



OPTIMIZACIÓN DE MÉTODOS DE CONTROL PARA LA LIBERACIÓN DEL
PRODUCTO INYECTABLE ^{18}F FLUORDESOXIGLUCOSA.

Especialización en Radioquímica y Aplicaciones Nucleares

Alumna: Lic. Paula Daniela Cantera

Directora: Bioq. Farm. María Verónica Cerizola

Co-Directora: Bioq. Farm. Patricia Silva Paulo

Enero 2013



UNSAM
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE
SAN MARTÍN

Este trabajo final consiste en una revisión de los métodos de control para la aprobación del producto inyectable ¹⁸Fluordesoxiglucosa.

Los métodos de control tanto del producto terminado como de materias primas, insumos, procesos y controles ambientales en las celdas de producción, están orientados a la liberación paramétrica.

Por eso la finalidad del presente trabajo es determinar los puntos críticos y ensayos que nos permitan especificar la calidad microbiológica del producto elaborado. El mismo se llevó a cabo en la división control de calidad de la Planta de Producción de Radioisótopos del Centro Atómico Ezeiza, Argentina, entre el Martes 27 de Noviembre y el Miércoles 11 de Diciembre del 2012.

AGRADECIMIENTOS

A la Comisión Nacional de Energía Atómica por otorgarme la beca de estudio que me permitió acceder a la Especialización en Radioquímica y Aplicaciones Nucleares. Así mismo, al Instituto de Tecnología Nuclear Dan Beninson por aceptarme como su alumna.

A la Mg. Sandra Siri, coordinadora de la Especialización, por su acompañamiento permanente durante este año. Destaco su motivación, disponibilidad y esfuerzo para que todo se desarrolle de la mejor manera durante la cursada.

A la Mg. María Celeste Fornaciari Ijadica por su disponibilidad permanente para atender mis inquietudes.

A todos los docentes que han dictado clases durante este ciclo lectivo. De todos se aprende algo, de todos aprendí un poquito más de CNEA.

A la Bioq. Farm. María Verónica Cerizola y a la Bioq. Fram. Patricia Silva Paulo, por recibirme en la Planta de Producción de Radioisótopos del Centro Atómico Ezeiza y dirigirme en el trabajo final de la carrera. Les agradezco el esfuerzo realizado para sacar este trabajo adelante, las enseñanzas impartidas y su dedicación.

A mis compañeros de curso: Lic. Franklin Niño Duarte, Lic. Mario Rossi, Lic. Andrea Rojas, Lic. Clarisa López Bularte, Lic. Marisa Trotta, Ing. Patricio Dos Reis. Fue muy grato compartir el estudio y el día a día con ustedes. Gracias por resolver las inquietudes más absurdas... del estudio y de la vida.

A la gente del edificio de Aplicaciones del Centro Atómico Ezeiza, por recibirme tan cordialmente.

A la Señora Karina Socolovsci, por ser una excelente profesional en su trabajo y ser una excelente persona. Gracias por cuidarme tanto y alentarme a nunca bajar los brazos.

A la Dra. Noemí Andreucetti y a la Mg. Mónica Pérez, de la Universidad Nacional del Sur, por comentarme sobre esta especialización y motivarme a realizarla.

A la Universidad Nacional Del Sur, por su formación académica.

A mis padres, hermanas, abuela y amigos que siempre están apoyándome en cada paso de mi vida. Gracias por creer en mí.

A mi marido, Enzo García. Gracias a su apoyo incondicional es más fácil emprender cualquier desafío. Su paciencia y su motivación a seguir adelante fueron fundamentales a lo largo del año. Gracias por ser el mejor compañero de estudio.

INDICE

Resumen	1
Capítulo 1: Introducción	2
Capítulo 2: Desarrollo	4
Capítulo 3: Trabajo experimental y Discusión	23
3.1 Control de calidad biológico: Ensayo de endotoxinas bacterianas	23
3.2 Preparación de placas de petri para controles microbiológicos ambientales	26
3.3 Conclusiones del Capítulo	28
Capítulo 4: Conclusiones	30
Capítulo 5: Anexos	31
Anexo 1: LAL Test	31
Anexo 2: Preparación y esterilización de medios de cultivo.	35
Anexo 3. Limpieza de Celda de Fraccionamiento de ¹⁸ F DG	37
Anexo 4: Preparación de placas de Petri para controles microbiológicos medioambientales.....	43
Capítulo 6: Bibliografía	53

1. INTRODUCCIÓN

Desde el año 2005, la Comisión Nacional de Energía Atómica, comenzó con la producción de ^{18}F FDG, en la instalación productiva Ciclotrón ubicada en el Centro Atómico Ezeiza.

Su implementación desde el principio involucró optimizar un gran número de parámetros y condiciones.

El producto 2-desoxi-2(^{18}F)flúor-D-glucosa solución inyectable es un radiofármaco utilizado específicamente para diagnóstico médico; por tratarse de una molécula de glucosa (marcada en su posición 2 con ^{18}F), se logra una óptima biodistribución; además, su adecuado período de semidesintegración permite realizar los estudios con una mínima dosis para el paciente.

La 2-desoxi-2(^{18}F)flúor-D-glucosa, conocida como ^{18}F FDG, es un análogo de la glucosa, como se muestra en la Figura 1.1.

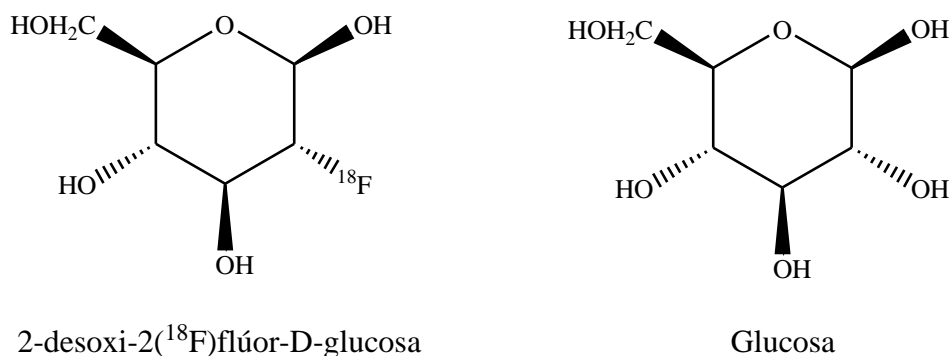


Figura 1.1 Forma estructural de la glucosa y su análogo.

La molécula marcada penetra en el interior de la célula mediante un mecanismo de difusión por medio de proteínas transportadoras de glucosa, para luego ser fosforilada dentro de la célula por acción de la enzima hexoquinasa. Se transforma en FDG-6P, que no puede metabolizarse y queda retenida en el interior de la célula, ya que la única forma que tiene de abandonarla es mediante una desfosforilación por acción de la enzima glucosa-6-fosfatasa, cuya actividad es significativa en el hígado, de forma de que la desfosforilación se desarrolla muy lentamente.

Por lo tanto dentro de un determinado tejido o por un proceso patofisiológico, la retención y eliminación de la ^{18}F FDG, refleja un balance entre las actividades del transportador de glucosa, hexoquinasa y glucosa-6-fosfatasa.

Cuando se toma en consideración las diferencias cinéticas entre el transporte y la fosforilación de la glucosa y de la 2-desoxi-2(^{18}F)flúor-D-glucosa, ésta puede ser utilizada para el estudio del metabolismo de la glucosa. En comparación con la actividad de fondo de

Los tipos de órganos o tejidos específicos, las regiones con captación de radiotrazador disminuida o nula, reflejan el decrecimiento o ausencia de metabolismo de la glucosa. Por el contrario las regiones de captación incrementadas reflejan tasas de metabolismo aumentadas.

En cáncer, las células se caracterizan generalmente por poseer un metabolismo de glucosa aumentado parcialmente atribuible a:

- Incremento de la actividad de los transportadores de glucosa
- Incremento de la tasa de fosforilación
- Disminución de la actividad de fosfatasa
- Alteración dinámica en el balance entre todos estos procesos.

Sin embargo, el metabolismo de glucosa en células cancerosas como reflejo de la acumulación de ^{18}F FDG muestra una variabilidad considerable. Dependiendo del tipo de tumor, el estadio y localización, la acumulación de la ^{18}F FDG puede ser aumentada, disminuida o ser normal. También los procesos inflamatorios pueden presentar una variabilidad similar con respecto a la acumulación de la ^{18}F FDG.

La 2-desoxi-2(^{18}F)flúor-D-glucosa es el radiotrazador más utilizado para efectuar estudios de PET (Positron Emission tomography), empleándose para el diagnóstico de patologías cerebrales, óseas, hepáticas, pancreáticas, pulmonares, renales, dérmicas, tiroides, cánceres de pequeños conductos biliares, cáncer de mama y metástasis de nódulos linfáticos, axilares, carcinoma de colon y recto, y otros.

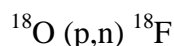
La ^{18}F FDG es una solución acuosa estéril, adecuada para la administración intravenosa. Contiene no menos del 90,0 por ciento y no más del 110,0 por ciento de la cantidad declarada de ^{18}F por ml a la hora indicada en el etiquetado. Puede contener agentes conservantes y/o estabilizantes.

2. DESARROLLO

A continuación se describirá el método de síntesis y purificación de la 2-desoxi-2- (^{18}F) flúor-D-glucosa.

- Paso 1. Obtención de ^{18}F .

El isótopo de número de masa 18 del Flúor se produce por irradiación con protones acelerados en el ciclotrón¹, del isótopo de número de masa 18 del oxígeno, bajo la forma de agua enriquecida en ese isótopo (H_2^{18}O). El ^{18}F se obtiene como ion fluoruro en medio acuoso. La reacción nuclear que se lleva a cabo se simboliza:



El núcleo de ^{18}F desintegra por captura electrónica (3 %) y emisión beta positiva (97 %) al nivel fundamental de ^{18}O con un período de semidesintegración de 109.726 minutos². La partícula beta positiva emitida (positrón, 0,6 MeV) se aniquila con un electrón emitiendo dos rayos gamma de 511 keV cada uno, en la misma dirección pero sentido opuesto.

El H_2^{18}O es alojada en un portablanco de Niobio cuya capacidad volumétrica del mismo es de 2,5 ml, ubicada en la estación de blancos líquidos del Ciclotrón. La irradiación se realiza con un haz de protones de energía de 16 MeV durante un período de 1 a 2 horas y aplicando una corriente de 30 μA .

Una vez obtenido el ^{18}F , se lleva a cabo la síntesis de ^{18}F FDG. El ^{18}F es enviado desde el blanco ubicado en la sala de irradiación hacia el módulo de síntesis, ubicado en el laboratorio de producción, a través de una tubería de teflón empleando un flujo de gas Argón.

El módulo de síntesis, mediante un programa computarizado, realiza todas las operaciones, desde la retención del ^{18}F hasta la obtención de ^{18}F FDG y su posterior dispensado a la celda de fraccionamiento.

- Paso 2. Purificación de $(^{18}\text{F})\text{F}^-$.

El $(^{18}\text{F})\text{F}^-$ producido por la reacción nuclear mencionada en el paso 1, se separa del restante H_2^{18}O usando una columna de intercambio aniónico. Los iones fluoruro se absorben en la resina mientras que el agua enriquecida en ^{18}O fluye a través de ella, siendo recogida en un recipiente apropiado.

¹ Acelerador de partículas circular ubicado en el Centro Atómico Ezeiza.

² Table of Isotopes. Seventh edition. C. Michel Lederer and Virginia S. Shirley

Para la elución del F⁻ retenido se usa solución de carbonato de potasio y acetonitrilo. Se utiliza un catalizador de transferencia de fase Kryptofix® para transportar el fluoruro a la fase orgánica, en la que se produce la reacción de síntesis de ¹⁸FDG.

En medio acuoso, cualquier especie con carga negativa tiene que estar acompañada de una especie de carga positiva. Esta última tiene la función de devolver la reactividad al fluoruro. Kryptofix 222 es un éter corona al cual se une el catión potasio, evitando la formación de fluoruro de potasio.

- Paso 3. Preparación de la sustitución nucleofílica.

El agua no es un buen solvente para llevar a cabo la reacción de marcación, ya que el fluoruro posee un elevado poder de hidratación en este medio. La solución debe evaporarse y secarse en forma cuantitativa para asegurarse de que no queda agua. El anión ⁻OH originado por la disociación de agua compite con el anión F⁻ durante la reacción y reduce considerablemente el rendimiento de la reacción de obtención de ¹⁸FDG.

El secado se realiza por medio de la destilación azeotrópica del agua con acetonitrilo. Para eliminar los restos de agua, la destilación va seguida de evaporación al vacío.

- Paso 4. Sustitución nucleofílica bimolecular (S_N2).

En esta fase, se añade al vaso de reacción el precursor FDG: 1, 3, 4, 6-tetra-O-acetilo-2-O-trifluorometanosulfonil-β-D-manopiranososa (Triflate manosa), disuelto en acetonitrilo. El fuerte anión triflato (trifluorometano sulfonilo) en posición C2 se sustituye en presencia de Kryptofix 222 (que actúa como catalizador) por F⁻. Los grupos protectores (en posición C1, C3, C4 y C6) son grupos acetilo.

La reacción de marcación, la cual se esquematiza en la Figura 2.1, consiste en un ataque nucleofílico bimolecular por parte del ión fluoruro, sobre el triflate de una molécula de manosa acetilada.

El ión fluoruro sale de la columna de separación aniónica como fluoruro de potasio, desplazado por el anión carbonato.

