
NORMA CUBANA

NC

ISO 10993-12: 2010
(Publicada por la ISO en 2007)

**EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE EQUIPOS MÉDICOS —
PARTE 12: PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y MATERIALES
DE REFERENCIA
(ISO 10993-12:2007, IDT)**

**Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample preparation and
reference materials**

ICS: 11.100.20

1. Edición Diciembre 2010
REPRODUCCIÓN PROHIBIDA

**Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261 Vedado, Ciudad de La
Habana. Cuba. Teléfono: 830-0835 Fax: (537) 836-8048; Correo electrónico:
nc@ncnorma.cu; Sitio Web: www.nc.cubaindustria.cu**



Cuban National Bureau of Standards

NC-ISO 10993-12: 2010

Prefacio

La Oficina Nacional de Normalización (NC), es el Organismo Nacional de Normalización de la República de Cuba y representa al país ante las organizaciones internacionales y regionales de normalización.

La elaboración de las Normas Cubanas y otros documentos normativos relacionados se realiza generalmente a través de los Comités Técnicos de Normalización. Su aprobación es competencia de la Oficina Nacional de Normalización y se basa en las evidencias del consenso.

Esta Norma Cubana:

- Ha sido elaborada por el Comité Técnico NC/CTN 11 de Equipos Médicos, integrado por representantes de las siguientes entidades:
 - Centro de Biomateriales
 - Centro de Control Estatal de Equipos Médicos
 - Centro Nacional de Electromedicina
 - Centro Nacional de Ensayos Clínicos
 - Centro Nacional de Investigaciones Científicas
 - Centro para el Control Estatal de la Calidad de Medicamentos
 - Comisión Asesora de Equipos Médicos
 - Complejo Ortopédico "Frank País"
 - Grupo Nacional de Anestesiología
 - Grupo Nacional de Estomatología
 - Instituto Central de Investigación Digital
 - Instituto Nacional de Investigaciones en Metrología
 - Instituto de Investigaciones en Normalización
 - Instituto de Oncología y Radiobiología
 - MEDICUBA
 - Ministerio de la Informática y las Comunicaciones
 - Oficina Nacional de Normalización
 - Red Funcional de Implantología

Esta tercera edición anula y sustituye la segunda edición (NC-ISO 10993-12:2007), la cual ha sido técnicamente revisada.

- Consta de las siguientes partes, bajo el título general Evaluación Biológica de Equipos Médicos:

Parte 1: Evaluación y ensayos.

Parte 2: Requisitos relativos a la protección de los animales.

Parte 3: Ensayos de genotoxicidad, carcinogenicidad y toxicidad para la reproducción.

Parte 4: Selección de los ensayos para las interacciones con la sangre.

Parte 5: Ensayos de citotoxicidad in vitro.

Parte 6: Ensayos relativos a los efectos locales después de la implantación.

Parte 7: Residuos de la esterilización por óxido de etileno.

Parte 9: Marco para la identificación y cuantificación de productos potenciales de degradación.

Parte 10: Ensayos de irritación y de hipersensibilidad retardada.

© NC, 2010

Todos los derechos reservados. A menos que se especifique, ninguna parte de esta publicación podrá ser reproducida o utilizada en alguna forma o por medios electrónicos o mecánicos, incluyendo las fotocopias, fotografías y microfilmes, sin el permiso escrito previo de:

Oficina Nacional de Normalización (NC)

Calle E No. 261, Vedado, Ciudad de La Habana, Habana 4, Cuba.

Impreso en Cuba.

0 Introducción

Esta parte de la Norma NC ISO 10993 especifica los métodos de preparación de la muestra y la selección de materiales de referencia en la evaluación biológica de equipos médicos.

Los métodos de preparación de la muestra deberían ser apropiados tanto para los métodos de evaluación biológica como para los materiales que se están evaluando. Cada método de ensayo biológico requiere la selección de los materiales, disolventes y condiciones de la extracción.

Esta parte de la Norma NC ISO 10993 está basada en especificaciones, reglamentación y normas nacionales e internacionales existentes cuando es posible. Se revisa y actualiza periódicamente.

EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE EQUIPOS MÉDICOS — PARTE 12: PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y MATERIALES DE REFERENCIA

1 Objeto y campo de aplicación

Esta parte de la Norma NC ISO 10993 especifica los requisitos y aporta recomendaciones sobre los procedimientos a seguir en la preparación de muestras y selección de materiales de referencia para el ensayo de equipos médicos en sistemas biológicos de conformidad con una o más partes de las normas de la serie NC ISO 10993. Específicamente, esta parte de la Norma NC ISO 10993 contempla:

- la selección de la muestra del ensayo;
- la selección de las porciones representativas de un producto;
- la preparación de la muestra del ensayo;
- los controles experimentales;
- la selección de los materiales de referencia y los requisitos que deben cumplir;
- la preparación de los extractos.

Esta parte de la Norma NC ISO 10993 no es aplicable a materiales o productos que contengan células vivas.

2 Normas para consulta

Las normas que a continuación se indican son indispensables para la aplicación de esta norma. Para las referencias con fecha, sólo se aplica la edición citada. Para las referencias sin fecha se aplica la última edición de la norma (incluyendo cualquier modificación de ésta).

NC-ISO 10993-1:2005 Evaluación biológica de equipos médicos. Parte 1: Evaluación y ensayos.
ISO 14971 Equipos médicos. Aplicación de la gestión de riesgos a los equipos médicos.

3 Términos y definiciones

A efectos de este documento, son aplicables los términos y definiciones siguientes.

3.1 Blanco

Vehículo de extracción que no contiene el material del ensayo, retenido en un recipiente idéntico al utilizado para contener la muestra del ensayo y sometido a condiciones idénticas a las que se somete la muestra de ensayo durante su extracción.

NOTA: El propósito del blanco es evaluar los posibles efectos espurios debidos al recipiente, al vehículo y al proceso de extracción.

3.2 Material de referencia certificado (MRC)

Material de referencia, acompañado de un certificado, uno o más de cuyos valores de la propiedad están certificados por un procedimiento que establece su trazabilidad hasta una realización exacta de la unidad en la que se expresan los valores de la propiedad, y para el que cada valor certificado está acompañado de una incertidumbre para un nivel de confianza.

