicarse el “Código de Práctica para la Esterilización por Radiación de Aloinjertos de Tejidos: Requerimientos para la Validación y Control de Rutina” elaborado por el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) y específico para tejidos biológicos. El uso de este documento permite disminuir la dosis de esterilización estándar aplicando lineamientos del aseguramiento de la calidad. El presente trabajo muestra los resultados para la validación de la dosis de radioesterilización en aloinjertos de hueso, aplicando el Código del OIEA. Se trabajaron 03 lotes de aloinjertos de hueso proporcionados por el Banco de Tejidos “Rosa Guerzoni Chambergó”. Los valores promedios de cargas microbianas fueron de 3, 0.65 y 7 UFC/item, siendo las dosis sub-esterilizantes que se aplicaron a las muestras de hueso de 2, 1 y 2,7 kGy respectivamente. Las pruebas de esterilidad realizadas cumplieron con los requisitos establecidos por el Código, siendo los valores validados de las dosis de irradiación para cada lote de: 15,8; 13,6 y 17,0 kGy, respectivamente. Las irradiaciones se llevaron a cabo en un equipo Gammacell-220 con una actividad de 17 000 Ci. En conclusión, este trabajo permite disminuir la dosis de esterilización estándar de 25 kGy a las dosis indicadas, aplicando un sistema de aseguramiento de la calidad que comprende también a los procesos que se llevan a cabo en los bancos de tejidos previa irradiación. También sirve de modelo para ser aplicado en otros tejidos para injertos, de origen humano u animal, que se procesan actualmente en bancos de tejidos de Perú.

Abstract

Bone allografts processed at Peruvian tissue banks are gamma-ray sterilized at the Peruvian Institute of Nuclear Energy (IPEN) using the standard dose of 25 kGy. This dose, that has been validated through ISO/TR 13409:1996, can be reduced following quality assurance procedures and guidelines specified at the IAEA document “Code of Practice for the Radiation Sterilization of Tissue Allografts: Requirements for Validation and Routine Control”. The purpose of this work is to validate the radiation sterilization dose delivered to bone allografts using the IAEA Code of Practice. Samples of 03 batches of bone allografts were provided by “Rosa Guerzoni Chambergó” tissue bank. Average values of bioburden present at the three batches were 3, 0.65 and 7 UFC/item, obtaining sub-sterilization doses of 2, 1 and 2,7 kGy respectively. Sterility tests performed fulfilled the requirements established by the Code, achieving validated dose values of 15.8; 13.6 and 17.0 kGy, for each tested batch. Irradiations were performed in the Gammacell-Excel, irradiation equipment with an activity of 17 000 Ci. Finally, this work allows to diminish 25 kGy as sterilizing dose to the stated above dose values, in a frame of a quality assurance system that also comprises the processes held at tissue banks previous irradiation. Besides, it also is a model to be applied for other biological tissues of human or animal origin that are currently processed at tissue banks of Peru.

1 Introducción

La práctica médica requiere de aloinjertos de hueso para tratar diversas condiciones médicas que involucran al sistema esquelético. Una de las etapas decisivas durante la producción de estos productos, es la esterilización.

Salvo que, todas las etapas de elaboración de los aloinjertos de hueso se realicen en ambientes estériles, no se requiere esterilizar al producto final. En caso contrario, se requiere de la aplicación de un agente esterilizante que además de eliminar los microorganismos presentes en el producto no dañe sus propiedades y sea seguro para su

uso. En la actualidad, el método de esterilización que se utiliza, por excelencia, es la radiación gamma proveniente de una fuente de Co-60.

La operación de banco de tejidos, es decir, la etapas que comprenden la selección del donante, la procuración, el procesamiento, distribución y aplicación médica, deben llevarse a cabo bajo un sistema riguroso de la calidad que permita la trazabilidad y validación de los procesos involucrados.

Las acciones de validación permiten establecer evidencia que proporciona un alto grado de aseguramiento, que un proceso específico o un producto cumplirá con las especificaciones y atributos de calidad previamente determinados.