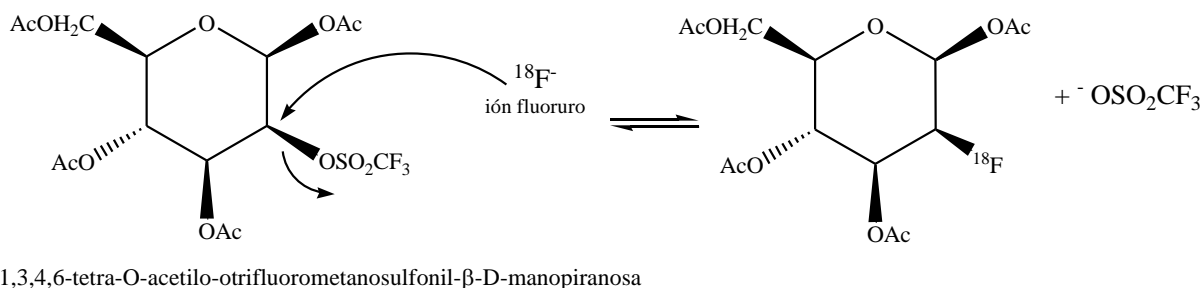


Figura 2.1 Reacción de marcación: Sustitución nucleofílica bimolecular.

La reacción tiene lugar a 85 °C durante 5 minutos.

Tras la sustitución completa, el acetonitrilo tóxico debe retirarse cuantitativamente. Nuevamente se emplea una destilación seguida de evaporación al vacío para la eliminación del solvente.

- Paso 5. Hidrólisis.

Se aplica hidróxido de sodio para eliminar todos los grupos protectores del producto de la reacción 2- ^{18}F]fluoro-1,3,4,6-tetra-O-acetilo-D-glucosa. La reacción ilustrada en la Figura 2.2 es un ejemplo de eliminación de grupos acetilo mediante hidrólisis básica, la cual tiene lugar a temperatura ambiente. El producto de reacciones 2-desoxi-2- (^{18}F)flúor-D-glucosa.

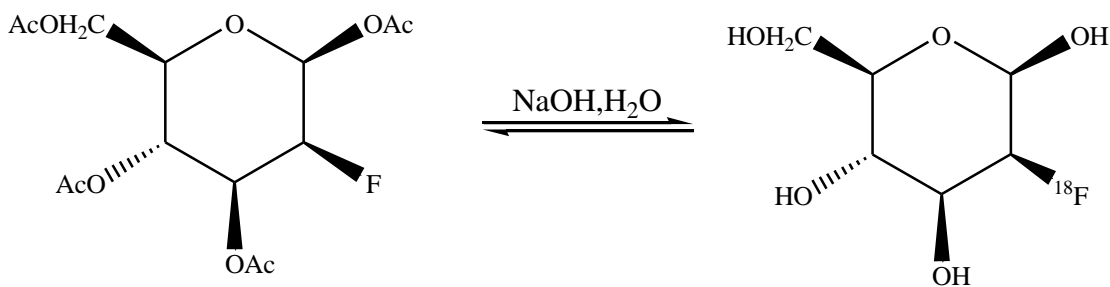


Figura 2.2 Hidrólisis básica

- Paso 6. Purificación cromatográfica.

Para separar la ^{18}F FDG de productos orgánicos derivados, K222, aniones fluoruros tras la hidrólisis, se envía la solución diluida en agua calidad inyectable a un tren de columnas de resinas y agentes de purificación cuya composición y funciones se detallan a continuación: 50WX8, retención del agente criptante K222; AG 11 neutraliza el pH; Alúmina: retención

de ^{18}F libre; C-18 retención de K222 y de posibles intermediarios orgánicos. En la Figura 2.3 se muestra un esquema de la columna para cromatografía líquida.

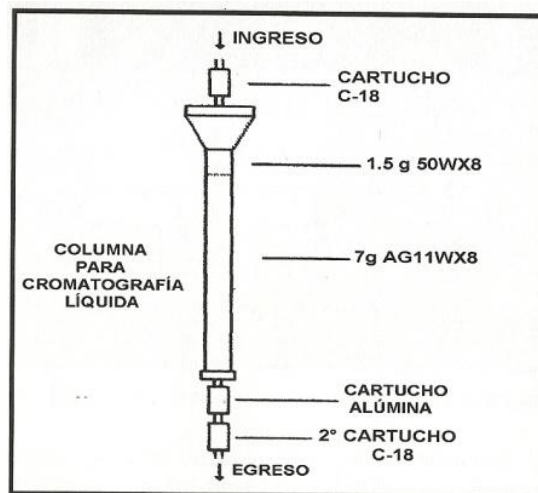


Figura 2.3

El producto 2-desoxi-2-(^{18}F)flúor-D-glucosa purificada se transfiere, por medio de tuberías de teflón, empleando gas Argón, a un batch estéril de 30 ml, que contiene solución isotónica. Ubicado en la celda de fraccionamiento, a partir del cual es fraccionado en viales estériles y apirógenos de 10 ml, de acuerdo a los requerimientos de números de dosis solicitadas por los usuarios. Una dosis contiene una actividad calibrada en el laboratorio de 30 mCi, que equivale a unos 20 mCi en el destino del usuario (centros de medicina nuclear).

En la Figura 2.4 se muestra el proceso de producción de la ^{18}F FDG.

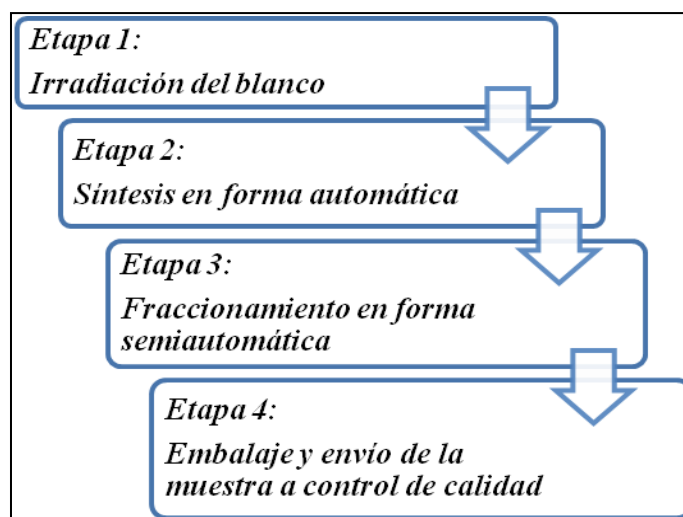


Figura 2.4 Proceso de producción de ^{18}F FDG

La muestra obtenida en la Etapa 4 consiste en una fracción del producto final, la cual será analizada por el laboratorio de control de calidad. El objetivo de este análisis será dar la aprobación o rechazo del producto en función del cumplimiento o no de las especificaciones.

Los requerimientos de calidad para la ¹⁸FDG se describen en las farmacopeas de cada país o región: USP (United States Pharmacopeia), BP (British Pharmacopeia), EP (European Pharmacopeia), CMC (Chemistry, Manufacturing and Controls dependiente de la FDA, food and drug administration). Una farmacopea es una fuente de autoridad para el aseguramiento de la calidad.

La Farmacopea Argentina es el libro oficial donde se prescriben las drogas, medicamentos y productos médicos necesarios o útiles para el ejercicio de la medicina y la farmacia, especificando lo concerniente al origen, preparación, identificación, pureza, valoración y demás condiciones que aseguran la uniformidad y calidad de las propiedades de los mismos. Se basa en las farmacopeas mencionadas anteriormente, y su confección y actualización está a cargo de la Asociación Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnologías médicas (ANMAT), la cual depende del Ministerio de salud de la Nación.

A continuación se listan los controles de calidad descriptos en la Farmacopea USP 34 a los que hay que someter al producto final:

Análisis	Valores de aceptación
Apariencia	Solución incolora, transparente libre de partículas visibles
pH	4.5 – 7.5
Pureza radioquímica	≥ 90 %
Identificación radioquímica	Valor de R _f aproximado : 0,4
Pureza radionucleídica	≥ 99.5 % de emisión gamma corresponde a ¹⁸ F: 0,511 MeV, 1,022 MeV o Compton
Identificación	Período de semidesintegración: 105-115 minutos
Pureza química	Límite de Kryptofix ≤ 50 µg/ml
Disolventes residuales	≤0.04% de acetonitrilo, ≤ 0.5% etanol y ≤ 0.5 % acetona
Esterilidad	No se observa desarrollo de microorganismos
Endotoxinas bacterianas	< 175 EU/V

- **Aspecto**

En una cama radioquímica, con visor de vidrio plomado, se saca del blindaje, por medio del uso de telepinzas, el vial conteniendo el producto ^{18}F FDG. Se realiza la inspección visual del contenido del vial.

Criterio de aceptación: Solución incolora, transparente libre de partículas visibles.

- **Ensayos de identificación**

- Identidad radionucleídica: Su período de semidesintegración, determinada con el empleo de un sistema detector apropiado, es de 105 a 115 minutos. (Es importante aclarar que el período de semidesintegración sirve para identificar al Flúor ya que el pico en 511Kev que se observa en el multicanal puede corresponder a otros emisores de positrones).
- Identidad radioquímica: El valor de R_f ^{18}F -Fluordesoxiglucosa en el cromatograma de la solución de prueba se corresponde con el valor del cromatograma de la solución estándar, según se obtienen en la prueba de pureza radioquímica.

- **Endotoxinas bacterianas.**

Para la determinación semicuantitativa de endotoxinas se recomienda el LAL Test: ensayo del lisado de amebocitos de Limulus, también conocido como método de Gel Clot. Es una técnica de coagulación en la que el contenido de endotoxinas de la muestra se determina por comparación con una curva de concentraciones de endotoxina conocida. Para más detalles ver Capítulo 5 Anexo 1. En el capítulo 3.1 se muestra un ejemplo de la aplicación del procedimiento que se realiza en el laboratorio de control de calidad.

- **pH:** entre 4,5 y 7,5

- **Pureza radioquímica**

Tanto el ^{18}F libre como ^{18}F DM (flúor deoxi manosa) pueden obtenerse al fin de la síntesis si la temperatura de reacción no es la adecuada.

Solución estándar- Disolver 10 mg de ER Fluodesoxiglucosa patrón en 100 ml de acetonitrilo y agua (95:5). (El ER Fluodesoxiglucosa patrón que se especifica en esta prueba es 2-desoxi-2-fluoro-D-glucosa no radiactiva de peso molecular 182,15).

Solución de prueba- Emplear la inyección

Procedimiento- Aplicar un volumen de inyección, diluido adecuadamente para obtener una tasa de conteo adecuada para el sistema de detección de radiactividad empleado, en una placa para cromatografía en capa delgada con gel de sílice activado. Aplicar aproximadamente 10 μl de la solución estándar a la misma placa cromatográfica. Desarrollar el cromatograma con una fase móvil constituida por una mezcla de acetonitrilo y agua (95:5) hasta que la fase móvil haya recorrido aproximadamente tres cuartos de la longitud de la placa. Retirar la placa y dejar que el cromatograma se seque. Determinar la distribución de radiactividad mediante barrido del cromatograma con un detector de radiación colimada. Determinar la ubicación de la Fluodesoxiglucosa rociando la placa cromatográfica con ácido sulfúrico 2N y calentando la placa a 110° durante 10 minutos. El valor de R_f de la ^{18}F –Fluodesoxiglucosa se corresponde con el valor de la solución estándar (aproximadamente 0,4); la radiactividad de la ^{18}F – Fluodesoxiglucosa no es menor de 90 % de la radiactividad total del mismo. En la Figura 2.5 se muestra una foto de la mesada de trabajo:



Figura 2.5 Mesada de trabajo para realizar la cromatografía. Hay que tener presente las normas de protección radiológicas.

- **Pureza radionucleídica.**

La impureza ^{13}N proveniente de la reacción $^{18}\text{O}(\text{p},\alpha)^{13}\text{N}$ puede detectarse si no se utiliza la purificación previa del ^{18}F por intercambio aniónico.

Consiste en conocer la fracción porcentual de radiactividad del ^{18}F de la preparación radiofarmacéutica en relación a su radiactividad total. Con un espectrómetro de rayos gamma adecuado (detector de Germanio Hiperpuro), contar una alícuota de la inyección durante un período de tiempo suficiente para obtener un espectro gamma. Analizar el espectro gamma resultante para identificar la presencia de fotopicos no característicos de las emisiones de ^{18}F . No menos del 99,5 % de las emisiones gamma observadas deben corresponder a 0,511 MeV, 1,022 MeV o a dispersión Compton.

- **Pureza química**

Se basa en la determinación cualitativa y cuantitativa de productos químicos presentes en la composición de los radionucleídos y/o radiofármacos.

- *Límite de aminopolieter (Kryptofix)*

Este compuesto empleado como catalizador en la síntesis de ^{18}F FDG, no debe estar presente en el producto final dado que causa apnea y convulsiones.

Se realiza un ensayo rápido y sencillo para su identificación. El mismo consiste en sembrar en una capa de 0,25 mm de gel de sílice para cromatografía, una gota de la inyección y una gota de solución patrón de Kryptofix. Colocar la placa en una cámara que contenga cristales de yodo, para revelar la mancha en el punto de siembra de la solución patrón. El resultado del ensayo es negativo (es decir, el producto final no presenta Kryptofix) si hay ausencia de mancha en el punto de siembra de la inyección. Si ocurre lo contrario, el resultado es positivo. Si se presenta una situación dudosa se procede de la siguiente manera:

Absorbente: Capa de 0,25 mm de gel de sílice para cromatografía. Solución de prueba: emplear la inyección. Solución estándar: Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ER compuesto Kryptofix sigma, en solución salina SR para obtener una solución cuya concentración será de 25 $\mu\text{l}/\text{ml}$. Volumen de aplicación: aproximadamente 1 μl . Fase móvil: una mezcla de metanol e hidróxido de amonio al 30 %.

Procedimiento: Colocar la placa en una cámara que contenga cristales de yodo. Desarrollar la placa hasta observar una mancha en el cromatograma de la solución estándar: el tamaño

y la intensidad de la mancha obtenida a partir de la solución de prueba no excede el tamaño y la intensidad de la mancha obtenida a partir de la solución estándar.