[Definición 2.2 de la Guía ISO 30]

3.3 Control experimental

Sustancia con respuestas bien caracterizadas, que se utiliza en un sistema de ensayo específico para contribuir a evaluar si el sistema de ensayo ha respondido de una forma reproducible y apropiada.

3.4 Extracto

Líquido que resulta de la extracción de la muestra de ensayo o del control.

3.5 Homogéneo

Propiedad de un material y su relación con un punto final biológico de forma tal que posea una estructura o composición uniforme que produzca o no repetidamente una respuesta biológica específica.

NOTA Un material de referencia se dice que es homogéneo si la respuesta biológica a un ensayo específico se encuentra dentro de los límites de incertidumbre especificados del ensayo, sea cual fuere el lote del material del que se toma la muestra de ensayo.

3.6 Control negativo

Cualquier material y/o sustancia bien caracterizada, que cuando se ensaya por un procedimiento específico, demuestra la idoneidad del procedimiento para producir una respuesta no reactiva o mínima apropiadamente negativa y reproducible en el sistema de ensayo.

NOTA En la práctica, los controles negativos son los materiales de referencia pero pueden incluir los blancos y los vehículos/disolventes de extracción.

3.7 Control positivo

Cualquier material y/o sustancia bien caracterizada, que cuando se evalúa por un método de ensayo específico, demuestra la idoneidad del sistema de ensayo para producir una respuesta reactiva apropiadamente positiva y reproducible en el sistema de ensayo.

3.8 Material de referencia (MR)

Material con uno o más valores de la propiedad que son suficientemente reproducibles y bien establecidos para permitir la utilización del material o sustancia para la calibración de un aparato, la evaluación de un método de medición, o para la asignación de valores a los materiales.

[Definición 2.1 de la Guía ISO 30]

NOTA A los efectos de esta parte de la Norma NC ISO 10993, un material de referencia es cualquier material o sustancia bien caracterizada, que cuando se ensaya por el procedimiento descrito, demuestra la idoneidad del procedimiento para producir una respuesta predecible y reproducible. La respuesta puede ser negativa o positiva.

3.9 Estabilidad <de los valores de la propiedad

Capacidad de un material, cuando se almacena en condiciones especificadas, para mantener una respuesta biológica específica, dentro de límites especificados, durante un período de tiempo específico.

NOTA Adaptada de la definición 2.7 de la Guía ISO 30.

3.10 Muestra de ensayo

Material, producto, porción de producto, componente, extracto o porción del mismo, sujeto a un ensayo o evaluación biológica o química.

3.11 Extracción de uso simulado

Extracción para demostrar la conformidad con los requisitos de esta parte de la Norma NC ISO 10993, mediante la evaluación de los niveles de material lixiviado disponibles al paciente o usuario, provenientes de productos durante la utilización de rutina de los mismos, usando un método de extracción que simula la utilización del producto.

NOTA La carga de la validación para el laboratorio analítico es demostrar que la extracción de uso simulado se efectúa en las condiciones que presentan el mayor desafío frente a la utilización prevista. La simulación del uso de categoría más exigente probable durante la exposición y que tiene en cuenta tanto el (los) tejido(s) expuesto(s) como la temperatura de exposición.

3.12 Extracción exagerada

Cualquier extracción que está previsto que produzca la liberación de una cantidad mayor de un constituyente químico, comparada con la cantidad generada en condiciones de utilización simulada.

NOTA La extracción exagerada podría producir un cambio químico del material o de las sustancias que se están extrayendo.

3.13 Extracción acelerada

Extracción que proporciona una medida de los materiales lixiviables del producto o material utilizando condiciones que reducen el tiempo de lixiviado de las sustancias en el vehículo de extracción pero que no producen un cambio químico de las sustancias que se están extrayendo.

NOTA Ejemplos de condiciones de extracción acelerada son las siguientes: temperatura y agitación elevadas, cambio del vehículo de extracción, etc.

3.14 Extracción exhaustiva

Extracción hasta que la cantidad de material lixiviable en una extracción subsiguiente es inferior al 10% de la detectada en la extracción inicial, o hasta que no existe ningún aumento analíticamente significativo de los niveles de material lixiviable acumulativos detectados.

NOTA Dado que no es posible demostrar la naturaleza exhaustiva de la recuperación residual, la definición de extracción exhaustiva adoptada es la arriba indicada. Véase también el anexo C.

4 Requisitos generales

4.1 Según se describe en la Norma NC ISO 14971, en la identificación de los peligros y la estimación de los riesgos para equipos médicos, los peligros que surjan de un cambio en el proceso de fabricación o de un control insuficiente del proceso de fabricación se deben considerar en el diseño y preparación de las muestras para el ensayo y la preparación de los extractos de tales productos. Se debe prestar atención especial a los residuos, por ejemplo, trazas de elementos y agentes de limpieza y desinfección de tales procesos de fabricación.

4.2 Dado que la Norma NC ISO 10993 describe muchos sistemas de ensayo biológico diferentes, se deben consultar las normas individuales para averiguar si estas recomendaciones son apropiadas para los sistemas de ensayo específicos. Los controles experimentales se deben utilizar en las evaluaciones biológicas para validar un procedimiento de ensayo y/o para comparar los resultados entre materiales. Dependiendo del ensayo biológico, los controles negativos, los blancos y/o los controles positivos se deben utilizar de forma apropiada al ensayo.

NOTA El mismo tipo de control puede ser aplicable a ensayos diferentes y puede permitir la referencia cruzada respecto a otros materiales y métodos de ensayo establecidos. En el anexo A se dan recomendaciones adicionales sobre la selección de controles experimentales. La utilización de controles positivos para ensayos in vivo puede estar afectada por reglamentación sobre el bienestar de los animales.

5 Materiales de referencia

5.1 Generalidades

Los laboratorios individuales establecen los materiales de referencia (MR). El laboratorio individual determina el alcance de la caracterización biológica, física y química. Los artículos disponibles comercialmente se pueden utilizar como materiales de referencia.

NOTA 1 Véase también la Guía ISO 35.

Los materiales de referencia certificados (MRC) se seleccionan por su alta pureza, características críticas, idoneidad para el fin previsto y disponibilidad general. Las características biológicas, físicas y químicas críticas se deben determinar por ensayos colaborativos en tres o más laboratorios, y el distribuidor debe ofrecer los disponibles al investigador.

