

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

**ESTUDIO PRELIMINAR DE LA INTERFERENCIA
DE COMPUESTOS PROTEICOS DE RADIOFARMACOS
EN LA PRUEBA LISADO DE AMEBOCITOS DE *LIMULUS* (LAL)**



Informe de Tesis

Presentado por

CLAUDIA FABIOLA AEDANA MARTINEZ

Para optar al título de

Químico Biólogo

Guatemala, Noviembre de 1,997

06
T(1832)
C.4

JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

DECANO	LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR
SECRETARIO	LIC. FEDERICO NAVE HERRERA
VOCAL I	LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ
VOCAL II	LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN
VOCAL III	LIC. RODRIGO HERRERA SAN JOSE
VOCAL IV	BR. HERBERT RAUL AREVALO ALVARADO
VOCAL V	BR. MANOLA ANLEU FORTUNY

DEDICO ESTA TESIS

A DIOS Y A LA VIRGEN MARIA.

A MI FAMILIA, ESPECIALMENTE:

A MIS PADRES: RAUL ANTONIO ALDANA ALONZO,
CARMEN AIDA MARTINEZ FERRATE.

A MIS HERMANOS: RAUL ANTONIO,
RODOLFO ALEJANDRO,
CARMEN VERONICA.

A MI TIA: OLGA MARTINEZ DE UMAÑA

A MI ABUELITA: CONCHA FERRATE DE MARTINEZ (Q.E.P.D.)

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS, ESPECIALMENTE A:

MARGARITA BOLOIX,
LORENA GARCIA,
FELISA ESTRADA,
RINA ORELLANA,
SUZZETTE CORDON,
LUIS ALFREDO BELTETON.

RECONOCIMIENTO

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, especialmente a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

A la Dirección General de Energía Nuclear del Ministerio de Energía y Minas por sus instalaciones, ayuda y colaboración para la realización de este trabajo especialmente al personal del Laboratorio de Radiofarmacia Centralizada, a la Licda. Diana Freire de Nave y a la Licda. Claudia Quinteros.

A la Associates of Cape Cod. Inc., Woods Hole, Massachusetts, en especial a la Dra. Carmen Leonor Barillas, M.S., por proporcionarme los reactivos para la realización de la parte práctica de esta tesis.

A todas las personas que me instruyeron desde el principio y que con su colaboración y apoyo en una u otra forma, hicieron posible mi formación profesional, especialmente al Lic. Angel Rodríguez Prieto, Lic. Pablo Yurrita, Licda. Miriam Figueroa de Chang y Licda. Claudia Vargas de Meneses, a quienes recordaré teniendo presente la honorabilidad de una profesión y la responsabilidad que ella conlleva.

INDICE

1.	RESUMEN.....	1
2.	INTRODUCCION.....	3
3.	ANTECEDENTES.....	4
3.1	Radiofármacos.....	4
3.1.1	Generador de ^{99m} Tecnecio.....	5
3.1.2	Radiofármacos del ^{99m} Tecnecio.....	6
3.1.3	Otros radiofármacos.....	6
3.1.4	Administración de los radiofármacos.....	7
3.1.5	Control de calidad.....	9
3.1.6	Límite de endotoxina permisibles en los radiofármacos.....	13
3.2	Pirógenos.....	14
3.2.1	Efectos farmacológicos.....	15
3.2.2	Fuentes de pirógenos bacterianos.....	17
3.2.3	Mecanismo de acción de los pirógenos.....	18
3.2.4	Pruebas para determinar pirógenos.....	18
3.2.4.1	Reacción Térmica en Conejos.....	18
3.2.4.2	Conteo de glóbulos blancos.....	19
3.2.4.3	Lisado de Amebocitos de <i>Limulus</i> (LAL).....	19
4.	JUSTIFICACION.....	30
5.	OBJETIVOS.....	32
6.	HIPOTESIS.....	33
7.	MATERIALES Y METODOS.....	34
7.1	Universo de trabajo.....	34
7.2	Recursos.....	34
7.3	Metodología.....	36
7.4	Diseño de la investigación.....	45
8.	RESULTADOS.....	46
9.	DISCUSION DE RESULTADOS.....	49

10.	CONCLUSIONES.....	53
11.	RECOMENDACIONES.....	54
12.	REFERENCIAS.....	57
13.	ANEXOS.....	59
13.1	Radiofármacos de ^{99m} Tecnecio disponibles.....	60
13.2	Radiofármacos comunes en medicina nuclear.....	61
13.3	Pirógenos bacterianos que han demostrado reacción con el Lisado de amebocitos de <i>Limulus</i> (LAL).....	62
13.4	Cálculos para determinar la sensibilidad del Lisado en la prueba LAL: Método gel coágulo.....	63
13.5	Certificado de análisis de los reactivos UPDATE.....	65
13.6	Tablas de Resultados.....	66
13.7	Formulación del Metilendifosfonato (MDP).....	77
13.8	Formulación de Macroagregados de Albúmina (MAA).....	78
13.9	Procedimiento de control de calidad microbiológico de los radiofármacos....	79
13.10	Protocolo de trabajo de la prueba LAL: Método gel coágulo para la Determinación de endotoxinas en los radiofármacos para marcar con ^{99m} Tecnecio Macroagregados de Albumina (MAA) y Metilendifosfonato (MDP).....	80

1. RESUMEN

En Guatemala, el Laboratorio de Radiofarmacia Centralizada de la Dirección General de Energía Nuclear (DGEN) produce 14 radiofármacos diferentes para marcar con ^{99m}Tc Tecnecio, que posteriormente serán administrados a pacientes con fines de radioterapia o para realizar exploraciones con o sin imágenes, los cuales van a contribuir de manera importante al diagnóstico o tratamiento de los mismos pacientes. Es indispensable que estos radiofármacos, que son administrados por vía intravenosa o intratecal, cumplan con un estricto control de calidad que confirmen la calidad del radiofármaco, es decir, comprobar que el comportamiento del radiofármaco sea el correcto y que de su aplicación se obtenga el beneficio que justifique su utilización debido, a todos los efectos secundarios que puedan presentarse después de su aplicación.

El programa de control de calidad que se realiza en el Laboratorio de Radiofarmacia Centralizada, incluye controles que evalúan los aspectos fisico-químicos, biológicos, y radiológicos de la preparación radiofarmacéutica, con el fin de garantizar el producto. Entre éstos, está la determinación de pirógenos que en la actualidad se realiza por medio de la Prueba de Reacción Térmica en Conejos; prueba engorrosa y costosa, que requiere de un tiempo largo para su realización, además presenta los problemas de las pruebas *in vivo*, problemas económicos para el mantenimiento del bioterio, etc.

El presente estudio evalúa la implementación de la prueba Lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL), una técnica de 60 minutos que consiste en que un lisado de células, preparado a partir de amebocitos de *Limulus polyphemus* (Cangrejo herradura), forma un gel opaco en presencia de concentraciones extremadamente pequeñas de endotoxinas bacterianas.

El objetivo principal de esta investigación fue evaluar la interferencia de los compuestos proteicos de los radiofármacos en la prueba LAL, se utilizó para ello Macroagregados de Albúmina (MAA) ya que por su formulación contienen grandes concentraciones de albúmina, una de las proteínas plasmáticas más abundantes, y se eligió el Metilendifosfonato (MDP) como control, por ser el radiofármaco más utilizado en centellografía ósea en los centros de Medicina Nuclear del país. Inicialmente se realizaron pruebas preliminares para determinar si alguno de los dos radiofármacos interferían con la prueba LAL, luego se procedió a validar la prueba y finalmente se realizaron las pruebas de rutina.

Con los resultados obtenidos en las pruebas preliminares se concluyó que en los MAA los compuestos proteicos, en este caso albúmina a una concentración de 2 mg/dl, no interfieren con la prueba LAL. Sin embargo, con el MDP se determinó que algún compuesto de este radiofármaco sí interfiere con la prueba LAL, fue imposible determinar que compuesto fue el que inhibió la formación del coágulo; la interferencia se superó mediante una dilución 1:8 de la muestra. Además se determinó que el lote de MAA 16/95 contenía endotoxina en una concentración mayor a 1 Unidad de Endotoxina/ml (EU/ml) pero menor a 2 EU/ml. Se realizaron ensayos para validar la prueba LAL con los dos radiofármacos, lo cual no fue posible debido a factores que influyeron en la parte práctica de este estudio, tales como la reducción de gran cantidad de los reactivos disponibles. Con las pruebas de rutina realizadas se demostró que el MDP y MAA si pasan la prueba de apirogenicidad, ya que no presentaron pirógenos fuera de los rangos de concentración permisibles por la USP XXIII.

Se determinó que el éxito de la prueba de LAL depende de condiciones específicas como temperatura, pH, incubación constante (sin variaciones mínimas), etc. Además es una prueba altamente sensible, rápida y de demostrada utilidad para el control de calidad de los radiofármacos.

2. INTRODUCCION

La Medicina Nuclear se dedica al diagnóstico y tratamiento de pacientes a través del estudio por imágenes del funcionamiento y metabolismo de los órganos en el estudio de diversas enfermedades, se utilizan isótopos radioactivos que permitan visualizar en imágenes las macroestructuras que expresan la función del órgano.

Una aplicación importante de la Medicina Nuclear es el estudio morfofuncional de un órgano específico; el radiofármaco y el trazador específico dependerán del órgano que se quiera estudiar.

Actualmente en Guatemala, en el Laboratorio de Radiofarmacia Centralizada de la Dirección General de Energía Nuclear, se producen 14 radiofármacos diferentes, los cuales son marcados con ^{99m}Tc Tecnecio, y son administrados intravenosamente.

En el presente trabajo de investigación se determinó la sensibilidad de la prueba Lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL) en la determinación de pirógenos en los radiofármacos que marcados con ^{99m}Tc Tecnecio se utilizan en centellografía: los Macroagregados de Albúmina (MAA) y el Metilendifosfonato (MDP). Al mismo tiempo que se determinó la presencia de pirógenos, se evaluó la interferencia de los componentes protéicos de los radiofármacos en la prueba LAL, y se pretende implementar el uso de la prueba LAL en el Laboratorio de Radiofarmacia Centralizada, como parte de las rutinas del control de calidad que aseguran la eficacia y la calidad del producto.

3. ANTECEDENTES

3.1 RADIOFARMACOS

Un radiofármaco es un trazador metabólico que está compuesto de dos partes: un radionucleido, que contiene nucleones marcados y un fármaco, cuya principal función es localizarse en un órgano específico y participar en la fisiología del mismo, para emitir radiación que sea percibida por un detector (1, 2, 3).

Administrado al paciente, el radiofármaco se localizará en un órgano o tejido específico, dependiendo de su biodistribución del fármaco. Al alcanzar el radiofármaco el órgano de interés, se podrá tomar una imagen del órgano por medio de instrumentos especiales, los cuales pueden detectar la radiación emitida por el radionucleido (1, 3).

En Medicina Nuclear, ciencia que se dedica al diagnóstico, estudio y tratamiento de los pacientes con diversas enfermedades, se utilizan radiofármacos con fines clínicos que visualizan las imágenes de diferentes órganos, así como sus procesos fisiológicos (4, 5) y con fines terapéuticos.

Comercialmente se encuentran disponibles radiofármacos para fines diagnósticos que permiten visualizar órganos como cerebro, corazón, pulmones, glándula tiroides, hígado, huesos, bazo, riñones y páncreas; además son útiles para investigar procesos fisiológicos de los órganos; determinar el volumen sanguíneo, estudiar las células rojas, etc (1, 3).

Los radiofármacos para usos terapéuticos son básicamente los mismos que se emplean para fines diagnósticos. La diferencia es la cantidad y el tipo de radiación administrada al paciente. Los radiofármacos administrados con fines terapéuticos se van a localizar en un órgano blanco y emiten partículas beta, mientras que los radiofármacos utilizados para el diagnóstico emiten fotones gamma (1, 6). Las partículas beta son usadas para terapia porque depositan virtualmente toda su energía

dentro del órgano específico; mientras que los fotones gamma, muy penetrantes, son capaces de atravesar los tejidos del organismo para ser detectados por el equipo de imagen (6).

3.1.1 GENERADOR DE ^{99m}Tc

El ^{99m}Tc tiene un período de semidesintegración de 6.04 horas y emite un fotón gamma simple de 140 kiloelectrovoltios (Kev). El corto período de semidesintegración y la falta de emisiones beta permiten la administración de dosis de varios milicurios (mCi) sin que ésta sea una dosis de radiación de efectos nocivos para el paciente, lo que hace al ^{99m}Tc el radionucleido de elección ideal para usos clínicos (1).

La radiación gamma monoenergética de 140 Kev presenta una penetración de los tejidos, y puede ser detectada con alta eficiencia por la instrumentación corrientemente utilizada en medicina nuclear, obteniéndose una buena resolución en las imágenes por centellografía. Sin embargo, debido a su corto período de semidesintegración, el ^{99m}Tc no suele estar disponible en una rutina básica en la mayoría de Departamentos de Medicina Nuclear (5, 7).

Debido a que el ^{99}Mo decae a ^{99m}Tc , se desarrolló un sistema con el que el ^{99m}Tc puede ser separado fácilmente del ^{99}Mo , cuyo período de semidesintegración (66.7 horas) es once veces mayor que el del ^{99m}Tc . Este método de separación se basa en la alta afinidad del ^{99}Mo por alúmina en una columna de adsorción (1). El ^{99m}Tc en forma de pertecnelato (TcO_4^-), producido por la desintegración del ^{99}Mo tiene menor afinidad por la alúmina, y puede ser separado del ^{99}Mo por elución de la columna con solución salina normal. El ^{99}Mo va continuar produciendo ^{99m}Tc y puede ser repetidamente eluido para cosechar ^{99m}Tc a lo largo de dos semanas. La vida útil de un generador es aproximadamente de una semana.

El eluido resultante contiene pertecnetato de sodio marcado con ^{99m}Tc ($^{99m}\text{Tc-NaTcO}_4$) altamente puro, listo para utilizarse (6 - 7). El $^{99m}\text{Tc-NaTcO}_4$ es utilizado como un agente en la exploración del cerebro. También es utilizado para la preparación de otros radiofármacos.

Aproximadamente del 80 a 90% de los procedimientos diagnósticos realizados actualmente utilizan ^{99m}Tc como radionucleido.

3.1.2 RADIOFARMACOS DEL $^{99m}\text{TECNECIO}$

El Tc tiene estados de valencia que van desde -1 a +7. El estado +7 es relativamente inerte a muchos materiales, por lo que se debe utilizar un agente reductor como el cloruro estannoso (SnCl_2). En varios radiofármacos de ^{99m}Tc los estados de valencia final de +4 y +5 son los más prevalentes.

Los juegos de reactivos de ^{99m}Tc se deben preparar diariamente debido a su corto período de semidesintegración. Se determina la cantidad de radioactividad en la preparación final y se realizan las pruebas de control de calidad. Muchos de estos juegos de reactivos son diseñados para dosis múltiples y tienen vida media de desecho entre 2 y 6 horas. Los radiofármacos de ^{99m}Tc comúnmente utilizados y que se encuentran disponibles en el mercado están listados en el Anexo 13.1.

3.1.3 OTROS RADIOFARMACOS

A pesar de que el ^{99m}Tc es el radionucleido más utilizado para fines clínicos en medicina nuclear, existen otros que también son empleados comúnmente, que se anotan en el Anexo 13.2.

El ^{131}I es un radionucleido útil para el diagnóstico y tratamiento de afecciones de la tiroides y en otras aplicaciones clínicas.

Otros radionucleidos útiles incluyen ^{67}Ga , ^{75}Se , ^{133}Xe , ^{201}Tl , ^{32}P , ^{125}I , ^{51}Cr , y el ^{23}I (1, 7). Todos estos radionucleidos están disponibles comercialmente listos, para su uso, debido a que la mayoría de ellos tienen un período de semidesintegración suficientemente largo para su envío (8, 9).

3.1.4 ADMINISTRACION DE LOS RADIOFARMACOS

La mayor parte de los radiofármacos se administran por vía parenteral, por lo que deben cumplir con las especificaciones de los inyectables (5). Además se debe administrar la dosis correcta del radiofármaco, en el paciente correcto y en el tiempo correcto (1).

Por ejemplo, la dosis de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ sulfuro coloidal es de 2 a 4 mCi. El volumen del compuesto necesario para administrar una dosis predeterminada de radiofármaco varía con el tiempo, debido al decaimiento del radionucleido. Por consiguiente, antes de administrarse individualmente un radiofármaco primero debe corregirse su concentración específica por decaimiento (mCi/ml), para así poder calcular el volumen necesario de solución (1, 3, 8). Asumiendo que el generador de ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$, eluyera a las 7:00 horas y se colectaron 20 ml, y que la cantidad total de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ en los 20 ml medidos y determinados en un calibrador de dosis fuera de 1,000 mCi, la concentración específica de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ es 50 mCi/ml a las 7:00 horas. A las 8:00 horas, una hora después, la concentración específica de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ es de 44.5 mCi/ml, la cual se calcula por medio de la ecuación del decaimiento radioactivo.

$$A_t = A_0 e^{-(0.693 + t\frac{1}{2})} = (50 \text{ mCi/ml}) e^{-(0.693 + 6.0 \text{ hr}) (1 \text{ h})} = 44.5 \text{ mCi/ml}$$

donde t = tiempo transcurrido desde la primera medición de la actividad del radionucleido.

$t\frac{1}{2}$ = tiempo medio de desintegración del radionucleido.

A_0 = Concentración inicial del radionucleido al momento de la primera medición.

A_t = Concentración luego de transcurrido un tiempo t de la primera medición.

Debido a la energía de radiación gamma se deben tomar precauciones de seguridad mientras se manipulan estos radiofármacos marcados con ^{99m}Tc (gamma 140 Kev). La administración debe realizarse detrás de una plancha de plomo con una jeringa plomada para reducir la exposición de radiación al individuo que está administrando la dosis. La cantidad de radiación presente en la dosis, debe ser determinada previamente a la administración del agente al paciente, colocando la jeringa o el vial en un detector de radiación, el cual va a determinar la cantidad de actividad presente (calibrador de dosis) (8).

3.1.4.1 VIA INTRADERMICA (I.D)

También es llamada intracutánea. La droga se inyecta dentro de la capa superficial de la piel. Por esta vía se administran volúmenes pequeños menores a 0.1 ml y generalmente se utiliza para pruebas diagnósticas, para un número limitado de vacunas y para los estudios de los vasos linfáticos. La absorción por esta vía es lenta (2).