- **Disolventes residuales**

Solución estándar- Preparar por separado soluciones acuosas de acetona, acetonitrilo y alcohol deshidratado con concentraciones conocidas de 0,1 %, 0,01 % y 0,1 % respectivamente.

Solución de prueba- Emplear inyección.

Sistema cromatográfico- Equipo: cromatógrafo gaseoso; Detector: ionización en llama; Fase estacionaria: G 16 químicamente estructurada de 0,25 µm; Fase móvil: gas helio, que fluye a una velocidad de 10 ml por minuto.

Procedimiento- Programar el cromatógrafo de la siguiente manera: gradiente de temperaturas, inicialmente a 40 ° C durante 2 minutos, luego aumentarla a una velocidad de 20 ° C por minuto hasta 130 ° C durante 5,5 minutos. Mantener la temperatura del inyector y del detector a 250 ° C y 300 ° C respectivamente. Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (1 µl) de las soluciones estándar y de prueba, registrar los cromatogramas y medir las respuestas correspondientes a los picos.

Criterios de aceptación- no se encuentra más de 0,04 % de acetonitrilo; no más de 0,5 % de acetona; y no más de 0,5 % de alcohol.

- **Valoración de radiactividad**

Emplear un sistema calibrado, cámara de ionización, y determinar la actividad de la inyección en MBq o mCi por ml.

- **Prueba de esterilidad**

Ensayo de esterilidad por el método de siembra directa

A continuación se detalla el procedimiento operativo:

- Como parte del control ambiental de la campana de flujo laminar durante el ensayo de esterilidad, se colocan en la misma una placa de AT (medio de cultivo Agar Triptosado de soja) y una placa AS (medio de cultivo Agar Sabureau) abiertas durante todo el ensayo. Las placas serán ubicadas en las esquinas de la campana, contra el fondo de la misma. Una vez finalizado el ensayo, se taparán estas placas de control y se incubarán no menos de 5 días a la temperatura correspondiente. Rotular las mismas con nombre del producto a controlar, CONTROL y fecha. En la

Figura 2.6 y 2.7 se muestran la campana de flujo laminar y las placas de control, respectivamente.



Figura 2.6 Campana de flujo laminar

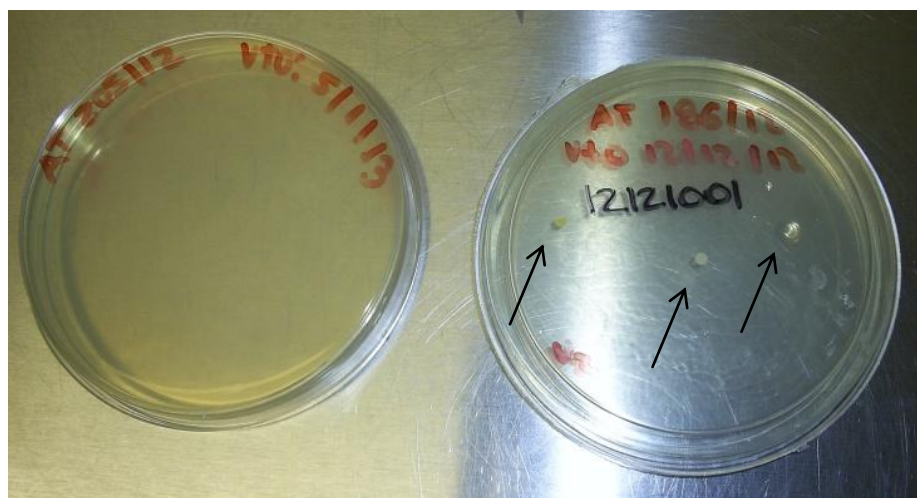


Figura 2.7 Placas para control ambiental. La de la izquierda no muestra crecimiento, mientras que la de la derecha presenta tres colonias.

- Corroborar que la limpieza del área de trabajo se haya realizado según el procedimiento correspondiente y que la luz UV de la campana de flujo laminar se haya apagado antes de ingresar al laboratorio.
- Colocar los siguientes elementos dentro del pass-box que se encuentra en el laboratorio y cerrar bien la puerta del mismo: tubos de ensayo, adecuados para el ensayo de esterilidad con medio de cultivo Tioglicolato "T" y Caseína de soja "TSB", los cuales se muestran en la Figura 2.8 (ver preparación medios de cultivos en Capítulo 5 Anexo 2); gradillas sanitizadas o estériles; jeringas y agujas estériles sanitizadas; marcadores indelebles sanitizados.



Figura 2.8 Tubos de ensayo para la prueba de esterilidad.

- El número mínimo de artículos a evaluar depende del tamaño del lote. La producción de la planta es menor a 100 envases por lote y corresponde evaluar el 10 % o 4 envases, lo que resulte mayor (USP 34).
- La cantidad mínima a usar para cada medio depende del volumen contenido en el envase: si es menor a 1 ml se sembrará la totalidad del volumen contenido en el envase. Si el contenido está entre 1-40 ml se sembrará la mitad del contenido en cada envase pero no menos de 1 ml (USP 34).
- Al ingresar al área limpia a trabajar, cumplir con las condiciones de vestimenta e higiene para el ingreso área limpia del laboratorio de microbiología.

- Una vez dentro del área limpia del laboratorio y con la campana de flujo laminar prendida, abrir la puerta interna del pass-box, retirar los elementos y colocarlos dentro de la campana de flujo laminar satinizandolos previamente con solución de alcohol al 70 %. En la Figura 2.9 se muestra una imagen del pass- box.



Figura 2.9 Pass-box

- Tomar el tubo rotulado como "T", abrirlo y transferir con jeringa directamente en el medio de cultivo la mitad del volumen total de muestra teniendo la precaución de que el volumen no sea mayor al 10 % del volumen total del medio.
- Tapar el tubo, rotularlo con el nombre del elemento testeado, el número de lote y la fecha de ensayo. Colocarlo en la grilla.
- Repetir el procedimiento con el tubo rotulado como TSB.
- Una vez finalizado todo el ensayo, cerrar las placas de control ambiental y rotularlas.
- Colocar la gradilla con las muestras y el resto de los elementos utilizados en el pass-box. Salir del área limpia.
- Sacar las muestras del pass-box, ya fuera del área limpia y ponerlas a incubar. Los tubos rotulados como TSB se incuban en estufa a una temperatura de $22,2^{\circ}\text{C} \pm 2,5$

° C durante 14 días y los tubos de ensayo rotulados como "T" se incuban en estufa a una temperatura de $32,2\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 14 días.

Ensayo de esterilidad por el método de filtración por membrana

En esta técnica se utiliza un equipo ensamblado que consiste en un embudo para recibir la muestra, un porta membrana dentro del cual se coloca una membrana de 47 mm de diámetro y un diámetro de poro de $0,45 \pm 0,2\text{ }\mu\text{m}$. Para soluciones acuosas será de nitrato de celulosa y para soluciones con alto contenido alcohólico será de acetato de celulosa. Se coloca un recipiente cerrado para recoger el filtrado, conectado por una manguera a una bomba de vacío. Todo este equipo debe desensamblarse, lavarse y envolverse en doble bolsa de papel para autoclave cada una de sus partes y esterilizarse. Las membranas a usar, si no vienen esterilizadas previamente, deben envolverse en doble bolsa de papel para autoclave y esterilizarse.

- Corroborar que la limpieza del área de trabajo se haya realizado según el procedimiento correspondiente y que la luz UV de la campana de flujo laminar se haya apagado antes de ingresar al laboratorio.
- Colocar los siguientes elementos dentro del pass-box que se encuentra en el laboratorio y cerrar bien la puerta del mismo: paquetes esterilizados conteniendo los componentes del filtro; paquetes con las membranas estériles a utilizar; frascos shott con medio de cultivo; Pinza abridora y pinza cerradora de viales; tijera y pinza esterilizadas previamente, envueltas en doble bolsa para el proceso de esterilización; marcadores indelebles.
- El número mínimo de artículos a evaluar depende del tamaño del lote. La producción de la planta es menor a 100 envases por lote y corresponde evaluar el 10 % o 4 envases, lo que resulte mayor (USP 34).
- La cantidad mínima a usar para cada medio depende del volumen contenido en el envase: si es menor a 1 ml se sembrará la totalidad del volumen contenido en el envase. Si el contenido está entre 1-40 ml se sembrará la mitad del contenido en cada envase pero no menos de 1 ml (USP 34).
- Al ingresar al área limpia a trabajar, cumplir con las condiciones de vestimenta e higiene para el ingreso área limpia del laboratorio de microbiología.
- Sacar de las bolsas los componentes del filtro y la membrana.
- Ensamblar sobre el kitasato, el portafiltros con la membrana y el embudo.
- Conectar la manguera por un extremo al adaptador del kitasato y por el otro extremo a la bomba de vacío y prenderla.

- Abrir, con la pinza abridora si fuera necesario, el vial que contiene la muestra a evaluar y vaciar el contenido dentro del embudo para que el líquido de muestra filtre por la membrana y quede retenido en el kitasato.
- Una vez que la muestra haya filtrado por completo, quitar el embudo superior, tomar el soporte de la membrana y quitar la membrana del interior del mismo con la pinza estéril.
- Cortar la membrana por la mitad con la tijera estéril. Destapar el frasco y colocar una de las mitades dentro del medio de cultivo y rotularlo como "TSB". Tapar el frasco.
- Colocar la segunda mitad de la membrana en un segundo frasco rotulado como "T".
- Rotular los frascos conteniendo las membranas con el nombre del producto analizado el número de lote y la fecha del ensayo.
- Una vez finalizado todo el ensayo, colocar los frascos y el resto de los elementos utilizados en el pass-box. Salir del área limpia.
- Sacar las muestras del pass-box, ya fuera del área limpia y ponerlas a incubar. Los tubos rotulados como TSB se incuban en estufa a una temperatura de $22,2\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 14 días y los tubos de ensayo rotulados como "T" se incuban en estufa a una temperatura de $32,2\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 14 días.
- Lavar la tijera, la pinza y cada una de las partes del filtro, secarlas muy bien y colocarlas nuevamente en doble bolsa para autoclave, quedando así listas para volverlas a esterilizar para un nuevo uso.

Control negativo

- Tomar dos tubos de ensayo con medio de cultivo y rotular cada uno como "TSB" y "T", agregando la fecha en que comienza la incubación.
- Los tubos rotulados como TSB se incuban en estufa a una temperatura de $22,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 14 días y los tubos de ensayo rotulados como "T" se incuban en estufa a una temperatura de $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 14 días.
- El medio, luego del período de incubación, no debe presentar crecimiento de ningún microorganismo para que este sea estéril. Si llega a haber contaminación, el ensayo de esterilidad se considerará inválido y debe repetirse.

Observación e interpretación de resultados

- Los tubos de ensayo con las muestras deber ser observados diariamente y al momento de finalización del período de incubación.
- Si no se hallan pruebas de crecimiento microbiano, el producto cumple con la prueba de esterilidad.
- Si se hallan pruebas de crecimiento microbiano, el producto no cumple con la prueba de esterilidad a menos que pueda demostrarse que la prueba resultó inválida.
- La prueba resultará inválida en caso de producirse desvíos tales como: que se observe crecimiento en las placas de control ambiental correspondientes a ese ensayo; que de la revisión de los procedimientos surja un error en la ejecución de los mismos; que se observe crecimiento en los tubos de control negativo; en el caso que se invalide se repetir el análisis. Si no se determina la causa se tomará como resultado fuera de especificación (OOS) y se realizará la investigación correspondiente.

Debido al corto período de semidesintegración de la ¹⁸FDG, no todos los ensayos listados alcanzan a concluir antes de la liberación al mercado del producto final. Las farmacopeas permiten la liberación de ¹⁸FDG antes de que el ensayo de pureza radionucleídica, el ensayo de endotoxinas y el ensayo de esterilidad concluyan. A esto se lo denomina liberación paramétrica, la cual se fundamenta en la validación del método de producción. Esta validación implica: conocimiento de puntos críticos en la producción, automatización del sistema de producción, personal entrenado, calibración periódica de equipos, empleo de materias primas de calidad adecuada, proveedores calificados, etc.

Para poder alcanzar esta liberación es necesario optimizar los controles de calidad durante el proceso de producción del inyectable. Esta optimización implica, además de los controles del producto terminado:

- Control del área de producción
- Control del envase
- Control de las materias primas
- Control de esterilización.

Control del área de producción

Con respecto al Control del área de producción, al tratarse de una solución inyectable, el programa de monitoreo ambiental debe utilizarse como parte del programa de aseguramiento de la esterilidad.

Las condiciones mínimas para el correcto control de área productiva son:

- Procedimientos normativos para la limpieza del área, sanitización y desinfección (Ver Capítulo 5, anexo 3).
- Establecer el tiempo de contacto con los desinfectantes utilizados, de acuerdo a los microorganismos ambientales que se desean eliminar, tipo de superficie a tratar, forma de aplicación, toxicidad y residuos.
- Validación del método de limpieza, donde debo tener en cuenta características de las superficies o áreas que debo limpiar /sanitizar, el desinfectante utilizado, concentración y tiempo de contacto con el mismo. Luego realizar un monitoreo químico y microbiológico para asegurar que el resultado de la sanitización fue el esperado con respecto a la disminución de la carga microbiana y no quedan residuos químicos que puedan afectar al producto que se quiere elaborar en el lugar.

El monitoreo microbiológico se puede realizar utilizando la técnica de hisopado de superficies o por controles ambientales con placas Rodac o sedimentación espontánea con medios de cultivos para crecimiento de microorganismos selectivos.

