

## Cytotoxicity of PVC tubes sterilized in ethylene oxide after gamma radiation exposure

### Citotoxicidad de tubos de PVC esterilizados por óxido de etileno luego de la exposición a radiación gamma

Traducción al español

#### RESUMEN

Los materiales esterilizados con radiación gama, al ser re-esterilizados por óxido de Etileno (EO), ¿forman sustancias tóxicas? Esta pregunta orientó el objetivo del presente estudio, que fue investigar el potencial efecto citotóxico del PVC esterilizado por radiación gamma y re-esterilizado por EO, usando el método de difusión en agar en cultivos celulares. Nueve tubos de PVC se sometieron a esterilización por radiación gamma y re-esterilizados por EO. Se les aplicaron en total 81 unidades de análisis, las que fueron testeadas de manera tal de representar las superficies internas, externas y la masa de cada tubo. Se concluyó que los materiales de PVC esterilizados con Radiación Gamma y, posteriormente, con EO, no son citotóxicos.

DESCRIPTORES: Esterilización - Rayos gamma - Óxido de etileno - Enfermería

#### INTRODUCCIÓN

En la práctica de rutina, la central de esterilización se maneja de acuerdo a la opinión de expertos (evidencia baja), en cuanto a no utilizar óxido de etileno (EO) para reesterilizar materiales reutilizables, previamente expuestos a radiación gamma. Se toma esta conducta a raíz de una carta publicada en 1967, que advierte acerca de la formación de etilenclorhidrina (ETCH) en dispositivos compuestos por cloruro de polivinilo (PVC) esterilizados por radiación gamma y luego por EO (1). Aunque no presentó datos experimentales, la carta promovió la realización de varios estudios en la década de 1970 y 1990. Cuatro estudios confirmaron la incompatibilidad de los dos métodos de esterilización (1-4) y otros tres refutaron la hipótesis (5-7). Debido a las controversias que surgieron respecto a la compatibilidad de estos métodos de esterilización, dos publicaciones, una de 1997(8) y otra de 2010(9), revisaron los datos disponibles. El primero concluyó que el número de estudios era insuficiente para establecer una afirmación y sugirió la realización de estudios adicionales. La segunda revisión analizó los siete estudios previos y **concluyó que la sensibilidad del método por cromatografía gaseosa fue demasiado baja** como para responder a esta pregunta experimental o empírica (es decir, no se pudieron detectar residuos debido a la baja sensibilidad del método, y quizá estaban presentes). La revisión también concluyó que la evidencia de los resultados de la incompatibilidad demostrada es débil, **porque los estudios aplicaron aireación ambiental al material tratado por EO y no aireación en cámara a 50 – 60°C temperatura como establece el método** validado. Las normas AAMI (Advanced Association of Medical Instrumentation) no aceptan la aireación ambiental (claro) (10). Tiene una eficiencia menor que la aireación mecánica en cámara con temperatura controlada (en realidad a temperatura ambiente no se logra la desorción de EO sino en cámara a 50-60°C temperatura).

Por ejemplo, la esterilización por EO de materiales de PVC, requiere la desorción del gas por aireación mecánica durante 8 a 12 horas en cámara, entre 50 y 60°C, mientras que el tiempo necesario para la desorción por aireación ambiental requiere 7 días (11).

Las muestras no esterilizadas se envasaron en pouch de plástico y se enviaron al Instituto de Energía e Investigación Nuclear (IPEN, São Paulo, Brasil) para esterilización por 25-kGy de radiación gamma. Después de la radiación, las muestras fueron enviadas para esterilización con EO usando una mezcla de 30% EO y 70% CO<sub>2</sub>, a una concentración de 480–600 mg/l y una presión de 0,40 kgf/ cm<sup>2</sup> (0,40 kilogramos fuerza/centímetro cuadrado), a temperatura de 50 ± 10°C y humedad relativa de 60±25%. La cámara se cargó al 80% de la capacidad máxima. El proceso de aireación inicial tuvo lugar en la propia cámara del esterilizador, usando tres pulsos de aire filtrado durante aproximadamente 30 minutos. Después de este paso, el material se transfirió a una cámara con aireación mecánica, donde permanecieron durante 10 horas a 50°C con 25 intercambios de aire por hora. El equipo utilizado se valida anualmente y los ciclos son monitoreados con indicadores biológicos clase 5 (Attest® 1294,3M® St. Paul, Minnesota, EE. UU.) e indicadores químicos (Browne®, Waterside Road, Reino Unido).