3.1.4.2 VIA INTRAVENOSA (I.V)

Se administran dentro de las venas soluciones en volúmenes variables, con el objetivo de lograr efectos rápidos. Los resultados son predecibles y potencialmente peligrosos debido a que no se puede retirar la droga después de ser administrada. Las soluciones de drogas irritantes son administradas por esta vía, ya que se diluyen rápidamente con la sangre o se utiliza un fluido intravenoso como disolvente, la administración IV tiene menos limitaciones respecto a volúmenes, número y localización de las venas, lo que la hace una vía muy accesible (1, 10). El 95% de los radiofármacos son administrados por esta vía.

3.1.4.3 VIA INTRATECAL

La droga es inyectada directamente por punción lumbar al líquido cefalorraquídeo. Esta vía presenta grandes desventajas debido a su alta invasividad, complicaciones por infecciones, lesión de órganos del sistema nervioso central y hematomas post punción (1), lo que ha restringido su uso, utilizándose únicamente para estudios radiológicos como mielogramas, ventriculogramas, etc., los cuales en la actualidad están siendo sustituidos por métodos menos invasivos ej. Centellografía, resonancia magnética nuclear y tomografía axial computarizada.

3.1.5 CONTROL DE CALIDAD

Después de la preparación de un radiofármaco y antes de su utilización, es necesario efectuar una serie de controles que comprueben la calidad del radiofármaco, es decir, verificar que el comportamiento del radiofármaco sea el correcto y demostrar que de su aplicación se obtendrá el beneficio que justifica su utilización para seguridad del paciente y para garantizar la eficacia del producto (1, 3, 8). Los controles que se realizan incluyen aspectos fisico-químicos, biológicos, y radiológicos de la preparación radiofarmacéutica (3).

3.1.5.1 CONTROLES FISICO-QUIMICOS

3.1.5.1.1 ESTADO FISICO DEL RADIOFARMACO

Hay radiofármacos en los tres estados físicos: sólido, líquido y gaseoso, y en ocasiones la forma o estado físico del radiofármaco va a determinar su comportamiento biológico. En el caso de que la preparación sea una solución, que es lo más frecuente, hay que considerar todos los aspectos

organolépticos de la misma: aspecto, turbidez, viscosidad, color, etc., comprobando especialmente la presencia de partículas extrañas. El color de la solución puede presentar modificaciones debido a la radiación emitida por el mismo radiofármaco (5).

3.1.5.1.2 TAMAÑO Y NUMERO DE PARTICULAS

Si la preparación se trata de una suspensión de partículas, como es el caso de los macroagregados y las microesferas de albúmina, es preciso controlar el tamaño y el número de las partículas por dosis (5). El tamaño de las partículas se determina en el microscopio óptico utilizando un ocular micrométrico y una cámara de recuento celular (3). El tamaño de las partículas del radiofármaco lo determina el órgano en el cual el agente se va a localizar (1). Por ejemplo el ^{99m}Tc -albúmina MAA es un agente explorador pulmonar con un tamaño de partícula de 20 á 75 μm ; partículas más pequeñas que 10 μm pueden escaparse de los pulmones y localizarse en otros órganos como hígado o bazo (5).

3.1.5.1.3 pH

Los radiofármacos que comúnmente tienen la forma farmacéutica de un inyectable, deben de tener un pH óptimo de 7.4, pero este valor puede variar significativamente en función de la estabilidad de la preparación radioquímica (8).

El valor del pH en los radiofármacos de administración intravenosa no tiene mucha importancia, gracias al gran poder tamponante de la sangre y a los volúmenes pequeños que normalmente se inyectan, pero los radiofármacos inyectables vía intratecal deben ser rigurosamente estabilizados a un valor de 7.4 (5).

3.1.5.2 CONTROLES RADIOLOGICOS

3.1.5.2.1 CONCENTRACION RADIATIVA

Es la actividad presente por unidad de volumen o por unidad de masa. En base a ella se calcula el volumen o la cantidad de radiofármaco necesario para la realización de una determinada exploración (5), vease la sección 3.1.4 Administración de los radiofármacos.

3.1.5.2.2 PUREZA RADIONUCLEIDICA

La pureza radionucleídica de un radiofármaco es la fracción de la radioactividad total presente señalada en la forma radionuclídica. La presencia de radionucleidos diferentes al requerido pueden incrementar la exposición de radiación al paciente (8). Además, la instrumentación de medicina nuclear está diseñada de tal forma que sólo un radionucleido en particular se pueda detectar eficientemente, por consiguiente la presencia de impurezas radionuclídicas puede afectar adversamente los resultados de la exploración (8). Estos equipos de detección nuclear son capaces de identificar el tipo y energía de radiación emitidas por la muestra (1, 3).

3.1.5.2.3 PUREZA RADIOQUIMICA

La pureza radioquímica es la fracción de radionúclido presente en una preparación radiofarmacéutica como radiofármaco (5). Las impurezas radioquímicas pueden causar localización de radioactividad en órganos diferentes al órgano blanco, causando una exploración pobre (3).

Para determinar la pureza radioquímica de un radiofármaco se utiliza cualquier método analítico que permita la separación de las diferentes especies químicas radioactivas (5). Las técnicas cromatográficas son las más utilizadas ya que son más fáciles de realizar y muy sensibles. El sistema

de solvente y medio de soporte se debe escoger cuidadosamente y varía dependiendo del radiofármaco que se va a analizar (3, 8). Después de correr el cromatograma de las tiras, si se cuenta con un integrador digital se obtiene un mapa cualitativo de la radioactividad como una función de la distancia recorrida y una impresión cuantitativa de la radioactividad; o se cortan las tiras a la medida de 1 cm. y se cuentan en un detector de radiación gamma tipo pozo y se grafica manualmente para obtener los resultados expresados en porcentaje en ambos casos (7).

3.1.5.3 DISTRIBUCION BIOLOGICA

Como los radiofármacos son diseñados para localizarse en un órgano objetivo específico, es importante determinar que el agente se localice en el órgano de interés. Por esta razón, dentro del programa de control de calidad, se realiza la determinación de la distribución biológica de cada radiofármaco antes de entregarlos. Este procedimiento implica la administración del radiofármaco a animales de laboratorio para averiguar la cantidad relativa de radioactividad en varios órganos. Este procedimiento no se utiliza de manera rutinaria (3).

3.1.5.4 CONTROLES BIOLOGICOS

3.1.5.4.1 ESTERILIDAD

La esterilidad es un requisito indispensable para todos los radiofármacos de administración parenteral (5, 11). En los compuestos radioactivos parece ser que la radiactividad inhibe el crecimiento bacteriano, pero aun así puede haber contaminaciones (5). La esterilidad se obtiene de varias formas durante su elaboración: autoclaveado, filtración por membranas, etc. pero no siempre se puede realizar el control de esterilidad antes de autorizar su distribución o administración (5).

3.1.5.4.2 APIROGENICIDAD

Las sustancias pirógenas o pirogénicas son complejos de proteínas y polisacáridos, asociados en parte a lípidos procedentes del metabolismo bacteriano, que al ser inyectados en un ser vivo producen una reacción con fuerte aumento de la temperatura (3). La apirogenicidad debe ser controlada en los radiofármacos que se administran en dosis de más de 15 ml de volumen (5).

El control de apirogenicidad se puede realizar por el método clásico de Reacción Térmica en Conejos o por la Prueba LAL, método más moderno, basada en la acción del lisado de amebocitos de *Limulus*, que consiste en la incubación de volúmenes pequeños del producto con el lisado de los amebocitos circulantes obtenidos de la sangre del cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*). La presencia de cantidades pequeñas de pirógenos causan que el lisado forme un gel; este método es simple de realizar y es muy sensible; posteriormente será descrito como prueba de Lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL) (8, 10, 12, 13).

3.1.6 LIMITE DE ENDOTOXINA PERMISIBLES EN LOS RADIOFARMACOS

Límite de endotoxina permisible es la cantidad o concentración máxima de endotoxina que puede administrarse al paciente sin que se produzca una respuesta pirogénica. Los límites permisibles reportados por la USP XXIII:

- Para radiofármacos que se administran por vía intravenosa, 175 (EU)/V*.

- Para radiofármacos que se administran por la vía intratecal, 14 (EU)/V*.

*donde V es la dosis máxima (cuerpo completo) en ml de aspiración del producto (14).

Para determinar el límite de endotoxina de un producto, primero se debe buscar en el Apéndice E de la Guía de la FDA (14) y confirmar que la dosis máxima del producto sea la correcta. Si la dosis es mayor que la listada, se debe calcular el límite de la siguiente forma:

$$\text{Límite de endotoxina} = \frac{175 \text{ EU (Límite USP para radiofármacos)}}{V \text{ (dosis máxima a la hora o fecha de expiración del radiofármaco)}}$$

Este límite de endotoxina para cada radiofármaco va a variar dependiendo de la dosis o del volumen que será administrado al paciente.

3.2 PIROGENOS

Se definen como productos del crecimiento bacteriano o productos ocasionados por la muerte de los microorganismos mismos, los cuales después de su inyección pueden causar trastornos de la temperatura (reacción febril o hipotermia) en animales y humanos (3).

En 1,923 Siebert llamó "sustancias pirógenas" a las sustancias responsables de las reacciones febriles, demostrando su vinculación con elementos figurados como bacterias muertas, desintegradas o intactas, o con productos solubles del metabolismo microbiano, como proteínas, endotoxinas y/o exotoxinas (7).

Se usan indistintamente los términos "pirógenos bacterianos" y "endotoxinas", sin embargo las endotoxinas son específicamente polisacáridos de alto peso molecular que provienen de la membrana

de las bacterias gram negativo, por lo que no son los únicos agentes pirogénicos producidos por los microorganismos, ya que otras bacterias gram positivo, hongos y virus también producen agentes pirogénicos, los cuales no poseen las mismas propiedades bioquímicas (15).

A pesar de la diferente fuente microbiológica, todos los pirógenos presentan propiedades similares (1), pero no todos tienen la misma composición ni la misma potencia, que varían según la bacteria que les dió origen (10).

Químicamente los pirógenos son lípidos o fosfolípidos adheridos a polipéptidos, a aminoácidos o a polisacáridos. Son solubles en agua pero insolubles en solventes orgánicos (1). Por su pequeño tamaño, generalmente menor de 1 micrón, no son atrapados por los filtros bacterianos de membrana (9). Debido a su solubilidad en agua los pirógenos no se eliminan con la esterilización con vapor húmedo bajo presión, ni con filtración a través de filtros de esterilización, aunque estos sí eliminan los microorganismos vivos y enteros (1).

Los pirogenos que producen las bacterias Gram negativo son los más potentes (1). También son los más activos y los trastornos en la regulación térmica pueden manifestarse por hipotermia o hipertermia (10). Los extractos secos de pirógenos son estables por largos periodos de tiempo, aún en soluciones acuosas pierden poca actividad después de varios años (2).

3.2.1 EFECTOS FARMACOLOGICOS

Los efectos farmacológicos que se presentan con la terapia intravenosa son la reacción febril, que se manifiesta poco después de la inyección y generalmente se acompaña de una deficiente respiración, cianosis, dolor de cabeza, sudor intenso, escalofríos, náuseas, vómitos y otros trastornos gastrointestinales (1, 9). Aparte de provocar los efectos señalados anteriormente, los pirógenos

tienen otras acciones farmacológicas, siendo las más importantes: la modificación en el recuento de glóbulos blancos, la inhibición del jadeo térmico en los perros, la acción inhibitoria de la úlcera, el efecto sobre la circulación periférica, la hiperglicemia, la reducción de secreción ácida gástrica y las reacciones tisulares a la inyección de los mismos (10).

También se citan cambios morfológicos en la corteza suprarrenal y modificación en la carga superficial de los eritrocitos, hipotensión o lesiones hemorrágicas en vísceras de piel (3); además, alteraciones en la coagulación y, en grandes dosis, pueden producir shock y muerte (10).

Los efectos de la administración de pirógenos varían, no sólo por la fuente microbiana de pirógenos sino también con las especies del animal que recibe la inyección (9).

El conejo es de los animales más sensibles a los efectos de los pirógenos, por esta razón se utiliza como el animal de elección en la prueba oficial de Reacción Térmica para la detección de pirógenos (1, 8).

Las variables en la respuesta a los pirógenos son: la vía de administración y el volumen de solución administrada (1). Los pirógenos tienen mayor importancia en la administración intravenosa de drogas que en la administración subcutánea o intramuscular; esto se debe no sólo a la vía de administración, sino también a que intravenosamente son administrados volúmenes mayores (3).

La reacción pirogénica en el hombre se manifiesta por fiebre y escalofríos. Después de la inyección hay un período latente de 45 a 90 minutos, luego hay un incremento rápido de la temperatura corporal, seguido por escalofríos, dolor de cabeza y malestar general. El escalofrío dura de 0 a 20 minutos. La fiebre comienza entre los 30 y 45 minutos después de la inyección de la solución pirógenica, alcanza su pico máximo en la segunda o tercera horas (1) y casi desaparece entre la cuarta y la sexta horas sin que después se adviertan efectos secundarios (10). Si el material

es muy pirogénico puede producirse un segundo pico (9). Durante el período de latencia, los granulocitos desaparecen virtualmente del torrente circulatorio por adherencia a las membranas de los vasos sanguíneos (10).

Usualmente los efectos pueden ser controlados por la administración de una droga antipirética, pero un incremento selectivo de la temperatura en pacientes enfermos puede producir consecuencias severas en el transcurso de la misma enfermedad (6).

3.2.2 FUENTES DE PIROGENOS BACTERIANOS

Dado que los pirógenos son producto del metabolismo de los microorganismos o residuos de estos, es de esperarse que se encuentren en todo lugar donde los microorganismos manifiesten su presencia (1, 3).

Cuando los pirógenos se detectan en los productos de uso parenteral, pueden provenir de varias fuentes: el agua utilizada como solvente, los recipientes con los cuales el preparado ha tenido contacto durante su fabricación, empaçado, almacenaje o administración; o los químicos usados en su preparación (1).

La formación o producción de pirógenos en una solución puede deberse a la contaminación por microorganismos, bacterias, hongos o virus presentes en el agua o en las drogas que se utilizan para la elaboración de la solución (10). La fuente de contaminación más común de pirógenos es el agua utilizada para hacer la solución. A pesar de que el agua por sí misma es un medio de cultivo pobre, la contaminación puede ocurrir por microorganismos transportados por el aire o el polvo, ésta es la razón por la cual únicamente se utiliza agua destilada estéril y libre de pirógenos para la preparación de productos para uso parenteral (1).

Frecuentemente, las drogas que se utilizan en la preparación de soluciones tienen pirógenos. Si son drogas que se cristalizan, los pirógenos pueden fijarse por medio de adsorción durante el proceso de cristalización, pues éste no exige agua libre de pirógenos (7). La contaminación también puede darse en los productos secos y es casi segura en aquellos que contienen agua de cristalización o que son higroscópicos (10). En cuanto más favorable sea el producto para el desarrollo de microorganismos, hay mayor probabilidad de una rápida producción de pirógenos (7). Cuanto más favorable sea el producto para el desarrollo de microorganismos, mayor probabilidad existe de una rápida generación de pirógenos (7). A pesar de los cuidados que se tienen para eliminar los pirógenos de las soluciones, todavía pueden contaminarse debido al tratamiento defectuoso de los recipientes en que se preparan, cañerías, envases, aparatos de transfusión, jeringas, etc (4).

3.2.3 MECANISMO DE ACCION DE LOS PIROGENOS

Los estudios sugieren que una sustancia de origen endógeno, producida por los glóbulos blancos lesionados por el pirógeno microbiano, es la que actúa sobre los centros de la termorregulación en el hipotálamo, ocasionando los trastornos de la temperatura que pueden manifestarse tanto como una reacción febril, mecanismo común en presencia de pirógenos, o como hipotermia (10, 16).

3.2.4 PRUEBAS PARA DETERMINAR PIROGENOS

3.2.4.1 REACCION TERMICA EN CONEJOS

Esta prueba es reconocida por la USP XXIII y la FDA como la prueba oficial para productos parenterales (13, 14); es una prueba muy compleja que consiste en determinar el incremento de la

temperatura que se produce en el cuerpo del conejo, al administrar una inyección intravenosa de una solución estéril de la sustancia a ser analizada (11) y está diseñada para productos que son tolerados por los conejos de prueba, en una dosis que no exceda los 10 ml/kg inyectados intravenosamente, dentro de un período de tiempo que no sea mayor de 10 min.

Para productos que requieren una preparación preliminar o están sujetos a condiciones especiales de administración, o en el caso de antibióticos y/o reactivos biológicos se deben seguir las instrucciones adicionales dadas por las regulaciones federales (1).

3.2.4.2 CONTEO DE GLOBULOS BLANCOS

Se considera una prueba limitada, por no tener la sensibilidad necesaria para obtener resultados cuantitativos. Después de una inyección que contiene pirógenos ocurre disminución de los glóbulos blancos con aumento simultáneo de la temperatura. Luego de la leucopenia hay un incremento de glóbulos blancos, sobrepasando el valor normal, y se produce una marcada leucocitosis cuyo pico se localiza entre las 8 y 16 horas después de la inyección, y se recupera el valor normal entre las 18 y 24 horas (10).

3.2.4.3 LISADO DE AMEBOCITOS DE *LIMULUS* (LAL)

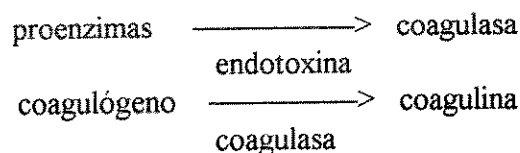
Este método, se basa en los trabajos de Levin y cols. (16, 17), es simple y rápido. Es una prueba cualitativa para la detección de endotoxinas *in vitro* por la reacción que se produce en un preparado que contiene lisado de amebocitos del *Limulus polyphemus* (Cangrejo herradura). El *Limulus* se desarrolla en la costa oriental de América del Norte, desde Nueva Escocia a Yucatán y en aguas superficiales de Asia, desde Japón a la India, incluyendo Filipinas y Borneo, y se explota a

escala comercial en Florida (18).

