

EJERCICIO DE INTERCOMPARACIÓN EN DOSIMETRÍA BIOLÓGICA MEDIANTE EL ENSAYO DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS INESTABLES (ACI) CON CRITERIO TRIAGE: METODOLOGÍAS DE RECuento, TIEMPO DE ANÁLISIS Y CATEGORIZACIÓN DE VÍCTIMAS

A Radl, C. Sapienza, M. R. Taja, M. Deminge, J. Fernández Rearte, M. Di Giorgio
Autoridad Regulatoria Nuclear (ARN), Av. Del Libertador 8250, C1429BNP Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

El ensayo de aberraciones cromosómicas inestables (ACI: dicéntricos y anillos) es utilizado para determinar dosis absorbida a cuerpo entero a fin de guiar el tratamiento médico en accidentes radiológicos con víctimas múltiples. El recuento con criterio de triage (reducción del número de células analizadas) permite una disminución en el tiempo de análisis permitiendo la clasificación de las víctimas en rangos de dosis de importancia clínica: <1 Gy; 1-2 Gy; 2-4 Gy; 4-6 Gy; >6 Gy

El Laboratorio de Dosimetría Biológica (LDB) de la Autoridad Regulatoria Nuclear (ARN) participó en un ejercicio de intercomparación internacional organizada por el Ministerio de Salud de Canadá cuyo objetivo fue la determinación de la dosis absorbida correspondiente a muestras de sangre venosa irradiadas ex vivo en 10 puntos de dosis con una fuente de Rayos X y transportadas al LDB según la normativa internacional (OMS-IATA). El análisis de las muestras se llevó a cabo mediante dos metodologías:

Metodología 1: Modo Convencional

a) Análisis de recuento de ACI mediante observación directa. Se analizaron 10, 20 y 50 metafases o 30 dicéntricos+anillos registrando el tiempo de análisis. b) Aplicando el mismo criterio que en a) pero mediante un sistema de microscopía con localización y captura automatizada de metafases.

Metodología 2: Modo rápido (Quick Scan).

Análisis de 10, 20 y 50 metafases o 30 dicéntricos+ anillos (sin recuento de centrómeros en cada metafase). El análisis se llevó a cabo en alta magnificación (100 X) en un tiempo menor a 20 segundos por cada metafase.

En el presente trabajo se evalúa el desempeño del LDB en la determinación de la dosis absorbida y se discuten las ventajas de ambas metodologías de recuento aplicadas, a fin de disminuir el tiempo de análisis y brindar una categorización de las víctimas para guiar un tratamiento médico apropiado.

1. INTRODUCCIÓN

El objetivo de la Dosimetría Biológica (DB) es la estimación de la dosis absorbida de personas presunta o comprobadamente sobreexpuestas a radiaciones ionizantes, mediante la cuantificación de aberraciones cromosómicas inestables (ACI: dicéntricos y anillos) a partir de muestras biológicas. Esta dosimetría constituye un soporte necesario de los programas de Protección Radiológica Nacionales y de los Sistemas de Respuesta en Emergencias Radiológicas o Nucleares, complementando las estimaciones dosimétricas realizadas por métodos físicos y clínicos, los cuales, permiten guiar y establecer el tratamiento médico más apropiado.

Las muestras biológicas requeridas para realizar dicha dosimetría son provenientes de sangre periférica, a partir de las cuales se efectúan cultivos celulares a fin de obtener una población representativa de un tipo celular, los linfocitos, que expresan el daño cromosómico radioinducido durante la división celular (estadio de metafase).

La estimación de dosis mediante el análisis de dicéntricos y anillos en un total de 500 a 1000 metafases evaluadas por muestra, requiere tiempo prolongado de análisis así como también, operadores experimentados. Consecuentemente, constituye una metodología laboriosa en caso de escenarios de sobreexposición con víctimas múltiples, donde el riesgo de desarrollo de un Síndrome Agudo de Radiación (SAR) necesita ser rápidamente evaluado para la determinación de un tratamiento médico adecuado. Sin embargo, el recuento con criterio de triage (reducción del número de células analizadas) proporciona una disminución en el tiempo de análisis permitiendo la clasificación de las víctimas en rangos de dosis de importancia clínica: <1 Gy; 1-2 Gy; 2-4 Gy; 4-6 Gy; > 6Gy. Realizando el análisis de un número significativamente menor de metafases (50) se incrementa el umbral del límite de detección de la metodología de 0,1 Gy a 1-2 Gy (Wilkins 2011). A pesar de esta limitación, este criterio permite identificar aquellas personas con dosis superiores a 1-2 Gy que representa la dosis umbral de mielotoxicidad de la forma hematológica del SAR y por lo tanto permitirá una aproximación adecuada para guiar el tratamiento médico.