- Determinar los puntos críticos de muestreo de las áreas (por ejemplo cercano al sas de ingreso de insumos a la celda, superficies cercanas al batch de producción, etc), que sitios representan los lugares más difíciles de limpiar.
- Determinar la frecuencia de muestreo de las áreas.
- Realizar monitoreo de aire, partículas viables y no viables

Control del envase

El envase primario es un vial con capacidad de 10 ml, transparente de vidrio borosilicato tipo I, con cierre hermético. Los tapones son de bromobutilo, color gris. Virolas de aluminio de 20,5 mm de diámetro y 5,5 mm de altura. En la Figura 2.10 se muestran los planos del vial y los tapones.

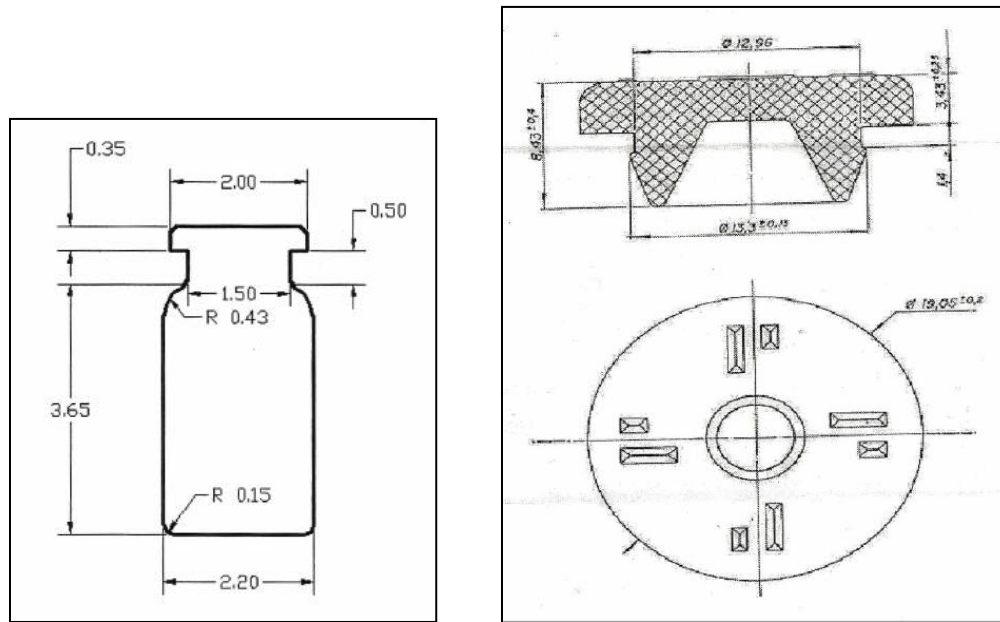


Figura 2.10 Plano del vial (medidas expresadas en cm) y del tapón (medidas expresadas en mm).

Métodos de Control para frascos- El muestreo se realiza según procedimiento interno.

- Resistencia hidrolítica de la superficie del vidrio.
- Contenido de arsénico.

Métodos de control para tapones- El muestreo se realiza según procedimiento interno.

- Acidez o alcalinidad.
- Absorbancia.
- Amonio.
- Sustancias reductoras.
- Fragmentación.

Métodos de control para precintos- El muestreo se realiza según procedimiento interno.

- Inspección visual.
- Cierre de frascos.

Se deberá controlar el blindaje que transportara al envase primario, el cual se basa en una inspección visual.

Control de materias primas

Manosa Triflate- Determinación del punto de fusión. Especificación: 120,0-120,6 ° C.

Kryptofix- Ensayo de identificación mediante cromatografía en capa fina, en comparación con un estándar.

Carbonato de potasio- Identificación de carbonatos: Si se le agrega unas gotas de HCl 3N se produce efervescencia. Si el gas liberado se hace burbujear sobre una solución de hidróxido de calcio se debe formar un precipitado blanco para cumplir con las especificaciones. *Identificación de potasio:* en soluciones de sales de potasio neutra, concentradas o moderadamente concentradas, el bitartrato de sodio produce un precipitado blanco cristalino que es soluble en hidróxido de amonio 6 N.

Acetonitrilo- Ensayo de identificación mediante cromatografía gaseosa, en comparación con un estándar.

Agua para inyección- Ensayo de esterilidad por el método de membrana filtrante. Endotoxinas bacterianas.

Control de esterilización

Dado que la ^{18}FDG es un radiofármaco inyectable debe ser estéril y apirógeno Como la liberación de ^{18}FDG y su inyección en el paciente se realiza antes de que los ensayos de esterilidad mencionados anteriormente hayan concluido, se necesita una prueba que brinde un pronto resultado para asegurar de manera indirecta la esterilidad

Un método de esterilización es empleando un autoclave, exponiendo al producto final a 120 ° C durante 20 minutos. En el caso de la ^{18}FDG no es un método útil dado el corto período de semidesintegración del ^{18}F , el cual es comparable con el tiempo que se necesita para llevar adelante la esterilización. Además, la estructura de química de la molécula marcada es sensible a la temperatura.

Otro método de esterilización, el cual es empleado en el proceso de producción estudiado, se basa en una filtración en la fase final de la producción, empleando una membrana de tamaño de poro adecuado para la retención de microorganismos. En este caso se emplean filtro Milipore con diámetro de poro de 0,22 μm . El análisis de este filtro permitirá conocer si el producto final es estéril o no. Equipos e insumos: Se utilizará un manómetro de rango 0-150 Psi. Los insumos empleados son: agua destilada, jeringas de 10 ml, guantes de látex, vaso de precipitado de 100 ml, aire comprimido.

- Los filtros utilizados en producción serán recibidos por el personal de control de calidad y deberán estar embalados dentro de bolsas plásticas transparentes, en forma individual. Cada bolsa deberá estar etiquetada con el nombre del producto, número de lote del producido y fecha de producción.
- Adecuación del filtro: colocar al filtro una jeringa, pasar 20 ml de agua destilada en forma pareja y constante humedeciendo así toda la membrana descartando dicha agua en un vaso de precipitado. No realizar el ensayo con el filtro seco.

- Determinación del punto de burbuja. El equipo se encuentra conectado a la salida el aire comprimido y consta de un manómetro y una conexión mediante una jeringa a la cual se une el filtro a testear. En el otro extremo del filtro se coloca la manguera que forma parte del equipo, que se hará burbujear en agua destilada en un vaso de precipitados de 100 ml. Una vez conectado, incrementar la presión gradual y lentamente hasta observar la salida de burbujas en el agua. En el momento en aparezca la primera burbuja, observar el manómetro y registrar la presión observada. En la Figura 2.11 se muestra el equipo empleado en esta determinación.

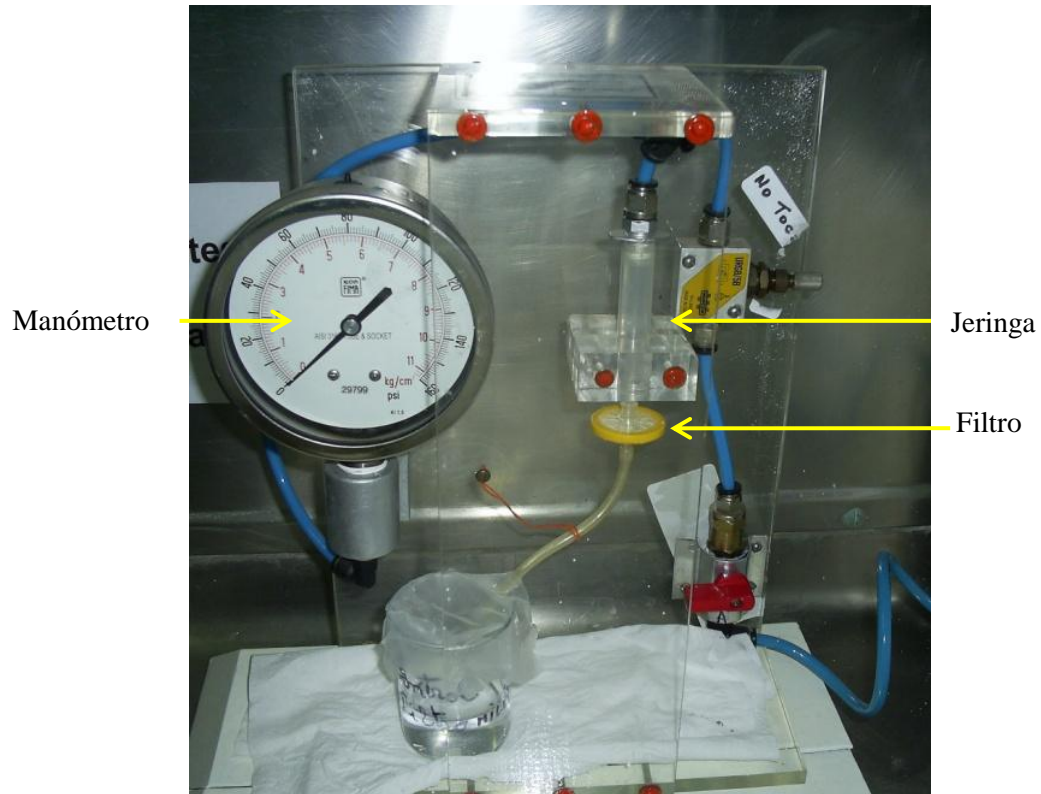


Figura 2.11

- La presión mínima aceptable para la prueba de punto de burbuja para un filtro de 0,22 μm es de 50 Psi o 3,5 Kg/cm^2 .-

3. TRABAJO EXPERIMENTAL Y DISCUSIÓN

Es esta sección se incluirán las experiencias que la alumna pudo realizar en la planta de producción de radioisótopos del Centro Atómico Ezeiza, bajo la supervisión de la Bioq. Farm. María Verónica Cerizola y la Bioq. Farm. Patricia Silva Paulo.

Cabe aclarar que ninguna de las experiencias se realizó con material radiactivo, dado que la alumna no cuenta con los permisos necesarios para hacerlo. Se trabajó en frío, lo cual no afecta los resultados finales.

3.1 Control de calidad biológico: Ensayo de endotoxinas bacterianas.

El objetivo de realizar este ensayo es que el alumno se familiarice con los ensayos microbiológicos, siguiendo un procedimiento establecido, y pueda sacar conclusiones sobre el mismo.

Se realizó la determinación de endotoxinas bacterianas empleando el método de gel clot siguiendo el procedimiento descrito en el método de control MC-PT-0014/01-ATN31-C2 Rev.: 0, el cual se detalla en el Capítulo 5 Anexo 1. Las muestras de ¹⁸FDG empleadas correspondían a diferentes lotes.

Los insumos empleados para este ensayo fueron: Endotoxina ENDOSAFE Lote EM 11302 y Lisado ENDOSAFE Lote 1252 L.

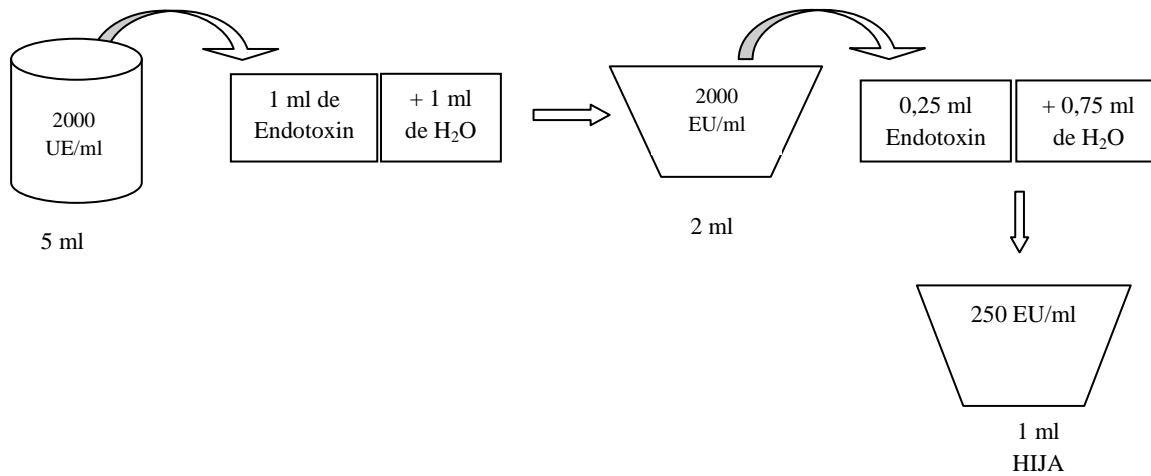
La endotoxina se adquiere en forma liofilizada, dentro de un vial. El fabricante de la misma expide un certificado en el momento de la compra que indica su concentración. En este caso, este valor es de 2000 EU/ml. Además, señala la cantidad de agua apirógena que hay que agregarle al liofilizado para reconstituirlo.

En este caso se agregó 5 ml de agua apirogenada y se dejó reposar para lograr su hidratación. Luego, se agito enérgicamente en un Vortex durante 5 minutos.

El lisado posee una sensibilidad (λ) de 0,125 UE/ml. También se presenta como un liofilizado, el cual se reconstituye con agua apirógena.