En 1,956 Bang observó una coagulación intravascular en *Limulus* inyectados con endotoxinas producidas por infecciones con bacterias gram negativo. Años después, Bang y Levin revelaron que esta coagulación era el resultado una proteína de coagulación que se encontraba en los amebocitos circulantes, que frente a trazas de endotoxinas formaba un coágulo (19), y sugirieron su empleo potencial para la prueba de pirógenos. Posteriormente Bang y Levin desarrollaron un anticoagulante apropiado para la sangre del *Limulus* y prepararon un lisado de amebocitos lavados, como un indicador extremadamente sensible a la presencia de endotoxina (16, 17). Solum y Young purificaron y caracterizaron la proteína coaguladora del LAL y demostraron que la reacción con la endotoxina es enzimática (16).

La prueba LAL está reconocida por la USP XXII para la detección y estimación cuantitativa de endotoxinas bacterianas en productos de uso parenteral (11, 16, 17). Recientemente fue aprobada por la USP XXIII como la prueba oficial para la detección de pirógenos en radiofármacos, especialmente para los radiofármacos de corto periodo de semidesintegración.

3.2.4.3.1 PRINCIPIO DE LA REACCION



La endotoxina bacteriana gram negativo cataliza la activación de la proenzima en el LAL (13, 16, 17). El rango inicial de activación es determinado por la concentración de endotoxina presente. La enzima activada (coagulasa) hidroliza los enlaces específicos dentro de la proteína

coaguladora (coagulógeno) también presente en el LAL. Una vez hidrolisada, la coagulina resultante se asocia por sí misma y forma un coágulo gelatinoso (17).

Levin y Bang propusieron inicialmente un modelo simple donde la endotoxina activa una enzima que actúa sobre un sustrato y se obtiene como resultado la proteína de coagulación (Fig. 1).

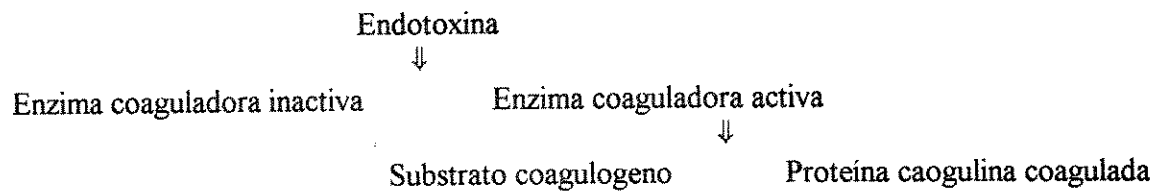


Figura 1
Modelo del mecanismo del coagulación del LAL (Modificado por Levin, 1,979) (16).

Existe un modelo más complejo del mecanismo de coagulación de la prueba LAL, en el cual hay una amplificación en los pasos intermedios de la coagulación de la proteína (Fig. 2).

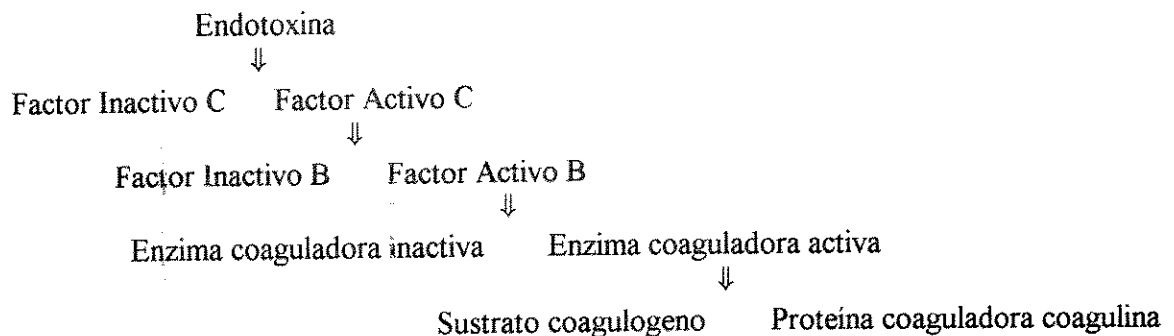


Figura 2
Modelo del mecanismo de coagulación del LAL (Nakamura et al., 1,983) (16).

Además existe una vía alterna en la que actúa un factor G, el cual va a producir la desintegración del coagulógeno produciendo la formación del gel matriz tridimensional, que al inicio es muy frágil e inestable (Fig. 3).

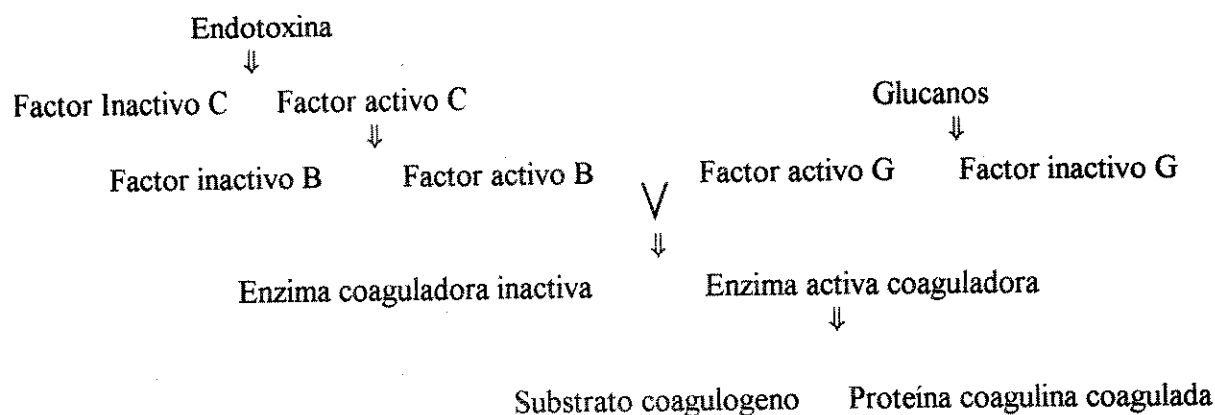


Figura 3
Modelo del mecanismo de coagulación del LAL con una vía alterna de activación
(Modificada por Morita et al., 1,981) (16).

3.2.4.3.2 PREPARACION DEL LISADO

Se extrae sangre de los animales por punción del corazón y luego se devuelven al mar. Un *Limulus* de 30 a 35 cm proporciona de 150 a 175 ml de sangre azul clara, que se recoge en una solución de N-etilmaleimida que se vuelve isotónica y libre de pirógenos. Se dejan sedimentar los amebocitos, lo que demora de 1 a 4 horas y se separan del plasma. Se lavan tres veces con la solución mencionada y otra vez más con agua de mar apirógena. Se tratan entonces con 7.5 ml de agua destilada por cada 100 ml de sangre para lisar los amebocitos. Los restos celulares se separan por centrifugación a 2,500 rpm durante 15 min. El preparado mantenido a 4°C conserva su actividad durante 4 semanas por lo menos (18, 19).

Antes de uso, el lisado se diluye con igual volumen de un buffer de fosfato de pH 7.2. A un décimo de ml o más de la solución en ensayo se adiciona 0.9 ml del lisado diluido de amebocitos y se incuba a 37°C. Si la solución contiene endotoxina, dentro de la hora se producirá un gel o aumento de la viscosidad de la mezcla, que se advertirá por no desplazarse fluidamente al inclinar el tubo 45° (10, 19). La velocidad de reacción entre el lisado y la endotoxina depende de la concentración de ésta, de la temperatura y del pH, debido a que se produce una reacción enzimática. La reacción es de gran sensibilidad (10, 14).

3.2.4.3.3 DIFERENTES METODOS PARA LA REALIZACION DE LA PRUEBA LAL

3.2.4.3.3.1 METODO GEL COAGULO:

Es el método más simple y el más ampliamente utilizado, el cual imita al cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) en la naturaleza. Es el método oficialmente registrado en la USP XXIII para determinar pirógenos en los radiofármacos (16).

El reactivo LAL está marcado por el fabricante con una sensibilidad de endotoxina, la cual va a producir la coagulación del reactivo. El punto final es la dilución más grande que da como resultado una prueba positiva: formación de un coágulo firme; el punto final debe caer dentro de un rango de 2 veces la concentración de endotoxina (16). Es una prueba de positivo o negativo. Se puede utilizar una sola dilución de la muestra a analizar para ver si se acepta o rechaza el producto a una concentración en particular. También es posible cuantificar la presencia de endotoxina en una muestra por medio de diluciones de la misma, pero no cuantifica en los intervalos entre las diluciones, por lo que la prueba se considera semicuantitativa (11). Las concentraciones son calculadas por medio de multiplicar el factor de dilución en el punto final por la sensibilidad del reactivo LAL (16).

Los resultados son reportados como un valor específico, en unidades de endotoxina por mililitro (EU/ml) (16). El error aceptado para la prueba gel coágulo es más o menos una dilución doble.

3.2.4.3.3.2 METODO TURBIDIMETRICO

En este método el desarrollo de la turbidez que acompaña la formación del coágulo se utiliza para la cuantificación de la endotoxina en la muestra. Los métodos turbidimétricos puede ser realizados como una prueba de punto final o una prueba cinética (16).

3.2.4.3.3.2.1 METODO DE PUNTO FINAL

Es un método simple, en el cual se utilizan diferentes concentraciones de endotoxinas que dan como resultado diferentes grados de turbidez. Se traza una línea estándar para la turbidez (densidad óptica) de los estándares de endotoxina medidos en un espectrofotómetro o en un lector de platos después del período determinado de incubación.

Las concentraciones de endotoxinas desconocidas pueden ser determinadas dentro de la línea estándar (16). No se utiliza frecuentemente, ya que el problema fundamental de este método es que la reacción no se puede detener completamente para leer la turbidez y como el tiempo para la lectura es crítico, las muestras no pueden ser releídas después de cualquier retraso. Además, debido a que la turbidez incrementa rápidamente después de un retraso inicial y se nivela a una turbidez final que no está relacionada con la concentración de endotoxina, hay un rango muy estrecho de concentración de endotoxina que puede ser cuantificado para cualquier período de incubación dado (14).

3.2.4.3.3.2 METODO TURBIDIMETRICO CINETICO

Este método requiere que las lecturas de turbidez/densidad óptica sean determinadas en intervalos regulares y frecuentes durante la incubación de la mezcla de reacción, por lo que es indispensable un equipo automatizado y computarizado, permitiendo que la cinética del desarrollo de turbidez sea ploteado. Determina, ya sea la proporción del desarrollo de turbidez o comúnmente el tiempo requerido para alcanzar una determinada densidad óptica (nivel de turbidez). A mayor concentración de endotoxina, mayor la relación o menor el tiempo para alcanzar el umbral de la densidad óptica. Se traza una curva estándar y se utiliza para la cuantificación de concentraciones de endotoxinas desconocidas (14).

El método turbidimétrico cinético tiene un amplio rango de respuesta (no un punto final arreglado). No presenta los mismos problemas de ensayo de punto final. El rango para las pruebas comercialmente disponibles es de 0.001 EU/ml hasta 100 EU/ml, un rango de 6 log (16). Debido a que no se debe formar un gel firme, el método es mucho más sensible que el método de gel coágulo (0.001 vs 0.03 EU/ml) (14).

3.2.4.3.3.3 METODO CROMOGENICO

En este método un sustrato sintético es añadido a la mezcla de reacción. El sustrato tiene una región terminal con la misma secuencia de aminoácidos que la proteína coaguladora del LAL (coagulígeno). A éste está unido un cromóforo, el cual es incoloro cuando está unido al resto del sustrato. La enzima coaguladora en el reactivo LAL, activada por la endotoxina, rompe el sustrato cromogénico (en adición al rompimiento del sustrato coagulígeno natural). Cuando es separado, el cromóforo terminal produce un color amarillo. A mayor concentración de endotoxina

en la muestra, mayor cantidad de enzima coaguladora activada, mayor cantidad de cromóforo roto y mayor intensidad de color amarillo producido. La intensidad del color amarillo se lee en un lector de platos o en un espectrofotómetro (14, 16).

3.2.4.3.3.1 METODO DE PUNTO FINAL

Después de la incubación de la muestra, el reactivo LAL y el substrato cromogénico, la prueba es detenida por la adición de ácido acético y leída en un espectrofotómetro o un lector de platos. A mayor coloración amarilla producida mayor concentración de endotoxina en la muestra original.

La principal ventaja sobre el método turbidimétrico de punto final es que la reacción es detenida y el desarrollo de color es arreglado, mientras que el desarrollo de turbidez prácticamente no puede ser detenida sin cambiar la turbidez. El rango de concentraciones de endotoxina que puede ser detectado en un período determinado de incubación es el mismo que el del método turbidimétrico de punto final (14).

3.2.4.3.3.2 METODO CROMOGENICO CINETICO

Este método evita las desventajas presentadas en el método turbidimétrico de punto final (solo un rango estrecho de concentración puede ser leído a un tiempo de incubación determinado) (16). El principio es muy similar al del método turbidimétrico cinético excepto, que el desarrollo del color amarillo es monitoreado, al contrario del desarrollo de la turbidez. El límite de detección de este método es aproximadamente de 0.005 EU/ml (14).

3.2.4.3.4 PRODUCTOS DE INHIBICION

La prueba LAL puede presentar algunos productos de inhibición que afecten su desarrollo. Como la reacción del lisado de amebocitos de *Limulus* es mediada enzimáticamente, se requiere de un rango de pH óptimo y de sales específicas y cationes divalentes (17).

Ocasionalmente las muestras de la prueba pueden alterar esas condiciones óptimas a tal punto que el lisado puede ser insensible a la endotoxina presente. Los productos que son extremadamente ácidos o básicos requieren un ajuste de pH a neutralidad, así como de dilución para superar completamente el producto de inhibición (12).

Algunos compuestos pueden inducir o dar un resultado falso positivo o falso negativo, por ejemplo: productos sanguíneos, polinucleótidos, soluciones que contienen metales pesados o surfactantes, compuestos con fuerza iónica alta u osmolaridad alta o algunos agentes acomplejantes (12, 17, 20, 21). Friberger, Knos y Mellstam han reportado que han superado la inhibición no específica en productos sanguíneos por medio de la dilución de la muestra 1:10 en agua destilada y apirogénica y calentando a 70°C durante 5 minutos (14, 17).

Los resultados negativos con muestras que inhiben a la prueba del LAL no indican necesariamente la ausencia de endotoxinas (16,17).

Inicialmente, con cada muestra se debe conocer si está presenta algún producto de inhibición de la formación del coágulo de la prueba (16). Para ello se preparan series de diluciones dobles de endotoxinas con agua destilada estéril y libre de pirógenos y series de diluciones similares de endotoxina, utilizando la muestra como diluyente cada vez más diluidas (incrementadas) del producto que contiene endotoxina igual en concentración al doble de la sensibilidad del lisado. Cada serie se ensaya simultáneamente utilizando procedimientos estándares (17). Al final del período de

incubación, se deben registrar los resultados positivos y negativos, calcular la media geométrica del punto final para ambas series de diluciones de endotoxinas. Los resultados positivos indican cuando el producto de inhibición ha sido superado. Se conocen como pruebas preliminares y son descritas con mayor detalle en este estudio (11, 14 - 17).

Uno de los medios más fáciles para superar los productos de inhibición es a través de la dilución. Este factor inicial de dilución se debe tomar en cuenta al calcular la concentración total de endotoxina en la muestra analizada (17).

3.2.4.3.5 PROBLEMAS Y LIMITACIONES DE LA PRUEBA LAL

Entre los problemas que presenta esta prueba y que no se han podido resolver están:

- La falta de un estándar internacional de lisado y de un estándar de endotoxina de referencia internacional para la prueba (15, 14, 22).
- Además también falta de estandarización internacional del procedimiento para la detección de endotoxina por el LAL (12).

Las limitaciones de esta prueba son: la baja estabilidad (sensibilidad variable) del lisado de amebocitos de *Limulus*; debe controlarse el pH de los radiofármacos aunque esto también es necesario en la Prueba de Reacción Térmica en Conejos (12, 16); no puede ser utilizado para ciertos radiofármacos o preparaciones que contengan inhibidores de la reacción de gelación (3, 16).

3.2.4.3.6 VENTAJAS

Esta prueba es más rápida, más sensible y más barata que la Prueba de Reacción Térmica en Conejos, además requiere volúmenes más pequeños de muestra (1, 2, 10, 23).

La reacción del *Limulus* es más sensible a las endotoxinas presentes en una mayor variedad de microorganismos gram negativo (ver Anexo 13.3) y extractos de algunas bacterias gram positivo, levaduras y mohos (1, 10, 17).

Se maneja fácilmente en laboratorios de hospitales o en unidades pequeñas de producción, debido a que no se requieren animales de laboratorio y no presenta las desventajas de las pruebas in vivo (1, 10). Además no existen problemas de desecho de desperdicios y los peligros de radiación son menores en el caso de LAL (15).

3.2.4.3.7 REQUERIMIENTOS DE LA PRUEBA

- 1° Confirmación de la sensibilidad de la etiqueta y certificación del técnico, en otras palabras, asegurarse que la prueba está funcionando y que el técnico la puede hacer.
- 2° Determinación de la potencia del CSE, lo que no es necesario si se obtiene un certificado de análisis.
- 3° Pruebas de validación (inhibición o realce) para asegurarnos que la prueba funciona con nuestro producto.
- 4° Pruebas rutinarias y repetición de pruebas.

4. JUSTIFICACION

En el Laboratorio de Radiofarmacia Centralizada de la Dirección General de Energía Nuclear (DGEN) se producen 14 diferentes radiofármacos liofilizados para ser marcados con ^{99m}Tc Tecnecio, de los cuales un 95% se administran por vía intravenosa, por lo tanto es de suma importancia garantizar el control de calidad de los mismos.

Por esta razón se realiza un estricto control de calidad, el cual incluye la evaluación de las características organolépticas, la realización de pruebas fisicoquímicas (tamaño y número de las partículas que lo forman y su pH), radioquímicas (determinación de la pureza química y de la actividad del radionucleido) y microbiológicas (esterilidad, toxicidad y ausencia de pirógenos).

Actualmente, para determinar la presencia de pirógenos se realiza la Prueba de Reacción Térmica en Conejos, siendo una prueba muy engorrosa, poco sensible e inespecífica, tardada y además produce muchos resultados falsos positivos, por lo que se pretende obtener una alternativa con la Prueba de Lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL), prueba recomendada por la USP XXIII para determinar pirógenos en radiofármacos.