A fin de brindar soporte en caso de accidentes radiológicos y nucleares en donde el número de víctimas potencialmente expuestas supera la capacidad de respuesta de los laboratorios locales, es necesario contar con procedimientos técnicos armonizados y consensuados, la participación en ejercicios de intercomparación periódicos y la asistencia mutua entre los laboratorios pertenecientes a redes regionales e internacionales de DB. En tal sentido, el LDB participa regularmente en ejercicios de intercomparación con las mencionadas redes para las distintas técnicas citogenéticas a fin de fortalecer las capacidades operativas del laboratorio en distintos escenarios de sobreexposición.

2. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es evaluar el desempeño del LDB en la participación de un ejercicio de intercomparación internacional de dosimetría biológica cuya organización estuvo a cargo del Ministerio de Salud de Canadá. Siendo el objetivo de dicho ejercicio la determinación de la dosis absorbida correspondiente a muestras de sangre venosa irradiadas *ex vivo* en 10 puntos de dosis con una fuente de Rayos X, mediante la aplicación de dos metodologías de análisis: Modo Convencional y Modo rápido (Quick Scan). Asimismo, se discuten las ventajas de las metodologías mencionadas para su aplicación en el triage citogenético.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Irradiación y envío de las muestras

El ejercicio se realizó a partir de 10 muestras de sangre venosa provenientes de 10 donantes diferentes cuya extracción estuvo a cargo del Ministerio de Salud de Canadá. Las muestras fueron irradiadas *ex vivo* con una fuente de Rayos X (252 kVp – 15 mA) en 10 puntos de dosis utilizando un Irradiador Biológico X-RAD, calibrado por el Consejo de Investigación Nacional del Gobierno de Canadá. Los puntos de dosis solo fueron conocidos por el proveedor del ensayo y estos fueron informados a los participantes una vez finalizado el ejercicio.

El Ministerio de Salud de Canadá envió al LDB de la ARN de Argentina las muestras irradiadas, a través de un Courier especializado en transporte de materiales biológicos según

la normativa nacional e internacional. Estas sustancias, clasificación 6.2 “Sustancias Infecciosas”, categoría B UN 3373; fueron transportadas acorde con el Embalaje PI 650. Las muestras se recibieron satisfactoriamente cumpliendo con los requisitos de transporte y envío de muestras biológicas descriptos en General Guidelines for safe and Expedient International Transport of Samples Subjected to Biological Dosimetry (Di Giorgio et al. 2014)

3.2. Procesamiento de las muestras

Los cultivos celulares se llevaron a cabo de acuerdo al procedimiento de ensayo acreditado del LDB bajo Norma ISO 17025:2005, 19238:2014 y estándares internacionales:

A partir de las muestras de sangre entera se desarrollaron cultivos de linfocitos estimulados *in vitro* a proliferación mitótica con fitohemaglutinina.

Cada cultivo se llevó a cabo en un frasco plástico estéril de 25 cm². Por frasco de cultivo se colocaron:

- 8 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco). El medio se filtró antes de su uso para asegurar su esterilidad, ajustando el pH a 6,8 – 7,2.
- 300 µl de fitohemaglutinina M (PHA M - Gibco), 3 % del volumen final de cultivo.
- 2,5 ml de suero bovino fetal certificado (Gibco), 25 % v/v.
- 0,8 - 1 ml de sangre entera.
- 100 µl de antibiótico, 1 % de concentración final Penicilina (100 UI/ml - Gibco) / Estreptomina (100 µg/ml - Gibco).
- 20 µl bromo deoxiuridina (BrdU - Sigma) de una solución madre de 2 mg/ml, concentración final de 6 µg/ml. Mediante la técnica de Fluorescencia plus Giemsa es posible diferenciar las metafases que se encuentran en la primera división celular de aquellas que están en ciclos posteriores. Esta discriminación es particularmente importante debido al decaimiento de la frecuencia de las aberraciones cromosómicas inestables a través de los sucesivos ciclos de división celular.

