

Empleo de las Radiaciones Gamma como Método de Esterilización en Biomateriales.

Lic. Lenay Barrera Barroso¹, MsC. Isabel Otero Abreu¹, Dania Rodríguez Nápoles¹, Lic. Yolma González Rodríguez²

¹Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear. Calle 30 #502 esq. 5^a, Playa, Miramar
Tel: 202-2567 e-mail: lenay@ceaden.edu.cu

²Departamento de Cerámicas y Composites, Centro de Biomateriales, Univ. de La Habana
Telef.: 70 05 94

RESUMEN: La esterilización de productos médicos es una de las principales aplicaciones de las radiaciones ionizantes, la cual a escala comercial fue aplicada a mediados de los años 50. En los años 70 se radio esterilizaban menos del 10% de estos materiales, pero a principios de los años 90 ascendía a más del 70%, con tendencia al aumento. El objetivo del presente trabajo fue determinar la dosis de esterilidad para los lotes de Alginato de Sodio, Quitosana y de Apafill-BP, en estado sólido, estudiados para lograr la esterilización de los mismos con un nivel de aseguramiento de 10^{-6} . Se realizó la determinación del efecto bacteriostático y fungistático y la determinación de la carga microbiana mediante el empleo de los métodos descritos en la ISO 11737-1 y el valor de dosis esterilizante mediante la expresión matemática que relaciona la carga microbiana presente en el producto, el valor de del microorganismo contaminante y el Nivel de Aseguramiento de la Esterilidad (SAL). Se obtuvo que los productos no presentaban efecto bacteriostático ni fungistático. Con los valores de carga microbiana promedio, el valor D_{10} y el SAL 10^{-6} se realizó el cálculo de la dosis esterilizante para cada lote de producto obteniéndose una dosis menor a los 25 kGy para cada uno. Todas las muestras irradiadas a las dosis de verificación se encontraron libres de microorganismos. Se obtuvo que los productos estudiados pueden ser esterilizados mediante el empleo de las radiaciones gamma lográndose la esterilidad con un nivel de aseguramiento de 1:1000000.

ADSTRACT: The sterilization of medical products is one of the principal applications of the radiations, which at commercial scale were applied to half-filled of the years 50. In 70 years, the average of radio sterilised materials was less than 10%, but at the beginning of the years 90 ascended at more than the 70%, with tendency at the increase for dry raw materials, principally. The objective of the present work was determine the dose of sterility for the batch of Alginato of Sodium, Quitosana and Apafill-BP, in being solid, studied in order to achieve the sterilization of the same with a Sterility Assurance Level of 10^{-6} . It was carried out the bacteriostatic and fungistatic effect determination, previously, and the determination of the bioburden by means ISO 11737-1. The sterilised dose was calculated by means of mathematical expression that relates the bioburden of the product, the D_{10} value of the most resistant micro organism at the product and the Sterility Assurance Level. It was gotten that the products didn't have bacteriostatic neither fungistatic effects. The sterilized dose for each batch of product was less than 25 kGy for each one. The verification dose experiment was successful; all the irradiated samples were sterile. It was gotten that the studied products could be sterilized gamma by means of the employment of the radiations achieving the sterility with a level of insurance of 1: 1000000.

Palabras Clave: radiaciones ionizantes, productos médicos, esterilización.

Key Words: radiations, medical products, sterilization.

INTRODUCCION

La esterilización de productos médicos es una de las principales aplicaciones de las radiaciones ionizantes, la cual a escala comercial fue aplicada a mediados de los años 50. En los años 70 se radio esterilizaban menos del 10% de estos materiales, pero a principios de los años 90 ascendía a más del 70%, con tendencia al aumento (1).

La radio esterilización es una técnica aplicable a muchos dispositivos de uso médico, productos farmacéuticos y materias primas, los cuales deben estar libres de microorganismos que puedan transmitir enfermedades infecciosas o alterar las características físicas químicas de los productos.

La International Standard Organization (ISO) ha publicado varias normas relativas a este proceso de esterilización, como la ISO 11137, ISO 13409, ISO 11737-1 y ISO 11737-2, entre otras. La gran ventaja es que la radiación gamma, proveniente de fuentes tales como el ^{60}Co , puede penetrar a través de productos de gran espesor, sin importar el tipo de producto, la densidad o el empaque empleado, no deja residuos tóxicos en el producto por lo que el mismo puede ser empleado sin necesidad de una cuarentena y además el único parámetro que debe ser controlado es el tiempo de exposición (2).