La prueba LAL es una prueba más rápida y sensible que la prueba de Reacción Térmica en Conejos, es más efectiva para detectar endotoxinas de una gran variedad de microorganismos, es más fácil de llevar a cabo en los laboratorios de hospitales o en unidades pequeñas de producción y además, no presenta las desventajas de las pruebas *in vivo*. Pero también presenta algunos problemas con muestras que contienen ciertos compuestos como productos sanguíneos, polinucleótidos, proteínicos, soluciones de metales pesados o surfactantes que interfieren en la prueba.

Esta prueba es esencial para el control de radiofármacos utilizados en centellografía y necesaria para los radiofármacos de corto período de semidesintegración de los radionucleidos ya que se lleva a cabo en menor tiempo, además necesita menor volumen de muestra y reduce la exposición del personal a la radiación y a los desechos radioactivos.

Por estas razones se realizó este estudio preliminar para evaluar la interferencia de los compuestos proteicos en los radiofármacos producidos en el Laboratorio de Radiofarmacia Centralizada con la Prueba de Lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL), antes de implementarla como una prueba de rutina en el programa de control de calidad en esta institución.

Para evaluar la interferencia de los compuestos proteicos en los radiofármacos se eligió al Macroagregados de Albúmina (MAA) por ser el radiofármaco que más material proteico contiene y como referencia se utilizó el Metilendifosfonato (MDP), ya que es el radiofármaco más utilizado en centellografía ósea en los centros de medicina nuclear del país; asumiendo que no presentaba ningún compuesto que pudiera interferir con la prueba LAL; además no se han reportado estudios con este radiofármaco sino solamente con pyro y trifosfatos, radiofármacos que eran utilizados anteriormente y que en la actualidad han sido reemplazados por el MDP.

5. OBJETIVOS

5.1 GENERAL

Evaluar la interferencia en la Prueba de Lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL), de los compuestos proteicos en los MAA, utilizando como control MDP.

5.2 ESPECIFICOS

- 5.2.1 Determinar la sensibilidad de la prueba LAL en radiofármacos liofilizados para marcar con $^{99m}\text{Tecnecio}$ (MAA y MDP).
- 5.2.2 Determinar la presencia de pirógenos en Macroagregados de Albúmina (MAA), radiofármaco que contiene proteínas en su formulación y en Metilendifosfonato (MDP), radiofármaco que no contiene ningún compuesto interferente con esta prueba, por medio de la Prueba de Lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL).
- 5.2.3 Proponer los protocolos de trabajo para implementar la prueba LAL en el Laboratorio de Radiofarmacia Centralizada de la Dirección General de Energía Nuclear (DGEN).

6. HIPOTESIS

Los radiofármacos con compuestos protéicos interfieren en la prueba de Lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL).

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 UNIVERSO DE TRABAJO

Dos radiofármacos diferentes de los catorce producidos en el Laboratorio de Radiofarmacia Centralizada de la Dirección General de Energía Nuclear (DGEN).

7.2 RECURSOS

7.2.1 RECURSOS HUMANOS

- Investigadora: Claudia Fabiola Aldana Martínez.
- Asesora: Licda. Diana Freire de Nave.
- Personal profesional y técnico del Laboratorio de Radiofarmacia Centralizada de la D.G.E.N. del Ministerio de Energía y Minas.

7.2.2 RECURSOS INSTITUCIONALES

- Laboratorio de Farmacia Centralizada de la D.G.E.N. del Ministerio de Energía y Minas.
- Instituto de Investigaciones de Química Biológica (IIQB) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

7.2.3 RECURSOS MATERIALES

7.2.3.1 EQUIPO

- Campana de flujo laminar.
- Baño María (37 ± 1 °C).

- Agitador Vortex.
- Potenciómetro.
- Refrigerador.
- Termómetros.
- Computadora.
- Cronómetro.
- Autoclave.
- Horno.

7.2.3.2 REACTIVOS

- Reactivos LAL de la casa Comercial Associates of Cape Cod, Inc., que contiene:
 - * Pyrotell, 5 ml de Lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) con una sensibilidad de 0.25 EU/ml, para el método gel coágulo.
 - * Control de estándar de endotoxina de *E. coli* 0113:H10, 0.5 µg/vial (CSE).
 - * Agua reactiva LAL (LWR), estéril y libre de pirógenos.
- Radiofármacos liofilizados.

7.2.3.3 MATERIALES

- Tubos de reacción de cal sodada Tipo III de 10 X 75 mm. estériles y libres de pirógenos (Pyrotubes™).
- Tubos de dilución de vidrio de 16 X 100 mm. estériles y libres de pirógenos.
- Micropipetas automáticas de 200 y 100 microlitros.

- Pipetas de 1.0, 5.0 y 10.0 ml estériles y libres de pirógenos.
- Puntas para micropipetas estériles y libres de pirógenos.
- Papel bond para computadora.
- Papel de aluminio.
- Discos de computadora.
- Cinta de computadora.
- Papel mayordomo.
- Cinta testigo.
- Etiquetas.
- Gradillas.
- Cuaderno.

7.3 METODOLOGIA: PRUEBA DE LISADO DE AMEBOCITOS DE *LIMULUS* (LAL)

METODO GEL COAGULO

7.3.1 PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Se utilizaron 9 muestras de radiofármacos para marcar con ^{99m}Tecnecio producidos en el Laboratorio de Radiofarmacia Centralizada de la DGEN, 5 de estas muestras fueron de MAA y las otras 4 muestras fueron de MDP.

A los dos radiofármacos se les determinó la presencia de pirógenos por medio de la Prueba de Lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL); para ello, primero se procedió a realizar las pruebas preliminares para determinar si algún compuesto utilizado en la formulación del radiofármaco interfería con la prueba y para determinar la dilución a la que se sobrepasa la interferencia para poder

validar la prueba. Posteriormente se procedió a validar la prueba con cada uno de los radiofármacos, cada uno a la dilución determinada en el procedimiento anterior y simultáneamente se realizaron pruebas de rutina. Las muestras se reconstituyeron con 1 ml de agua reactiva LAL, las cuales estuvieron listas para ser analizadas.

Los requisitos necesarios para realizar la prueba LAL son:

- Todos los materiales que van a estar en contacto con la muestra y reactivos deben ser estériles y libres de pirógenos. Esto se logró mediante el buen lavado del material con jabón que no dejaba residuos y agua desmineralizada, fue secado a temperatura ambiente con el material en posición invertida para evitar que quedaran depósitos de agua en la superficie del material, autoclaveado y por último fue sometido a calor seco a 180 °C por 4 horas; este material se envolvió individualmente en papel de aluminio para evitar contaminación posterior. Sin embargo, los materiales se pusieron a prueba antes de su uso regular y además se llevó a cabo una técnica cuidadosa para evitar la contaminación.
- Las muestras deben estar en un rango óptimo de pH entre 6.0 á 7.5, las que se encontraban fuera de este rango fue necesario ajustarles el pH con ácido o base libre de pirógenos (1, 5, 10, 17).
- Las muestras que no se analizaron inmediatamente, pero fueron trabajadas a las 24 horas debían ser guardadas en refrigeración a 2 á 8°C y las que se iban a trabajar por mucho más tiempo debían ser congeladas.
- Es necesario utilizar tubos de cal sodada ya que tubos de otro material no cumplen con los requisitos necesarios, induciendo falsos resultados, falsos positivos debido a que la endotoxina se deposita en la superficie porosa de los tubos (no de cal sodada) y falsos negativos ya que otro material diferente a la cal sodada absorbe la endotoxina que pueda estar presente en la muestra.

7.3.2 PREPARACION DE LOS REACTIVOS

7.3.2.1 PYROTELL: LISADO DE AMEBOCITOS DE *LIMULUS* (LAL), DE SENSIBILIDAD 0.25 U/ML, PARA EL METODO GEL COAGULO

Cada frasco de reactivo contenía el lisado proveniente de los amebocitos que circulan en el cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) estandarizado para detectar la concentración de endotoxina marcada (en EU/ml) por la FDA en el estándar de referencia de la endotoxina. Además contenía un buffer con cationes mono y divalentes.

El lisado fué liofilizado y sellado en vacío y rehidratado hasta el momento en que se utilizó. Este lisado liofilizado se guardó bajo refrigeración, de 2 a 8 °C. Además se tuvo el cuidado de evitar la exposición del lisado a temperaturas mayores de 25 °C, pero si accidentalmente el lisado ha sido expuesto durante periodos largos a temperaturas mayores de 25 °C o a la luz brillante y se ha tornado amarillo, debe ser descartado.

Para rehidratar el lisado liofilizado se sacó de la refrigeradora, se golpeó suavemente el frasco de LAL para que todo el liofilizado cayera al fondo, se removió el sello de metal del frasco de LAL de 5 ml, cuidadosa y lentamente, ya que el lisado estaba bajo vacío.

Posteriormente se removió el tapón de hule con una pipeta de vidrio libre de pirógenos y se agregó 5 ml de agua LWR para reconstituir el lisado, se selló el frasco de LAL con un pedazo de parafilm, utilizando para ello el lado que tiene contacto con el papel. No se mezcló el lisado en el agitador Vortex debido a que el LAL entra en solución por sí mismo en un par de minutos y la agitación fuerte puede alterar las características del lisado.

7.3.2.2 CONTROL ESTANDAR DE ENDOTOXINA DE *E. coli* 0113:H10 (CSE), 0.5 µg/vial

Cada frasco contenía 0.5 µg. Se removió el sello de metal del frasco de CSE, cuidadosa y lentamente, ya que la endotoxina estaba bajo vacío, se removió el tapón de hule con una pipeta de vidrio libre de pirógenos y se agregó 5 ml de LWR a temperatura ambiente. Se selló el frasco de CSE con un pedazo de parafilm y se mezcló en el agitador tipo Vortex, a máxima velocidad, por un minuto. Se dejó reposar por diez minutos a temperatura ambiente y se repitieron los pasos de mezclar y reposar durante una hora (aproximadamente 6 ciclos).

Una vez reconstituido, el CSE es estable por un mes a temperatura de 2 a 8 °C según el fabricante del reactivo, Associates of Cape Cod. Inc., y según USP XXIII, 14 días. Por lo que después de haber sido reconstituido el CSE, una parte fue utilizada inmediatamente para hacer las diluciones para la curva estándar de endotoxina y la otra parte se guardó en refrigeración.

Antes de ser reutilizado el CSE refrigerado, se llevó la solución a temperatura ambiente y se agitó vigorosamente durante 15 minutos, para evitar que la endotoxina se adhiriera al recipiente.

Un frasco de CSE contenía aproximadamente 1,000 EU/ml de endotoxina liofilizada. La concentración real de cada frasco fue determinada por el valor señalado en la etiqueta.

7.3.3 PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA LAL

7.3.3.1 CONFIRMACION DE LA SENSIBILIDAD DEL LISADO MARCADA EN LA ETIQUETA O CURVA ESTANDAR DE ENDOTOXINA

Por las especificaciones de la USP BET y de la Associated of Cape Cod. Inc., se verificó la sensibilidad (λ) del lisado, para lo cual se utilizó un frasco de LAL y una serie de concentraciones de endotoxina que abarcó la sensibilidad de la etiqueta (2 λ , λ , 0.5 λ , 0.25 λ), cuatro veces cada una.

En casos en los cuales fue necesario calcular la sensibilidad del lisado por medio de la media geométrica, los puntos finales de la media geométrica debían caer dentro de un factor de 2 de la sensibilidad de la etiqueta, es decir entre 2λ y 0.5λ , cuando los puntos finales no caían dentro de este rango era posible confirmar la sensibilidad de LAL (Anexo 13.4).

Otra opción válida para la confirmación de la sensibilidad del lisado marcada en la etiqueta en el método gel coágulo es la consulta del Certificado de Análisis, el cual en este estudio se obtuvo en la Associated of Cape Cod. Inc. El Certificado de Análisis es específico para la combinación de los lotes de CSE y de LAL que se utilizaron en esta prueba (Anexo 13.5) con lo cual sólo fue necesario correr la curva estandar de endotoxina (en duplicado, no en cuadruplicado como refiere la USP XXIII) con cada ensayo que se realizó para confirmar que la prueba sí estaba funcionando y para verificar que los materiales utilizados estaban libres de pirógenos. Este procedimiento se detalla en la sección Anexo 13.10 del Protocolo de trabajo de la prueba LAL: Método gel coágulo para la determinación de endotoxinas en los radiofármacos para marcar con ^{99m}Tc Macroagregados de Albúmina (MAA) y Metilendifosfonato (MDP).

7.3.3.2 PRUEBAS PRELIMINARES

Primero se aseguró que el pH de la muestra con el reactivo LAL (una parte del radiofármaco: una parte LAL) estuviera entre 6.0 y 8.0 (USP o Associates of Cape Cod. Inc.). El pH importante es el de la mezcla de reacción ya que LAL tiene cierta capacidad de regulador y aunque la muestra sola no tenga un pH entre 6.0 y 8.0, puede que la mezcla si se encuentre entre los límites requeridos.

En las pruebas preliminares se analizaron series de diluciones del producto con y sin la adición de endotoxina. A las diluciones a las que se les adicionó endotoxina se les agregó a la

muestra un pequeño volumen de endotoxina concentrada que dió una concentración final de 2λ (2 X la sensibilidad del lisado). Esto se realizó con la finalidad de determinar si el producto interfería con la prueba LAL, ya que una concentración de 2λ debe dar una reacción positiva siempre, a menos que el producto este interfiriendo con la reacción.

Si el producto interfiere con la prueba LAL, se diluye hasta la dilución a la cual se ha sobrepasado esta interferencia. Este procedimiento se detalla en la sección Anexo 13.10 del Protocolo de trabajo de la prueba LAL: Método gel coágulo, para la determinación de endotoxinas en los radiofármacos para marcar con ^{99m}Tc Macroagregados de Albúmina (MAA) y Metilendifosfonato (MDP).

7.3.3.3 INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA

La lectura de esta prueba se realizó inmediatamente después del período de incubación de 60 ± 2 minutos. Este período de incubación se llevó a cabo en un baño María con circulación continua, donde las reacciones no fueron expuestas a ninguna vibración; esto se logró colocando únicamente el baño de María en la mesa de trabajo, lejos del agitador tipo vortex y de cualquier otro equipo que pudiera producir vibraciones que interfirieran con la prueba LAL; además, durante todas las pruebas realizadas se mantuvo constante el agua del baño María a un mismo nivel, el cual debía cubrir el volumen total de los reactivos más la mitad del mismo en el tubo de reacción para lograr una incubación homogénea.

La forma correcta de leer la reacción fue invirtiendo el tubo 180° para ver si se formó el coágulo. El movimiento de la mano al invertir el tubo debe ser terso y sin pausas. Además se debió tener cuidado de no pegarle al tubo con alguna superficie ya que el coágulo que se forma es muy

delicado y puede romperse fácilmente. Si un coágulo parecía haberse formado, pero al invertir el tubo se deslizaba por el lado del tubo o simplemente hubo aumento de la viscosidad de la solución, se tomó la reacción como negativa, y solamente si el coágulo se mantenía firme en el fondo del tubo al invertirlo se tomó como una reacción positiva.

Para que la prueba fuera válida los controles negativos debían dar un resultado negativo y de no ser así, se debía obtener un punto final (concentración más baja que de un coágulo) dentro de una dilución doble de la sensibilidad (λ) del lisado (0.5λ , λ , ó 2λ), cualquiera de estos tres resultados era aceptable. Sin embargo, las concentraciones 2λ debían dar positivo siempre al igual que las concentraciones 0.25λ siempre debían dar negativo.

Un resultado diferente de los controles invalida la prueba y puede ser indicativo de: a) contaminación, b) diluciones de endotoxina estándar no realizadas en la forma apropiada, c) incubación no realizada a la temperatura debida, d) incubación no realizada en el tiempo debido, e) resultados leídos en forma inapropiada.

7.3.3.4 PRUEBAS DE VALIDACION DEL PRODUCTO

La validación del producto consiste en confirmar en duplicado la sensibilidad del lisado en agua y en una concentración fija de producto (USP y FDA). El objetivo de estas pruebas de validación es demostrar que la sensibilidad de la prueba (el punto final) no se ve afectado por la presencia del producto o de algún compuesto en particular. Asimismo determinamos el nivel de interferencia de la prueba LAL con cada producto, antes de utilizarlo para la determinación del contenido de endotoxina presente en el mismo.

La Guía de Validación de la prueba Lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL) sugiere que se

realicen las pruebas con tres lotes diferentes del mismo producto para poder validar la prueba LAL con dicho producto y además especifica el número de muestras que se debe analizar por lote. Los puntos finales de las series de las pruebas de validación debían estar dentro de la variabilidad de la prueba (una dilución doble de cada lado de la sensibilidad) y no deben variar entre sí por más de una dilución doble. La USP requiere que se hagan dos réplicas de la serie en agua y cuatro réplicas de la serie en producto. Se incluyen cuatro réplicas de un control negativo de producto (la concentración de validación de producto con LAL sin adición de endotoxina).

Estas pruebas de validación se realizaron con dos réplicas de la serie en agua, es decir la concentración del estándar en LWR, y cuatro réplicas de la serie en el producto, a la concentración del estándar en la muestra del producto diluido a una concentración X, dilución que fue determinada durante la realización de las pruebas preliminares, en la cual la concentración del producto fue constante mientras que la concentración de la endotoxina fue disminuyendo; este procedimiento se detalla en la sección Anexo 13.10 del Protocolo de trabajo de la prueba LAL: Método gel coágulo para la determinación de endotoxinas en los radiofármacos para marcar con ^{99m}Tecnecio Macroagregados de Albúmina (MAA) y Metilendifosfonato (MDP). Si se confirma la sensibilidad en las pruebas de validación utilizando como mínimo 2 lotes diferentes del producto, la prueba habrá sido validada.

REVALIDACION

Para revalidar la prueba LAL en un producto determinado, según la Guía de Validación de la Prueba Lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL), se requiere:

- a) La revalidación con 3 lotes de producto si se cambia el método de LAL.

b) La revalidación con un lote de producto si se cambia el fabricante de LAL.

Si se cambia la formulación o el proceso de manufactura del producto no es necesario revalidar la prueba; el control positivo se encarga de informar si la prueba se verá afectada; solamente si hay un cambio muy drástico se recomienda revalidar, para confirmar que el nivel de validación no ha cambiado.