Nuestra hipótesis inicial se basó en que tanto EO como etilenclorhidrina y etilenglicol SE REMUEVEN POR EL PROCESO DE AIREACIÓN MECÁNICA EN CÁMARA. La ausencia de efectos citotóxicos en los cultivos celulares eliminarían las dudas de compatibilidad de estos métodos de esterilización.

Dos estudios (6-7) que mostraron compatibilidad con los dos métodos emplearon pruebas de cultivos celulares citotóxicos para evaluar la efectividad del método de aireación utilizado en el proceso de esterilización para remover residuos de OE y subproductos (byproducts) (12). En esos métodos, las muestras esterilizadas se testearon en células vivas en condiciones diseñadas para reproducir o replicar (to model) los efectos que el contacto con material que contiene residuos tóxicos podría tener en la práctica clínica. De este modo, las pruebas de citotoxicidad pueden ser capaces de resolver la cuestión de incompatibilidad de estos dos métodos de esterilización (7,9).

Nuestra hipótesis inicial se basó en el razonamiento de que EO y ETCH se remueven mediante la aireación mecánica, proceso recomendado por la AAMI. La ausencia de efectos tóxicos en cultivos celulares podría eliminar las dudas de compatibilidad de los métodos de esterilización. El objetivo de este estudio fue investigar los efectos citotóxicos de materiales constituidos por PVC esterilizados por radiación gamma y re-esterilizados por EO usando aireación mecánica.

## MÉTODO

Se tomaron muestras de tubos de PVC flexibles, no estériles, (RWR®, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil) de 1,5 m de longitud, con 1 cm de diámetro externo y 0,6 cm de diámetro interno. El tamaño de la muestra del estudio se calculó asumiendo una diferencia entre las medias experimentales del 50% de la desviación estándar. Se requirió un total de 74 unidades de análisis para un 95% de confianza y un 99% de potencia.

Las muestras no esterilizadas se envasaron en pouch de plástico y se enviaron al Instituto de Energía e Investigación nuclear (IPEN, São Paulo, Brasil) para esterilización por 25-kGy de radiación gamma. Después de la radiación, las muestras se esterilizaron con EO usando una

mezcla de 30% EO y 70% CO<sub>2</sub> a una concentración de 480–600 mg/l, una presión de 0,40 kgf/cm<sup>2</sup>, una temperatura de 50 ± 10°C y una humedad relativa de 60±25%. La cámara se cargó al 80% de la capacidad máxima.

El proceso de aireación inicial tuvo lugar en la propia cámara del esterilizador usando tres pulsos de aire filtrado durante aproximadamente 30 minutos. Luego, los materiales se transfirieron a una cámara de aireación mecánica donde permanecieron durante 10 horas a 50°C con 25 recambios de aire por hora. El equipo utilizado tiene una validación anual y los ciclos se monitorean con indicadores biológicos clase 5 (Attest® 1294, 3M® St. Paul, Minnesota, EE. UU.) e indicadores químicos (Browne®, Waterside Road, Reino Unido).

Dos estudios (6-7) que mostraron compatibilidad de los dos métodos emplearon pruebas de cultivos celulares apropiados para detectar citotoxicidad, para evaluar la efectividad del método de aireación utilizado en el proceso de esterilización para remover residuos de OE y subproductos (12). En esos métodos, las muestras esterilizadas se testearon en células vivas en condiciones diseñadas para reproducir los efectos que el contacto de los residuos tóxicos del material podría tener en la práctica clínica. De este modo, las pruebas de citotoxicidad tienen capacidad de resolver la cuestión de incompatibilidad de estos dos métodos de esterilización (7,9).

La hipótesis inicial de los investigadores se basó en el razonamiento de que EO y ETCH se eliminan mediante la aireación mecánica, proceso recomendado por la AAMI. La ausencia de efectos citotóxicos en cultivos celulares podría eliminar las dudas de compatibilidad de los métodos de esterilización. El objetivo de este estudio fue investigar los efectos citotóxicos de materiales con PVC esterilizados por radiación gamma y re esterilizados luego por EO usando aireación mecánica.