Como se menciona en el Anexo 1, es necesario construir una curva que permitirá conocer la sensibilidad del lisado. Para ello, es necesario preparar una solución hija de concentración menor a la solución inicial. Se realizaron las siguientes diluciones:

Optimización de métodos de control para la liberación del producto inyectable ¹⁸FDG



A partir de la solución hija se fueron realizando diluciones sucesivas empleando agua apirógena, como se muestra en la siguiente tabla:

Tubo	Endotoxina	Agua LAL	Dilución	EU/ml
1	0,25 ml de hija	2,25 ml	1/10	25
2	0,25 ml de tubo 1	2,25 ml	1/10	2,5
3	0,5 ml de tubo 2	2,0 ml	1/5	0,5
4	0,5 ml de tubo 3	0,50 ml	1/2	0,25
5	0,5 ml de tubo 4	0,50 ml	1/2	0,125
6	0,5 ml de tubo 5	0,50 ml	1/2	0,06
7	0,5 ml de tubo 6	0,50 ml	1/2	0,03
8	0,5 ml de tubo 7	0,50 ml	1/2	0,015
9	0,5 ml de tubo 8	0,50 ml	1/2	0,0075

De esta tabla se seleccionan los tubos que poseen una concentración de endotoxina igual a: 2λ , λ , $0,5\lambda$ y $0,25\lambda$. En este caso serán los tubos 4, 5, 6, 7. A estos se le suma: un control negativo, que es el agua apirógena; un control positivo (spike), que es una mezcla de muestra y endotoxina diluida; y las muestras. Cada tubo mencionado debe realizarse por duplicado, y se le debe agregar 100 μ l de lisado.

Las muestras empleadas fueron diferentes lotes de ¹⁸FDG con los que contaba el laboratorio de control de calidad.

- FDG L 12110901
- FDG L 12111601
- FDG L 12111201
- FDG L 12111901
- FDG L 12102201
- FDG L 12102601.

Se emplearon 100 µl de cada muestra, excepto de las últimas dos en donde se usaron 50 µl ya que no se contaba con más cantidad de la misma. Estas muestras corresponden a producciones del mes de octubre y noviembre del corriente año, por lo tanto, no poseen actividad significativa.

Los 26 tubos mencionados anteriormente se incubaron en baño térmico 60 ± 2 minutos a 37 ± 1 °C. Desde el momento en que comenzó la incubación se abandono el recinto donde se estaba trabajando para evitar vibraciones en la mesa de trabajo, las cuales podrían perjudicar los resultados del ensayo. El gel formado en el tubo, debido a la presencia de endotoxinas, podría desprenderse debido a las vibraciones, dando un falso positivo.

Pasado este tiempo se analizan los tubos, invirtiéndolos cuidadosamente 180°. Los resultados obtenidos fueron:

Tubo	Muestra	Endotoxina	Resultado
1	H ₂ O		-
2	H ₂ O		-
3		0,25 EU/ml	+
4		0,25 EU/ml	+
5		0,125 EU/ml	+ / -
6		0,125 EU/ml	+
7		0,06 EU/ml	+
8		0,06 EU/ml	+
9		0,03 EU/ml	+
10		0,03 EU/ml	+ / -
11	FDG 12110901		-
12	FDG 12110901		-
13	FDG 12111601		-
14	FDG 12111601		-
15	FDG 12111201		-
16	FDG 12111201		-
17	FDG 12111901		-
18	FDG 12111901		-
19	FDG 12102201		-
20	FDG 12102201		-
21	FDG 12102601		+
22	FDG 12102601		+
23	FDG 12110901		+
24	FDG 12110901		+
25	FDG 12102201		+
26	FDG 12102201		+

Observando los resultados obtenidos se pueden realizar los siguientes comentarios:

- El análisis del agua apirógena (también llamada agua calidad LAL) es necesario para descartar la presencia de endotoxinas en ella. Si esto fuera así, los resultados del ensayo en las muestras serían siempre positivos y no se podría adjudicar a presencia de pirógenos en la muestra.
- El análisis por duplicado permite llegar a una conclusión correcta. Como se observa en el tubo 5 y 10, el resultado es dudoso. El resultado positivo y certero de su par permiten concluir que ambos tubos dan positivo a este ensayo, lo cual se corresponde con la presencia de endotoxina de referencia.
- Llama la atención el resultado positivo para el lote FDG 12102601, el cual debería ser negativo ya que este lote fue liberado en el momento de su control. Es un resultado confirmado por duplicado, por lo que se debería volver a realizar la incubación de esta muestra. En ensayo debería hacerse por cuadruplicado, pero por una cuestión de costos y tiempos se hace de esta manera. Es poco probable que la muestra se haya contaminado durante el periodo de almacenamiento.
- Los tubos correspondientes al lote FDG 12102201 muestran que emplear menor cantidad de muestra no afecta el resultado del ensayo.
- Los tubos Spike 23/24 y 25/26 muestran que la muestra no inhibe endotoxinas. Si lo hiciera, el resultado debería ser negativo.

A partir de estos resultados se busca conocer la sensibilidad del lisado a través del cálculo de la media geométrica (MG):

$$MG = Antilog \left(\frac{\sum e}{f} \right)$$

Donde $\sum e$ es la suma de los logaritmos de las 4 primeras concentraciones finales positivas de la serie de diluciones y f es el número de réplicas.

El ensayo es válido y, por lo tanto, el lisado es sensible a endotoxinas si $0,5\lambda \leq MG \leq 2\lambda$, siendo λ la sensibilidad del lisado indicada por el fabricante. En este caso, entonces, la media geométrica tiene que tomar un valor entre 0,25 UE/ml y 0,0625 UE/ml.

$$MG = Antilog \left(\frac{\log 0,06 + \log 0,06 + \log 0,125 + \log 0,125}{4} \right) = 0,0866$$

La media geométrica tiene un valor de 0,0866, el cual se ubica dentro del intervalo mencionado. Por lo tanto, el lisado es sensible a endotoxinas bacterianas.

3.2 Preparación de placas de petri para controles microbiológicos ambientales.

Esta preparación se llevo a cabo siguiendo el procedimiento operativo PO-ATN31C2-003.

El personal del laboratorio se encargó de preparar el medio de cultivo según las instrucciones del fabricante y de su esterilización. También, realizó la limpieza del área limpia.

El medio de cultivo preparado es un líquido color ambar intenso y olor fuerte. Este se ubica dentro del pass-box que comunica al laboratorio con el área limpia, junto con las cajas de petri que también fueron previamente esterilizadas. Además, hay que colocar dos placas de petri ya con cultivo que se utilizarán para el control ambiental de la campana de flujo laminar.

En primer lugar se ingresa al vestuario, el cual se ubica entre el laboratorio y el área limpia. Allí hay que retirarse el guardapolvo y, en el caso de las damas, cualquier accesorio que pueda ser una fuente de microorganismos (aros, pulseras, etc). El personal que ingresa al área limpia deberá colocarse la ropa correspondiente: mameluco, cubre zapatos, cofia, barbijo y guantes, todos previamente esterilizados. Los guantes, que son de látex, vienen doblados de manera tal de que el usuario no toque la zona de los dedos con las manos.

Dentro el área limpia, se retiran los elementos de trabajo del pass-box. Lo primero que realiza el operador es prender la campana y colocar las cajas de petri para control ambiental abiertas, en los extremos traseros de la campana de flujo laminar. Luego ubica dentro de la misma las cajas de petri vacías, el medio de cultivo y la fibra para rotular (la cual ya se encontraba dentro de esta área). Sentado para poder trabajar de manera cómoda, se procede al llenado de las cajas: se les quita la tapa, se agrega el medio de cultivo, se las deja reposar unos instantes y luego se les coloca nuevamente la tapa. Esto es para que el medio de cultivo disminuya su temperatura y no genere condensación en la tapa de la caja.

El operador tendrá sus brazos dentro de la campana. Si por algún motivo debe sacarlos de allí, deberá satinizarlos con una solución de alcohol al 70% antes de ingresarlos nuevamente. Esto será para cada elemento que deba colocarse en la zona de la campana. En la Figura 3.1 se muestra a la autora del presente escrito trabajando.



Figura 3.1. Se muestra a la autora del escrito vestida con la ropa reglamentaria trabajando en la campana de flujo laminar

Luego de que el medio de cultivo ha tomado consistencia sólida, se procede al rotulado indicando el medio de cultivo y la fecha de vencimiento (un mes posterior a su preparación). Esta identificación se debe realizar sobre el cuerpo de la caja y no sobre la tapa, de manera de que si por error se confunden las tapas de dos controles ambientales cercanos no se obtendrán resultados erróneos.

Para finalizar, se cierran las placas de control medio ambiental, se colocan junto con las placas preparadas y todo lo que se quiera retirar del área limpia dentro del pass-box. Se apaga la campana de flujo laminar y el personal se retira. En el vestuario se quita la ropa y se vuelve a colocar el guardapolvo. Ya en el laboratorio, se retiran los elementos del pass-box. Las placas de petri recién preparadas se incuban en estufa durante 24 horas. Luego, se refrigeran en heladera hasta el momento de uso. La fecha de vencimiento de las placas es un mes luego de su preparación.

3.3 Conclusiones

Conclusiones de la sección 3.1

- El LAL Test es un ensayo que requiere conocimiento del procedimiento operativo, para no cometer errores en las diluciones.
- Hay que ser muy cuidadosos para evitar contaminar las muestras de ^{18}FDG y el agua apirógena con endotoxina, lo cual puede lograrse trabajando en serie: con un

tip apirógeno y nuevo agrego el agua en todos los tubos correspondientes. Descarto el tip. Con un nuevo tip agrego las muestras en los tubos correspondientes, empleando un tip por lote y descartándolo luego de su uso. Con un nuevo tip agrego endotoxina en los tubos Spike. Finalmente, con un nuevo tip agrego el lisado a todos los tubos teniendo la precaución de que la punta del mismo no toque la solución dentro.

- Es importante la homogeneización muestra-lisado, agua-lisado y endotoxina-lisado.
- Control de calidad debería recibir mayor cantidad de muestra para poder tener contra muestras de cada lote. Si esto fuera así, se podría realizar un nuevo ensayo de endotoxinas en caso de que surja alguna duda.
- La confección de la curva se realiza por día de producción. Es decir, si la planta produce más de un lote por día la curva se realiza al comenzar las actividades del laboratorio y se emplea durante todo el día. En el caso de la planta de producción de radioisótopos del Centro Atómico Ezeiza, donde llega un lote por día de producción, se realiza una curva por lote.
- Debido a la cantidad de pasos a seguir en este ensayo, el ensayo requirió cerca de 2 horas de trabajo previo a la incubación. Es necesario reducir este tiempo, para que el laboratorista pueda realizar otras tareas. Esto se logra con un buen conocimiento de procedimiento y del manejo del material de laboratorio. Contar con un termómetro calibrado, que permita mantener a temperatura del baño estable es fundamental.

Conclusiones de la sección 3.2

- Hay que evitar la condensación del vapor en las cajas de petri luego del llenado para que no caiga alguna gota de agua sobre el medio. Esto implicaría un mayor tiempo en estufa.
- La preparación de las placas de petri para control ambiental deben realizarse en una zona libre de microorganismos, ya que su función posterior será la determinación de los mismos.

4. CONCLUSIONES

La calidad, seguridad y efectividad deben ser diseñadas en el producto, no pueden ser obtenidas a través del control del producto terminado. En las formas farmacéuticas estériles, más que en cualquier otra forma, es donde debe prevalecer este concepto ya que deben liberarse sin los resultados del control microbiológico. Esto se debe a que el corto período de semidesintegración del radiofármaco usado para PET limita su tiempo de uso.

Las condiciones de esterilidad y apirogenuidad son puntos claves en la producción de un fármaco inyectable, los cuales no pueden ser desatendidos. Es por ello que el conocimiento en controles de calidad microbiológicos es crucial para obtener resultados verdaderos.

Por lo tanto es importante ajustar y optimizar todas las condiciones y operaciones para tender a la liberación paramétrica de los productos:

- Es importante tener instalaciones adecuadas y de fácil limpieza, para las operaciones a realizarse en el lugar. Flujo unidireccional, ingreso de materiales separado de personal, sistema de ventilación y filtración, áreas operativas separadas para evitar contaminaciones cruzadas, etc.

- Los equipos implicados tanto en la producción como en el control deben ser calibrados y verificados. Se debe calificar la instalación, operación y performance.

- Entrenamiento y constante capacitación del personal.

- Disponer de un programa de limpieza y saneamiento donde se debe definir claramente zonas y equipos a limpiar, productos a utilizar, concentración de uso y tiempo de contacto, frecuencia de la limpieza.

- Procedimientos escritos y responsabilidades establecidas.

El conjunto de todos los sistemas anteriormente mencionados, la validación de los mismos y optimización de métodos de control nos permite minimizar riesgos y asegurar la esterilidad de radiofármacos inyectables como la 2-desoxi-2(¹⁸F)flúor-D-glucosa o ¹⁸FDG.

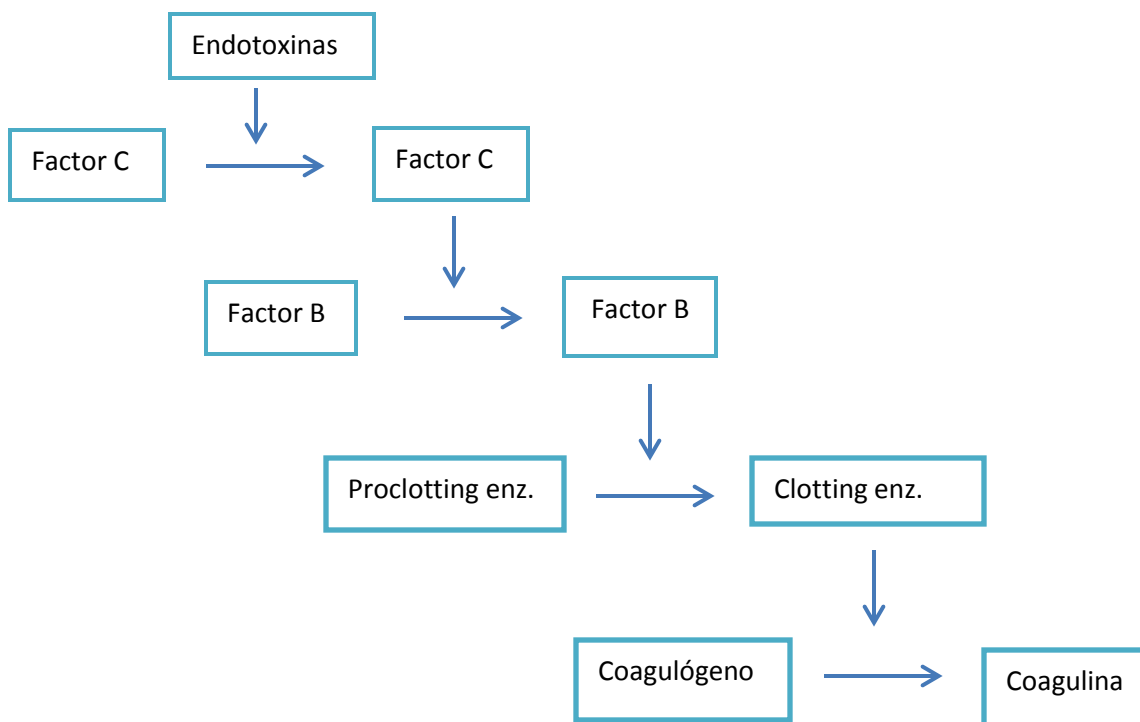
El Limulus Test o LAL Test o método de Gel Glot, es el método de referencia para determinar endotoxinas bacterianas. Es un método sencillo, que se puede aplicar en cualquier laboratorio de microbiología ya que no se requiere gran instrumental. Existen otros métodos como los fotométricos, en los cuales se necesita un espectrofotómetro UV para brindar un resultado. Es un ensayo aplicable tanto a producto terminado como a validación de la limpieza de áreas.