7.3.3.5 PRUEBAS DE RUTINA

En las pruebas de rutina deben analizarse todos los lotes. Se analizan por lo menos 3 muestras, del principio, mitad, y final de la producción de cada lote.

El producto se analiza a la dilución a la cual fue validado. Se debe incluir la curva estándar de endotoxina con cada ensayo realizado, y la muestra del producto diluido (a la dilución a la cual fue validada) en duplicado, con y sin la adición de endotoxina para dar una concentración final de 2λ . El volumen de endotoxina agregado a la muestra no debe sobrepasarse del 10%, ya que no se debe diluir significativamente la muestra.

Para que el producto pase la prueba, la muestra del producto sin endotoxina debe resultar negativa, y la muestra con la adición de endotoxina debe resultar positiva (control positivo de producto o control de inhibición). Además se deben incluir controles negativos en duplicado con todas las pruebas. Si se omite la curva estándar de endotoxina, se deben incluir controles positivos (2λ de endotoxina en agua) en duplicado con la prueba.

La prueba es válida únicamente si los controles negativos son negativos, y si la sensibilidad del lisado se confirma en la curva estándar de endotoxina (o en la ausencia de esta curva, los controles positivos son positivos); este procedimiento se detalla en la sección Anexo 13.10 del

Protocolo de trabajo de la prueba LAL: Método gel coágulo para la determinación de endotoxinas en los radiofármacos para marcar con ^{99m}Tc Tecnecio Macroagregados de Albúmina (MAA) y Metilendifosfonato (MDP).

7.4 DISEÑO DE LA INVESTIGACION

Del lote 16/95 de 100 muestras del radiofármaco liofilizado Macroagregados de albúmina (MAA) se seleccionaron al azar 5 muestras: 3 frascos de MAA para realizar las pruebas preliminares y 2 frascos de MAA para realizar la validación de la prueba LAL. Asimismo, simultáneamente, a 3 de estas muestras se les determinó la presencia de pirógenos por medio de la prueba LAL.

Del lote 15/95 de 100 muestras del radiofármaco liofilizado Metilendifosfonato (MDP) se seleccionó al azar 4 muestras: 3 frascos de MDP para realizar las pruebas preliminares y 1 frasco de MDP para realizar la validación de la prueba LAL. Asimismo, simultáneamente, a 3 de estas muestras se les determinó la presencia de pirógenos por medio de la prueba LAL.

Este muestreo se realizó por conveniencia ya que el limitante es el elevado precio de los reactivos de la prueba de Lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL).

A este trabajo de investigación se le aplicó un análisis descriptivo de los resultados obtenidos.

8. RESULTADOS

La lectura de la prueba se realizó inmediatamente después del período de incubación (60 ± 2 minutos), invirtiendo el tubo de reacción 180° para determinar si se formaba el coágulo. Si no se formó el coágulo o simplemente aumentó la turbidez pareciendo que se había formado, pero al invertir el tubo el coágulo se deslizó por un lado, se tomó como una reacción negativa. Una reacción es positiva únicamente si se forma el coágulo y se mantiene firme en el fondo del tubo al invertirlo.

Todas las tablas de resultados, de pruebas preliminares, validación y rutina, van acompañadas de la curva estándar de endotoxina, que se requiere con cada ensayo para validar cada prueba.

Se realizaron 3 repeticiones de las pruebas preliminares con cada uno de los radiofármacos, macroagregados de albúmina (MAA) y metilendifosfonato (MDP), y de acuerdo a los resultados obtenidos se determinó:

- La primera prueba preliminar realizada con los MAA no fue válida como se observa en la Tabla No.1 del Anexo 13.6, ya que en ella no se confirmó la sensibilidad del lisado.
- La segunda prueba preliminar realizada con los MAA fue válida como se observa en la Tabla No.2 del Anexo 13.6 debido a que se confirmó la sensibilidad del lisado, los puntos finales obtenidos fueron de $0.25 (\lambda)$, lográndose determinar que el radiofármaco MAA no interfería con la prueba LAL, como se observa en el área "B" de la tabla, es decir, que los compuestos de seroalbúmina humana a una concentración de 2mg/dl , utilizados para la formulación de los MAA, no interfirieron con esta prueba; además se determinó que este radiofármaco contenía endotoxina, como se observa en el área "A" en la cual hubo formación del coágulo, pero como los resultados obtenidos en las réplicas no fueron reproducibles fue necesario volver a correr la prueba.

- La tercera prueba preliminar realizada con los MAA fue válida, como se observa en la Tabla No.3 del Anexo 13.6, y se determinó que este radiofármaco contiene endotoxina hasta una dilución de 1:4 como se observa en el area "A", ($4 \times 0.25 \text{ EU/ml} = 1 \text{ EU/ml}$, hay que corregir por la dilución). Además se determinó que para validar la prueba LAL con los MAA es necesario realizar una dilución, por lo hay que validar la prueba a una dilución de por lo menos 1:16 por el error de la prueba o bien buscar un lote de este radiofármaco que contenga menos contaminación.

- La primera prueba preliminar realizada con el MDP no fue válida como se observa en la Tabla No.4 del Anexo 13.6, ya que con los resultados obtenidos no se pudo confirmar la sensibilidad del lisado, estos resultados se obtuvieron debido a que la temperatura del Baño María no fue constante a causa de fluctuaciones en la corriente eléctrica.

- La segunda prueba preliminar realizada con el MDP fue válida, como se observa en la Tabla No.5 del Anexo 13.6, pero como se utilizó un lisado que fue reconstituido una semana antes y otro reconstituido en el momento, los resultados obtenidos no fueron válidos.

- La tercera prueba preliminar realizada con el MDP fue válida, como se observa en la Tabla No.6 del Anexo 13.6, con la cual se pudo determinar que este radiofármaco sí interfiere con la prueba LAL hasta una dilución 1:2; esta interferencia se logra sobrepasar en la dilución 1:4, pero debido a un error de la prueba hay que validar por lo menos a una dilución de 1:8 ($4 \times 2 = 8$, por el error de la prueba).

En base a los resultados obtenidos anteriormente de las pruebas preliminares realizadas con cada uno de los dos radiofármacos se procedió a validar la prueba LAL, estas pruebas de validación se realizaron a una dilución por lo menos 2 veces mayor que la primera dilución con la cual se logró sobrepasar la interferencia detectada. Se realizaron 2 veces las pruebas de validación con los MAA y una vez con el MDP, ya que los reactivos eran limitados.

- La primera prueba de validación de los MAA fue necesario realizarla con una dilución de por lo menos 1:16, para sobrepasar la cantidad de pirógenos presentes en cada vial, pero debido a factores externos que afectaron la prueba LAL en corrida no fue válida, ya que no se obtuvieron los resultados necesarios para la confirmación del lisado; vease la Tabla No.7 de l Anexo 13.6.
- La segunda prueba de validación de los MAA tampoco fue válida, debido a que no fue posible mantener constante la temperatura de incubación en el Baño María por lo que no se obtuvieron los resultados esperados, ver Tabla No.8 del Anexo 13.6.
- La prueba de validación del MDP fue necesario realizarla por lo menos a una dilución de 1:8 para poder sobrepasar la interferencia que presentó este radiofármaco con la prueba LAL durante la realización de las pruebas preliminares; esta prueba no fue válida ya que el lisado utilizado para esta prueba fue reconstituído una semana antes y no funcionó; a causa de esto no fue posible la validación de la prueba; ver Tabla No.9 del Anexo 13.6.

Simultáneamente a estas pruebas, preliminares y de validación, se llevaron a cabo 3 pruebas rutinarias con cada uno de los radiofármacos (MAA y MDP).

- Las pruebas rutinarias realizadas a los MAA se hicieron a una dilución de 1:16 y demostraron que este radiofármaco si pasa la prueba de apirogenicidad requerida por la USP; ver Tabla No.10 del Anexo 13.6.
- Las pruebas rutinarias realizadas al MDP se hicieron a una dilución de 1:8 y demostraron que este radiofármaco si pasa la prueba de apirogenicidad requerida por la USP; ver Tabla No.11 del Anexo 13.6.

9. DISCUSION DE RESULTADOS

La curva estándar de endotoxina es indispensable realizarla con cada corrida de la prueba, ya que sin está no se puede asegurar que la prueba haya funcionado adecuadamente y tampoco se puede concluir que los materiales utilizados estuvieran libres de pirógenos y que la endotoxina presente sea de la muestra no del material utilizado. Para que esta curva sea válida se espera obtener un resultado positivo hasta una dilución de λ (en este caso 0.25 EU/ml) y un resultado negativo a partir de 0.5λ (0.125 EU/ml) además el control negativo debe dar siempre negativo.

Según la literatura consultada, compuestos proteicos (como los productos sanguíneos), y polinucleótidos pueden interferir en la prueba LAL. Algunas de las proteínas presentes en las muestras pueden interferir en la prueba, unas desnaturalizando las proteínas de la cascada enzimática y otras rompiendo el coagulógeno e induciendo la coagulación, obteniéndose como resultado falsos negativos y positivos respectivamente. En nuestro caso, los MAA están compuestos básicamente de albúmina, una de las proteínas plasmáticas mas abundantes, en una concentración de 2 mg/dl. Según los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, a esta concentración la albúmina no presentó interferencia alguna con la prueba LAL, con lo cual no podemos descartar la posibilidad de que una concentración mayor de albúmina si interfiera. Por lo anteriormente mencionado, se descartó la hipótesis alterna, ya que nuestro compuesto proteico, albúmina a una concentración de 2 mg/dl, no interfirió con la prueba LAL.

Al analizar los resultados obtenidos durante las pruebas preliminares de los MAA, además de demostrar que este radiofármaco no interfería con la prueba LAL, se determinó que contenía endotoxina en una concentración mayor de 1 EU/ml pero menor de 2 EU/ml, la cual es una

concentración mínima de endotoxina que no afecta al producto, ya que se encuentra por debajo del rango permisible establecido por la USP, de 175 EU/ml para radiofármacos que se administran intravenosamente. Con los datos obtenidos se determinó la alta sensibilidad de esta prueba, ya que es capaz de detectar concentraciones tan lejos como 2 EU/ml valor 87.5 veces menor al límite permitido para los MAA por la USP.

Con los resultados obtenidos de las pruebas preliminares del MDP se concluye que este radiofármaco sí interfiere con la formación del coágulo en la prueba LAL hasta una dilución 1:2 del producto, logrando sobrepasar esta inhibición hasta la dilución 1:4; por ello fue necesario validar la prueba a una dilución de por lo menos 1:8 (4 X 2 por el error de la prueba). Este radiofármaco se utilizó como referencia, asumiendo que no presentaba ninguna interferencia con la prueba LAL, ya que es el radiofármaco más utilizado en centellografía ósea en los centros de medicina nuclear del país.

En este trabajo no fue posible determinar la causa exacta de la interferencia que presentó el MDP con la prueba LAL; se consultó bibliografía existente y se comprobó que este producto no presentaba en su composición compuestos como productos sanguíneos, polinucleótidos, proteínicos, soluciones de metales pesados o surfactantes que pudieran interferir en la prueba, los cuales han sido los únicos interferentes que se han reportado anteriormente.

Además, se determinó durante las pruebas preliminares que el MDP no presenta una concentración de endotoxina mayor a 1 EU/ml, pero no se puede asumir que el producto esté libre de endotoxinas por debajo de estos niveles, ya que el compuesto interfirió con la prueba LAL hasta la dilución de 1:4.

Después de realizadas las pruebas preliminares con cada uno de los radiofármacos, en las cuales

se determinó la concentración a la cual había que validar el producto, se procedió a la validación de la prueba LAL con cada radiofármaco, con una dilución por lo menos 2 veces mayor que la primera dilución a la cual se sobrepasó la interferencia, sin embargo, debido a diversos factores que afectaron la realización de estas pruebas, no fue posible obtener los resultados deseados, por lo que no fue posible validar la prueba LAL con ninguno de estos radiofármacos.

Se pudo comprobar que varios factores afectan directamente la prueba LAL, los cuales influyeron en el desarrollo de la parte práctica de este trabajo de investigación, impidiendo que se llevara a cabo en su totalidad, y por lo tanto no fue posible la validación de la prueba LAL en los radiofármacos (MDP y MAA) ni se realizaron todas las pruebas rutinarias deseadas; estos factores hicieron inválidas las pruebas y tuvieron que repetirse, lo que redujo la cantidad de reactivo disponible. Entre los factores que afectaron el desarrollo de la prueba LAL están: Cambios de temperatura debido a interrupciones y a fluctuaciones en la corriente de energía eléctrica que afectaron directamente la formación del coágulo en esta prueba; ya que desestabilizaban el equipo el cual, a pesar de ser muy preciso, no contaba con un regulador de voltaje necesario para minimizar estos cambios, lo que ocasionó cambios irregulares de temperatura de $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, como se puede observar en las tablas de resultados, que afectaron considerablemente la prueba por lo que fue necesario calibrar nuevamente el equipo. Es necesario utilizar únicamente tubos de cal sodada, ya que inicialmente para las pruebas preliminares se utilizaron tubos de borosilicato con los cuales no se obtuvieron resultados reproducibles en cada una de las corridas, a pesar de estar estériles y libres de pirógenos, debido a que la endotoxina se adhería a la pared porosa de los tubos ocasionando resultados falsos positivos incluso en los controles negativos.

Se realizaron 3 repeticiones de las pruebas de rutina con cada uno de los radiofármacos (MAA

y MDP) y con los resultados obtenidos se determinó que estos radiofármacos sí pasan la prueba de apirogenicidad, aunque los MAA presentaron una pequeña concentración de pirógenos, los niveles detectados son permitidos ya que esta concentración es tolerada por el cuerpo humano sin que su presencia provoque algún tipo de reacción adversa en el paciente.

Se efectuó un protocolo de trabajo de la prueba LAL: Método gel coágulo para poder implementarla, tanto en los radiofármacos utilizados en este trabajo de investigación como en todos los demás radiofármacos útiles en centellografía, como una prueba rutinaria para el control de calidad interno de los mismos, el cual se adjunta en el Anexo 13.10.

10. CONCLUSIONES

Se rechazó la hipótesis alterna, ya que se comprobó que la albúmina, compuesto proteico presente en los MAA, a una concentración de 2 mg/dl, no interfiere con la prueba LAL.

Se determinó que el MDP contiene compuestos que interfieren con la prueba LAL, en esta investigación no fue posible identificar la causa de dicha interferencia.

Los dos radiofármacos analizados en este estudio, MAA y MDP, pasan la prueba de apirogenicidad, es decir cumplen con las normas de la FDA , USP XXIII y el Guideline.

Los factores que influyeron en la prueba LAL son cambios irregulares mínimos de temperatura causados por interrupciones del suministro de la energía eléctrica y fluctuaciones en la corriente eléctrica y falta de un regulador de voltaje; además los tubos de ensayo de un material diferente a la cal sodada, las vibraciones en el área de trabajo, el material no depirogenizado completamente y los tiempos inexactos de incubación afectaron el desarrollo de la prueba LAL invalidándola.

La prueba LAL es más rápida, reproducible, cuantificable y fácil de realizar que la Prueba de Reacción Térmica en Conejos, y es más efectiva para la determinación de endotoxinas de una gran variedad de microorganismos, además no presenta las desventajas de las pruebas in vivo como la Prueba de Reacción Térmica en Conejos.

Para los radiofármacos utilizados en centellografía y radiofármacos de corto período de semi-desintegración es esencial la prueba LAL ya que requiere menor volumen de muestra y menor tiempo de reacción que las pruebas in vivo.

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Cen

11. RECOMENDACIONES

Es indispensable verificar el pH de la reacción, que debe encontrarse dentro del rango óptimo de 6.5 á 7, ya que un pH ácido o básico enmascara la reacción. Es importante determinar el pH de la reacción no el pH de cada uno de los reactivos ya que el lisado contiene un buffer que ayuda a mantener el pH dentro del rango óptimo.

No es necesario trabajar en una campana de flujo laminar ni en una área estéril, únicamente se necesita una área limpia y controlada de corrientes de aire para evitar la formación de partículas que interfieran con la prueba LAL .

Es indispensable utilizar tubos de cal sodada ya que tubos de otro material diferente no cumplen con las condiciones necesarias, induciendo resultados falsos; falsos positivos debido a que la endotoxina se deposita en la superficie porosa de los tubos (no de cal sodada) y falsos negativos debido a que material diferente a la cal sodada absorbe la endotoxina que pueda estar presente en la muestra.

No se recomienda el uso de guantes debido a que el talco que facilita el uso de los mismos puede interferir en la prueba o puede estar cargado de endotoxinas, a pesar de ser guantes estériles .

Al reconstituir todos los reactivos se deben descartar los tapones de hule y taparlos con la parte interna del papel parafilm, para evitar la contaminación de los mismos y además evitar la pérdida de grandes cantidades de reactivos que se depositan en el tapón de hule, ya que se demostró que aproximadamente 1 ml del reactivo se deposita en la parte inferior del tapón y se descarta.

Se deben correr controles positivos de los radiofármacos con cada corrida de la prueba LAL, especialmente cuando se analizan formulaciones nuevas, debido a que productos de diferentes

fabricantes pueden comportarse en diferente forma en esta prueba. Esto es importante cuando se utilizan agentes quelantes o surfactantes, metales pesados, partículas vasoconstrictoras y bacteriostáticos.

Se debe utilizar únicamente agua reactiva LAL para reconstituir los reactivos, tanto el lisado como los radiofármacos, y para realizar las diluciones del producto, de esta manera estamos minimizando los factores que puedan influir en el desarrollo de la prueba LAL.

No debemos colocar el baño María cerca del agitador tipo vortex o de aparatos eléctricos que provoquen movimientos vibratorios durante el periodo de incubación, ya que influyen en la formación del coágulo. Además el agua del baño María debe estar a un mismo nivel, debe cubrir el volumen total de reactivos más la mitad del mismo en el tubo de reacción, para lograr una incubación homogénea.

Durante el periodo de incubación se deben colocar en el baño María los tubos de reacción inmediatamente después de haber agregado el lisado.

La lectura de esta prueba debe realizarse inmediatamente después del periodo de incubación: 1 hora \pm 2 minutos.

Es necesario el entrenamiento del personal que realizará esta técnica para el control de calidad de los radiofármacos.

Es indispensable la estandarización del procedimiento de la prueba LAL, utilizando para ello estándares de referencia internacionales y estándares de endotoxina para el desarrollo de la prueba LAL.