Para que el proceso de radioesterilización cumpla con los requisitos que establece un sistema de la calidad, la dosis que se entrega para eliminar a los microorganismos debe ser validada.

Para validar la dosis de radioesterilización, se puede aplicar la norma ISO/TR 13409:1995 [1] ó el documento Código de Práctica del OIEA “Esterilización por Radiación de Aloinjertos, de Tejidos” [2].

Este último documento que adopta los principios estipulados en la norma ISO 11137-1995 [3], se elaboró bajo el auspicio del OIEA durante la ejecución de su Programa Mundial “Banco de Tejidos y Radiación”, en el que participó también el Perú [4]. Este documento responde a la necesidad de contar con una guía específica para la esterilización por radiación de aloinjertos de tejidos, dadas las características especiales y específicas de los tejidos para injertos, los que distinguen claramente de los productos estériles, de uso médico, que se producen industrialmente. Estas características específicas están relacionadas con la uniformidad de la forma y tamaño de los tejidos; carga microbiana variable de donante a donante; necesidad de pruebas de tamizaje del donante para excluir el riesgo de posible contaminación microbiana al receptor del injerto y el pequeño número de unidades obtenido por lote de producción. Por otro lado, el Código de Práctica solo se puede aplicar si la esterilización por radiación es la etapa final de una secuencia de

procedimientos cuidadosamente documentados y detallados, que involucran a los procesos realizados en bancos de tejidos previa esterilización, como son: la selección del donante, procuración de los tejidos y el procesamiento.

El presente estudio tiene por objetivo validar la dosis de esterilización que se entrega a los aloinjertos de hueso, producidos en Bancos de Tejidos, aplicando el “Código de Práctica del OIEA para la Esterilización por Radiación de Aloinjertos, de Tejidos”. Este trabajo, también tratará de disminuir la dosis de 25 kGy, que actualmente se entrega, así como evaluar la performance de los procesos que intervienen en la aplicación de la dosis esterilizante. Como antecedente previo a este trabajo, mediante la norma ISO/TR 13409:1995, se ha validado la dosis de 25 kGy con que actualmente se esterilizan los aloinjertos de hueso [5].

Esta investigación forma parte de un trabajo más completo que comprende la aplicación de normativas y del aseguramiento de la calidad en los procesos involucrados en la radioesterilización de aloinjertos de tejidos con el propósito de incrementar la calidad de los aloinjertos de tejidos producidos en los Bancos de Tejidos. Igualmente, se prevé que contribuya a la normatividad nacional sobre el funcionamiento de banco de tejidos que esterilizan aloinjertos por radiación gamma.

2 Metodología

El Banco de Tejidos “Rosa Guerzoni Chambergó” del Instituto de Salud del Niño proporcionó 03 lotes de aloinjertos de hueso liofilizados. El tipo de injertos entregado fue chips esponjosos y chips cortico-esponjosos. El tejido óseo pertenecía a 03 donantes diferentes, con las siguientes características:

Donante 1: Sexo masculino, 31 años
Donante 2: Sexo masculino, 36 años
Donante 3: Sexo masculino, 27 años

Los lotes de trabajo se denominaron Lote 1, 2 y 3 y correspondieron a los Donantes 1, 2, y 3 respectivamente.

A todos los donantes se les realizó el tamizaje serológico que permitió la procuración de los tejidos. Estas pruebas incluyeron: Anticuerpos contra HIV 1,2; Anticuerpos contra la Hepatitis C, Antígenos de

superficie de Hepatitis B y VRDL. El tejido óseo se procuró de la cresta iliaca y columna vertebral obteniéndose chips de hueso esponjoso y córtico-esponjoso.

Todas las actividades previas a la irradiación se llevaron a cabo según los Estándares de Banco de Tejidos del OIEA [6].