Incubación:

- Los cultivos se incubaron en estufa gaseada (con CO₂ al 5%) a 37,0 °C ± 0,5 °C. El tiempo de incubación fue de 48 horas. Sin embargo, se realizaron réplicas con tiempos de cultivos de 50 h y 52 h teniendo en cuenta el tiempo de transporte que sufrió la muestra, lo cual pudiese ocasionar un posible retraso mitótico.
- A fin de detener las células en metafase se agregó 3 h antes de la cosecha 500 µl colcemida (Gibco) 0.5 µg/ml de concentración final.

Cosecha:

- Recolección de células: Al finalizar el tiempo de incubación se transfirió el contenido del frasco de cultivo a un tubo de centrifuga cónico plástico de 15 ml. Las células se colectaron por centrifugación a 2000 rpm durante 15 minutos.
- Tratamiento Hipotónico: consistió en el agregado de 5 ml de una solución de KClO, 075 M al precipitado. Se homogenizó con pipeta Pasteur y se incubó en estufa a 37 °C durante 7 minutos. La detención del tratamiento hipotónico se realizó agregando 1 ml de fijador Carnoy (3 partes de metanol (Merck) : 1 parte de ácido acético glacial (Merck)), homogeneizando, centrifugando a 2000 rpm durante 15 minutos y descartando el sobrenadante.

- Lavados: Las células se fijaron colocando entre 5 y 7 ml de fijador Carnoy por lavado. La suspensión se centrifugó a 2000 rpm por 15 minutos y se descartó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió habitualmente entre 2 y 3 veces.

Sembrado:

- el precipitado final se resuspendió en 100 – 300 µl de fijador fresco según densidad celular de la suspensión.
- para la preparación de los extendidos se utilizaron portaobjetos limpios y desengrasados. Se dejaron caer 5 gotas de la suspensión desde una distancia de al menos 10 cm sobre los portaobjetos previamente humedecidos en vapor de agua, a fin de favorecer la separación de los cromosomas. A continuación se gotearon 3 gotas de fijador sobre el sembrado y se llevó a estufa para un secado lento.

Coloración:

- Los preparados se colorearon de acuerdo a la técnica de Fluorescencia Plus Giemsa (FPG) descrita en EPR - Biodosimetry 2011

3.3. Criterio de selección y recuento de metafases

Para este ejercicio de intercomparación, el laboratorio coordinador envió a cada laboratorio participante los procedimientos necesarios, que fueron diseñados para la armonización de los criterios de selección, análisis y recuento de metafases.

Metodología 1: Convencional.

Para la selección de metafases, el escaneo inicial fue realizado a baja magnificación (con objetivos de 10X/20X) con una magnificación de 100X/200X.

Las metafases seleccionadas debían poseer un total de 46 centrómeros y la calidad de los cromosomas debía estar basada en la nitidez de la imagen, torsión y superposición de los mismos, rechazando a su vez, aquéllas que se encontraban en segunda división.

Tanto las aberraciones cromosómicas como las cromatídicas fueron registradas (cromosomas multicéntricos, anillos céntricos ó acéntricos, fragmentos asociados a aberraciones inestables, excesos de restos acéntricos, gaps y breaks).

El recuento se realizó con criterio triage, sobre un total de 50 metafases o 30 dicéntricos (valor al cual se arribe primero) por punto de dosis mediante metodología automatizada (localización y captura automatizada de metafases - Cytovision 3.7) y metodología manual, registrando en ambas metodologías el tiempo de análisis luego de las 10, 20 y 50 metafases evaluadas.

Metodología 2: Modo rápido (Quick Scan)

La selección y evaluación de metafases fue realizada en un tiempo no mayor a 20 segundos, utilizando un objetivo de 100X y siguiendo los criterios de selección de la Metodología convencional respecto a la calidad de los cromosomas y su estado en el ciclo celular. Dentro de ese lapso de tiempo se evaluaron y registraron las metafases con o sin ACI (dicéntricos y/o anillos) y sus fragmentos acéntricos asociados.

El recuento se realizó con criterio de triage sobre un total de 50 células o 30 dicéntricos (lo que ocurra primero) por punto de dosis, mediante metodología Quick Scan (sin recuento del número de centrómeros y cromosomas) registrando los tiempos de análisis luego de las 10, 20 y 50 metafases evaluadas.