5. ANEXOS

Anexo 1: LAL Test

Las endotoxinas son lipopolisacáridos que forman parte de la pared de las bacterias Gram negativas. Su actividad biológica se basa en su encuentro con receptores in vivo como son los macrófagos, linfocitos T y neutrófilos. Por ejemplo, en el primero de ellos se encuentra una proteína que da la visualización de la respuesta: fiebre, neutrofilia, proliferación de colágeno, etc.

El LAL Test es recomendado para la cuantificación de endotoxinas en materias primas utilizadas en la producción, para productos terminados y para todo aquellos procesos que requieras monitorear el nivel de endotoxinas que ellos puedan contener. El reactivo LAL se obtiene a partir del Cangrejo herradura, del cual existen varias especies pero la primera estudiada fue la *Limulus polyphemus*. Tiene hemolinfa y sus linfocitos (amebocitos) son su mecanismo de defensa, los cuales responden por degranulación ante la presencia de un cuerpo extraño como por ejemplo ante la presencia de endotoxinas. Se producen dos tipos de granulos en esta degranulación: chicos (poseen en su interior sustancias neutralizantes de los lipopolisacáridos) y grandes (contienen Factor C, Factor B, proclotting enzyme, coagulólogo y anti lipopolisacáridos factor). A continuación se muestra la cascada de coagulación:



Este método se basa en los principios de esta cadena de reacciones, siendo el paso más importante la activación de la enzima coagulante que actuará sobre el coagulógeno para dar lugar a la coagulina que es el producto insoluble que da lugar a la formación del gel matriz.

La técnica consiste en agregar una cierta cantidad del lisado reconstituido a un tubo de reacción que contiene una cierta cantidad de la muestra o control y mezclar suavemente para homogeneizar. Incubar los tubos por 60 ± 2 minutos a $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, evitando la agitación de los tubos durante este proceso. Al cabo de este tiempo observar la formación del gel invirtiendo al tubo 180 ° . A continuación se detallan los pasos de esta técnica:

1. *Preparación de la solución madre y las soluciones estándar de endotoxina.*

1.1. Reconstituir la endotoxina liofilizada con agua apirógena, en base a la concentración del certificado de análisis para llegar a la concentración final deseada (por ejemplo. 1000 EU/ml = 1000 unidades de endotoxinas por mililitro de solución). Así, si el certificado indica que el vial de endotoxina contiene 4000 EU por vial debe agregarse 4 ml de agua calidad LAL. Dejar reposar para que comience a hidratarse.

1.2. Vortexear el vial conteniendo la endotoxina rehidratada durante 5 minutos. Debe homogeneizarse la endotoxina de la misma manera cada vez que se la use. Luego de su uso, guardarla en heladera a $5\text{-}10 \text{ }^\circ\text{C}$.

1.3. Preparación de la endotoxina hija: tomar con la pipeta (con tips apirógenos, que se descartan luego de su uso) 0,25 ml de endotoxina reconstituida, colocarla en un tubo de ensayo de 13 x 100 mm y agregar con pipeta despirogenada 0,75 ml de agua calidad LAL.

A partir de la hija se van transfiriendo volúmenes a los tubos de ensayo despirogenados y agregando agua calidad LAL. Las diluciones de endotoxinas se preparan de acuerdo a lo indicado en la siguiente tabla:

Tubo	Endotoxina	Agua LAL	Dilución	EU/ml
1	0,25 ml de hija	2,25 ml	1/10	25
2	0,25 ml de tubo 1	2,25 ml	1/10	2,5
3	0,5 ml de tubo 2	2,0 ml	1/5	0,5
4	0,5 ml de tubo 3	0,50 ml	1/2	0,25
5	0,5 ml de tubo 4	0,50 ml	1/2	0,125
6	0,5 ml de tubo 5	0,50 ml	1/2	0,06
7	0,5 ml de tubo 6	0,50 ml	1/2	0,03
8	0,5 ml de tubo 7	0,50 ml	1/2	0,015
9	0,5 ml de tubo 8	0,50 ml	1/2	0,0075

2. Ensayo para la confirmación de la sensibilidad del lisado

Se realiza con el fin de confirmar si la sensibilidad rotulada en el lisado es correcta

2.1 Transferir a sendos tubos de ensayo de 10 x 75 mm, utilizando tips y pipeta despirogenada, 100 µl de:

- control negativo: agua de reacción calidad LAL
- Disoluciones seleccionadas de estándar: 2λ , λ , $0,5\lambda$ y $0,25\lambda$, siendo λ la sensibilidad del lisado declarada en el envase del mismo. Ejemplo, para una sensibilidad de 0,125 EU/ml es necesario utilizar los tubos 4,5,6 y 7.
- Agregar posteriormente 100 µl de lisado de sensibilidad 0,125 EU/ml a todos los tubos.

2.2 Agitar suavemente para mezclar y colocar los tubos inmediatamente y con cuidado en el baño térmico.

2.3 Incubar en baño térmico durante 60 ± 2 minutos a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

2.4 Durante el periodo de incubación no trabajar sobre la mesada donde está colocado el baño térmico y evitar golpes y vibraciones.

2.5 Una vez finalizado el periodo de incubación, retirar los tubos de a uno, invertirlo 180° y verificar la formación de un gel firme.

2.6 Un resultado positivo (+) se caracteriza por la formación de un gel firme que se mantiene al invertir el tubo.

2.7 Un resultado negativo (-) se caracteriza por la ausencia del gel o por la formación de un gel viscoso que no mantiene su integridad al invertir el tubo.

2.8 Ensayar cada dilución por duplicado.

2.9 Calcular la Media Geométrica. El ensayo solo es válido si la MG es mayor o igual a $0,5\lambda$ y menor o igual a 2λ . Siendo $MG = \text{Antilog} \left(\frac{\sum e}{f} \right)$, donde $\sum e$ es la suma de los logaritmos de las concentraciones finales positivas de la serie de diluciones y f es el número de réplicas.

3. Determinación de la máxima dilución válida

3.1 El cálculo se realiza según la siguiente fórmula: $MDV = LE \times \frac{C}{\lambda}$, donde LE corresponde al límite de endotoxina especificado, C es la concentración del principio activo en la solución a ensayar, que según las especificaciones puede estar dada en:

- Cuando en una monografía se especifica el límite de endotoxina en términos de volumen (UE/ml), se divide el límite de endotoxina por la sensibilidad del lisado (en UE/ml) para obtener el factor MDV.

- Cuando el límite de endotoxina se especifica en términos de peso o unidades de droga activa (UE/ml o UE/UI) se multiplica el límite por la concentración (en mg/ml o UI/ml) de la droga en la solución ensayada o de la droga reconstituida de acuerdo con las instrucciones que figuren en el rotulo y se divide el producto de la multiplicación por λ para obtener el factor MDV.

3.2 El límite de endotoxina para radiofármacos es LE: 175/V unidades de endotoxina por mililitro de inyección, siendo V el volumen máximo recomendado total en mililitros a la fecha o tiempo de expiración, siendo para la ¹⁸FDG de 5 ml

4. *Determinación del límite de endotoxina en una muestra de radiofármacos.*

4.1. Se aplica al producto para determinar si el mismo cumple con el valor de endotoxinas especificado en la monografía correspondiente.

4.2. Cada uno de los tubos que se describen a continuación debe realizarse por duplicado.

4.3. Muestra: se agregan 100 μ l de la muestra en tubos de 10 x 75 mm para LAL.

4.4. Control negativo: 100 μ l de agua reactivo LAL.

4.5. Control positivo (Spike): Diluir endotoxina control o de referencia a una concentración igual a 2 λ .

4.6. Agregar a cada tubo 100 μ l del reactivo LAL reconstituido.

4.7. Agitar suavemente para mezclar en Vortex durante 30 segundos.

3.8 Incubar en baño térmico durante 60 ± 2 minutos a $37^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$.

3.9 Durante el periodo de incubación no trabajar sobre la mesada donde está colocado el baño térmico y evitar golpes y vibraciones.

3.10 Una vez finalizado el periodo de incubación, retirar los tubos de a uno, invertirlo 180° y verificar la formación de un gel firme.

3.11 Un resultado positivo (+) se caracteriza por la formación de un gel firme que se mantiene al invertir el tubo.

3.12 Un resultado negativo (-) se caracteriza por la ausencia del gel o por la formación de un gel viscoso que no mantiene su integridad al invertir el tubo.

3.13 El resultado solo es válido cuando los controles negativos y positivos dan el resultado apropiado en ambos duplicados.

3.14 La muestra cumple con el ensayo si el resultado de ambos duplicados resulta negativo.

3.15 La muestra no cumple con el ensayo si el resultado de ambos duplicados resulta positivos.

Anexo 2: Preparación y esterilización de medios de cultivo.

Disolución de los medios de cultivo

Los medios a utilizar en el ensayo de esterilidad son Tioglicolato Líquido con indicador (resazurina) en el cual crecerán bacterias anaeróbicas, y Caldo digerido de soja-caseína, en el cual crecerán bacterias aeróbicas y hongos. Los mismos se preparan según las instrucciones del fabricante. Se procederá según PO-ATN31C2 “Preparación de placas de Petri para controles microbiológicos ambientales”.

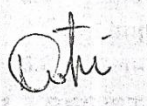
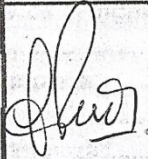

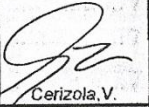

Esterilización de los medios de cultivo

- Fraccionar en tubos perfectamente limpios y secos 10 ml de medio bien disuelto en cada uno.
- Colocar el tapón autoclave a cada uno. Los tubos deberán estar rotulados con T (Tioglicolato) y TSB (Caseína de soja) y el número de lote.
- Colocar los tubos en un recipiente autoclavable que permita contenerlos de forma vertical.
- Comenzar el ciclo de esterilización según el procedimiento para el manejo de autoclave.
- Registrar los datos del proceso en el cuaderno de uso del autoclave
- Cuando el ciclo de esterilización del autoclave haya terminado, retirar los tubos con los medios de cultivo y colocarlos sobre la mesada. Dejar tomar temperatura ambiente y guardar en la heladera.
- Conservar un tubo de cada medio preparado, dejar que alcance temperatura ambiente y proceder a tomar el pH de los mismos utilizando tiras indicadoras.
- Para el medio Tioglicolato el pH luego de la esterilización deberá ser $7,1 \pm 0,2$ y para el medio caseína de soja $7,3 \pm 0,2$.

Prueba de promoción de crecimiento

- Tomar dos tubos de ensayo con medio de cultivo y rotular a cada uno como "T" y "TSB", agregando la fecha del día en que se pone a incubar.
- Inocular, al tubo rotulado como "hongos" (TSB) no más de 100 UFC (unidades formadoras de colonias) de alguno de los siguientes microorganismos: *Aspergillus Niger* y *Bacillus subtilis*. Incubar en estufa a temperatura de $22,5 \pm 2,5$ ° C durante no más de 5 días.
- Inocular, al tubo rotulado como "anaerobios" (T) no más de 100 UFC (unidades formadoras de colonias) de *Clostridium sporogenes*. Incubar en estufa a temperatura de $32,5 \pm 2,5$ ° C durante no más de 3 días.
- Los medios son adecuados si se produce crecimiento claramente visible de los microorganismos.

Anexo 3. Limpieza de Celda de Fraccionamiento de ¹⁸FDG

	GERENCIA DE APLICACIONES Y TECNOLOGÍA DE LOS RADIOISOTOPOS		PO-ATN30C-002 Rev.: 1
	PROCEDIMIENTO OPERATIVO		Página: 1 de 7
TÍTULO: Limpieza de Celda de Fraccionamiento de ¹⁸FDG			
1. OBJETIVO Describir la forma y la frecuencia de limpieza de las celdas de fraccionamiento de ¹⁸ FDG del Laboratorio del Ciclotrón del Centro Atómico Ezeiza.			
2. ALCANCE Este procedimiento se aplica cada vez que se deba proceder a la limpieza de las celdas de fraccionamiento ¹⁸ FDG dentro de las zonas blindadas. Este procedimiento aplica, en lo que hace a Limpieza rutinaria preliminar, Limpieza rutinaria para el proceso y Limpieza excepcional de: Superficies del estanco dentro de la Celda de Fraccionamiento de ¹⁸ FDG, dentro del cual se encuentra instalado el equipamiento para fraccionamiento, y superficies del equipamiento en el interior de dicho estanco.			
Preparó		Revisó	
 Dantoni, L.		 Peña, G.	
		Intervino calidad	
		 Bongiovanni, S.	
		Aprobó	
		 Rocco, C.	
		 Cerizola, V.	
REVISIONES			
Rev.	Fecha	Modificaciones	
1		Punto 6.1.1;6.1.2;Pag. 6 hasta pag.7.	
FECHA DE VIGENCIA:			
DISTRIBUCIÓN		ESTADO DEL DOCUMENTO	
Copia N°: PARA		LIBERADO	
Distribuyó: INFORMACIÓN		Fecha: 19/4/2012	
		Firma: 	
		Lic. Sandra F. Bongiovanni JEFE DEPARTAMENTO GARANTÍA DE CALIDAD	
NOTA: Este documento es propiedad de CNEA y se reserva todos los derechos legales sobre él. No esta permitida la explotación, transferencia o liberación de ninguna información en el contenido, ni hacer reproducciones y entregarlas a terceros sin un acuerdo previo y escrito de CNEA.			