Con este trabajo nos propusimos esterilizar mediante el empleo de radiaciones gamma los biomateriales, Alginato de Sodio, Apafill-BP y Quitosana, en su estado sólido, lo cual está recomendado para evitar la acción de los radicales libres producidos durante la radiólisis del agua, mediante el empleo de la expresión matemática que relaciona, la carga microbiana presente en el producto, el valor de D_{10} del microorganismo contaminante y el Nivel de Aseguramiento de la Esterilidad, para lograr el nivel de esterilidad necesario en dichos productos.

MATERIALES Y METODOS

Recobrado de la carga microbiana.

Para establecer una dosis de esterilización adecuada, es necesario conocer la carga microbiana presente en el producto a esterilizar con la mayor precisión posible. La muestra, de cada producto, empleada para la determinación de la carga microbiana se seleccionó de acuerdo al tamaño del lote, tomando 10 porciones de 10 mg. Se sumergieron las porciones de cada producto, en frascos de Erlenmeyer que contenían 25 mL del líquido de extracción: agua peptonada al 0.1% (3), además del surfactante Tritón X al 0.1-1%.

Los frascos Erlenmeyer se agitaron en una zaranda orbital a 75 RPM durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se tomaron alícuotas de 1 mL de las suspensiones obtenidas y se depositaron en placas vacías estériles a las cuales se añadió un volumen de 25 mL Agar Triptona Soya fundido y a una temperatura de 45 °C aproximadamente, las placas con el medio nutritivo solidificado se incubaron a 35 +/- 2 °C durante 72 h, envueltas en papel estéril.

Se mantuvieron placas de Agar Triptona Soya expuestas dentro del flujo laminar durante todo el experimento, como un control ambiental.

Transcurrido el tiempo de incubación se realizó el conteo de colonias en un estereoscopio Olympus CH-2 para determinar la carga microbiana como ufc/gramo de producto. Se realizaron 3 réplicas de este experimento.

Determinación del efecto bacteriostático y fungistático de los tejidos

Para comprobar que el producto no tiene efectos inhibitorios para el crecimiento microbiano que pudieran interferir en el resultado de la prueba de esterilidad y del experimento de verificación de dosis, reflejando falsos negativos es necesario realizar este ensayo, el cual se llevo a cabo según métodos descritos en la USP24-NF18 (4) y la ISO 11737-1 (5).

Curva dosis- efecto

Se realizó la curva según PT-LM-10 procedimiento técnico del laboratorio de microbiología del CEADEN para realizar las curvas dosis-efecto ante la acción de los rayos gamma, el cual plantea los siguientes pasos. Los microorganismos aislados se cultivaron en medio óptimos según sus requerimientos nutricionales. Después del crecimiento hasta la fase estacionaria de los mismos se realizó una suspensión a una concentración de 10^7 - 10^8 ufc/mL, comprobando esto mediante el conteo en cámara de Newbauer. Dicha suspensión se distribuyó en tubos y las mismas fueron irradiadas. Se realizó conteo de viables y se elaboró un gráfico de dosis vs log N/No donde N es el conteo promedio de una dosis determinada y No el conteo en el control. Se realizó el cálculo del D_{10} para cada producto el cual se calcula como el inverso de la pendiente de la recta resultante.

Calculo de la dosis de verificación y dosis esterilizante

Con el valor del D_{10} (dosis de radiación necesaria para la inactivación del 90 % de la población microbiana inicial) y el valor de la carga microbiana (CM) se realizó el cálculo de la dosis esterilizante (D_s) y la dosis de verificación (D_v) de cada lote de producto, mediante la aplicación de la ecuación que relaciona D_{10} , Nivel de Aseguramiento de la Esterilidad (SAL, el cual es un factor de seguridad que está preestablecido de acuerdo a la vía de entrada del producto en el cuerpo humano) y carga microbiana, según Kairiyama (6).

$$D_s = D_{10} (\log CM + \log SAL) \text{ donde el SAL es } 10^{-6}$$

$$D_v = D_{10} (\log CM + \log SAL) \text{ donde el SAL es } 10^{-2}$$

Irradiación de las muestras.