NOTA 2 Es deseable que los usuarios obtengan un compromiso de los proveedores de MR o MRC para suministrar estos materiales al usuario durante al menos cinco años. Una segunda opción, pero menos deseable, es que la fuente de MR o MRC publique una "formulación abierta" del material, es decir, publicación de los materiales de partida e información sobre el procesado necesario para asegurar la obtención de lotes uniformes del MR.

5.2 Certificación de los MR para ensayos de seguridad biológica

5.2.1 La calificación de un MR es un procedimiento que establece el valor cualitativo o numérico de la respuesta biológica del material en las condiciones de ensayo especificadas, asegurando la reproducibilidad de la respuesta dentro de un mismo laboratorio y/o entre laboratorios diferentes. La gama de respuestas biológicas asociadas con el material se debe establecer mediante ensayos de laboratorio.

NOTA Véase también la Guía ISO 34.

5.2.2 Los proveedores de MR deben certificar los materiales. El proveedor determina el alcance de la caracterización física y química que se efectúa. Los laboratorios individuales que utilizan los MR deben identificar la caracterización biológica necesaria para calificar un MR para un ensayo o procedimiento específico. Se pueden utilizar materiales comercialmente disponibles como MR siempre que estén certificados y calificación.

5.2.3 La certificación de un MR es un procedimiento que establece el valor numérico o cualitativo de la respuesta biológica del material en las condiciones de ensayo especificadas. Este proceso sirve para validar el ensayo del material para tal respuesta particular y da lugar a la emisión de un certificado. La respuesta biológica del material se debe establecer mediante ensayos entre laboratorios.

6 Utilización de los mr como controles experimentales

6.1 Los MR o MRC se deben utilizar en los ensayos biológicos como materiales de control para demostrar la idoneidad de un procedimiento que proporciona una respuesta reproducible, ya sea positiva y/o negativa. Cualquier material utilizado de esta forma se debe caracterizar con cada procedimiento de ensayo biológico para el que se desea la utilización del material. Un material caracterizado y posteriormente certificado para un método de ensayo o respuesta de referencia, por ejemplo, hipersensibilidad de tipo retardado, no se debe utilizar como un MR para otro método o respuesta de referencia, por ejemplo, citotoxicidad, sin validación adicional.

NOTA La utilización de un MR facilita la comparación de la respuesta entre laboratorios diferentes y ayuda a evaluar la reproducibilidad de las prestaciones del ensayo dentro de un mismo laboratorio individual. Para la comparación de la respuesta biológica es deseable utilizar MR que tengan una gama de respuestas, por ejemplo, mínima, intermedia o severa.

6.2 Los MR utilizados como controles experimentales deben cumplir los procedimientos de aseguramiento de la calidad establecidos del fabricante y del laboratorio de ensayo. Se deben identificar respecto a la proveniencia, fabricante, grado de pureza y tipo. Los MR se procesan de conformidad con el capítulo 8.

6.3 Cuando los MR se utilizan como controles experimentales, deben pertenecer a la misma clase de material que la muestra de ensayo, es decir, polímero, cerámica, metal, coloide, etc. Sin embargo, los productos químicos puros se pueden utilizar como controles experimentales para procedimientos de ensayo con base mecánica, por ejemplo, los ensayos de genotoxicidad y de hipersensibilidad inmune de tipo retardado.

7 Selección del material de ensayo

7.1 Los ensayos se deben efectuar utilizando el producto final, o muestras representativas tomadas de los productos finales, o materiales procesados de la misma forma que el producto final (véase la Norma Internacional ISO 10993-1). Se debe justificar la elección de la muestra de ensayo.

NOTA En el caso de materiales que curan in situ, podrían ser necesarias muestras de ensayo diferentes representativas del material curado frente al estado sin curar del material.

7.2 Es aplicable el mismo procedimiento de selección del material de ensayo cuando se precisa un extracto.

8 Muestra de ensayo y preparación del mr

8.1 Las muestras de ensayo y los MR se deben manipular con cuidado para evitar la contaminación. Cualquier residuo de los procesos de fabricación se debe considerar como parte integral del producto, porción del producto o componente del mismo.

NOTA Consúltese el anexo B para recomendaciones adicionales sobre la preparación.

- a)** Las muestras de ensayo de productos y MR esterilizados se deben manipular asépticamente si es apropiado al procedimiento de ensayo.
- b)** Las muestras de ensayo de un producto que se suministra normalmente no estéril, pero que requiere esterilización antes de utilizarlo, se deben esterilizar utilizando el método recomendado por el fabricante y se deben manipular asépticamente si es apropiado al procedimiento de ensayo.
- c)** Si las muestras de ensayo se limpian antes de su esterilización, se debe considerar la influencia del proceso y agente de limpieza al seleccionar y manipular la muestra de ensayo.

8.2 Si se precisan muestras de ensayo estériles para el procedimiento de ensayo, se debe considerar el efecto de la esterilización o del proceso de esterilización sobre la muestra de ensayo y los MR.

8.3 Cuando las muestras de ensayo y los MR precisan ser cortados en trozos según se describe en el punto b) del apartado 10.3.3, se debe considerar la influencia de las superficies previamente no expuestas, por ejemplo, lúmenes o superficies cortadas. Las herramientas utilizadas para cortar

los equipos médicos en porciones representativas para el ensayo se deben limpiar entre utilizaciones consecutivas para impedir la contaminación.

9 Selección de porciones representativas de un producto

9.1 Si un producto no se puede ensayar como un todo, cada material individual en el producto final debe estar representado proporcionalmente en la muestra de ensayo.

- a) La muestra de ensayo de productos con recubrimientos superficiales debe incluir tanto el material de recubrimiento como el sustrato, aunque el sustrato no tenga contacto con el tejido.
- b) La muestra de ensayo debe incluir una porción representativa de la unión y/o sello si se utilizan adhesivos, sellos de radiofrecuencia o sellos de disolvente en la fabricación de una porción del producto que entre en contacto con los pacientes.

9.2 Los materiales compuestos se deben ensayar como materiales acabados.

9.3 Cuando diferentes materiales están presentes en un único producto, se debe considerar el potencial de sinergias e interacciones al seleccionar la muestra de ensayo.