3.4. Estimación de la dosis absorbida (Gy)

Para cada muestra, la dosis evaluada a todo el cuerpo se expresó como dosis media, Estableciendo un intervalo de confianza del 95%, utilizando una curva de calibración *in vitro* de ⁶⁰Co construida en el LDB con coeficientes:

Curva de Calibración <i>in vitro</i> ⁶⁰ Co					
Radionucleido	ACI	C ± ES	α ± ES [Gy ⁻¹]	β ± ES [Gy ⁻²]	Referencia
⁶⁰ Coaguda β: 0,3 MeV; γ: 1,2 MeV	dic+r	0,0010 ± 0,0005	0,019 ± 0,006	0,075 ± 0,0029	LDB-ARN

4. RESULTADOS

4.1. En la Figura 1 se representa la comparación de los resultados obtenidos de la estimación de la dosis biológica (dosis absorbida en Gy) de 3 operadores del LDB para la metodología convencional (recuento manual y automatizado de metafases).

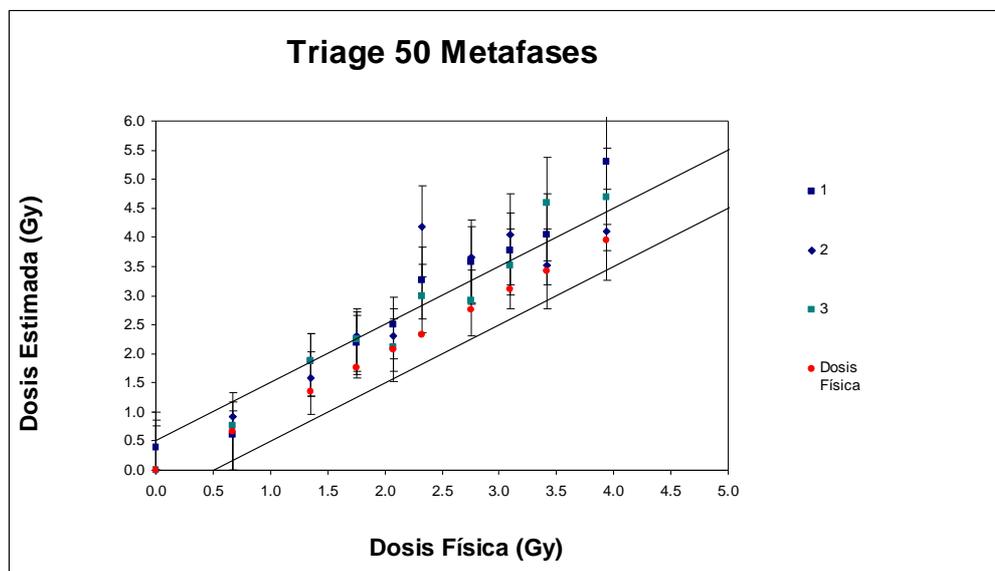


Figura 1: Dosis estimada (Gy) Vs. Dosis Física (Gy) para la metodología convencional. Las líneas representan el error de ± 20% de la dosis física. Operador 1 y 2: recuento manual de metafases. Operador 3: recuento automatizado de metafases

Los resultados obtenidos aplicando la metodología de análisis convencional muestran una sensibilidad en la determinación de la dosis de alrededor del 100% para dosis menores o iguales a 2,5 Gy y una sensibilidad de alrededor del 33% para dosis mayores, basado en el criterio de ± 20% de error de la dosis física administrada, con una tendencia a la sobreestimación y sin falsos negativos. Esta tendencia se observó para el análisis de 10, 20 y

50 metafases analizadas, obteniéndose un mejor ajuste con el incremento del número de metafases evaluadas (Figura 2).