CNEA	Limpieza de Celda de Fraccionamiento de ¹⁸FDG	PO-ATN30C-002 Rev.: 1 Página: 3 de 7
-------------	---	--

3. ABREVIATURAS Y DEFINICIONES

C.N.E.A.: Comisión Nacional de Energía Atómica.

Kits: Conjunto de insumos que se utilizan en determinada operación.

Batch: Vial estéril y apirógeno de 30ml, tapado y precintado utilizado como reservorio del producto a granel.

Laboratorio de Producción: Zona externa a Vestuario, Área Limpia y Celdas.

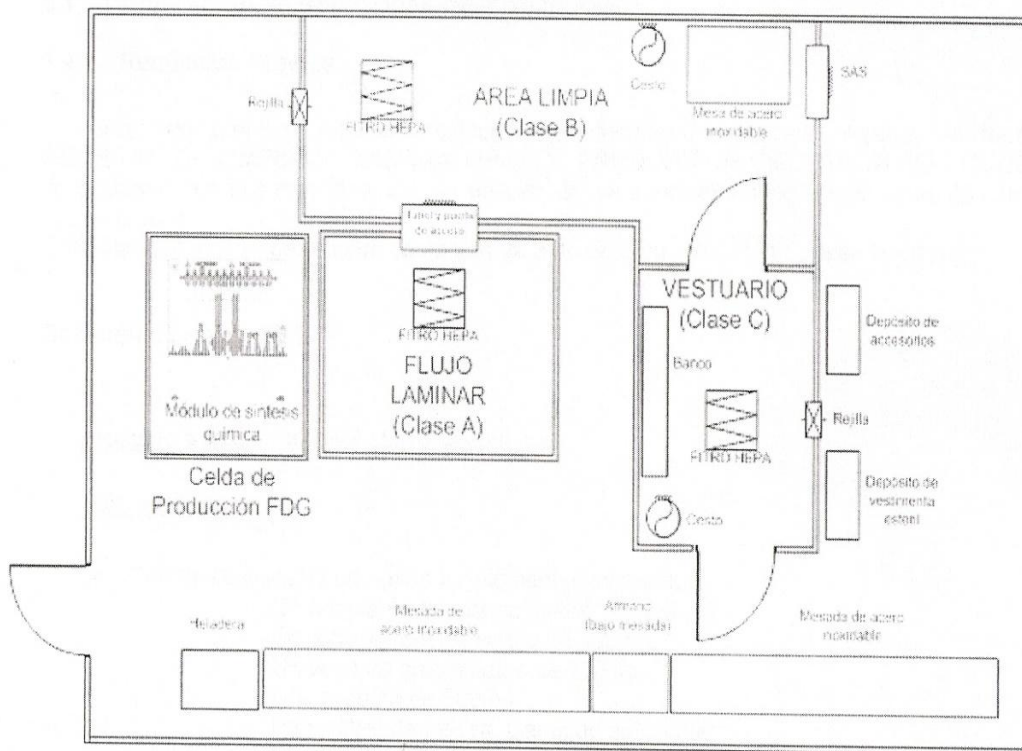
Celda de fraccionamiento: Zona de fraccionamiento, dentro de la celda blindada, contigua a la de producción.

Area Limpia: Zona de acceso a la zona de fraccionamiento de ¹⁸FDG, desde donde se ingresan las materias primas y retiran los productos terminados de la misma.

Vestuario: Zona de acceso y cambio de indumentaria, previa al Área Limpia.

SAS: Safety Airlock System.

UFC: Unidades formadoras de colonias.



Esquema del Vestuario, Área Limpia, Celda de producción y Fraccionamiento de 18-FDG

CNEA	Limpieza de Celda de Fraccionamiento de ¹⁸FDG	PO-ATN30C-002 Rev.: 1 Página: 5 de 7
<ul style="list-style-type: none">• Sanitizar las superficies internas de la campana con la solución de etanol al 70% y el papel libre de pelusa. Descartar los papeles en el cesto.• Destapar el recipiente de etanol y medir en una probeta de 500 ml. 350 ml del mismo.• Trasvasar los 350 ml de etanol en el vaso de precipitados de 500 ml. <p>Medir 150 ml de agua bidestilada en la probeta de 500 ml y verterlos en el vaso de precipitados de 500 ml.</p> <ul style="list-style-type: none">• Agitar la solución con la varilla de vidrio durante 1 minuto.• Verter 500 ml de dicha solución en un rociador seco y limpio rotulado previamente con la leyenda “Solución de etanol al 70% para Limpieza de la celda de fraccionamiento de 18-FDG” Y a continuación la fecha de elaboración y fecha de vencimiento. <p><i>Nota: la fecha de vencimiento será la del día siguiente al de preparación.</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Colocarle la tapa al rociador y agitarlo suavemente. Conservarlo a temperatura ambiente.• Lavar con solución de detergente y una escobilla el vaso de precipitados, la probeta y varilla que se emplearon en la preparación, enjuagar y secar con papel libre de pelusa.• Devolver el recipiente de etanol, vaso de precipitados, la probeta, varilla y papeles no usados a sus lugares de origen.• Quitarse los guantes y descartarlos en el cesto		
6.2 Limpieza de la Celda de Fraccionamiento de ¹⁸FDG.		
<p>Es aquella que es desarrollada previa a la producción de 18-FDG por el operador de celda. Antes de ingresar deberá estar colocado el rótulo correspondiente al área y vestuario en estado “Sucio”</p>		
6.2.1 Requisitos previos al ingreso		
<ul style="list-style-type: none">-Completar el libro de registro los campos correspondientes. (según Procedimiento PO-ATN30C-003)-Cumplir con el procedimiento CONDICIONES DE VESTIMENTA E HIGIENE PARA EL INGRESO AL VESTUARIO, ÁREA LIMPIA Y CELDA DE PRODUCCIÓN DEL LABORATORIO DEL CICLOTRÓN PO-ATN30C-004 antes de ingresar a limpiar.Antes de entrar al Área Limpia adyacente a la celda de fraccionamiento, operador debe colocarse en el Vestuario: mameluco, barbijo, guantes, cofia, antiparras y cubre zapatos estériles.-Retirar el rótulo “sucio”-Completar el rótulo “en uso” (según sop PO-ATN30C-003)-Colocarlo en la celda de fraccionamiento, en el portacarteles correspondiente.		
6.2.2 Procedimiento		
<ul style="list-style-type: none">-Usar guantes descartables para realizar la limpieza.-Una vez dentro del Área Limpia tomar desde el SAS de transferencia el pulverizador del desinfectante que corresponda.		

CNEA	Limpieza de Celda de Fraccionamiento de ¹⁸FDG	PO-ATN30C-002 Rev.: 1 Página: 4 de 7
-------------	---	--

4. REFERENCIAS

Disposición 2819/2004 de ANMAT.

5. RESPONSABILIDADES

Es responsabilidad del Jefe de la Instalación y de Aseguramiento de la Calidad la puesta en vigencia y el control del cumplimiento del presente procedimiento.

Es responsabilidad del operador de celda la limpieza de la misma para la producción de ¹⁸FDG.

Es responsabilidad del oficial de radioprotección verificar que la dosis radioactiva sea lo suficientemente baja como para poder llevar a cabo la limpieza correspondiente.

6. DESARROLLO

6.1 Preparación de soluciones desinfectantes.

6.1.1 Requisitos Previos

Antes de preparar cualquier solución desinfectante se deberá observar el formulario REGISTRO DE LIMPIEZA - LABORATORIO DE PRODUCCION CICLOTRON FO-ATN30C-001, constatando que sus mesadas, etc, se encuentran en condiciones higiénicas antes de comenzar la preparación.

Controlar que el libro de registro se encuentra apto para su utilización (posee hojas, etc)

Solución de etanol 70 %

Producto a utilizar: alcohol etílico calidad p.a.

Procedimiento:

- Tomar y llevar a la campana los siguientes elementos:
 - Un recipiente de alcohol etílico calidad p.a.
 - Un rociador seco y limpio de 500 ml.
 - Un vaso de precipitados de 500 ml.
 - Una probeta de 500 ml.
 - Papel libre de pelusa. Cantidad suficiente
 - Una varilla de vidrio
 - Guantes descartables.
 - Un rociador conteniendo solución de etanol al 70 %
 - Un recipiente con agua bidestilada
- Colocarse los guantes descartables.

CNEA	Limpieza de Celda de Fraccionamiento de ¹⁸FDG	PO-ATN30C-002 Rev.: 1 Página: 6 de 7
-------------	---	--

-Pulverizar todas las superficies con la solución desinfectante, haciendo uso del pulverizador manual.

-Limpiar todas las superficies con paños Sontara® húmedos en la solución desinfectante. Iniciar la limpieza en el interior de la Celda de Fraccionamiento y dirigirse progresivamente hacia la puerta de la misma. No abrir las puertas bruscamente ni realizar movimientos rápidos.

-Pasar el paño húmedo por los distintos componentes dentro de la celda de fraccionamiento.

-Dejar actuar el desinfectante no menos de 10 minutos. Secar con paños secos todas las superficies desinfectadas. Evitar que queden gotas de desinfectante.

Precauciones

-Evitar tocar los filtros absolutos y flujo laminar.

-Limpiar cuidadosamente los retornos de ventilación.

NOTAS IMPORTANTES:

El orden de limpieza se realiza de arriba hacia abajo, de dentro hacia fuera. Iniciar la limpieza en el interior de la Celda de Fraccionamiento y dirigirse progresivamente hacia la puerta de la misma.

No abrir la puerta bruscamente ni realizar movimientos rápidos. Se evitará de esta manera la generación de turbulencias en el ambiente.

Evitar que queden gotas de desinfectante sobre las superficies limpiadas. Avisar al Jefe de Producción en caso de que se observe desprendimiento, roturas, desgaste u óxido en las superficies limpiadas.

6.3 Limpieza excepcional de la Celda de Fraccionamiento de ¹⁸FDG.

Es aquella que es desarrollada luego de eventos no rutinarios como ser operaciones de mantenimiento (cambios de filtros HEPA, revestimiento interior, iluminación y reparación de cualquier equipo que se encuentre dentro de ella) y en los casos que los controles de calidad indiquen que se sobrepasa el límite máximo de UFC. También en el caso de tratarse de períodos no productivos.

Frecuencia: Esta limpieza deberá realizarse sólo de considerar necesario una limpieza adicional; la misma será determinada en caso de resultados indeseables en los controles microbiológicos del área o cuando el operador de celda lo disponga, notificando la causa en el libro de registros correspondiente.

En el caso de tratarse de un periodo no productivo: La Limpieza de la celda de fraccionamiento se realiza cumplido el plazo de máximo de limpieza del rótulo sucio (48 horas después de ingresado en el rotulo sucio)

6.3.1 Requisitos previos al ingreso

Proceder igual que en el punto 6.2.1

6.3.2 Procedimiento

Proceder en igual que en el punto 6.2.2

CNEA	Limpieza de Celda de Fraccionamiento de ¹⁸FDG	PO-ATN30C-002 Rev.: 1 Página: 7 de 7
-------------	---	--

6.4 Finalización de la limpieza.

- Cerrar la Celda de Fraccionamiento retirando pulverizador y demás accesorios.
- Descartar el contenido de la bolsa de residuos.

- Humedeciendo un paño en solución desinfectante, limpiar la puerta del lado exterior de la puerta de la Celda. Descartar el paño junto con los demás residuos.
- Sacarse la ropa descartable y descartarla en los recipientes provistos para tal fin.
- Descartar los mamelucos y cubremangas en el recipiente dedicado a tal efecto para su posterior lavado y esterilización.
- Desechar el sobrante de la solución desinfectante y guardar todos los elementos de limpieza a sus lugares originales.
- Retirar el rótulo "en uso"
- Completar el rótulo "Limpio" (según Procedimiento PO-ATN30C-003)
- Colocarlo en el la puerta de ingreso al vestuario, en el portacarteles correspondiente.
- Completar en el libro de registro los campos faltantes.(según Procedimiento PO-ATN30C-003)

6.5 Limpieza de Indumentaria

Los cubre zapatos, los barbijos y los guantes utilizados durante el proceso serán descartables. Los mamelucos y cubremangas deben ser enviadas a lavar y luego a esterilizar, cada vez que se termine el proceso. Para esto, dejarlos en el recipiente dedicado a tal efecto. Usar indumentaria limpia para las tareas durante el proceso productivo, para tal efecto tomarla del recipiente dedicado para ropa limpia.

6.6 Vencimiento de la limpieza

La limpieza rutinaria vence transcurridas 24 horas a partir de la hora de finalización de la misma.
La limpieza excepcional vence transcurridas 48 horas a partir de la hora de finalización de la misma.