Después de la esterilización sucesiva por radiación gamma y EO, y asumiendo que la parte interna de las muestras fueron de dificultosa aireación, los trozos de 0,5 cm de los tubos de PVC se removieron en forma aséptica, para luego aplicar un test de citotoxicidad a los mismos. El análisis de citotoxicidad se realizó utilizando un método de difusión en agar que permitió la evaluación cualitativa de la citotoxicidad (13). En esta prueba, el agar semisólido proporcionó una estructura para colocar monocapas celulares, y también permitió la difusión de sustancias químicas desde los trozos de tubos de PVC estériles.

Las pruebas se realizaron por triplicado. Se analizó la superficie interna, la superficie externa y la masa de cada trozo de los tubos.

Para realizar las pruebas de citotoxicidad, se procedió a tomar 5 ml de **NCTC 929** (el clon NCTC 929 es una de las primeras cepas celulares que por medio de cultivo, se pueden utilizar como pruebas de toxicidad) (\*); las células se inocularon en placas de Petri de 60 × 15 mm para cultivos celulares (TTP®, Trasadingen, Suiza) en una concentración de 3 × 10<sup>5</sup> células/ml. Los cultivos se volvieron a incubar durante 48 horas a 37 ± 1°C, en atmósfera conteniendo 5% de CO<sub>2</sub>. Después de este período, se determinó la consistencia de las monocapas, y los medios de cultivo se reemplazaron por el medio Eagle de doble resistencia (BD® Franklin Lakes, Nueva Jersey, EE. UU) con 0,01 % de una solución neutra de tinte rojo vital. El agar utilizado en esta preparación se mezcló (1:1) con el medio Eagle a 44°C (15). Después de preparar las placas,

tres trozos de tubo de PVC: uno con la superficie interna, otro con la superficie externa, y otro con la masa (es decir, un trozo de tubo completo), se colocaron asépticamente en el medio mencionado. Los cultivos se incubaron a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas.

{{(\*) *Rapid proliferation of sublines of NCTC clone 929 (strain L) mouse cells in a simple chemically defined medium (MB 752/1). C WAYMOUTH. J Natl Cancer Inst. 1959 May*}

La citotoxicidad se verificó microscópicamente mediante cambios en la morfología celular alrededor o por debajo de las muestras y macroscópicamente por la presencia de un halo incoloro rodeando la muestra (14). Los discos de papel filtro de unos 0,5 cm de diámetro sirvieron como controles negativos y los trozos de látex de 0,5 cm de diámetro fueron los controles positivos. La prueba se consideró válida si el control positivo mostraba un halo de al menos 0,5 cm y el control negativo no mostraba reacciones biológicas. Después de medir la extensión de los halos incoloros en relación con el tamaño de la muestra, la citotoxicidad se calificó de acuerdo a la conformidad con los criterios ISO 10993-5:2009 para el agar prueba de difusión (13) como se describe en la Tabla 1.

Tabla 1: Criterios de la norma ISO 10993-5:2009 para la puntuación de la reactividad del ensayo de difusión en agar

Grado	Reactividad	Descripción de la zona de reactividad Citotoxicidad
0	Ninguno	No se observa alrededor o debajo de la muestra
1	Leve (slight)	Algunas degeneraciones o malformaciones celulares debajo de la Muestra
2	Leve (Mild)	Zona limitada al área bajo la muestra
3	Moderado	Zona que se extiende hasta 1,0 cm + del tamaño muestral
4	Severa	Zona que se extiende más de 1,0 cm más allá de la muestra

## RESULTADOS

Independientemente de su posición original, las muestras no causaron citotoxicidad después de esterilización por radiación gamma y luego por EO. Los resultados de las pruebas de citotoxicidad se muestran en las Tablas 2, 3 y 4, para la superficie externa, interna y de masa de los tubos de PVC.

(VER LAS TABLAS EN EL ARTÍCULO ORIGINAL)

Los resultados de este estudio verifican la seguridad de los materiales de PVC, previamente esterilizados mediante irradiación gamma y re esterilizados por EO.

Sin embargo, hay tres factores que pueden limitar la aplicación práctica de estos resultados.

**El primero** se refiere a la forma en que se lleva a cabo la aireación durante la esterilización por

parte de proveedores de servicios de OE. En 2006, un estudio describió el procedimiento de empresas de la Región Sudeste de Brasil en relación a la aireación de los procesos por EO. Los resultados revelaron que el 60% de las empresas utiliza aireación ambiental a pesar de contar con equipos capaces de realizar aireación mecánica (16).