Se deben realizar pruebas preliminares con cada radiofármaco para conocer el comportamiento de la muestra ante la prueba LAL y así poder determinar si algún compuesto interfiere, y si se puede

sobrepasar esta interferencia para posteriormente validar la prueba con el radiofármaco específico. La realización de estas pruebas preliminares ayudan a reducir los costos y a la vez podemos darnos cuenta si la prueba LAL puede utilizarse con el radiofármaco elegido.

12. REFERENCIAS

1. Turco S, King RE. Sterile Dosage Forms. 2a.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1,974. X + 456p.
2. Groven MJ, et al. Sterile Pharmaceutical Manufacturing Applications for the 1,990's. Vol II.
3. Zimmer AM, Spies SM. Quality Control of Radiotracers, Section of Nuclear Medicine. Department of Radiology. Northwestern University Medical Center. Chicago, Illinois. (p.270 - 291).
4. Mc Donald RA, et al. Reduction of Residual Radioactivity in Syringes by Flushing with Blood. J. Nucl. Med 12: 480, 1,971.
5. Mallol J. Radiofarmacia. Interamericana - Mc Graw - Hill, 1,989. 130 p.
6. Callahan RJ, Giovanoni RL, Potsaid MS. Particulate Matter Contamination of Radiopharmaceuticals. Abs Nucl Pharm Sec Ame Pharm Assoc, New Orleans, April 1,976. (135 -140).
7. International Atomic Energy Agency: Preparation of Kits for ^{99m}Tc Radiopharmaceuticals. IAEA, May 1,992, IAEA, Doc. Tec. No.649, Austria (Viena).
8. Servian JL. Report of an International Atomic Energy Agency Meeting on Quality Control of Radiopharmaceuticals. Internacional Atomic Energy Agency, P. O. B. 590, A-1011Viena, Austria. (p. 653 - 658).
9. Lachman L, Lieberman HA, Kaming JL. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy. 2a. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1,976. XI + 1,787p. (p.588 - 589 y 620 - 622).
10. Helman J. Farmacotecnia Teorica y Practica. Tomo V, 4ta. ed. México: CECSA, 1,981. 2,624p. (p.1381-1400).
11. United States Pharmacopeia. (21th Revision). Rockville, Md, United States Pharmacopcial Convention Inc., 1,990. LIV + 2,067p. (p.1,495 - 1,496 y 1,515 - 1,516).

12. Eckelman, WC, Levenson, SM. Radiopharmaceuticals Labelled with Technetium. *Int J Appl Rad and Isot* 28: 67-82, 1,977.
13. British Pharmacopeia. 21th Volume II. London: Her Majesty's Stationery office, 1,988. A301 + 1,140 + XLI p.
14. U.S. Departamen of health and human services Public health service Food and Drug Administration. Guideline on validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices. Rockville, Md. United States: FDA, Dic. 1,987. iv + 48 p (p.48).
15. Murata H, Masayoshi K, y cols. Sensity of Limulus Test and Inhibitory Factors in the Radiopharmaceuticals. *J Nucl Med* 17: 1088-1092, 1976.
16. LAL Workshop. Associates of Cape Cod, Inc. Advances in Marine Biotechnology Since 1,974 Doc Tec. Massachussetts.
17. *Limulus* Amebocyte Lysate (LAL), Doc. Tec. No.50-500U. Whittaker Bioproducts, Inc. 7/90.
18. Novitsky T. The Biology of the Hoerseshoe Crab. *LAL Update*. 1,985; Vol. 3, No.4.
19. Novitsky T. The Blood of the Hoerseshoe Crab. *Oceanus, Int. Perspec. on Our Ocea. Envi.* 1,991; Vol. 27, No.1: 13 - 18.
20. USP Changes Affecting LAL Users. *LAL Update*. 1,983; Vol. 1, No.2.
21. Novitsky T. <85> Bacterial Endotoxins Test (8th. Supllement to USP XXII). *LAL Update*. 1,993; vol. 11, No.2: 1 - 4.
22. Novitsky T. Guideline on Validation of The Limulus Amebocyte Lysate Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices. *LAL Update*. 1,988; Vol. 6, No.1: 1 - 4.

13. ANEXOS

ANEXO 13.1

RADIOFARMACOS DE ^{99m}TECNECIO DISPONIBLES

Radiofármaco	Organo de interés
^{99m} Tc NaTcO ₄	Cerebro, Tiroides
^{99m} Tc sulfuro Coloidal	Hígado, Bazo, Médula Osea
^{99m} Tc pirofosfato	Hueso
^{99m} Tc polifosfato	Hueso
^{99m} Tc difosfonato	Hueso
^{99m} Tc metilen difosfonato	Hueso
^{99m} Tc macroagregados de albúmina	Pulmón
^{99m} Tc albúmina humana microsferas	Pulmón
^{99m} Tc ácido dietilentriaminopentacético	Riñón
^{99m} Tc albúmina de suero humano	Corazón, Placenta

FUENTE: Turco S, King RE. STERILE DOSAGE FORMS (1)

PROFESOR DE LA FACULTAD DE LAS CIENCIAS DE QUATELANA
Biblioteca Centro

A N E X O 13.2

RADIOFARMACOS COMUNES EN MEDICINA NUCLEAR

Radiofármacos	Organo de interés
^{131}I NaI	Tiroides
^{131}I Orthoyodohipurato	Riñón
^{131}I Rosa de Bengala	Vejiga e Hígado
^{67}Ga Citrato	Tumores, Abscesos
^{75}Se Selenometionina	Páncreas
^{133}Xe Gas	Pulmón
^{210}Tl Thallio Clorhidro	Corazón
^{32}P Fosfato de sodio	Terapia: Policitemia Vera
^{32}P Fosfato Crómico	Terapia: Efusiones pleurales y peritoneales
^{51}Cr Cromato de Sodio	Masas RBC, supervivencia y volumen
^{125}I Albúmina de Suero Humano	Volumen sanguíneo
^{123}I Yoduro de Sodio	Tiroides

FUENTE: Turco S, King RE. STERILE DOSAGE FORMS (1)

A N E X O 13.3

**FUENTE DE PIROGENOS BACTERIANOS QUE HAN DEMOSTRADO REACCION
CON EL LISADO DE AMEBOCITOS DE *LIMULUS (LAL)***

Aerobacter aerogenes

Arizona arizonae

Aeromona pneumoniae

Bethesda sp.

Escherichia coli

Kleibsellia

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas fluorescens

Salmonella abortus

Salmonella enteritidis

Salmonella typhimurium

Salmonella typhosa

Serratia marcescens

Shigella flexneri

FUENTE: Servian JL. REPORT OF AN INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY
MEETING ON QUALITY CONTROL OF RADIOPHARMACEUTICALS. Internacional
Atomic Energy Agency (8).

A N E X O 13.4
CALCULOS PARA DETERMINAR LA SENSIBILIDAD DEL LISADO
EN LA PRUEBA LAL: METODO GEL COAGULO

	Diluciones de endotoxina (EU/ml)						Pto. Final
	Réplica	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	
1.	+	+	+	-	-	-	0.12
2.	+	+	+	-	-	-	0.12
3.	+	+	+	+	-	-	0.06
4.	+	+	+	-	-	-	0.12

La sensibilidad del lisado es calculada por medio de la determinación del punto medio geométrico del punto final. Cada valor de punto final es convertido a log de base 10. Cada valor individual del log de base 10 es promediado y la sensibilidad del lisado es tomado como el antilog 10 de este valor promedio del log de base 10.

Cálculo del Punto Medio Geométrico del Punto final

Punto Final (EU/ml)	Log10 Punto Final
0.12	- 0.921
0.12	- 0.921
0.06	- 1.222
0.12	- 0.921

Medio= - 0.996
 Antilog 10 del medio= 0.10 EU/ml

Una variación aceptable es la mitad o dos veces la sensibilidad marcada del lisado.

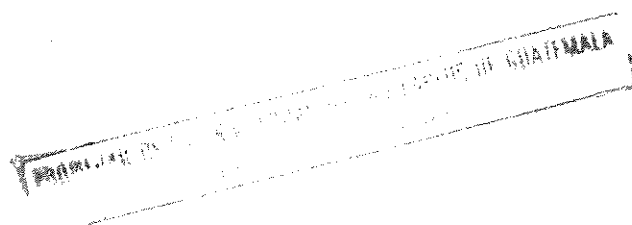
FUENTE: *Limulus* Amebocyte Lysate (LAL), (17) .

Si se realizan réplicas múltiples de una prueba (y generalmente las pruebas deben correrse por duplicado) y los puntos finales de las réplicas no son todos a la misma dilución la media geométrica de los puntos finales debe ser tomada. La media geométrica es utilizada porque en las diluciones de estándar y muestras son una progresión geométrica (1,2,4,8,16, etc).

Nota: si una progresión aritmética fuera utilizada (1,2,3,4,5) entonces es más apropiado utilizar la media aritmética más común.

Para calcular la media geométrica, tomar los log de los puntos finales (la base no importa, base 10 es comúnmente utilizada), sumar el logaritmo de puntos finales, dividir la suma de los puntos finales por el número de puntos finales para dar la media de los valores de logaritmo, tomar el antilogaritmo (misma base como la de arriba) de la media para dar la media geométrica.

FUENTE: *Limulus* Amebocyte Lysate (LAL), (17) .



ANEXO 13.5

CERTIFICATE OF ANALYSIS
Standardization of CSE against RSE

Technician: S. Chandler

Date of Test: 10/05/95

Reference Standard Endotoxin (RSE): lot #EC-6, 10,000 EU/vial

Control Standard Endotoxin (CSE): Associates of Cape Cod, Inc. lot #65, 0.50 µg/vial

Pyrotell® lot #12-45-637, Expiration date: 20 JAN 99

Repl.	Concentration of RSE (EU/mL)					Concentration of CSE (ng/mL)				
	0.50	0.25	0.125	0.06	0.03	0.05	0.025	0.0125	0.006	0.003
1	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
2	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
3	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
4	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-

Calculations:

Potency of CSE (EU/ng) is the ratio of the geometric mean (GM) of endpoints of RSE assays to the GM of endpoints of CSE assays.

GM of endpoints of assays = antilog $\Sigma e/f$, where Σe = sum of log endpoints, and f = number of replicate endpoints.

Repl#	log endpoints (e)		GM endpoints			
	RSE	CSE	RSE	CSE		
1	-0.6	-1.6	$\Sigma e =$	-2.4	-6.4	
2	-0.6	-1.6		$\Sigma e/f =$	-0.6	-1.6
3	-0.6	-1.6		antilog $\Sigma e/f =$	0.25	0.025
4	-0.6	-1.6				

$$\text{Potency of CSE} = \frac{\text{GM RSE}}{\text{GM CSE}} = 10 \text{ EU/ng}$$

Concentration of CSE in vial = 10 EU/ng x 500 ng/vial CSE = 5,000 EU/vial.

Associates of Cape Cod, Inc.

P.O. Box 224, Woods Hole, MA 02543-0224

Tel: 508-540-3444 Fax: 508-540-8680


Quality Control/Quality Assurance Department

ANEXO 13.6

TABLA No.1
PRUEBAS PRELIMINARES
RADIOFARMACO: MACROAGREGADOS DE ALBUMINA (MAA)
LOTE 16/95

1.1 Curva estándar de endotoxina

Concentración del Estándar / (EU/ml)				
2λ 0.5	λ 0.25	0.5 λ 0.125	0.25 λ 0.06	Control Negativo
+	+	+	+	-
+	+	-	-	-

1.2 Diluciones de la muestra del radiofármaco

	Repl.	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
A	1.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2.	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
B	1.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ = Prueba Positiva: Formación del coágulo

- = Prueba Negativa: No se formó el coágulo

A = Radiofármaco sin adición de endotoxina

B = Radiofármaco con adición de endotoxina (2λ= 0.5 EU/ml)

NOTA: Las concentraciones de los estándares de endotoxina para la curva estándar de endotoxina no se realizó en las concentraciones requeridas.

..... CONTINUACION ANEXO 13.6

TABLA No.2
PRUEBAS PRELIMINARES
RADIOFARMACO: MACROAGREGADOS DE ALBUMINA (MAA)
LOTE 16/95

2.1 Curva estándar de endotoxina

Concentración del Estándar (EU/ml)				
2λ 0.5	λ 0.25	0.5λ 0.125	0.25λ 0.06	Control Negativo
+	+	-	-	-
+	+	-	-	-

2.2 Diluciones de la muestra del radiofármaco

	Repl.	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
A	1.	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	2.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
B	1.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

- + = Prueba Positiva Formación del coágulo
 - = Prueba Negativa: No se formó el coágulo
A = Radiofármaco sin adición de endotoxina
B = Radiofármaco con adición de endotoxina ($2\lambda = 0.5$ EU/ml)

..... CONTINUACION ANEXO 13.6

TABLA No.3
PRUEBAS PRELIMINARES
RADIOFARMACO: MACROAGREGADOS DE ALBUMINA (MAA)
LOTE 16/95

3.1 Curva estándar de endotoxina

Concentración del Estándar (EU/ml)				
2λ 0.5	λ 0.25	0.5 λ 0.125	0.25 λ 0.06	Control Negativo
+	+	-	-	-
+	+	-	-	-

3.2 Diluciones de la muestra del radiofármaco

	Repl.	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
A	1.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	2.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
B	1.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ = Prueba Positiva: Formación del coágulo

- = Prueba Negativa: No se formó el coágulo

A = Radiofármaco sin adición de endotoxina**B** = Radiofármaco con adición de endotoxina (2λ= 0.5 EU/ml)

CONCLUSION: Los Macroagregados de albúmina no interfieren con la prueba LAL, formación del coágulo; pero contiene endotoxina (4X 0.25 EU/ml = 1 EU/ml , hay que corregir por la dilución) y hay que validar la prueba a una dilución de por lo menos 1:16 o encontrar un lote con menos contaminación para hacer la validación.

..... CONTINUACION ANEXO 13.6

TABLA No.4
PRUEBAS PRELIMINARES
RADIOFARMACO: METILENDIFOSFONATO (MDP)
LOTE 15/95

4.1 Curva estándar de endotoxina

Concentración del Estándar (EU/ml)				
2λ 0.5	λ 0.25	0.5λ 0.125	0.25λ 0.06	Control Negativo
-	+	-	-	-
+	-	-	-	-

4.2 Diluciones de la muestra del radiofármaco

	Repl.	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
A	1.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	1.	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	2.	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

+ = Prueba Positiva: Formación del coágulo

- = Prueba Negativa: No se formó el coágulo

A = Radiofármaco sin adición de endotoxina**B** = Radiofármaco con adición de endotoxina ($2\lambda = 0.5$ EU/ml)

NOTA: Prueba no válida. La temperatura del Baño María no fue constante ya que se presentaron oscilaciones de $\pm 0.5^\circ$ de temperatura debido a fluctuaciones de la corriente eléctrica por los cortes de luz imperantes en esa época en nuestro país.

... CONTINUACION ANEXO 13.6

TABLA No.5
PRUEBAS PRELIMINARES
RADIOFARMACO: METILENDIFOSFONATO (MDP)
LOTE 15/95

5.1 Curva estándar de endotoxina

Concentración del Estándar (EU/ml)				
2λ 0.5	λ 0.25	0.5 λ 0.125	0.25 λ 0.06	Control Negativo
+	+	-	-	-
+	+	-	-	-

5.2 Diluciones de la muestra del radiofármaco

	Repl.	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
A	1.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	1.	-	-	+	+	- *	- *	- *	- *	- *	- *
	2.	- *	- *	- *	- *	- *	- *	- *	- *	- *	- *

+ = Prueba Positiva: Formación del coágulo

- = Prueba Negativa: No se formó el coágulo

A = Radiofármaco sin adición de endotoxina

B = Radiofármaco con adición de endotoxina (2λ= 0.5 EU/ml)

NOTA: * El lisado reconstituido una semana antes no funcionó, se observó cambio en la viscosidad y color del lisado, por lo cual esta corrida fue no válida.

..... CONTINUACION ANEXO 13.6

TABLA No.6
PRUEBAS PRELIMINARES
RADIOFARMACO: METILENDIFOSFONATO (MDP)
LOTE 15/95

6.1 Curva estándar de endotoxina

Concentración del Estándar (EU/ml)				
2λ 0.5	λ 0.25	0.5 λ 0.125	0.25 λ 0.06	Control Negativo
+	+	-	-	-
+	+	-	-	-

6.2 Diluciones de la muestra del radiofármaco

	Repl.	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
A	1.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	1.	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	2.	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

+ = Prueba Positiva: Formación del coágulo

- = Prueba Negativa: No se formó el coágulo

A = Radiofármaco sin adición de endotoxina**B** = Radiofármaco con adición de endotoxina (2λ = 0.5 EU/ml)

CONCLUSION: El Metilendifosfonato interfiere con la prueba LAL: formación del coágulo, hasta una dilución de 1:2 sobrepasamos la inhibición en la dilución 1:4, por lo que hay que validar a una dilución de por lo menos 1:8 (4 X 2 = 8, por el error de la prueba).

..... CONTINUACION ANEXO 13.6

TABLA No.7
 PRUEBAS DE VALIDACION DE LA PRUEBA
 RADIOFARMACO: MACROAGREGADOS DE ALBUMINA (MAA)
 LOTE 16/95

7.1 Curva estándar de endotoxina

Concentración del estándar en LWR

Concentración del Estándar (EU/ml)				
2λ 0.5	λ 0.25	0.5 λ 0.125	0.25 λ 0.06	Control Negativo
+	+	-	-	-
+	-	-	-	-

7.1 Concentración del estándar en muestra diluida 1:16

No. Repeticiones	Concentración del Estándar (EU/ml)				
	2λ 0.5	λ 0.25	0.5λ 0.125	0.25λ 0.06	Control Negativo
1.	+	+	+	+	-
2.	+	+	+	+	-
3.	+	+	+	+	-
4.	+	+	+	+	-

+ = Prueba Positiva: Formación del coágulo
 - = Prueba Negativa: No se formó el coágulo

NOTA: La prueba no fue válida ya que no se confirmó la sensibilidad del lisado.