El orden y denominación de las actividades que se llevaron a cabo para realizar la validación de la dosis en los tres lotes de aloinjertos de tejidos, se consignan a manera de etapas, tal como se estipula en el Código de Práctica del OIEA. Estas etapas, que fueron aplicadas a cada lote de aloinjertos por separado, fueron:

Etapas 1: Establecimiento de los tamaños de las muestras para las pruebas y determinación de la Porción del Item de la Muestra (SIP)

En esta parte del trabajo se determina el número de unidades que se utilizará para realizar las pruebas que se indican en las diferentes etapas de la investigación. La cantidad de muestras de trabajo depende del número de unidades obtenidas en el lote de producción. En la Tabla 1 se observa el número de unidades de aloinjertos obtenidos por cada lote de producción. Al requerir, trabajar con un Nivel de Aseguramiento de la Esterilidad (SAL, sterility assurance level) de 10^{-1} , se determinó trabajar con 10 unidades por lote para la determinación de la carga microbiana (Etapas 3) y 10 unidades por lote para el experimento de verificación de la dosis (Etapas 4).

Etapas 2: Obtención de muestras (unidades de producto)

A partir de cada lote de producción se selecciona aleatoriamente 20 unidades de producto, es decir de chips. Así, el trabajo completo se realizó con 60 unidades de aloinjertos de hueso.

Etapas 3: Determinación de la Carga Microbiana Promedio

En esta etapa se determina la Porción del Item de la Muestra (SIP, siglas por Sample Item Portion, en inglés), que depende del tipo y tamaño del aloinjerto y se determina la carga microbiana promedio del SIP seleccionado.

Siendo chips, el tipo de aloinjerto de hueso, de aproximadamente 1 cc, se trabajó con un SIP equivalente a 1, es decir, no se fraccionó la unidad de producto.

La determinación de la carga microbiana promedio, se realizó utilizando 10 unidades de producto, mediante la prueba de recuento total de microorganismos, usando la técnica de filtración, según la Norma ISO 11737-1 1995 [7]. Para ello se emplearon membranas de acetato de celulosa, de 47 mm de diámetro y $0,45\mu\text{m}$ 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

Etapas 4: Cálculo de la dosis de verificación

Para el cálculo de la dosis de verificación, denominada también sub-esterilizante, se asume una distribución estándar de resistencias de los microorganismos presentes en los aloinjertos de tejidos. El dato que se obtiene de los resultados de las pruebas de carga microbiana promedio, se utiliza para determinar la dosis de verificación, utilizando el Código de Práctica [8].

Luego se procedió a la irradiación de 10 unidades de aloinjertos por lote (número estipulado en la Etapas 1) a las dosis de verificación encontradas. Las irradiaciones se llevaron a cabo en un equipo Gammacell-Excel con fuentes de Co-60 y una actividad de 17 000 Ci al mes de enero del 2006. Las mediciones de las dosis se realizaron en el Espectrofotómetro Perkin Elmer Modelo, UV VIS, Lambda 2. Los dosímetros utilizados fueron Fricke como sistema de referencia y etanol clorobenceno como sistema rutinario. Las dosis de verificación se midieron en el equipo Oscilótrotador/TRIEM, utilizando, un dosímetro de etanol clorobenceno

Se elaboraron registros de las actividades realizadas

Etapas 5: Realización del experimento de verificación de la dosis.

Se realizaron las pruebas de esterilidad (de acuerdo a la Norma ISO 11737-2: 2000 [9]) a todas las muestras irradiadas a la dosis de verificación, incubándose las muestras durante 14 días a 28°C . El medio de cultivo empleado fue Caldo Casoy, Merck.

Los equipos utilizados para realizar las pruebas microbiológicas de recuento total de microorganismos y de esterilidad 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 Enviar. Se elaboraron registros de las pruebas realizadas

Etapa 6: Selección de la Dosis de Validación

Los resultados obtenidos de las pruebas de esterilidad permitieron extrapolar el valor de la dosis de verificación a la dosis de validación para un SAL de 10^{-6} . Para ello, se consultó la Tabla 2b: "Radiation dose (kGy) required to achieve a SAL of 10^{-6} for different bioburdens having standard distribution of resistances (Dosis de radiación (kGy) requerida para lograr un SAL de 10^{-6} para diferentes cargas microbianas con una distribución estándar de resistencias)", ubicada en el Código de Práctica [10].