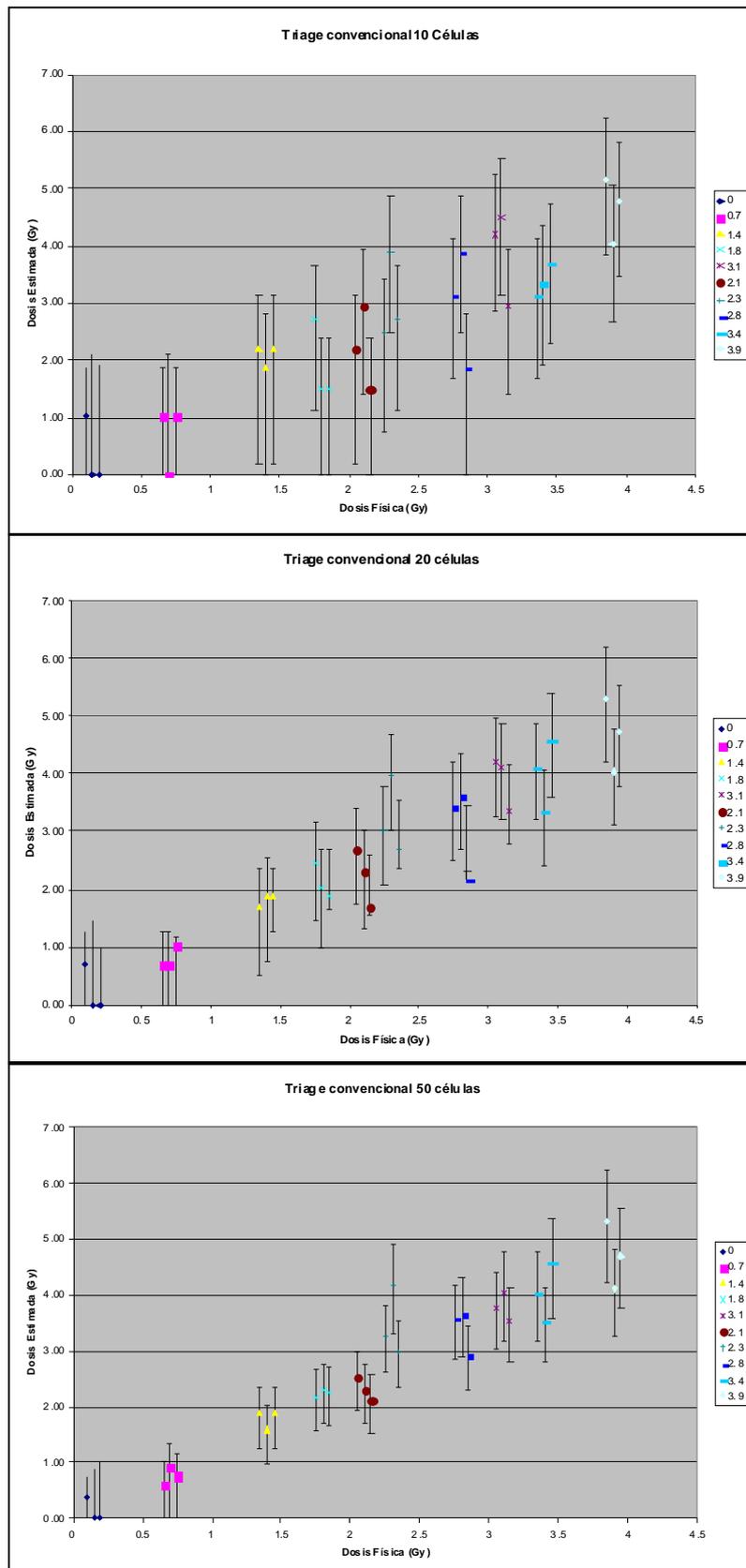


Figura 2: Dosis Estimada (Gy) Vs. Dosis Física para el recuento de 10, 20 y 50 células (metafases), para 3 operadores del LDB con la metodología convencional.

En relación al tiempo de análisis se observó una reducción del mismo para el recuento automatizado (Cytovision 3.7) de alrededor de un 30% con respecto al recuento manual.

4.2. En la Figura 3 se representa la comparación de los resultados obtenidos de la estimación de la dosis biológica (dosis absorbida en Gy) de 2 operadores del LDB para la metodología Quick Scan.

