

# VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA L.A.L. (GEL CLOT) EN LOS AGENTES DE RADIODIAGNÓSTICO Y RADIOISÓTOPOS

Morote M.<sup>(1)</sup> [mmorote@ipen.gob.pe](mailto:mmorote@ipen.gob.pe), Otero M.<sup>(1)</sup> [motero@ipen.gob.pe](mailto:motero@ipen.gob.pe),  
Chávez G.<sup>(2)</sup> [gchavezperu@netscape](mailto:gchavezperu@netscape)

(1) Planta de Producción de Radioisótopos – IPEN / Lima, Perú

(2) Empresa Científica Andina S.A.

## RESUMEN

Sobre la base de la validación de la técnica del *Límulus Amebocyte Lisate* (LAL) por el método gel clot *in vitro*, se han determinado los límites reales de endotoxina bacteriana (L.E.), expresados en unidades de endotoxina por mililitro (UE/mL) y el máximo volumen de dilución (M.V.D.), los cuales son necesarios en los controles de endotoxinas bacterianas (E.B.) para los productos que se aplican por vía endovenosa. Los productos validados son siete agentes de radiodiagnóstico (A.R.D.): **Medronato, pentetato, sulfuro coloidal, macroagregado de albúmina, succímero, disofenin y pirofosfato**; los cuales dieron como resultado valores de M.V.D. correspondiente a: 1:80; 1:16; 1:128; 1:64; 1:4; 1:128; 1:64 respectivamente y valores de L.E. de 20 U.E./mL; 4 U.E./mL; 32 U.E./mL; 16 U.E./mL; 1 U.E./mL; 32 U.E./mL y 16 U.E./mL respectivamente. También se ha validado el radioisótopo tecnecio 99m, que dio como resultado el M.V.D. de 1:1 y el L.E. menor de 0,25 U.E./mL. Se determinó también una evidente interferencia de la reacción con el Pyrotell, debido a la acidez del sulfuro coloidal (pH menor de 2) hasta en la sexta dilución del producto. Asimismo, los resultados de MVD mostraron que las diluciones prácticas son bastante menores hasta en 100 veces con relación a los valores teóricos.

## 1. METODOLOGÍA

Antes de empezar la validación se realiza la **caracterización del producto** para determinar los límites teóricos de endotoxina bacteriana (L.E) y las máximas diluciones válidas (MVD) para cada uno de los ARD, así como para el <sup>99m</sup>Tc. Luego, se procede a determinar los valores prácticos, mediante la validación con la

técnica del *Límulus Amebocyte Lisate* (LAL), que emplea el método gel clot y que se inicia con las diluciones del **Control Estándar de Endotoxina (CSE)**, que son endotoxinas (UE) de *Echerichia coli* que contiene 5000 UE/mL y se diluyen con agua despirogenada desde 10 hasta 0,063 UE/mL, para utilizarlo en el **control positivo**, que está constituido por una gradilla con 2 filas de 10 tubos, al que se agregan: 100 µL de ARD de mayor a menor dilución (1 a 500 veces), 0,25 UE/mL y 100 µL del reactivo pyrotell que reacciona con la endotoxina.

En la misma gradilla, pero en el extremo opuesto se colocan un par de tubos y sólo se agregan 100 µL de agua despirogenada y con otra cantidad igual de pyrotell, al que se denomina **control negativo**, finalmente esta gradilla con tubos se incuba a 37 °C por 60 minutos. Inmediatamente después se retiran todos los tubos y se observan, los del control positivo tienen que presentar coagulación en todos los tubos o parcialmente, con la finalidad de comprobar si la composición química del ARD no interfiere en la reacción coagulante del pyrotell con la endotoxina.

Una vez conseguido el resultado anterior, continua el **control del producto**, que está constituido por una segunda gradilla con 2 filas de 10 tubos, que contiene cada uno: 100 µL de ARD de mayor a menor dilución (1 a 500 veces) y luego 100 µL de pyrotell, esta gradilla con tubos se incuba en las mismas condiciones que el control anterior, inmediatamente después se observa la formación o no de coagulación y cuando se observa al primer tubo que salga sin la presencia de coagulo, se podrá determinar el límite de endotoxinas y el máximo volumen de dilución práctico, con la dilución que le corresponde.

## 2. RESULTADOS

Estos valores que se describen a continuación (Tabla 1), son los resultados de dos validaciones que se han realizado para cada producto y con diferentes lotes

de producción, es decir a siete agentes de radiodiagnóstico y un radioisótopo, que se producen en la Planta de Producción de Radioisótopos del Centro Nuclear del IPEN.

Tabla 1. Valores reales de L.E y MVD para ARD Y <sup>99m</sup>Tc.

A.R.D y RADIOISÓTOPO	L. E. ( UE/mL)	M.V.D.
MEDRONATO	20	1 : 80
PENTETATO	04	1 : 16
SULFURO COLOIDAL	32	1 : 128
MACROAGREGADO DE ALBÚMINA	16	1 : 64
SUCCIMERO	01	1 : 04
DISOFENIN	32	1 : 128
PIROFOSFATO	16	1 : 64
TECNECIO 99m	< 0,25	1 : 01

## 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las 16 validaciones que se realizaron en total, es decir dos para cada producto, tuvieron resultados satisfactorios, tanto en el **control positivo** como en el **negativo**. En el primer caso, todos los tubos coagularon, excepto en el ARD denominado **sulfuro coloidal** o TSC que presentó cierta dificultad en los tres primeros tubos, los cuales no coagularon, debido a que tenían un pH menor de 6, sin embargo a partir del cuarto tubo hacia adelante si coagularon, esto significa que la composición química del TSC no interfiere en la reacción de coagulación del pyrotell con la endotoxina. En el segundo caso, todos los tubos no coagularon es decir permanecen líquidos, debido al que el agua está despirogenada y la manipulación ha sido correcta, es decir no hay presencia de endotoxinas.

Todos los resultados del **control del producto**, tuvieron valores de límites de endotoxinas bastante bajos, es decir desde 1 hasta 32 UE/mL, lo que significa que tanto la manipulación como las áreas limpias de producción se encuentran en buenas condiciones.

- Los resultados de los MVD determinaron que las diluciones son bastante menores hasta en 100 veces con relación a los valores teóricos.
- Solamente en el caso del sulfuro coloidal se ha podido detectar una coagulación, en las dos primeras diluciones del producto, debido al pH, sin embargo las restantes se comportaron de acuerdo a lo previsto.

Los valores de los L.E. nos permiten concluir que el IPEN está elaborando sus productos con buena calidad sanitaria.

## 5. REFERENCIA

- (1) Associates of Cape Cod INC. Simple test vial, for the detection and quantitation of endotoxins, Massachusetts - USA, 1982
- (2) Chavez G. "Demostración de la potencia del reactivo LAL, caracterización del producto y validación" Empresa Científica Andina, Lima Perú, julio 97
- (3) F.D.A. "Guideline on validation of the LAL test as an end-product endotoxins test for human an animal parenteral drugs, biologicalproduct, and medical devices" Validation LAL USA 1987.

## 4. CONCLUSIONES