**El segundo factor** tiene que ver con las características del material constitutivo de los objetos esterilizados, incluyendo materia prima y forma. El presente estudio utilizó formas simples (tubo), pero puede ser desafiante controlar los residuos y subproductos de OE en artículos con componentes complejos y/o grandes dimensiones.

Según la AAMI (10), las condiciones mínimas recomendadas para aireación en cámara para PVC son: 8 horas a 60°C o 12 horas a 50°C.

Sin embargo, la recomendación no considera los requerimientos de aireación mínima para confirmar la eficacia de diferentes sistemas de aireación mecánica. Algunos dispositivos requieren mayor o menor tiempo de exposición al EO por su tamaño y complejidad. Para dar cuenta de estas variables, se requiere la realización de estudios adicionales que empleen las muestras representativas de cada producto para someterse a la esterilización por EO para verificar la compatibilidad del método (es decir, se pudo comprobar con trocitos de tubos de PVC pero no sabemos qué puede suceder con materiales más complejos tanto en formato como en composición).

**El tercer factor** consiste en realizar testeos para garantizar la seguridad de los dispositivos esterilizados con OE. La Legislación brasileña (17) establece límites de tolerancia para EO residual, ETCH (etilenclorhidrina) y etilenglicol (ETG), que son los mismos valores considerados por la Administración Estadounidense de Alimentos y Medicamentos (FDA) (18). Estos residuos se cuantifican mediante cromatografía gaseosa y la responsabilidad es del proveedor del servicio de esterilización con OE. Además de que la eficacia de la cromatografía gaseosa para garantizar la seguridad de los pm esterilizados por EO se cuestiona, como se dijo en otra oportunidad, es difícil controlar y regular los procesos de aireación llevados a cabo por los proveedores de servicios de esterilización por EO (los servicios tercerizados). Los agentes sanitarios que utilizan servicios de esterilización no reciben informes de evidencia por parte de los terceros que garanticen la seguridad de materiales devueltos para su uso (19). Es esencial que las empresas terceristas no solo proporcionen datos fehacientes de la cantidad de residuos hallados sino que confirmen también la eliminación de la citotoxicidad, certificando que la aireación mecánica usada ha sido suficiente para garantizar la seguridad del material expuesto a EO. Se supone que está todo bien pero la verdad está en la evidencia demostrada.

Además de los problemas discutidos anteriormente, existen datos publicados en 2006(20) que revelaron otras prácticas inseguras en esterilización por EO (agrego yo: quizá en 2023 el avance de la tecnología logre equipos en los que la aireación se lleve a cabo adecuadamente) Entre ellos figuraba la falta de tiempo para la lectura adecuada de los indicadores biológicos utilizados en el control de calidad de los procesos de esterilización, la información incompleta en los rótulos del empaque del material que se va a esterilizar que comprometen la trazabilidad de los productos, y la limpieza DEFICIENTE por parte de las instituciones de salud que generan productos no estériles, como sabemos. Estas cuestiones muestran que la falta de eficacia de la esterilización por rayos gamma puede estar relacionada también con diversas deficiencias de limpieza y procedimientos previos.

## CONCLUSIONES

En las condiciones del presente estudio, el material de PVC esterilizado por radiación gamma y re-esterilizado consecutivamente por EO no mostró toxicidad. La extensión de los resultados a la práctica clínica depende de la confirmación de la efectividad del proceso de aireación utilizado para eliminar los efectos citotóxicos en los cultivos celulares

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA: VER EL ARTÍCULO ORIGINAL.

Traducido por Mónica Cirulli. Octubre de 2023.

Nota de la traductora: es razonable que un producto con PVC esterilizado por radiación gamma se usa en un paciente; si es reutilizable, luego de finalizado el procedimiento médico-quirúrgico, se le aplica prelavado o descontaminación, luego de aplica se lavado, enjuague y secado, se acondiciona y se esteriliza por EO. La función del lavado y enjuague es el arrastre de todos los contaminantes, microbiológicos y no microbiológicos. De todos modos, coincido con los autores que se necesitan más estudios para demostrar esto con evidencia objetiva, y no simplemente con la razón.

Fin de la traducción del documento.