9.4 La muestra de ensayo se debe escoger para maximizar la exposición del sistema de ensayo a los componentes de un producto que se conozca que poseen un potencial para provocar una respuesta biológica.

10 Preparación de extractos de muestras

10.1 Generalidades

Si se precisan extractos del producto para el procedimiento de ensayo, los vehículos de extracción y las condiciones de extracción utilizadas deben ser apropiados a la naturaleza y utilización del producto final y al propósito del ensayo, por ejemplo, identificación de los peligros, estimación de los riesgos, o evaluación de los riesgos. Cuando se escogen las condiciones de extracción, se deben considerar las propiedades fisicoquímicas de los materiales del producto, las sustancias lixiviables, o los residuos.

NOTA Consúltese el anexo C que contiene recomendaciones adicionales sobre la extracción de muestras.

10.2 Recipientes para la extracción

10.2.1 La extracción se debe efectuar en recipientes limpios cerrados, químicamente inertes, con un espacio muerto mínimo.

10.2.2 Para garantizar que los recipientes de extracción no adulteran el extracto de la muestra de ensayo, los recipientes deben ser:

- a) tubos de vidrio borosilicatado con tapón dotado de un recubrimiento inerte [por ejemplo, poli(tetrafluoroetileno)];
- b) otros recipientes de extracción inertes según se precisen para materiales y/o procedimientos de extracción específicos.

10.3 Condiciones y métodos de extracción

10.3.1 Las condiciones de extracción están basadas en prácticas comunes y se justifican basándose en que proporcionan un enfoque normalizado que es, en muchos sentidos, una exageración apropiada de la utilización del producto. La extracción se debe efectuar en una de las condiciones siguientes (véase también el capítulo C.5):

- a) $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ durante $(72 \pm 2)\text{h}$;
- b) $(50 \pm 2)^\circ\text{C}$ durante $(72 \pm 2)\text{h}$;
- c) $(70 \pm 2)^\circ\text{C}$ durante (24 ± 2)
- d) $(121 \pm 2)^\circ\text{C}$ durante $(1 \pm 0,1)$

NOTA La extracción a $(37 + 1)^\circ\text{C}$ durante $(24 + 2)\text{h}$ en medios de cultivo de tejidos podría ser aceptable para los ensayos de citotoxicidad. Véase la Norma Internacional ISO 10993-5.

Las condiciones de extracción descritas en el párrafo anterior que se han utilizado para proporcionar una medida del potencial de peligro para la estimación de los riesgos del producto o material, están basadas en precedentes históricos. Se pueden utilizar otras condiciones que simulen la extracción que ocurre durante el uso clínico o que proporcionen una medida adecuada del potencial de peligro, pero se deben describir y justificar.

La extracción es un proceso complejo influenciado por la duración, temperatura, proporción área superficial a volumen, vehículo de extracción y las fases de equilibrio del material¹. Los efectos de temperaturas más altas o de otras condiciones sobre la cinética de extracción y la identidad del (de los) vehículo(s) de extracción se deben considerar cuidadosamente si se utiliza extracción acelerada o exagerada.

Por ejemplo, existen dos posibilidades cuando se utilizan temperaturas más altas:

- 1) la energía correspondiente a la mayor temperatura puede causar un aumento del entrecruzamiento de las cadenas poliméricas y/o la polimerización del polímero, y por tanto, resultar en un descenso de la cantidad de monómero libre que está disponible para migrar desde el polímero;
- 2) la mayor temperatura puede provocar la formación de productos de degradación que no se encuentren normalmente en el producto terminado en condiciones de utilización.

10.3.2 Para los materiales que se disuelven o reabsorben en condiciones de utilización, se siguen las condiciones de extracción descritas en el apartado 10.3.1. La extracción se efectúa utilizando el vehículo de extracción apropiado y las condiciones de duración/temperatura que simulen la exposición exagerada siempre que sea posible. Puede ser apropiada la disolución completa.

10.3.3 El área superficial estándar se puede utilizar para determinar el volumen del vehículo de extracción que se necesita. Esta área incluye el área combinada de ambos lados de la muestra y excluye las irregularidades indeterminadas de la superficie. Cuando el área superficial no se puede determinar debido a la configuración de la muestra, se debe utilizar una proporción masa de muestra/volumen de fluido extractor. Véase la tabla 1.

- a) Se pueden utilizar otras proporciones de extracción área superficial/volumen, por ejemplo, aquéllas relacionadas con la evaluación de materiales porosos, si simulan las condiciones durante el uso clínico o resultan en una medida del potencial de peligro.
- b) Los materiales se deben cortar en trozos pequeños antes de la extracción para optimizar el íntimo contacto por inmersión en los medios de extracción, excepto cuando sea inapropiado (por ejemplo, véase el apartado 10.3.4). Por ejemplo, para los polímeros, son apropiados trozos de aproximadamente 10 mm x 50 mm o 5 mm

1) El equilibrio entre fases de un material durante la extracción determina las cantidades relativas de las fases amorfa y cristalina presentes. Para la fase amorfa, la temperatura de transición vidriosa, T_g , dicta la movilidad de la cadena polimérica y la velocidad de difusión en esta fase. Normalmente, la velocidad de difusión por encima de T_g es considerablemente superior que aquélla por debajo de T_g . La velocidad de difusión más baja corresponde a la de la fase cristalina. Las condiciones de extracción no deberían alterar la fase de equilibrio del material. La alteración de esta fase puede afectar a la cantidad y al tipo de sustancias extraíbles.

10.3.4 Los elastómeros, materiales recubiertos, compuestos, laminados, etc., se deben ensayar intactos, siempre que sea posible, debido a diferencias potenciales en las características de extracción entre las superficies cortadas y las intactas.

NOTA Como resultado de los procesos de fabricación, muchos elastómeros pueden tener propiedades superficiales que difieren de las del material a granel.

10.3.5 Se debe efectuar la extracción utilizando disolventes tanto polares como apolares. Ejemplos de vehículos de extracción son:

- a) vehículo de extracción polar: agua, solución salina fisiológica; medios de cultivo sin suero;
- b) vehículo de extracción apolar: aceite vegetal recientemente refinado (por ejemplo, aceite de semilla de algodón o de sésamo) de calidad definida en diversas farmacopeas;
- c) vehículos de extracción adicionales: etanol/agua, etanol/solución salina, polietilenglicol 400 (diluido hasta presión osmótica fisiológica), dimetilsulfóxido y medios de cultivo con suero.