Para la irradiación fue empleada una instalación auto blindada, modelo PX- γ -30, con fuentes de cobalto 60. Con un volumen efectivo de 4.4 L. La distribución del campo de dosis de la instalación y la calibración del proceso de irradiación se realizaron mediante el sistema dosimétrico Fricke (7); mientras que en el control del proceso fueron empleados dosímetros Red Perspex (8).

Se emplearon las siguientes cepas: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 2091 y *Escherichia coli* ATCC 25922. El ensayo se realizó de acuerdo a la United Standards Pharmacopea (4).

Prueba de esterilidad

Las pruebas de esterilidad se realizaron bajo las condiciones necesarias para evitar la ocurrencia de falsos positivos. El método empleado fue el de inmersión directa de las muestras de producto (irradiadas a la dosis de verificación calculada) en Caldo Triptona Soya, según se recomienda en la ISO/TC 198 No.175 (9). La incubación se realizó durante 14 días, 72 horas a 35 \pm 2 °C y 11 días a la temperatura del cuarto, según la Norma ISO/TC 198 No. 175 (9) y la Norma Cubana 26-211-1(10).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La determinación del efecto bacteriostático y fungistático de los productos no es requerido explícitamente por la norma, sin embargo es necesario tener en cuenta que durante el procesamiento de las muestras, las mismas pueden estar en contacto con sustancias ajenas al producto, que de permanecer en el producto final a determinadas concentraciones provocarían falsas interpretaciones de los resultados del ensayo de esterilidad. El ensayo de determinación del efecto bacteriostático y fungistático confirmó que la Quitosana, el Alginato de sodio y el Apafill-BP no presentaban sustancias tóxicas a los microorganismos que pudieran provocar falsos negativos en el ensayo de esterilidad.

En la fig. 1 se muestran las curvas de radioresistencia que se obtuvieron para cada uno de los tres microorganismos, mas resistentes, aislados en los biomateriales estudiados siguiendo los pasos explicados en el acápite anterior. En los tres biomateriales se aislaron microorganismos pertenecientes al género *Bacillus*.

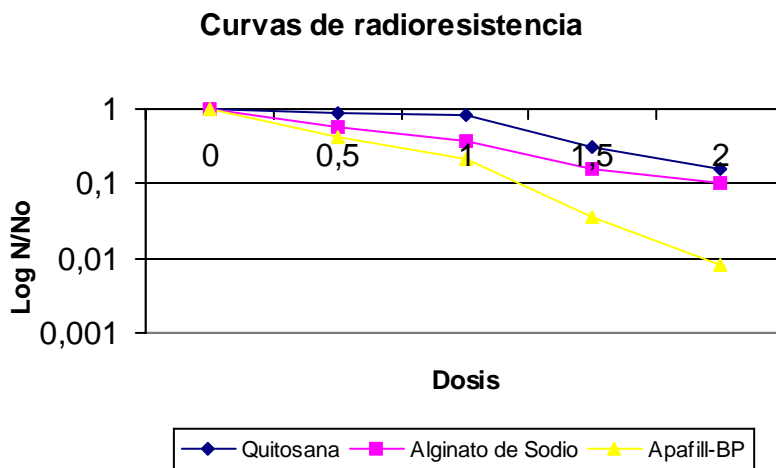


Fig.1. Curvas de radio resistencia de los microorganismos aislados

En la tabla 1 se muestran los resultados de la carga microbiana recobrada, los valores de D₁₀ y las dosis esterilizantes que se obtuvieron para cada uno de los lotes de producto estudiados empleando los métodos descritos en el acápite anterior.

Tabla 1. Valores de carga microbiana, D₁₀ y dosis esterilizantes de los tres lotes de productos.