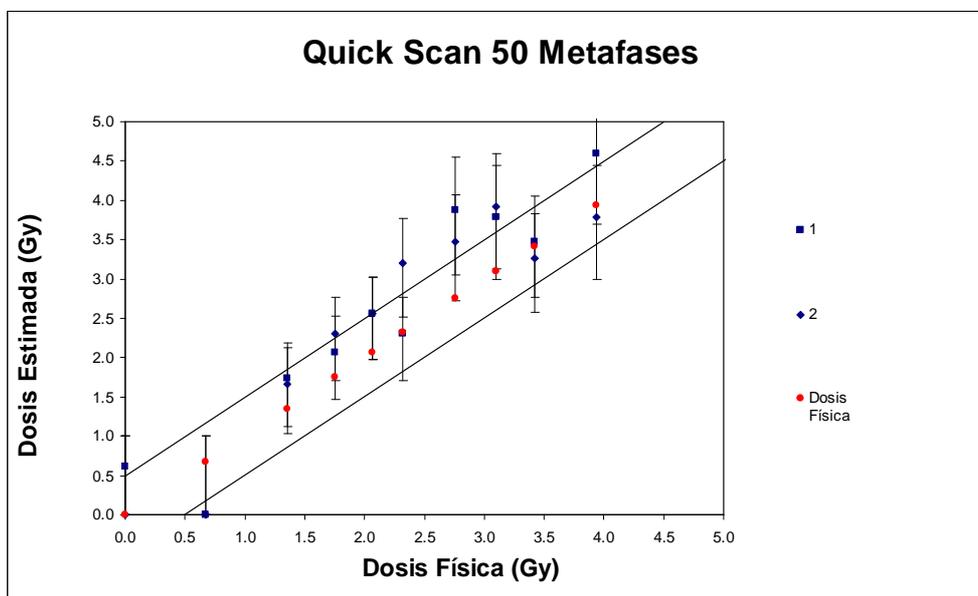


Figura 3: Dosis estimada (Gy) Vs. Dosis Física (Gy) para la metodología Quick Scan, operador 1 y 2. Las líneas representan el error de $\pm 20\%$ de la dosis física.

El valor de las dosis medias estimadas mediante la aplicación del criterio de recuento Quick Scan, resultó aleatorio, tanto para el recuento de 10, 20 y 50 metafases, evaluados mediante el % de error relativo.

Los resultados obtenidos en relación al tiempo de análisis indican una reducción del mismo para la metodología Quick Scan de alrededor de un 70% con respecto a la metodología convencional (Tabla 1).

Tiempo promedio de Análisis/vidrio (minutos)	N° Metafases Analizadas					
	10		20		50	
	Operadores		Operadores		Operadores	
	1	2	1	2	1	2
Metodología Convencional	48,8	35,1	89,2	73,7	166	121,7
Metodología Quick Scan	11,3	13,3	18,2	28	43,2	53,5

Tabla 1. Tiempo promedio de análisis por vidrio expresado en minutos para la metodología convencional y la metodología Quick Scan de 2 operadores del LDB.

4.3. En la Figura 4 se representa la comparación de los resultados obtenidos de la estimación de la dosis biológica (dosis absorbida en Gy) para todos los operadores de cada laboratorio participante, mediante la metodología convencional (recuento manual y automatizado de metafases). El código correspondiente al LDB es el N° 6.

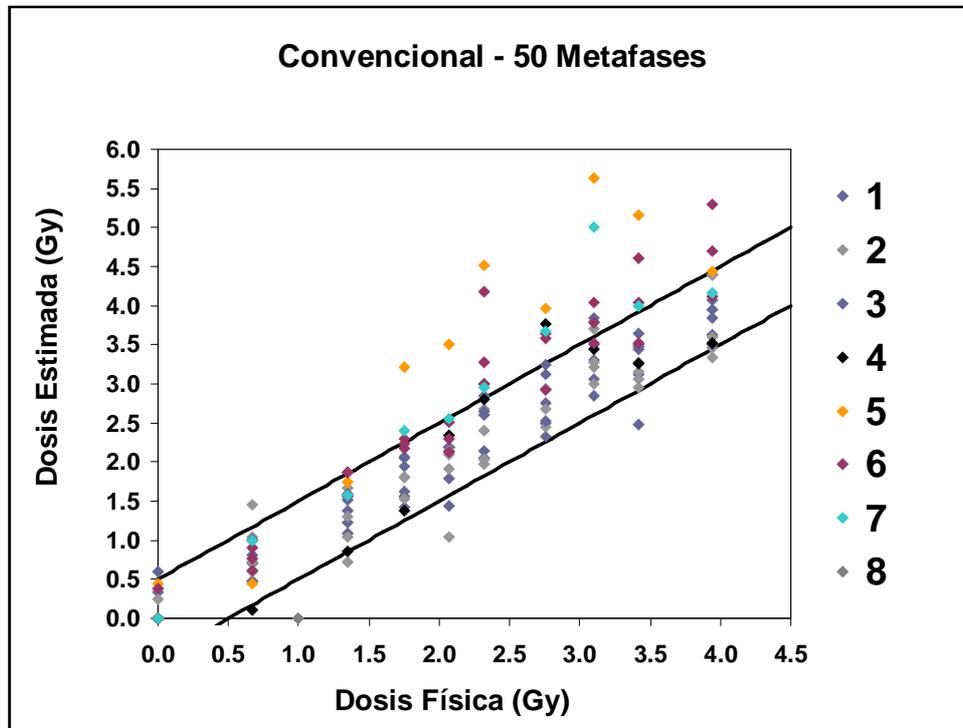


Figura 4: Dosis estimada (Gy) Vs. Dosis Física (Gy) para la metodología convencional. Lab.6=LDB. Las líneas representan el error de $\pm 20\%$ de la dosis física.