..... CONTINUACION ANEXO 13.6

TABLA No.8
PRUEBAS DE VALIDACION DE LA PRUEBA
RADIOFARMACO: MACROAGREGADOS DE ALBUMINA (MAA)
LOTE 16/95

8.1 Curva estándar de endotoxina
Concentración del estándar en LWR

Concentración del Estándar (EU/ml)				
2λ 0.5	λ 0.25	0.5 λ 0.125	0.25 λ 0.06	Control Negativo
+	+	-	-	-
+	-	-	-	-

8.2 Concentración del estándar en muestra diluida 1:16

No. Repeticiones	Concentración del Estándar (EU/ml)				
	2λ 0.5	λ 0.25	0.5λ 0.125	0.25λ 0.06	Control Negativo
1.	-	-	-	-	-
2.	-	-	-	-	-
3.	-	-	-	-	-
4.	-	-	-	-	-

+ = Prueba Positiva: Formación del coágulo
- = Prueba Negativa: No se formó el coágulo

NOTA: Debido a la falta de un regulador de voltaje no fue posible mantener la temperatura constante, $T_0=37.0^{\circ}\text{C}$ y $T_f=37.5^{\circ}\text{C}$, que estuvo oscilando durante todo el periodo de incubación, por lo que no fue posible la validación de la prueba LAL con este radiofármaco.

..... CONTINUACION ANEXO 13.6

TABLA No.9
PRUEBAS DE VALIDACION DE LA PRUEBA
RADIOFARMACO: METILENDIFOSFONATO (MDP)
LOTE 15/95

9.1 Curva estándar de endotoxina
Concentración del estándar en LWR

Concentración del Estándar (EU/ml)				
2 λ 0.5	λ 0.25	0.5 λ 0.125	0.25 λ 0.06	Control Negativo
+	+	-	-	-
+	-	-	-	-

9.2 Concentración del estándar en muestra diluida 1:8

No. Repeticiones	Concentración del Estándar (EU/ml)				
	2 λ 0.5	λ 0.25	0.5 λ 0.125	0.25 λ 0.06	Control Negativo
1.	-	-	-	-	-
2.	-	-	-	-	-
3.	-	-	-	-	-
4.-	-	-	-	-	-

+ = Prueba Positiva: Formación del coágulo
- = Prueba Negativa: No se formó el coágulo

NOTA: El lisado reconstituido una semana antes no funcionó, se observó cambio en la viscosidad y color del lisado, por lo que no fue posible validar la prueba LAL con este radiofármaco.

..... CONTINUACION ANEXO 13.6

TABLA No.10
PRUEBAS DE RUTINA
RADIOFARMACO: MACROAGREGADOS DE ALBUMINA (MAA)
LOTE 16/95

10.1 Curva estándar de endotoxina

Concentración del Estándar (EU/ml)				
2λ 0.5	λ 0.25	0.5 λ 0.125	0.25 λ 0.06	Control Negativo
+	+	-	-	-
+	+	-	-	-

10.2 Pruebas de rutina para Macroagregados de albúmina (MAA)
Muestra diluída 1:16

	Número de Repeticiones (en duplicado)					
	1		2		3	
Sin endotoxina	-	-	-	-	-	-
Con endotoxina 2λ= 0.5 EU/ml Control positivo	+	+	+	+	+	+

+ = Prueba Positiva: Formación del coágulo
- = Prueba Negativa: No se formó el coágulo

..... CONTINUACION ANEXO 13.6

TABLA No.11
PRUEBAS DE RUTINA
RADIOFARMACO: METILENDIFOSFONATO (MDP)
LOTE 15/95

11.1 Curva estándar de endotoxina

Concentración del Estándar (EU/ml)				
2λ 0.5	λ 0.25	0.5 λ 0.125	0.25 λ 0.06	Control Negativo
+	+	-	-	-
+	+	-	-	-

11.2 Pruebas de rutina para Metilendifosfonato (MDP)
Muestra diluida 1:8

	Número de Repeticiones (en duplicado)					
	1		2		3	
Sin endotoxina	-	-	-	-	-	-
Con endotoxina 2λ= 0.5 EU/ml Control positivo	+	+	+	+	+	+

+ = Prueba Positiva: Formación del coágulo
- = Prueba Negativa: No se formó el coágulo

ANEXO 13.7

FORMULACION DEL METILENDIFOSFONATO (MDP)

*** Reactivos**

- Acido metilendifosfato Merck
- Cloruro estannoso dihidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) Merck
- Acido clorhídrico (HCl) Merck
- Hidróxido de sodio (NaOH) Merck
- Agua destilada estéril y apirógena

*** Técnica para preparar 100 frascos**

- Pesar 500 mg de metilendifosfato
- Agregar 75 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ disuelto en 50 ml de HCl 0.25N previamente nitrogenado (2.1 ml de HCl concentrado en 100 ml de agua destilada estéril y apirógena)
- Llevar a pH de 6.0 á 6.5 con NaOH 1N (4 gr de NaOH en 100 ml de agua destilada estéril y apirógena)
- Completar con agua destilada y apirógena nitrogenada hasta un volumen final de 200 ml
- Filtrar la solución con un filtro milipore de 0.22μ de porosidad
- Fraccionar 1 ml en cada frasco
- Liofilizar

FUENTE: PREPARATION OF KITS FOR ^{99m}Tc RADIOPHARMACEUTICALS.

IAEA, TECDOC-649 (11)

ANEXO 13.8

FORMULACION DE MACROAGREGADOS DE ALBUMINA (MAA)

*** Reactivos**

- Suero de albúmina humana (HSA) al 30% Sigma
- Acetato de Sodio Merck
- SnCl₂.2H₂O Merck
- HCl al 37% Merck
- Polisorbato (Tween 80)
- NaCl al 0.9% nitrogenado

*** Técnica para 100 frascos**

- Preparar 5 ml de HSA al 1% (0.17 ml de HSA al 30% llevar a 5 ml con NaCl 0.9%)
- Preparar el frasco de reacción (frasco de 50 ml con un pescadito pequeño)
- Agregar al frasco de reacción lo siguiente (todo filtrado) 5 ml de HSA al 1 %, 10 ml de Acetato de sodio al 6 % y 10 ml de NaCl al 0.9 %
- Agitar en baño María hirviendo durante 7 minutos . * Observaciones: Formación de grumos.
- Agitar fuertemente a temperatura ambiente durante 15 min.
- Pasar la suspensión por diferentes agujas No.21, No.23, No.24 y No.25
- Nitrogenar 15 minutos. Chequear el tamaño de las partículas: 10 - 80 μ (99.0 %) y el pH: 5.2 -5.8.
- Fraccionar en viales y liofilizarlo

FUENTE: PREPARATION OF KITS FOR ^{99m}Tc RADIOPHARMACEUTICALS.

IAEA, TECDOC-649 (11)

A N E X O 13.9

PROCEDIMIENTO DE CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLÓGICO

DE LOS RADIOFARMACOS

- * Reconstituir 5 frascos con 2 ml de agua bidestilada y apirógena cada uno.
- * Observar partículas en cámara con fondo negro y lámpara de tungsteno.
- * Preparar un pool con todos los frascos del mismo radiofármaco.
- * Sembrar unas gotas del pool de radiofármacos en:
 - Tioglicolato —————> para bacterias anaeróbicas
 - Tripticasa soya —————> para bacterias aeróbicas
 - Sabouraud —————> para levaduras y mohos

Incubar los primeros dos tubos (tioglicolato y tripticasa soya) a 37 °C por 24 horas, y el sabouraud a temperatura ambiente durante 7 días.

- * Observar turbidez en los tubos y si existe sembrar en Mc Conkey, agar sangre y SS.
- * Realizar la prueba LAL para detectar pirógenos.
- * Observar después de una hora de incubación a 37°C, la formación de coágulo indica una prueba positiva (+).

ANEXO 13.10

PROTOCOLO DE TRABAJO DE LA

PRUEBA LAL: METODO GEL COAGULO PARA LA

DETERMINACION DE ENDOTOXINAS EN LOS RADIOFARMACOS PARA

MARCAR CON ^{99m}TECNECIO MACROAGREGADOS DE ALBUMINA (MAA) Y

METILENDIFOSFONATO (MDP).

MATERIALES

1. Parafilm: Utilice el lado que tiene contacto con el papel para sellar recipientes de soluciones que deben mantenerse libres de pirógenos.
2. Tubos de ensayo libres de pirógenos para hacer diluciones del producto.
3. Tubos de cal sodada depirogenizados para las reacciones (Pyrotubes™).
4. Pipetas estériles y libres de pirógenos.
5. Puntas de pipeta o tips desechables para pipeta automática, estériles y libres de pirógenos.

REACTIVOS (Associates of Cape Cod, Inc.):

1. Pirotell: botella de 5 ml de Lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL) con una sensibilidad de 0.25 EU/ml, para método gel coágulo.
2. Control Estándar de Endotoxina de *E. coli* 0113:H10 (CSE), botella de 0.5 µg/vial.
3. Agua que ha sido calificada como LAL Reagent Water (LRW) para ser utilizada en la prueba LAL.

EQUIPO:

1. Pipeta automática.
2. Mezclador tipo Vortex.
3. Incubadora de bloque seco o baño de agua sin circulación capaz de mantener 37 ± 1 °C.
4. Gradillas de tres tramos para tubos de reacción de 10 X 75 mm.
5. Gradillas para tubos de ensayo, tubos de diámetro de 16 - 20 mm.

PROCEDIMIENTO:

No es necesario trabajar en una área estéril; sin embargo, se debe mantener una técnica aséptica en todo momento. Es preferible no usar guantes, ya que muchos de los guantes desechables tienen polvos que pueden interferir con la prueba y pueden estar cargados de endotoxina a pesar de ser estériles.

A. Reconstitución del Control Estándar de Endotoxina (CSE)

Remover el sello de metal del frasco de CSE, cuidadosa y lentamente, ya que la endotoxina está bajo vacío, remover el tapón de hule con una pipeta de vidrio libre de pirógenos.

Agregar 5 ml de LWR y sellar frasco de CSE con un pedazo de parafilm. Mezclar el CSE en el mezclador tipo Vortex, a máxima velocidad, por un minuto. Dejar reposar por diez minutos a temperatura ambiente. Repetir los pasos de mezclar y reposar durante una hora (aproximadamente 6 ciclos). Después de reconstituir el CSE, se puede guardar, a $2 - 8$ °C; o utilizar inmediatamente para hacer diluciones para la curva estándar de endotoxina. Este CSE puede ser reutilizado durante cuatro semanas (según la USP XXIII 14 días).

B. Diluciones para Curva Estándar de Endotoxina o Confirmación de la Sensibilidad Marcada en la etiqueta.

Obtener el Certificado de Análisis para la combinación de lotes de CSE y LAL que utilizará en la prueba. En este caso el lote del LAL es el No.12-45-637 y el lote 65 de CSE, esta combinación tiene una potencia de 10 EU/ng de endotoxina.

La potencia es la actividad (en unidades de endotoxina [EU]/ng) de esta preparación de endotoxina con una preparación de LAL en particular, la cual está marcada en el certificado.

Una vez que se conozca la potencia de la combinación de los reactivos que utilizará, debe hacer una conversión para saber la concentración, en unidades de actividad, de su CSE. Como se reconstituyó el CSE (0.5 μ g o 500 ng) con 5 ml, se obtiene una concentración inicial de 100 ng/ml de CSE en el frasco.

La curva estándar de endotoxina debe incluir las siguientes concentraciones de endotoxina, donde λ = la sensibilidad del LAL utilizada: 2λ , λ , 0.5λ , 0.25λ , y control negativo de LRW (agua). En este caso, se utiliza un lisado (lote No. 12-45-637) de sensibilidad (λ) de 0.25 EU/ml.

Por consiguiente, la curva estándar incluirá las siguientes concentraciones en duplicado (dos réplicas de cada concentración): 0.5 EU/ml (2λ), 0.25 EU/ml (λ), 0.125 EU/ml (0.5λ), 0.0625 EU/ml (0.25λ), y el control negativo de LRW (agua).

Basado en lo anterior, es necesario hacer diluciones del CSE con agua y tubos de ensayo libres de pirógenos para llegar a las concentraciones apropiadas para la curva estándar:

Potencia:	$\frac{10 \text{ EU/ng}}{1,000 \text{ EU/ml}}$
Concentración inicial	
	↓ 1:100
	10 EU/ml = 40λ
	↓ 1:10
	1 EU/ml = 4λ
	↓ 1:2
	0.5 EU/ml = 2λ

C. Diluciones del Producto: ^{99m}Tc Macroagregados de Albúmina y ^{99m}Tc Metilendifosfonato.

Para reconstituir los radiofármacos liofilizados se debe remover el sello de metal del frasco y, cuidadosa y lentamente remover el tapón de hule con una pipeta libre de pirógenos. Reconstituir agregando 2 ml de agua LWR, y sellar el frasco con un pedazo de parafilm; mezclar en el agitador vortex y listos para ser utilizados.

1. Límite de Endotoxina

Límite de endotoxina: cantidad de endotoxina que puede ser tolerada por el humano y que es aceptable por las agencias reguladoras.

Se calcula de la siguiente forma para los radiofármacos que serán administrados intravenosamente, no administrados al líquido cefalorraquídeo:

$$\text{Límite de endotoxina} = \frac{175 \text{ EU (Límite de USP para radiofármacos)}}{V \text{ (Dosis máxima a la hora o fecha de expiración del radiofármaco)}}$$

LIMITE DE ENDOTOXINA PARA $^{99m}\text{TcMAA}$:

Para ^{99m}Tc Macroagregados de Albúmina, asumiendo que la dosis máxima es de 2 mg/paciente/en una sola inyección (puede ser dada en un volumen de 1 á 3 ml, pero jamás se administrará más de 2 mg/paciente/hora):

$$\text{Límite de endotoxina} = \frac{175 \text{ EU}}{2 \text{ mg}} = 87.5 \text{ EU/mg de Macroagregados de Albúmina}$$

LIMITE DE ENDOTOXINA PARA $^{99m}\text{TcMDP}$:

En el caso de ^{99m}Tc Metilendifosfonato, asumiendo que la dosis máxima es de 0.5 mg/paciente/en una sola inyección (puede ser dada en un volumen de 1 á 3 ml, pero jamás se administrará más de 0.5 mg/paciente/hora):

$$\text{Limite de endotoxina} = \frac{175 \text{ EU}}{0.5 \text{ mg}} = 350 \text{ EU/mg de Metilendifosfonato}$$

2. Diluciones del producto a analizar:

Una vez que se ha determinado el límite de endotoxina, se debe determinar la máxima dilución válida (MVD) que es útil para informarnos acerca del límite que tenemos en nuestras diluciones del producto, y la mínima concentración válida (MVC) ya que muchas veces es necesario diluir el producto para sobrepasar ciertos tipos de interferencia que podemos llegar a observar con el producto.

MAXIMA DILUCION VALIDA (MVD):

Es la dilución más grande que se le puede hacer al producto y aún detectar el límite de endotoxina con el sistema de pruebas que se esté utilizando.

El MVD depende del límite de endotoxina y de la sensibilidad del lisado que se está utilizando, es útil para evitar que se diluya un producto más allá de donde no se podría detectar el límite de endotoxina.

Si no existiera el MVD, uno podría diluir cualquier producto con agua libre de pirógenos hasta ya no detectar endotoxina y así poder sacar cualquier producto al mercado, no importando que tan contaminado estuviera el producto.

En este caso, en el cual estamos analizando un producto con un límite de endotoxina de 175 EU/ml (asumiendo que los productos liofilizados: $^{99m}\text{TcMAA}$ será reconstituido a una concentración de 2 mg/ml; $87.5 \text{ EU/mg} \times 2 \text{ mg/ml} = 175 \text{ EU/ml}$ y el $^{99m}\text{TcMDP}$ será reconstituido a una concentración de 0.5 mg/ml; $350 \text{ EU/mg} \times 0.5 \text{ mg/ml} = 175 \text{ EU/ml}$), con un LAL de sensibilidad de 0.25 EU/ml, el MVD se calcula de la siguiente manera:

$$\text{MVD} = \frac{\text{Límite de endotoxina}}{\text{Sensibilidad del Lisado}} = \frac{175 \text{ EU/ml}}{0.25 \text{ EU/ml}} = 700$$

Por lo tanto, los radiofármacos para marcar con ^{99m}Tc Tecnecio: Macroagregados de Albúmina (dosis máxima de 2 mg por paciente en el espacio de una hora) y Metilendifosfonato (dosis máxima de 0.5 mg por paciente en el espacio de una hora) pueden ser diluidos hasta llegar a una dilución máxima de 1:700 para determinar si tienen un nivel mayor del límite de endotoxina. Esto no significa que sea necesario diluir este producto 1:700 para poder realizar la prueba; sino que si uno quiere hacer una prueba de límites para saber si su producto pasa o falla al límite, es necesario diluirlo y analizarlo a la dilución de 1:700, lo que da una idea de la sensibilidad tan grande que tiene la prueba LAL comparada con la Prueba de Reacción Térmica en Conejos.

IMPRESA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
 INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS Y FÍSICAS
 CARRERA DE QUÍMICA
 AV. INSTITUTO QUÍMICO Y FÍSICO S/N, CUERPO CENTRAL DE INVESTIGACIONES
 CDMX, MÉXICO

CONCENTRACION MINIMA VALIDA (MVC)

La MVC es la concentración más baja a la que se puede analizar un producto y aún detectar el límite de endotoxina. Hay una relación inversa entre el MVC y el MVD, mientras más grande la dilución del producto más baja en la concentración.

Una vez más, en este caso en el cual estamos analizando dos productos con un límite de endotoxina de 175 EU/ml (ver sección anterior: MDV) y el reactivo LAL tiene una sensibilidad de 0.25 EU/ml:

$$\text{MVD} = \frac{\text{Sensibilidad del Lisado}}{\text{Límite de endotoxina}} = \frac{0.25 \text{ EU/ml}}{175 \text{ EU/mg}} = 0.00143 \text{ mg/ml}$$

Es otra forma de expresar que el producto no se puede diluir menos que la Mínima Concentración Valida (MVC). La ventaja del MVC es que no depende de la concentración inicial del producto mientras que el MVD es específico para una concentración inicial del producto.

3. Sensibilidad de la Prueba

La sensibilidad del ensayo va a depender de la sensibilidad del lisado que se utilice (en este caso 0.25 EU/ml) y de la dilución del producto que se utilice para analizar. Si se determina que en el ensayo se analizará una dilución de producto 1:8 (sólo un ejemplo) con un lisado de sensibilidad de 0.25 EU/ml, lo único que se podrá decir del resultado (si todos los controles funcionan), es que el producto contiene ≥ 2 EU/ml ($0.25 \text{ EU/ml} \times 8$) para una reacción positiva ó de < 2 EU/ml para una reacción negativa.