3 Resultados

En la Tabla 1 se muestra el número de unidades obtenidas por lote de producción y el tipo de aloinjertos entregados por el Banco de Tejidos. A partir de estos datos se obtuvieron los tamaños de las muestras para las pruebas de validación de la dosis así como para determinar el SIP.

Tabla 1. Etapa 1: Establecimiento de los tamaños de las muestras para las pruebas y el SIP.

Lote de Aloinjerto de Hueso	Número de unidades en el lote de producción	Tipo de aloinjerto de hueso	SIP
Lote 1	21	Chips esponjosos	1
Lote 2	26	Chips esponjosos	1
Lote 3	51	Chips cortico-esponjosos	1

En la Tabla 2 se muestra el número de muestras obtenidas a partir de los lotes de producción de aloinjertos.

Tabla 2. Etapa 2: Obtención de Muestras.

Lote de Aloinjerto de Hueso	Número de unidades seleccionadas aleatoriamente para la validación de la dosis
Lote 1	20 Chips esponjosos
Lote 2	20 Chips esponjosos
Lote 3	20 Chips córtico- esponjosos

Los resultados de la determinación de la carga microbiana promedio en los tres lotes en estudio, correspondientes a la Etapa 3, se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Etapa 3: Determinación de la Carga Microbiana Promedio de los Lotes 1, 2 y 3 de Aloinjertos de Hueso.

Nº de Aloinjerto	SIP = 1, n=10; i=1...10 x _i [UFC/100m/item]		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
1	5	0	4
2	0	1	6
3	2	0	8
4	2	0	10
5	3	0	7
6	2	1	12
7	5	2	4
8	4	0	6
9	4	1	8
10	3	1	5
Σx _i	30	6	70
Σx _i /n =	3	0.6	7

Se observa que los resultados de los 10 recuentos efectuados indicaron los valores promedio de 3; 0,6; y 7 UFC/item para los lotes 1, 2 y 3 respectivamente. En el caso del Lote 2 se asumió el valor de 0,65 ubicado en la Tabla 2a del Código de Práctica. En la Tabla 4 se presentan las dosis de verificación, obtenidas de acuerdo a las cargas microbianas promedio encontradas.

Tabla 4. Etapa 4: Cálculo de la Dosis de Verificación según carga microbiana promedio de los Lotes 1, 2 y 3.

Lote	Carga Microbiana Promedio [UFC/100m/item]	Dosis de Verificación [kGy]
1	3	2
2	0.65	1
3	7	2,7

La irradiación de 10 unidades por lote de aloinjertos de hueso, con las dosis de verificación encontradas, se llevó a cabo con dosímetros de etanol-clorobenceno ubicados en los sitios de dosis mínima. La lectura post-irradiación de los dosímetros, indicó que los valores prácticos de las dosis entregadas estuvieron en el rango de $\pm 10\%$.

En la Tabla 5 se observan los resultados de las pruebas de esterilidad realizadas a las 10

muestras irradiadas por cada lote, a las dosis de verificación respectivas.

Tabla 5. Etapa 5: Realización del Experimento de Verificación de la Dosis - Pruebas de Esterilidad realizadas en los Lotes 1, 2 y 3 de Aloinjertos de Hueso.

<i>Número de Lote</i>	<i>Número de unidades por prueba</i>	<i>Resultado</i>
1	10	10 negativas
2	10	10 negativas
3	10	10 negativas

Los resultados de las 10 pruebas de esterilidad efectuadas en los aloinjertos de hueso tratados con la dosis de verificación arrojaron en todos los casos un resultado negativo.

En la Tabla 6 se muestran los valores seleccionados de las dosis validadas de los tres lotes estudiados

Tabla 6. Etapa 6: Selección de la Dosis de Validación en los Lotes 1,2 y 3 de Aloinjertos de Hueso.