Los resultados obtenidos aplicando la metodología de análisis convencional muestran, al igual que los resultados obtenidos en el intralaboratorio, un mejor ajuste para dosis menores o iguales a 2,5 Gy, con una tendencia a la sobreestimación para dosis mayores.

4.4. En la Figura 4 se representa la comparación de los resultados obtenidos de la estimación de la dosis biológica (dosis absorbida en Gy) para todos los operadores de cada laboratorio participante, mediante la metodología Quick Scan. El código correspondiente al LDB es el N° 6.

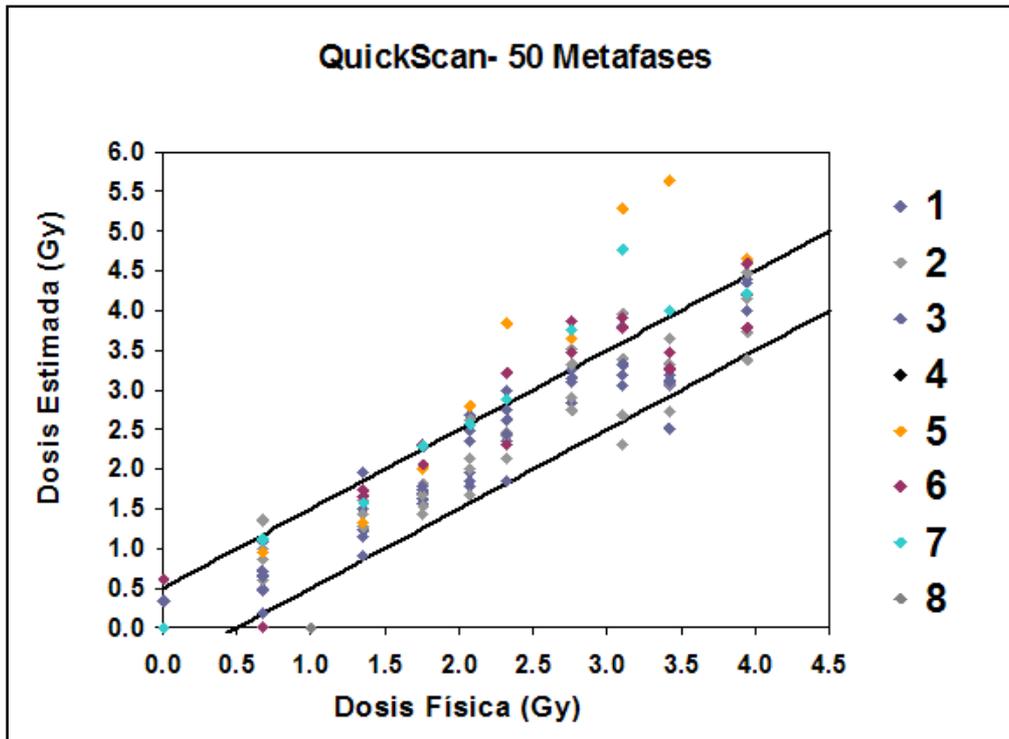


Figura 5: Dosis estimada (Gy) Vs. Dosis Física (Gy) para la metodología convencional. Lab. 6=LDB. Las líneas representan el error de $\pm 20\%$ de la dosis física.

Los resultados globales obtenidos de la aplicación del criterio de recuento Quick Scan, mostraron un comportamiento aleatorio para dosis menores a 0,5 Gy y mayores a 2,5 Gy, observándose un mejor ajuste en el rango de 0,5-2,5 Gy, para el recuento de 10, 20 y 50 metafases evaluados mediante el % de error relativo

Los tiempos involucrados en el análisis de las metafases para ambas metodologías, se expresan en la Tabla 2., observándose una reducción del tiempo de análisis para la metodología Quick Scan de alrededor de un 65% con respecto a la metodología convencional.

Resultados Globales	N° Metafases Analizadas		
	10	20	50
Tiempo promedio de análisis/vidrio (minutos) Metodología Convencional	16,4	31,6	57,8
Tiempo promedio de análisis/vidrio (minutos) Metodología Quick Scan	5,9	10,9	21,8

Tabla 2. Tiempo promedio de análisis por vidrio expresado en minutos para la metodología convencional y la metodología Quick Scan para la totalidad de los laboratorios participantes.