NOTA Se pueden también utilizar otros vehículos de extracción apropiados a la naturaleza y utilización del producto o a los métodos de identificación de los peligros si se conocen los efectos sobre el material y el sistema biológico.

Tabla 1 — Áreas superficiales estándar y volúmenes del líquido extractor

Espesor mm	Proporción de extracción (área superficial o masa/volumen) + 10%	Ejemplos de formas de los materiales
<0,5	6 cm ² /ml	película, lámina, pared de un tubo
0,5 a 1,0	3 cm ² /ml	pared de un tubo, losa, artículos moldeados pequeños
>1,0	3 cm /mi	artículos moldeados grandes
> 1,0	1,25cm ² /ml	cierres elastoméricos
Productos sólidos de forma irregular	0,2 g de muestra/ml	polvo, gránulos, espuma, artículos moldeados no absorbentes
Productos porosos de forma irregular (materiales de baja densidad)	0,1 g/ml	membranas

NOTA Si bien no existen métodos normalizados disponibles actualmente para el ensayo de absorbentes e hidrocoloides, se recomienda el protocolo siguiente:
Se determina el volumen del vehículo de extracción que absorbe cada 0,1 g ó 1,0 cm del material. Entonces, al efectuar la extracción del material, se añade este volumen adicional a cada 0,1 g ó 1,0 cm en una mezcla de extracción.

10.3.6 Las extracciones se deben efectuar con agitación o circulación. Cuando la extracción en condiciones estáticas se considera apropiada, el método se debe justificar, especificar e incluir en el informe.

10.3.7 Si es posible, los extractos líquidos se deben utilizar inmediatamente después de su preparación para impedir la adsorción en el recipiente de extracción u otros cambios en la composición. Si un extracto se almacena durante más de 24 h, entonces se debe verificar la estabilidad y homogeneidad del extracto en las condiciones de almacenamiento.

10.3.8 El pH del extracto no se debe ajustar a menos que se indique la razón que lo justifica.

10.3.9 El extracto no se debe procesar rutinariamente por filtración, centrifugación u otros métodos para eliminar partículas en suspensión. Sin embargo, si tal procesado es necesario, se debe documentar la justificación.

10.3.10 Para la identificación de los peligros, se deben considerar condiciones de extracción exageradas para aumentar la dosis de exposición de las sustancias lixiviables. El disolvente y las condiciones de extracción se deben seleccionar basándose en las propiedades fisicoquímicas del material y/o en los productos químicos de masa molecular baja esperados que se puedan extraer.

10.3.11 Para los materiales o productos que no se espera que se disuelvan o reabsorban en las condiciones de utilización, cualquier disolvente utilizado en la extracción de un material polimérico o producto no debe causar la disolución de la formulación del polímero. No debe ocurrir más que un ligero reblandecimiento del material polimérico en presencia del disolvente volátil (por ejemplo, menos del 10% del polímero disuelto). El disolvente se debe eliminar (antes de utilizar el producto en un ensayo biológico) hasta que cualquier residuo no afecte de forma adversa el ensayo biológico (por ejemplo, cause una desnaturalización de proteínas o irritación de la piel). Para los materiales o productos que se espera se disuelvan o reabsorban en las condiciones de utilización, véase el apartado 10.3.2.

10.3.12 Si el producto es un fluido acuoso, no se efectúa la extracción. Se utiliza el fluido directamente en el sistema de ensayo.

10.3.13 Donde circulen fluidos a través del producto en condiciones normales de utilización, por ejemplo, en productos extracorpóreos, se puede utilizar la extracción mediante la recirculación. Cuando sea posible, una o más de las condiciones deben ser exageradas, por ejemplo, la temperatura, la duración, el volumen, el caudal. La justificación de la extracción seleccionada se debe incluir en el informe.

10.4 Condiciones de extracción para la identificación de los peligros y estimación de los riesgos en condiciones de uso exagerado

10.4.1 Los peligros que surjan de cambios en el proceso de fabricación o de un control insuficiente del proceso de fabricación se deben considerar en el diseño y preparación de las muestras para el ensayo y preparación de extractos de tales productos Norma NC ISO 14971. Se debe prestar atención especial a los residuos, por ejemplo, trazas de elementos y agentes de limpieza y desinfección de tales procesos de fabricación.

10.4.2 Cuando se demuestra que el potencial tóxico está dentro de los límites requeridos para un producto sometido a ensayo por extracción exagerada, no debe ser preciso someter el producto a ensayos adicionales por extracción de uso simulado.

10.4.3 En el caso de productos que polimerizan in situ, las muestras a ensayar deben representar las condiciones de utilización clínica previstas para proporcionar información de la toxicidad potencial de los componentes reaccionantes en el polímero durante el proceso de curado. Estos extractos preparados en momentos diferentes, si procede, se deben basar en la cinética de polimerización después del mezclado de los componentes, incluyendo un extracto preparado transcurrido el tiempo de curado esperado. Se debe justificar el ensayo del material después del curado.

Cuando los extractos se utilizan en los métodos de ensayo para la evaluación de materiales que curan *in situ*, la iniciación de la extracción debe ocurrir a partir del punto de curado en el que el material se coloca *in situ*.

Para los métodos de ensayo que utilizan estos materiales directamente, por ejemplo, citotoxicidad por contacto directo o por recubrimiento con agar, implantación, algunos ensayos de genotoxicidad, y hemólisis por contacto directo, el material se debe utilizar de la misma forma que se utiliza durante el uso clínico, con curado *in situ* en el sistema de ensayo.

NOTA Puede ser apropiada la modificación del sistema de administración clínica, de forma que se administren para el ensayo las dimensiones o la masa designadas del material.

11 Registros

La documentación de la muestra y su preparación deben incluir pero no limitarse a:

- a) el tipo y, si se conoce, la composición del material, proveniencia del material, producto, porción o componente del producto;

NOTA Una descripción, dibujo, fotografía u otros métodos se pueden utilizar para lograr el cumplimiento de todo o de parte de este requisito.