Para los ^{99m}Tc MAA:

Si la concentración del producto que se analizó es de 2 mg/ml, se deberá hacer una conversión para obtener los resultados en EU/mg:

Reacción Positiva

$$> 2 \text{ EU/ml} \div 2 \text{ mg/ml} = \geq 1 \text{ EU/ml}$$

Reacción Negativa

$$< 2 \text{ EU/ml} \div 2 \text{ mg/ml} = < 1 \text{ EU/mg}$$

En el caso de que la reacción sea negativa, la prueba ha demostrado que el producto tiene por lo menos 87 veces menos endotoxina del límite que es permitido. Sin embargo, si la prueba sale positiva, puede haber 1 EU/mg o más. Puede que sea menos de 87.5 EU/mg pero eso no se puede saber si tan sólo se corrió una dilución (1:8) y esta se obtuvo positiva.

Para el $^{99m}\text{TcMDP}$:

Si la concentración del producto que se analizó es de 0.5 mg/ml, se deberá hacer una conversión para obtener los resultados en EU/mg:

Reacción Positiva

$$> 2 \text{ EU/ml} \div 0.5 \text{ mg/ml} = \geq 4 \text{ EU/ml}$$

Reacción Negativa

$$< 2 \text{ EU/ml} \div 0.5 \text{ mg/ml} = < 4 \text{ EU/mg}$$

Si la reacción es negativa, la prueba ha demostrado que el producto tiene por lo menos 87 veces menos endotoxina del límite permitido. Si es positiva, el producto tiene 4 EU/mg o más. Puede que sea menor de 350 EU/mg pero eso no se puede asegurar si tan sólo se corrió una dilución (1:8).

Es necesario hacer pruebas preliminares (vea sección E. Pruebas Preliminares) para:

- Determinar a qué dilución del producto sobrepasamos interferencias del producto con la reacción del LAL / endotoxina.

- Determinar los niveles de endotoxina que encontraremos en el producto habitualmente, para hacer

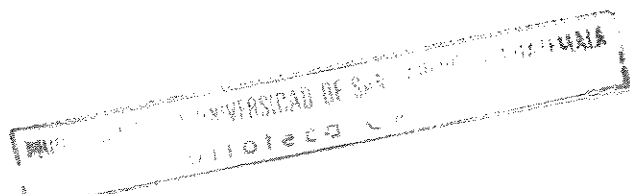
las pruebas rutinarias con una dilución menor del MVD pero mayor que las diluciones donde veremos interferencias o donde tendremos que repetir un gran número de lotes a una dilución mayor, cualquier dilución menor del MVD nos dará un ensayo que es más sensible del límite permitido.

D. Confirmación de la Sensibilidad del Lisado

Se debe correr esta curva con cada ensayo que se haga para confirmar que la prueba está funcionando adecuadamente y que los materiales que se están utilizando están libres de pirógenos. Una vez más, la curva estándar debe incluir las siguientes concentraciones en duplicado (dos réplicas de cada concentración): 0.5 EU/ml (2λ), 0.25 EU/ml (λ), 0.125 EU/ml (0.5λ), 0.0625 EU/ml (0.25λ), y el control negativo de LRW (agua). Por lo tanto, se necesitarán 10 tubos de reacción (Pyrotubes™) para correr la curva.

Para preparar la endotoxina a una concentración de 2λ seguir los siguientes pasos:

Potencia:	$\frac{10 \text{ EU/ng}}{1,000 \text{ EU/ml}} = 400 \lambda$
Concentración inicial	1,000 EU/ml
	↓ 1:100 50 μ l endotoxina + 4,950 ml LWR
	10 EU/ml = 40λ
	↓ 1:10 500 μ l endotoxina + 4,500 ml LWR
	1 EU/ml = 4λ
	↓ 1:2 3 ml endotoxina + 3 ml LWR
	0.5 EU/ml = 2λ



Obteniendo ya la concentración de 2λ o 0.5 EU/ml, es posible hacer el resto de las diluciones en los tubos de reacción:

1. Agregar 0.1 ml (100 μ l) de agua a los tubos que llevarán las concentraciones de λ , 0.5λ , 0.25λ , y controles negativos de LWR (agua) utilizando la pipeta automática y un tip o con una pipeta de vidrio, excepto al tubo que llevará la concentración 2λ .
2. Mezclar vigorosamente, agregar 0.1 ml de la concentración 2λ a los tubos de reacción de concentración 2λ y λ , utilizando una pipeta automática. Ahora se tiene 0.1 ml de 0.5 EU/ml (2λ) en el primer tubo de replicados y 0.2 ml de 0.25 EU/ml (λ) en el segundo par de replicados. Mezclar los cuatro tubos con el agitador Vortex por un par de segundos.
3. Transferir 0.1 ml de la concentración λ a la concentración 0.5λ y mezclar vigorosamente con el agitador Vortex por un par de segundos.
4. Transferir 0.1 ml de la concentración 0.5λ a la concentración 0.25λ y mezclar con el agitador Vortex un par de segundos.
5. Desechar 0.1 ml de la concentración 0.25λ para terminar con 0.1 ml en el tubo de reacción.

En este momento tendrá 0.1 ml de las concentraciones de endotoxina apropiadas en 4 pares de tubos de reacción y 0.1 ml de LWR (agua) en un par de tubos de reacción (controles negativos de LWR). Ver sección E. Pruebas Preliminares para el procedimiento a seguir en la preparación de las muestras a analizar.

E. Pruebas Preliminares

No son requeridas por la FDA pero pueden ahorrar bastante trabajo. Primero asegurarse que el pH de la muestra con LAL (una parte muestra: una parte LAL) este entre 6.0 y 8.0 (USP o

instrucciones del fabricante). Siempre se debe tomar el pH de la mezcla de reacción ya que LAL tiene cierta capacidad de regulador y aunque la muestra sola no tenga un pH entre 6.0 y 8.0, puede ser que la mezcla si esté entre los límites. Si es necesario, ajustar el pH con un regulador (se puede usar Pyrosol [Assoc. Of Cape Cod] para reconstituir el lisado) o con NaOH o HCl libres de pirógenos.

Las pruebas preliminares y de validación requieren que se analicen unos lotes con bastante menos endotoxina que el límite (por lo menos 4 veces menos). Usualmente, es posible validar un producto bastante por debajo del MVD, sin embargo a veces es necesario cambiarse a un lisado de mayor sensibilidad para incrementar su MVD.

Algunos productos necesitan tratamiento adicional. La FDA prefiere que no se haga la prueba a la MVD y la USP dice que se diluya tan poco como sea necesario para poder sobrepasar la interferencia.

En una prueba preliminar, se analizan series de diluciones de producto con y sin la adición de endotoxina. Se agrega un pequeño volumen de endotoxina concentrada ($\leq 10\%$ del volumen de la muestra) a la muestra para dar una concentración final de 2λ (2 X la sensibilidad del lisado). Esto se hace para observar qué concentraciones del producto interfieren con la prueba ya que una concentración de 2λ debe dar una reacción positiva siempre, a menos que esa concentración de producto esté interfiriendo con la reacción.

Para hacer la dilución del producto con endotoxina, donde $2\lambda = 0.5$ EU/ml, este método se utiliza cuando uno quiere comenzar su serie con producto sin diluir:

1. Agregar 0.1 ml (100 μ l) de una concentración de 2λ a los tubos en la serie de dilución de su producto (i.e. diluciones dobles: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, etc.), excepto al primer tubo en la serie (1:1).

2. Agregar 0.2 ml (200 μ l) de la muestra al primer tubo (1:1) de la serie.
3. Agregar 10 μ l de 10 EU/ml CSE (40 λ) al primer tubo (1:1) de la serie (ahora tendrá \approx 200 μ l de una concentración 2 λ de endotoxina en su producto sin diluir) y mezclar.
4. Transferir 100 μ l del primer tubo al segundo tubo en la serie el cual contiene 100 μ l de 2 λ) y mezclar (ahora tendrá 200 μ l de una dilución 1:2 del producto en una concentración de 2 λ de endotoxina).
5. Seguir realizando las diluciones de la misma manera y al final tendrá una serie donde la concentración de su producto va disminuyendo pero la concentración de endotoxina sigue constante.
6. Desechar 0.1 ml del último tubo en la serie para terminar con 0.1 ml en todos los tubos de la serie.

Para hacer la serie de dilución de su producto sin endotoxina, poner 100 μ l de LWR en todos los tubos de su serie, excepto en el primero. Agregar 100 μ l del producto sin diluir al primer y segundo tubos de la serie y realizar las diluciones dobles como fue explicado arriba en los pasos 4 - 6, solo que ahora está utilizando LWR como diluyente.

Una vez que haya preparado las muestras y la curva estándar de endotoxina para la confirmación de sensibilidad (vea sección D. Confirmación de la sensibilidad del Lisado), sacar el frasco de lisado de donde lo tiene guardado entre 2 y 8 °C. Remover el sello de metal del frasco de LAL de 5 ml. Cuidadosa y lentamente, ya que el lisado está bajo vacío, remover el tapón de hule con una pipeta de vidrio libre de pirógenos. Agregar 5 ml de agua LWR para reconstituir el lisado. Sellar el frasco de LAL con un pedazo de parafilm, utilizando el lado que tiene contacto con el papel. No mezclar el lisado en el agitador Vortex, el LAL entrará en solución por sí mismo en un par de minutos. Puede

mover el lisado suavemente para que entre en solución un poco más rápidamente. Una vez que el lisado esté en solución agregar 0.1 ml (100 μ l) de LAL a cada tubo de reacción. Poner el ensayo a incubar a 37 ± 1 °C por 60 minutos. No debe tardar más de 2 minutos desde el momento en que agrega LAL al primer tubo, y el momento en que pone el ensayo entero a incubar. Se puede acortar este tiempo utilizando una pipeta repetidora y una gradilla de tres tramos (de este modo se pueden mezclar las reacciones en la gradilla dándole golpecitos con la mano y sacudiendo la gradilla entera, si la gradilla no es de tres tramos los tubos saldrán despedidos al momento de agitarlos. Mezclar todos los tubos del ensayo bien antes de ponerlos a incubar.

F. Resultados de la Prueba

Leer las reacciones después de una incubación de 60 ± 2 minutos. La incubación debe transcurrir en un baño (seco o de agua) donde las reacciones no se vean expuestas a ninguna vibración. La forma apropiada de leer una reacción es de invertir el tubo 180° para ver si se formó un coágulo. El movimiento de la mano al invertir el tubo debe ser terso y sin pausas. Se debe tener cuidado de no pegarle al tubo con alguna superficie pues el coágulo que se forma es muy delicado y puede romperse fácilmente. Si parece que un coágulo se había formado pero al invertir el tubo se desliza por el lado del tubo, se debe tomar la reacción como negativa. Solamente un coágulo que se mantiene en el fondo del tubo al invertirlo es una reacción positiva.

Los controles negativos deben dar un resultado negativo y uno debe obtener un punto final (concentración más baja que de un coágulo) dentro de una dilución doble de la sensibilidad (λ) del lisado (0.5λ , λ , ó 2λ). Cualquiera de estos tres resultados es aceptable. Sin embargo, las concentraciones 2λ deben dar positivo siempre y las concentraciones 0.25λ deben dar negativo.

Un resultado diferente en los controles puede ser indicativo de: a) contaminación, b) las diluciones de endotoxina estándar no fueron hechas de forma apropiada, c) la incubación no fue hecha a temperatura debida, d) la incubación no fue hecha en el tiempo debido, e) los resultados no fueron leídos en forma apropiada, etc.

En la serie con endotoxina de su producto, las concentraciones de producto donde haya observado un coágulo en las diluciones 1:8 en adelante, pero no en las 1:1, 1:2, y 1:4, significa que una dilución menor de 1:8 de su producto interfiere con la prueba LAL. Por lo tanto, cualquier resultado que uno obtenga de su producto a una dilución menor de 1:8 probablemente sea negativo, no porque no hay endotoxina sino porque el producto está inhibiendo la reacción.

G. Validación del producto

La validación de un producto consiste en demostrar una confirmación en paralelo de la sensibilidad del lisado en agua y en una concentración fija de producto (USP y FDA). El objetivo es demostrar que la sensibilidad de la prueba (el punto final) no se ve afectada por la presencia del producto. Asimismo se determina el nivel de interferencia de la prueba LAL con cada formulación de la droga antes de que se utilice para determinar el contenido de endotoxina presente en la misma droga.

El Guideline indica que se debe hacer la prueba de validación con tres lotes diferentes del producto para poder validar la prueba LAL para ese producto y da detalles acerca del número de muestras que se deben analizar por lote, para fármacos y para aparatos médicos.

Una validación debe realizarse a una dilución menor o igual que el MVD; esta concentración se va a determinar durante las pruebas preliminares.

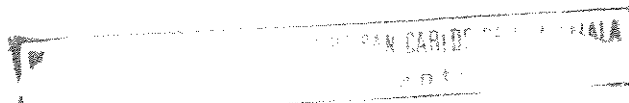
La endotoxina estándar se diluye en agua y en una concentración fija de producto: la concentración del producto es constante mientras que la concentración de la endotoxina va disminuyendo. Los puntos finales de las series deben caer dentro de la variabilidad de la prueba (una dilución doble de cada lado de la sensibilidad) y no deben variar entre sí, por más de una dilución doble.

La USP requiere que se hagan dos réplicas de la serie en agua y 4 réplicas de la serie con el producto. Se deben incluir 4 réplicas de un control negativo de producto (la concentración de validación de producto con LAL sin adición de endotoxina).

Para realizar las dos réplicas de la serie en agua, es decir la concentración del estándar en LWR, se deben seguir los mismos pasos (del 1 al 5) de la sección D. Confirmación del lisado.

Para realizar las 4 réplicas de la serie con el producto, concentración del estándar en la muestra diluida a una concentración X (dilución determinada durante la realización de las pruebas preliminares), en la cual la concentración del producto es constante mientras que la concentración de la endotoxina va disminuyendo, se deben seguir los siguientes pasos:

1. Reconstituir la muestra del radiofármaco liofilizado con 2 ml de LWR y diluirlo hasta la concentración más adecuada para la validación de la prueba determinada durante la realización de las pruebas preliminares.
2. Agregar 0.1 ml (100 μ l) de muestra diluida del producto a los tubos en la serie de dilución de la endotoxina (i.e. diluciones cuádruples: λ , 0.5λ y 0.25λ y control negativo), excepto al primer tubo de reacción en la serie (2λ).
3. Agregar 200 μ l (0.2 ml) de la muestra diluida al primer tubo de reacción en la serie (2λ).
4. Agregar 10 μ l de 10 EU/ml CSE (40λ) al primer tubo (2λ) de la serie (ahora tendrá \approx 200 μ l de



muestra con una concentración 2λ de endotoxina en su producto diluido) y mezclar.

5. Transferir 100 μ l del primer tubo al segundo tubo en la serie (el cual contiene 100 μ l de 2λ) y mezclar (ahora hay 200 μ l del producto diluido con una concentración de endotoxina de λ).
6. Seguir realizando las diluciones de la misma manera y al final se tendrá una serie donde la concentración de endotoxina va disminuyendo pero la concentración del producto sigue constante.
7. Descartar 0.1 ml del último tubo en la serie (0.25λ) para terminar con 0.1 ml en todos los tubos de la serie.

Una vez se hayan preparado las muestras, en las cuales se tengan diferentes concentraciones de endotoxina diluidas en agua LWR y en diferentes concentraciones de endotoxina diluidas en el producto (a una dilución determinada), seguir los pasos de la sección E. Pruebas preliminares a partir de la preparación del lisado y leer la prueba como se indica en la sección F. Resultados de la prueba.

Si se confirma la sensibilidad en la prueba de validación utilizando como mínimo 2 lotes más, la prueba habrá sido validada para el producto.

REVALIDACION: Para poder revalidar la prueba LAL en un producto se requieren según el Guideline: a) Revalidación con 3 lotes de producto si se cambia el método de LAL, b) Revalidación con un lote de producto si se cambia el fabricante de LAL. Si se cambia la formulación o proceso de manufactura del producto no es necesario revalidar, el control positivo se encarga de informar si la prueba se verá afectada, solamente si hay un cambio muy drástico se recomienda revalidar para confirmar que el nivel de validación no ha cambiado.

7. Pruebas Rutinarias

Todos los lotes deben ser analizados. Analice por lo menos 3 muestras, del principio, la mitad, y el final de la producción de un lote. El producto debe ser analizado con la dilución a la cual fue validado. La USP requiere que se incluya la curva estándar de endotoxina con cada ensayo realizado; pero si el laboratorio ya ha demostrado la consistencia de puntos finales, entonces solamente incluye la curva estándar de endotoxina con la primera prueba del día y se omite en el resto de pruebas que se realicen durante ese mismo día, con tal que no haya cambio en las condiciones de la prueba (diferentes lotes de materiales, cambios de temperatura, etc.).

La muestra del producto diluido (a la dilución a la cual fue validada) debe estar en duplicado, con y sin la adición de endotoxina para dar una concentración final de 2λ . El volumen de endotoxina que se le agrega a la muestra no debe sobrepasarse del 10% de la muestra, ya que la muestra no debe ser diluida significativamente.

Para pasar la prueba, la muestra del producto sin endotoxina debe salir negativa, y la muestra con la adición de endotoxina debe salir positiva (control positivo de producto o control de inhibición). Se deben incluir controles negativos en duplicado con todas las pruebas. Si se omite la curva estándar, deben incluirse controles positivos en duplicado (2λ de endotoxina en agua) con la prueba. La prueba es válida solamente si los controles negativos son negativos, y si la sensibilidad del lisado se confirma en la curva estándar de endotoxina (o en la ausencia de esta curva, los controles positivos son positivos). Para que una muestra supere la prueba, la muestra debe ser negativa a una dilución menor que la MVD o debe demostrar tener menos endotoxina que el límite de esa dilución/concentración del producto.

Claudia Aldana

Claudia Fabiola Aldana Martinez

TESISTA

Licda. Diana Freire de Nave

ASESORA

Lic. Gerardo Arroyo Catalán

DIRECTOR

Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar

DECANO