<i>Lote</i>	<i>Dosis Validada [kGy]</i>
1	15.8
2	13.6
3	17.0

En resumen, los resultados obtenidos, que se muestran en las tablas anteriores nos indican que:

- En todos los casos el número de unidades del lote de producción fue < 100 items y que la carga microbiana promedio de los tres lotes estudiados fue < 1000 UFC/ item cumpliendo con los requisitos necesarios para poder aplicar el Código de práctica del OIEA.
- El valor práctico de la dosis sub-esterilizante se encuentra en el rango especificado por la norma
- La prueba de validación de la dosis es pertinente en el caso de los tres lotes, ya que todos los resultados de las pruebas de esterilidad fueron negativos, cumpliendo con las especificaciones de la norma, que indica que solo se puede obtener un resultado positivo en 10 pruebas de esterilidad efectuadas .
- El valor de las dosis validadas para los tres lotes examinados, fue de 15.8, 13,6 y 17 kGy.
- Se elaboró la correspondiente documentación de la calidad para todas las

actividades que se llevaron a cabo, durante las Etapas del trabajo.

4 Conclusiones

- Se ha validado la dosis de esterilización en 03 lotes de aloinjertos de hueso de acuerdo al Código de Práctica del OIEA, logrando valores de dosis, en todos los casos menores de 25 kGy.

- La aplicación del Código de Práctica del OIEA para validar la dosis en aloinjertos de tejidos permite disminuir el tiempo de irradiación de los aloinjertos de hueso optimizándose el proceso de irradiación de productos.

- La documentación de la calidad que se ha generado a través de este trabajo, permite una mejor trazabilidad del producto dando como resultado el incremento de la calidad del producto así como la calidad del servicio de irradiación entregado.

- Se han fortalecido las acciones que permitirán implementar un sistema de la calidad para la irradiación de aloinjertos de hueso y otros tejidos tanto de origen humano como animal.

- Este trabajo ha permitido adquirir experiencia en la validación de la dosis en tejidos para injertos y sirve de modelo para realizar trabajos similares.

Se recomienda completar la implementación del Código de Practica del OIEA para la esterilización por radiación de aloinjertos de hueso. Esto permitirá ofrecer un servicio de irradiación de calidad incrementada.

5 Agradecimientos

Se agradece al Ing. Marco Linares y al grupo de Irradiación por el apoyo brindado para las irradiaciones requeridas en este trabajo. A la Bióloga Kety León por el apoyo en las pruebas microbiológicas.

6 Referencias

[1] ISO-TR 13409:1996. Sterilization of health care products-Radiation

- sterilization-Substantiation of 25 kGy as 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 11137:1995 Sterilization of Health Care Products-Requirements for Validation and Routine Control – Radiation Sterilization.
- [4] Programa de Banco de Tejidos y Radiación del OIEA [home page de Internet] Disponible en: www.iaea.org
- [5] Castro E. Substanciación de la dosis de radioesterilización para aloinjertos de hueso. En: Instituto Peruano de Energía Nuclear. Informe Científico Tecnológico 2004; Lima: Perú; 2005. p. 155-158.
- [6] International Standards on Tissue Banks. The IAEA Programme in Radiation and Tissue Banking, First Meeting of the IAEA Technical Advisory Committee. Boston: United States; 2002.
- [7] ISO 11737-1 1995 Sterilization of Medical Devices – Microbiological Methods – Part 1: Estimation of Populations of Microorganisms on Products.
- [8] International Atomic Energy Agency. IAEA Code of Practice for the Radiation Sterilization of Tissue Allografts: Requirements for Validation and Routine Control. Table 2a: Radiation dose required to achieve given SAL for different bioburden (cfu) having standard distribution of resistances. Boston, USA 2002. p. 31.
- [9] ISO 11737-2: 2000 Sterilization of medical devices- microbiological methods- part 2: Tests of Sterility performed in the Validation of a Sterilization Process.
- [10] Code of Practice for the Radiation Sterilization of Tissue Allografts: Requirements for Validation and Routine Control. Boston, USA 2002. p. 34.