- b) el número de lote, cuando proceda;
- c) la descripción del procesado, tratamientos de limpieza o esterilización, si procede;
- d) las técnicas de extracción, según proceda, incluyendo la documentación del vehículo de extracción, las proporciones y condiciones de extracción, medio de agitación, así como cualquier desviación de las condiciones especificadas en esta parte de la Norma NC ISO 10993, tales como filtración de los extractos o de los medios de extracción.

ANEXO A
(Informativo)

CONTROLES EXPERIMENTALES

A.1 Los materiales enumerados en los apartados siguientes pueden cumplir los criterios exigibles a un control experimental en los ensayos seleccionados. Es responsabilidad del investigador seleccionar los materiales apropiados al ensayo indicado (véase también la tabla A. 1).

Tabla A.1 — Ejemplos de materiales de referencia y controles disponibles

La información sobre los materiales de referencia y los controles se suministra solamente para aquellos ensayos en la Norma NC ISO 10993 que no requieren materiales de referencia o controles específicos.

Ensayo	Control positivo	Control negativo"	Material de referencia"
Implantación	PVC-org. Sn	PE	
	SPU-ZDEC	Silicona	
	Látex de caucho natural	Óxido de aluminio	
		Acero inoxidable	
Citotoxicidad	PVC-org. Sn	PE	
	SPU-ZDEC		
	SPU-ZBEC		
	Látex de caucho natural		
	Poliuretano		
Compatibilidad sanguínea			PVC 7506 PUR2541
Las abreviaturas en esta tabla se refieren a los materiales específicos disponibles a partir de las fuentes designadas en los capítulos A.2 y A.3.			

A.2 Los materiales que han sido utilizados como controles negativos o MR son, por ejemplo, polietileno de alta densidad²⁻¹³⁻¹⁴⁻¹⁵⁻¹, polietileno de baja densidad⁶⁻¹, polidimetilsiloxano exento de sílice⁷⁻¹⁸⁻¹, cloruro de polivinilo⁹⁻¹, poliuretano¹⁰⁻¹, polipropileno¹¹⁻¹, barras cerámicas de óxido de aluminio, acero inoxidable y aleaciones de titanio comercialmente puro (cp).

A.3 Los materiales que han sido utilizados como controles positivos son, por ejemplo, cloruro de polivinilo conteniendo aditivos orgánicos¹²⁻¹, películas de poliuretano segmentadas conteniendo dietil-¹³⁻¹⁴⁻¹ o dibutil-¹⁵⁻¹ ditiocarbamato de zinc, ciertas formulaciones de látex, soluciones de sales de zinc, y cobre. Las sustancias que han sido utilizadas como controles positivos para muestras de extractos son diluciones de fenol y agua.

-
- 2) Pellicle de HDPE: Hatano Research Institute/Food and Drug Safety Center, 729-5 Ochiai Hadano, Kanagawa 257-8523 JAPAN.
 - 3) Lámina de HDPE: Hatano Research Institute/Food and Drug Safety Center, 729-5 Ochiai Hadano, Kanagawa 257-8253 JAPAN.
 - 4) Barra de HDPE: Hatano Research Institute/Food and Drug Safety Center, 729-5 Ochiai Hadano, Kanagawa 257-8523 JAPAN.
 - 5) Tubo PE 140: RAUMEDIC AG, Postfach 501, 95205 Münchberg, Germany. La película de PE está disponible solicitándola a Hoechst AG, D- 6230 Frankfurt 80, Germany.
 - 6) Biomaterials Program, Devices and Technology Branch, National Heart, Lung and Blood Institute, NIH, Building, 7550 Wisconsin Ave., Bethesda, MD 20892, USA.
 - 7) Tubo SIK 8363: RAUMEDIC AG, Postfach 501, 95205 Münchberg, Germany.
 - 8) Tubo PVC 7506 y PVC 7536 RAUMEDIC AG, Postfach 501, 95205 Münchberg, Germany. PVC-DEHP y película de PVC-TEHTM están disponibles solicitándolos a Hoechst AG, D-6230 Frankfurt 80, Germany.
 - 9) Tubo PUR 2541: RAUMEDIC AG, Postfach 501, 95205 Münchberg, Germany. La película de PU está disponible solicitándola a Frontline Filmbiasning, S-60003 Norrköping, Sweden.
 - 10) Tubo PP 146 está disponible solicitándolo a RAUMEDIC AG, Postfach 501, 95205 Münchberg, Germany. PP está disponible solicitándola a Hoechst AG, D-6230 Frankfurt 80, Germany.
 - 11) Material de control positivo, código 499-300-000-000: Portex Limited [lo mismo que RS control positivo que se puede obtener solicitándolo a US Pharmacopeia, Rockville, MD 20852, USA].
 - 12) Película de poliuretano - ZDEC: RM-A; Hatano Research Institute/Food and Drug Safety Center, 729-5 Ochiai Hadano, Kanagawa 257-8523 JAPAN.
 - 13) Barra de poliuretano - ZDEC: RM-F; Hatano Research Institute/Food and Drug Safety Center, 729-5 Ochiai Hadano, Kanagawa 257-8523 JAPAN.
 - 14) Película de poliuretano - ZDBC: RM-B Hatano Research Institute/Food and Drug Safety Center, 729-5 Ochiai Hadano, Kanagawa 257-8523 JAPAN.

La información dada en las llamadas 2) a 15) es una lista de productos disponibles comercialmente. Esta información se da para conveniencia del usuario de esta parte de la Norma Internacional ISO 10993 y no constituye un respaldo de ISO al producto.

ANEXO B
(Informativo)

PRINCIPIOS Y PRÁCTICAS GENERALES DE PREPARACIÓN DEL MATERIAL DEL ENSAYO Y DE SELECCIÓN DE LA MUESTRA

El material utilizado en el ensayo biológico debe ser representativo de la composición y características superficiales del producto final y de los procesos utilizados en su fabricación. Véase el apartado 7.1 y el punto a) del apartado 5.1 de la Norma NC ISO 10993-1:2005.

La documentación de la composición de los materiales de plástico y goma debe incluir la identificación de la resina, polímero, y cualquier aditivo. La descripción de la formulación debe especificar la historia del material, por ejemplo, información sobre el procesado térmico, y si es virgen o proviene de un proceso de trituración, y si es triturada, la especificación del número máximo de triturados permisible.

Los materiales que se pueden reesterilizar por el mismo método o por métodos alternativos se deben ensayar después del tratamiento por esterilizaciones múltiples.