5. CONCLUSIONES

La estimación de la dosis biológica en situaciones accidentales con víctimas múltiples requiere de metodologías que permitan una categorización rápida de las víctimas en niveles de importancia médica. Es de interés de las redes regionales e internacionales de dosimetría biológica, trabajar de manera coordinada para estimar la dosis absorbida de un gran número de personas sobreexpuestas, en cortos lapsos de tiempo.

Para ello, es necesario contar con protocolos de trabajo armonizados, sistemas automatizados de microscopía, y metodologías de recuento con criterio de triage que pueden ser aplicables a los distintos dosímetros citogenéticos.

En el ejercicio de intercomparación realizado, los datos del LDB al aplicar los criterios de triage precedentemente descritos, muestran una disminución del intervalo de confianza con el incremento del número de metafases evaluadas (10, 20 y 50), disminuyendo la mínima dosis que es posible detectar. Consecuentemente, la mínima dosis detectable es de 1,5 Gy a partir de 20 metafases analizadas, valor de importancia dosimétrica ya que permite identificar la dosis umbral de mielotoxicidad de la forma hematológica del SAR (2 Gy).

Los resultados obtenidos al evaluar la aplicabilidad de estas metodologías indican una tendencia a la sobreestimación a partir de 2,5 Gy para ambos modos de recuento (convencional y Quick Scan), tanto en el análisis de los resultados intralaboratorio como en el interlaboratorio. En el rango de 0 a 2,0 Gy los resultados mostraron una performance satisfactoria para el LDB con una sensibilidad de la metodología de alrededor del 100%.

La sobreestimación observada para dosis superiores a 2,0 Gy es de aproximadamente $\pm 1,5$ Gy para el recuento de 10 metafases, $\pm 1,0$ Gy para el recuento de 20 metafases y $\pm 0,7$ Gy para el recuento de 50 metafases, datos provenientes del cálculo de los intervalos de confianza del 95% correspondientes a cada una de las dosis estimadas. Estos resultados indican una mayor exactitud en la determinación de la dosis con el aumento del número de metafases evaluadas, dichos valores son consistentes con los datos reportados por Wilkins et al. (2011), Beinke et al. (2011) y Bakkiam et al. (2015).

El presente ejercicio, a partir de los resultados del intralaboratorio, permitió al LDB validar el uso de las metodologías de análisis con criterio de triage, mediante modo convencional y Quick Scan, en caso de accidentes radiológicos y nucleares con víctimas múltiples. Los resultados interlaboratorio permitirían la utilización de estas metodologías con fines de asistencia mutua y la colaboración con redes de dosimetría biológica internacionales.

Dada la proximidad en el rango de las dosis evaluadas, los resultados obtenidos en el intra e interlaboratorio avalarían la construcción de curvas de calibración *in vitro* con criterio de triage tanto para el modo convencional como para el modo Quick Scan.

Si bien el modo convencional mostró un mejor ajuste en la estimación dosimétrica, el modo Quick Scan permitió una mayor rapidez en el análisis del número de metafases evaluadas (10, 20 y 50) con una reducción del tiempo de análisis de alrededor del 65%. Asimismo, se observó que la utilización del sistema automatizado de microscopía reduce el tiempo de análisis alrededor de un 30% respecto del recuento manual, mediante la aplicación de la metodología convencional.

6. REFERENCIAS

1. Bakkiam *et al.* 2015. Dicentric assay: Inter-laboratory comparison in Indian laboratories for routine and triage applications Applied Radiation and Isotopes, Volume 99 (2015) 77-85
2. Beinke *et al.* 2011. Interlaboratory comparison to validate the dicentric assay as a cytogenetic triage tool for medical management of radiation accidents. Radiation Measurements (Impact Factor: 1.14). 09/2011; 46(9):929-935. DOI: 10.1016/j.radmeas.2011.05.038
3. Di Giorgio, M *et al* 2014. General Guidelines for safe and expeditious international transport of samples subjected to biological dosimetry assessment. Radiation Protection Dosimetry 159 (2014):3-9
4. International Atomic Energy Agency. IAEA Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies. Vienna: -EPR- Biodosimetry 2011
5. International Organization for Standardization (ISO), General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ISO 17025:2005. Geneva
6. International Organization for Standardization (ISO), Radiation Protection – Performance criteria for service laboratories performing biological dosimetry by cytogenetics. ISO 19238:2014.Geneva
7. Wilkins, R C *et al.* 2011. Biological Dosimetry by the Triage Dicentric Chromosome Assay-Further validation of International Networking. Radiat Meas. 1; 46(9): 923–928. doi:10.1016/j.radmeas.2011.03.012.