Producto	Carga microbiana	Valor D ₁₀	Dosis de verificación	Dosis esterilizante
Quitosana	3.6 x 10 ² ufc/g	1.82 kGy	8,3 kGy	15.56 kGy
Alginato de Sodio	1.45 x 10 ² ufc/mL	1.9 kGy	7,9 kGy	15.5 kGy
Apafill- BP	1.0 ufc/mL	1.55 kGy	6,2 kGy	9.3 kGy

Con los valores de carga microbiana promedio obtenidos en cada lote de producto y el valor del D₁₀ de los microorganismos contaminantes más resistentes se procedió al cálculo de la dosis necesaria para obtener la esterilización del lote de producto con un Nivel de Aseguramiento de la Esterilidad (SAL) de 1: 1000000. En los resultados mostrados podemos ver como la dosis de esterilización de los lotes de biomateriales fue inferior a los 25 kGy, que es la dosis recomendada por la Norma ISO 13409 (11), la cual es empleada en muchos casos para la esterilización de este tipo de producto. Estos resultados demuestran que con el empleo de la expresión matemática es posible esterilizar el producto con una dosis menor y con un nivel de esterilidad elevado lo que favorece tanto al producto como al productor, ya que al recibir menor dosis se disminuye el riesgo de que el producto pueda ser afectado en cuanto a sus propiedades y se disminuye en el tiempo necesario para la esterilización del mismo.

La prueba de esterilidad de las muestras se realizó empleando Caldo Triptona Soya (CTS) para detectar la presencia de microorganismos aerobios mesófilos como se recomienda en la norma ISO/TC 198 (9) teniendo en cuenta las posibles fuentes contaminantes. En todos los casos las pruebas de esterilidad se Aceptaron, pues presentaron menos de 2 muestras positivas que es la condición necesaria establecida en la Norma para considerar que la radio resistencia de la población microbiana presenta un comportamiento similar a la de los microorganismos empleado en los estudios que sustentan la norma.

CONCLUSIONES

- La esterilización por radiaciones gamma es aplicable a los lotes de biomateriales estudiados siendo la misma menor a 25 kGy
- La dosis de esterilización para el lote de Quitosana fue de 15.56 kGy
- La dosis de esterilización para el lote de Alginato de Sodio fue de 15.5 kGy
- La dosis de esterilización para el lote de Apafill-BP fue de 9.3 kGy

REFERENCIAS

1. Mukherjee, R. N. IAEA standards applicable for sterilisation. In: Sterilisation of Medical Products, R.F. Morrissey, and Y.I. Prokopenco, eds, Johnson & Johnson, Polyscience Publication Inc., Morin Heights, Canadá, 117-124. 1991
- 2- Edwards, H.E. and Phillips, G.O. Influence of ionizing radiation on differents molecules. Radiat Phys Chem, 22, 889-900. 1983
- 3- Straka, R.P. and Stokes, J.L. Rapid Destruction of Bacteria in Commonly Used Diluents and its Elimination. Journal of Applied Microbiology, Vol 5, 21, 1957
- 4- United States Pharmacopeia XXIV <1225>, Validation of Compendial Methods, <1227>, Validation of Microbial Recovery from Pharmacopeial Articles and <61>, Microbial Limit Tests, 2001.
- 5- Norma ISO 11737-1. "Sterilization of medical devices- Microbiological methods- Part 1: Estimation of population of microorganisms on products." 1995
- 6- Kairiyama, E. Efecto de las radiaciones sobre los microorganismos. Radio sensibilidad. Valor D₁₀. Proceso de esterilización. Validación. Curso regional de capacitación para operadores de banco de tejidos. Comisión Nacional de Energía Atómica. Centro Atómico de Ezeiza, 1999

- 7- Prieto E.F.; Chávez, A.; Sainz, D. y Cuesta, G.L. Dosimetría para la puesta en marcha del irradiador de laboratorio MPX- γ -30. CIEN-R 10/97, 1997.
- 8- Prieto y Chávez. Influencia de diferentes factores en la calibración de los dosímetros Perpex (Red and Clear). **Nucleus**, **15**, 16-19, 1993.
- 9- ISO/TC 198. Sterilization of Medical Devices- Microbiological methods- Part 2: Test of sterility performed in the validation of sterilization process, 1994.
- 10- Norma Cubana 26-211-1. Buenas Prácticas de Producción. Producciones estériles. 1^{ra} Edición, 1995.
- 11- ISO/TR 13409. Sterilization of health care products-Radiation sterilization dose small or infrequent production batches. Technical Report. First Edition. 1996