Por ejemplo, un material que se esteriliza por irradiación y es reesterilizado por óxido de etileno se debe ensayar después del tratamiento por:

- a) irradiación,
- b) irradiación y óxido de etileno.

Si se puede identificar una exposición representativa del "caso más desfavorable" con justificación apropiada, el ensayo se puede efectuar después de la exposición a este tratamiento.

Idealmente, todos los ensayos biológicos que utilizan un material cortado de un producto, un propio componente del producto como el material de ensayo, o un extracto preparado a partir de cualquiera de ambos, se deben efectuar con la superficie del material expuesta al entorno celular/biológico del sistema de ensayo. Un método alternativo en vez de cortar la superficie es la fabricación de miniaturas del producto utilizando los mismos parámetros del proceso (extrusión, inmersión, etc.) tales como temperatura, duración del proceso, atmósfera, agentes de liberación del molde, endurecimiento superficial, curado, limpieza, esterilización, etc. utilizados en la fabricación del producto. Esto facilita la evaluación de cualquier efecto relacionado con el área superficial, características de la superficie, concentración de sustancias lixiviables y la superficie y forma del material.

Los metales utilizados en los ensayos biológicos deben ser del mismo material de partida que el utilizado para fabricar el producto y habiendo sido sometido a los mismos procesos de mecanización, trituración, pulido, limpieza, pasivación, tratamiento superficial y esterilización que los utilizados en la fabricación del producto final.

Los materiales cerámicos utilizados en los ensayos biológicos se deben fabricar a partir del mismo material en polvo de partida que el utilizado para fabricar el producto y utilizando los mismos procesos de fundición, recubrimiento, moldeado, sinterizado, acabado de la superficie y esterilización que los utilizados en la fabricación del producto final.

Los equipos médicos que utilizan tejidos animales o sus derivados y que son tratados con fijadores, se deben ensayar después de haber sido preservados durante los tiempos de fijación máximo y mínimo permisibles especificados por el fabricante para permitir una variación en el grado de penetración del fijativo.

En vez de la extracción de los materiales metálicos seguida de la aplicación del extracto a los sistemas del ensayo, se debe considerar el ensayo de las soluciones de diversas concentraciones de la sal apropiada del (de los) metal(es) específico(s) identificado(s) en el producto, para identificar el peligro del (de los) ión(es) metálico(s) específico(s) y para conocer su(s) nivel(es) más alto(s) de ausencia de efecto.

NOTA Este principio es también aplicable a los materiales orgánicos cuando se identifican productos químicos contenidos en el producto.

Las condiciones de extracción para materiales implantables que pueden causar generación de partículas *in vivo* durante el uso clínico se deben considerar en el diseño de los ensayos del material. El efecto de los procedimientos de extracción se debe considerar en el diseño de los ensayos de un material si las condiciones de extracción generan partículas.

La cantidad y el área superficial del material deben ser apropiadas a las restricciones físicas y biológicas del sistema de ensayo. En la práctica, se recomienda la utilización de un tamaño de muestra normalizado para un ensayo específico.

Se llama la atención de los usuarios de esta parte de la Norma NC ISO 10993 sobre la discusión de la "utilización apropiada" y "utilización incorrecta" de los MRC en la Introducción a la Guía ISO 33. Esta discusión señala áreas tanto de sobreutilización como de infrautilización potenciales de los MR y MRC. Los usuarios de esta parte de la Norma NC ISO 10993 deben también advertir que es aceptable la utilización de materiales de calibración para evaluar la respuesta biológica de los materiales que se están investigando dentro de un mismo laboratorio.

ANEXO C
(Informativo)

PRINCIPIOS DE LA EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA DE ENSAYO

C.1 El propósito de un extracto de un producto sanitario es proporcionar una muestra de ensayo adecuada para determinar la reactividad biológica de cualquier sustancia lixivable en un sistema biológico, para demostrar el potencial de peligro (identificación del peligro) de la sustancia lixivable y para utilizarlo cuando se evalúan los riesgos para la salud humana de la sustancia lixivable. Cuando se preparan extractos de un producto, el vehículo y las condiciones de extracción utilizados deben ser apropiados a la naturaleza y utilización del producto final así como a la predictibilidad (propósito del ensayo, justificación, sensibilidad, etc.) del método de ensayo. Por lo tanto, las condiciones de extracción y la aplicación del extracto a los sistemas de ensayo deben idealmente reflejar no solamente las condiciones reales durante la utilización de los productos, sino también el propósito y predictibilidad de los ensayos.

Cuando circulan fluidos a través del producto en las condiciones normales de utilización, por ejemplo, en productos extracorpóreos, se debería consultar la norma vertical para las técnicas de extracción apropiadas.

Se efectúan ensayos biológicos para identificar los peligros y estimar los riesgos de los peligros en condiciones de uso exagerado y/o en condiciones de uso real. Las extracciones difieren para los diversos fines del ensayo.

- a) La extracción exagerada es apropiada para la identificación de los peligros.
- b) La extracción de uso simulado es aplicable para generar un factor de seguridad para utilización en evaluaciones de los riesgos para la salud humana.
- c) La extracción exhaustiva es aplicable para la evaluación de la seguridad de un producto implantable y para estimar los límites superiores de los productos químicos que se podrían liberar en el paciente.

C.2 Esta parte de la Norma NC ISO 10993 supone que la cantidad de sustancia(s) extraíble(s) depende del período de extracción, de la temperatura, de la relación del área superficial del material al volumen del vehículo de extracción, y de la naturaleza del vehículo de extracción.

C.3 El período de extracción debe ser suficiente para hacer máxima la cantidad de material extraído. En la práctica, se recomienda utilizar estas condiciones normalizadas de duración y temperatura para la extracción en vez de otras condiciones no validadas o no normalizadas.

C.4 Una práctica alternativa consiste en la extracción repetida seguida de la concentración del extracto para obtener suficiente cantidad de sustancia(s) extraíble(s) para el análisis. Esta práctica es aplicable para el fin de la identificación de los peligros.

C.5 Las temperaturas de extracción pueden variar para los diferentes materiales a ensayar. La extracción no debe iniciar una degradación significativa del material, excepto si el material está previsto que se disuelva o reabsorba durante su utilización (véase el apartado 10.3.2). La temperatura de extracción depende de las características fisicoquímicas del (de los) material(es) del producto.

Por ejemplo, la temperatura de extracción escogida para polímeros debe ser inferior a la temperatura de transición cristalina. Si la temperatura de transición cristalina es inferior a la temperatura de utilización clínica, la temperatura de extracción debe ser inferior a la temperatura de fusión del material. Las condiciones recomendadas se dan el apartado 10.3.1.

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar la interpretación del apartado 10.3.1.

- a) Los materiales que tienen un punto de fusión o reblandecimiento inferior a (121 ± 2) °C se extraen a una temperatura normalizada inferior al punto de fusión (por ejemplo, el polietileno de muy baja densidad).
- b) Los materiales que experimentan hidrólisis se extraen a una temperatura que reduzca al mínimo la cantidad de hidrólisis [por ejemplo, las poliamidas se extraen a (50 ± 2) °C].
- c) Los materiales que se procesan mediante esterilización por vapor de agua y que contienen un líquido durante el almacenamiento, se extraen a (121 ± 2) °C (por ejemplo, los dializadores pre llenados).
- d) Los materiales que se utilizan solamente a la temperatura corporal se extraen a temperaturas que proporcionen la máxima cantidad de sustancias lixiviables sin degradación del material por ejemplo, los tejidos fijos se deben extraer a (37 ± 1) °C, mientras que los implantes cerámicos se pueden extraer a (121 ± 2) °C].

ADVERTENCIA — La aplicación de los métodos de ensayo de la Norma NC ISO 10993-12 a los materiales de un producto que contienen proteínas se debe hacer con gran cuidado para asegurar que el procedimiento de extracción no altere las propiedades biológicas de los materiales que se están extrayendo.

C.6 La relación del área superficial del producto al volumen de vehículo o disolvente de extracción debe ser suficiente para:

- a) alcanzar la cantidad máxima de sustancia(s) extraíble(s) en un volumen de dosis apropiado para realizar el ensayo biológico (es decir, volumen de dosis dentro de los límites fisiológicos) o análisis químico;
- b) demostrar el potencial de peligro para la utilización del producto en seres humanos;
- c) sumergir cubriendo completamente el material en el volumen del disolvente.

En la práctica, se recomienda la utilización de valores normalizados de áreas superficiales y volúmenes de disolvente según se describe en el apartado 10.3.3 en vez de utilizar parámetros específicos para un producto. Algunos métodos de ensayo requieren la concentración de los extractos para aumentar la sensibilidad del ensayo.

NOTA La concentración de los extractos puede dar lugar a la pérdida de materiales volátiles tales como el óxido de etileno.

C.7 El (los) disolvente(s) seleccionado(s) como el vehículo de extracción debe(n):

- a) ser adecuado(s) para su utilización en los sistemas específicos del ensayo biológico;
- b) simular la extracción que tiene lugar durante la utilización clínica del producto;
- c) hacer máxima la cantidad de sustancias extraídas.

En la práctica, se recomienda la utilización de disolventes polares y apolares. El apartado 10.3.5 recomienda éstos en vez de disolventes específicos para un producto.

NOTA La normalización de los parámetros especificados en los acápites C.5 y C.6 permite la utilización de datos obtenidos a partir de ensayos biológicos de equipos médicos para otro tipo de aplicaciones, por ejemplo, para la estimación de los riesgos y para desarrollar bases de datos normalizadas.

C.8 Para los materiales que se disuelven o reabsorben en el cuerpo:

- a) se siguen las condiciones de la tabla 1;
- b) se siguen la temperatura/duraciones del apartado 10.3.1;
- c) se sigue el apartado 10.3.9 respecto a la filtración o centrifugación.

C.9 Preparación de la muestra de productos ensamblados in situ

No se puede construir una especificación normalizada para contemplar las necesidades especializadas de preparación de extractos de productos polimerizados *in situ*. Es necesario tener en cuenta los componentes individuales, el tiempo de polimerización, la utilización prevista y los vehículos de extracción para desarrollar un extracto pertinente. El texto debería incluir que es necesario utilizar la cinética de polimerización en el diseño de la metodología correcta para desarrollar un extracto pertinente para el ensayo. Los componentes no curados es necesario considerarlos cuando se selecciona un disolvente apropiado para la extracción de la muestra.

C 10 Comentarios sobre la extracción exhaustiva

La duración de una extracción exhaustiva se determina efectuando una serie de extracciones consecutivas a una temperatura y periodos de tiempo especificados, analizando el contenido en materiales lixiviables de los extractos, reponiendo el vehículo de extracción fresco, exponiendo otra vez la muestra durante un periodo de tiempo, analizando, y repitiendo el proceso. Cuando el nivel de los productos químicos extraídos sea la décima parte (0,1) del nivel encontrado en la etapa de extracción inicial, el proceso se estima completo de forma que se puede aplicar una corrección del 10% al material extraído total.

Bibliografía

- [1] ISO Guide 30, Terms and definitions used in connection with reference materials.
- [2] ISO Guide 31, Reference materials. Contents of certificates and labels.
- [3] ISO Guide 33, Uses of certified reference materials.
- [4] ISO Guide 34, General requirements for the competence of reference material producers.
- [5] ISO Guide 35, Reference materials. General and statistical principles for certification.
- [6] BRAYBROOK, J.H. and MACKAY, G.A. Supercritical fluid extraction of polymer additives for use in biocompatibility testing, *Polymer International*, 27, 1992, pp. 157-164.
- [7] F S 90-701 Medico-Surgical Equipment, Biocompatibility of Materials and Medical Devices, Methods for Extraction, 1988.
- [8] UPHILL, P.F. and CHRISTOPHER, D.H. Developing a Positive Control for Cytotoxicity Testing of Medical Device Materials, *Medical Device Technology*, Nov/Dec 1990, pp. 24-27.
- [9] United States Pharmacopeia/National Formulary, <88> Biological Reactivity Tests, In Vivo.
- [10] MHLW Notification (Tsuuchi), Principles for Biological Safety Evaluation of Medical Devices. Iyakushin No. 0213001, 2003.02.13.
- [II] Memorandum (Jimu-renraku), Guide Unes for Specific Biological Tests relevant to the Principles, issued by the MHLW Notification No. 0213001, 2003.02.13, Iryokiki-Shinsa No. 36, 2003.03.19.