7. REGISTROS

Completar libro de registros según procedimiento.
Los libros registros deben ser guardados por el operador que realizo la limpieza.
Los libros de registro se archivarán en Aseguramiento de la Calidad.

8. ANEXOS

No aplica.

Anexo 4: Preparación de placas de Petri para controles microbiológicos medioambientales

	GERENCIA DE APLICACIONES Y TECNOLOGIA DE LOS RADIOISOTOPOS			PO-ATN31C2-003 Rev.: 0		
	PROCEDIMIENTO OPERATIVO.			Página: 1 de 8		
TÍTULO: PREPARACIÓN PLACAS DE PETRI PARA CONTROLES MICROBIOLÓGICOS AMBIENTALES.						
<p>1. OBJETIVO</p> <p>Establecer un procedimiento para:</p> <p>La preparación y esterilización de medios de cultivo sólidos.</p> <p>La preparación de las placas de Petri conteniendo los medios de cultivo.</p> <p>2. ALCANCE</p> <p>Este procedimiento abarca a la preparación de medios de cultivo Agar Triptosado de Soja y Agar Sabureau y a las placas de Petri que los contiene.</p>						
Preparó		Revisó			Intervino calidad	Aprobó
Huala, R.		Silva Paulo, P.	Carlzola, V.		Bongiovanni, S.	Silva Paulo, P. Carlzola, V.
REVISIONES						
Rev.	Fecha	Modificaciones				
FECHA DE VIGENCIA:						
DISTRIBUCIÓN			ESTADO DEL DOCUMENTO			
Copia Nº:						
Distribuyó			Fecha:			
			Firma:			
<p>NOTA: Este documento es propiedad de CNEA y se reserva todos los derechos legales sobre él. No está permitida la explotación, transferencia o liberación de ninguna información en el contenido, ni hacer reproducciones y entregarlas a terceros sin un acuerdo previo y escrito de CNEA.</p>						

CNEA	PREPARACIÓN DE PLACAS DE PETRI PARA CONTROLES MICROBIOLÓGICOS AMBIENTALES	PO-ATN31C2-003 Rev.:0 Página 2 de 10
-------------	--	--

INDICE

1. OBJETIVO.....	1
2. ALCANCE.....	1
3. ABREVIATURAS.....	3
4. REFERENCIAS.....	3
5. RESPONSABILIDADES.....	3
6. DESARROLLO.....	3
6.1 Disolución de medios de cultivo en frío.....	3
6.2 Disolución de medios de cultivo en caliente.....	4
6.3 Rotulado de frascos.....	4
6.4 Esterilización.....	5
6.5 Traslado de materiales.....	5
6.6 Precauciones.....	5
6.7 Preparación de campana y laboratorio.....	6
6.8 Plaqueado.....	6
7. REGISTROS.....	7
8. ANEXO.....	8

CNEA	PREPARACIÓN DE PLACAS DE PETRI PARA CONTROLES MICROBIOLÓGICOS AMBIENTALES	PO-ATN31C2-003 Rev.:0 Página 3 de 10
-------------	--	--

3. ABREVIATURAS Y DEFINICIONES

ATS: Agar Triptosado de soja.

AS: Agar Sabureau.

4. REFERENCIAS

PO-ATN31C2-001 r0 "Proced. para el manejo de autoclave de Chamberlain"

PO-ATN31C2-002 r0 "Proced. para el manejo de autoclave Hogner 703".

PO-ATN31C-012 r0 "Utilización de la balanza Sartorius e Impresora Sartorius".

PO-ATN31C-016 r0 "Procedimiento para el manejo de autoclave Steryle Max serie 1277"

Es responsabilidad del jefe de Control de Calidad conocer, capacitar al personal y hacer cumplir este procedimiento.

Es responsabilidad del encargado de controles microbiológicos, técnicos y/o auxiliares que realicen controles microbiológicos ambientales o de esterilidad o asistan en estos procesos, tener conocimiento de este procedimiento y aplicarlo.

5. DESARROLLO

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

6.1 Disolución de medios de cultivo en frío:

Para preparar 600 ML De medio de cultivo:

Agar Triptosado de soja

NOTA: Se sigue la proporción especificada en cada envase de medio de cultivo

6.1.1 Pesar en la balanza digital, que se encuentra en la sala de pesadas, un vaso de precipitado de 50 mL y llevar el display a cero con el botón central azul, sin retirar el vaso del plato de la balanza (tara).

6.1.2 Una vez que el display esta en cero, colocar dentro del vaso, con una espátula o cuchara, 24g de Agar Triptosado de Soja (ATS). El mismo se encuentra en la vitrina del laboratorio de materias primas (lab.19).

6.1.3 Realizar lo mismo con el Agar Sabureau (AS). Se deben pesar 39g en un vaso de precipitado de 50mL.

CNEA	PREPARACIÓN DE PLACAS DE PETRI PARA CONTROLES MICROBIOLÓGICOS AMBIENTALES	PO-ATN31C2-003 Rev.:0 Página 4 de 10
-------------	--	--

6.1.4 Colocar los dos medios de cultivo en sendos Erlenmeyer de 1 lit cada uno, rotulados con las siglas ATS y AS, con marcador indeleble rojo y negro respectivamente.

6.1.5 Colocar en una probeta de 1lit, 600ml de agua destilada, que se obtiene del bidón que se encuentra en el laboratorio 20, y volcar esta agua, suave y directamente en el Erlenmeyer que contiene el medio de cultivo ATS.

6.1.6 Realizar lo mismo colocando 600 ml de agua destilada en el Erlenmeyer que contiene AS

6.1.7 Revolver con espátula de metal o varilla de vidrio hasta eliminar los grumos. Se obtienen dos soluciones turbias de color amarillento.

NOTA: desde este punto del proceso en adelante, para ambos medios de cultivo, ATS y AS, se procede de la misma manera.

6.2 Disolución de medios de cultivo en caliente:

Se realiza en el laboratorio de esterilización y preparación de medios, nº 20.

Durante todo el proceso hay que usar guantes de doble tela para proteger las manos del calor.

NOTA: Colocar en la puerta del laboratorio de preparación de medios el cartel indicador de "NO entrar con material sucio – Laboratorio dedicado a la preparación de medios de cultivo". El cartel se encuentra pegado en la puerta, girarlo de manera que se lea desde el exterior.

Durante el proceso de preparación de medios está prohibida la entrada de material sucio al laboratorio

6.2.1 Calentar el medio de cultivo sobre un mechero, para esto se conecta el mechero mediante una manguera plástica, a la salida de gas. Se abre la llave de paso del gas (color verde) girándola en sentido antihorario, se enciende el mechero con un encendedor y se coloca este debajo de un tripode con tela de amianto sobre la que se coloca el erlenmeyer a Baño María. Este proceso puede hacerse en su defecto en plancha calefactora eléctrica con agitación.

6.2.2 Revolver la solución, siempre sobre el mechero, con una varilla de vidrio, durante 20+/- 5 minutos, a Baño María o en plancha calefactora con agitación.

6.2.3 Una vez transcurrido el tiempo indicado, controlar si la disolución es completa: se debe lograr una solución de aspecto amarillo oscuro y sin grumos, que al agitar el erlenmeyer por rotación, no se observen partículas de agar sobre las paredes del erlenmeyer. Si así no fuera, dejar más tiempo el medio calentándose, hasta lograr la disolución completa.

NOTA: La aparición de un color amarronado o marrón es indicativo de excesivo calentamiento y se debe descartar el medio.

CNEA	PREPARACIÓN DE PLACAS DE PETRI PARA CONTROLES MICROBIOLÓGICOS AMBIENTALES	PO-ATN31C2-003 Rev.:0 Página 5 de 10
-------------	--	--

6.2.4 Traspasar estas soluciones directamente, desde el erlenmeyer a frascos tipo Pirex, ya que estos frascos resisten el calor de esterilización, de 200 ml. cada uno, llenando los frascos hasta $\frac{3}{4}$ de su capacidad y cerrándolos con media rosca. Siempre protegiendo las manos con guantes.

6.2.5 Se utilizan tantos frascos de 200 ml como volumen de medio de cultivo haya. Los frascos, que se encuentran en el laboratorio de microbiología, deben tener tapa de cierre hermético a rosca y deben estar perfectamente limpios.

6.3 Rotulado de frascos:

Usar marcador indeleble.

6.3.1 Los frascos que vayan a contener medio Saboreau deben rotularse con las letras AS en color negro.

6.3.2 Los que contengan medio Agar Triptosado de Soja, llevarán la inscripción ATS en color rojo.

6.4 Esterilización:

6.4.1 Una vez rotulados y cerrados a media rosca los frascos, conteniendo el medio de cultivo, se colocan, con cuidado, en la bandeja metálica del autoclave Hogner 703 código ECC 017 ó del autoclave Harvey SterileMax serie 1277 código ECC 018. La misma debe ubicarse en el estante medio de cualquiera de los dos autoclaves para su esterilización, siendo de primera elección el autoclave Harvey Sterilemax serie 1277 código ECC 018 ya que al tener impresora, se registran los parámetros de esterilización alcanzados.

6.4.2 El pH de las soluciones se mide con tiras Indicadoras marca MERCK de rango 5-10 previamente verificadas con soluciones patrón.

6.4.3 Dejar que los medios tomen temperatura ambiente, sin solidificarse, 20°-25° C y tomar asepticamente una muestra sobre la cual se realizará la prueba.

6.4.4 Sobre la muestra se determina el valor de pH que deberán ser de pH de 7,3+/- 0,2 para el agar Triptosado de soja (AT) y 5,6+/- 0,2 para el agar Saboreau (AS), para los medios de cultivo marca DIFCO (los valores de pH pueden variar levemente según las indicaciones de distintos fabricantes).

6.5 Traslado de los frascos a la campana de flujo laminar:

6.5.1 Colocarse guantes protectores de doble tela para proteger las manos del calor.

6.5.2 Cuando el ciclo de esterilización del autoclave haya terminado, retirar los frascos con los medios de cultivo correspondientes y cerrarlos a rosca completa inmediatamente.

CNEA	PREPARACIÓN DE PLACAS DE PETRI PARA CONTROLES MICROBIOLÓGICOS AMBIENTALES	PO-ATN31C2-003 Rev.:0 Página 6 de 10
-------------	--	--

6.5.3 Trasladar los frascos al laboratorio de controles microbiológicos y colocarlos dentro del pass-box que se encuentra en ese laboratorio. El mismo se abre tirando de la manija de la puerta hacia fuera al mismo tiempo que se presiona el botón del medio del interruptor que se encuentra en la pared, sobre el pass-box.

6.6 Precauciones antes del plaqueado:

- 6.6.1 Cualquier elemento que vaya a Ingresar al área limpia de trabajo debe Ingresar por el pass-box del laboratorio de microbiología.
- 6.6.2 Los elementos de trabajo deben rociarse con una solución de alcohol etílico: agua 70:30 estéril antes de Introducirlos en la campana de flujo laminar.
- 6.6.3 El personal debe Ingresar al área de trabajo, vestidos con la ropa apropiada según SOP "Condiciones de vestimenta e higiene para el ingreso al área limpia del laboratorio de microbiología", versión vigente.
- 6.6.4 En ningún momento abrir las placas o los frascos con medio de cultivo esterilizado fuera de la campana de flujo laminar.
- 6.6.5 Antes de comenzar con el plaqueado el técnico debe rociarse las manos con la solución sanitizante de alcohol etílico: agua 70:30 estéril, procediendo de igual manera ante cualquier salida eventual de la campana de flujo laminar.

6.7 Preparación de la campana de flujo laminar y el laboratorio de trabajo.

- 6.7.1 El vestuario y área limpia de trabajo deben limpiarse y acondicionarse por personal técnico capacitado.
- 6.7.2 Limpiar la campana, de flujo laminar, con una solución sanitizante de alcohol etílico y agua destilada en proporción 70:30 estéril, según SOP "Limpieza y mantenimiento del laboratorio de microbiología", versión vigente.
- 6.7.3 Brevemente, se rocía todo el interior de la campana de flujo laminar y se pasa un paño Sontara micropure 100 (u otro elemento que no deje pelusa) estéril para limpiar y retirar la solución. Finalmente vuelve a rociarse la campana de la misma manera pero sin retirar la solución.
- 6.7.4 Encender la campana (la luz, el flujo de aire y la luz germicida) media hora antes de comenzar a trabajar.

CNEA	PREPARACIÓN DE PLACAS DE PETRI PARA CONTROLES MICROBIOLÓGICOS AMBIENTALES	PO-ATN31C2-003 Rev.:0 Página 7 de 10
-------------	--	--

6.7.5 Encendido de la Campana de Flujo Laminar:

En el frente de la campana, arriba a la derecha, se encuentran los botones de encendido / apagado. El primero desde la izquierda, señalado con el símbolo de un pequeño ventilador. Los que corresponden a encendido y apagado de luz de la campana, segundo botón desde la izquierda simbolizado con el dibujo de una lamparita, y el encendido y apagado de la luz germicida, tercer botón contando desde la izquierda simbolizado con una lamparita y la inscripción LG.

La luz germicida debe apagarse al comenzar a trabajar.

6.7.6 Todos los elementos de trabajo deben tomarse del pass-box ó de la mesa auxiliar que se encuentra en el área a medida que sean necesarios, colocados dentro de la campana, siendo previamente sanitizados con la solución de alcohol: agua 70:30 estéril.

6.7.7 Los elementos dentro de la campana deben ubicarse a los costados ya que ningún objeto debe interponerse entre el flujo de aire y las placas con las que se está trabajando.

6.8 Plaqueado.

Se procede de la misma manera tanto para el plaqueado de Agar Sabureau como para el de Agar Triptosado de Soja.

Se preparan primero las placas con uno de los medios de cultivo y se rotulan y luego se repite lo mismo para el otro medio de cultivo.

6.8.1 Abrir una bolsa de placas dentro de la campana de flujo laminar, cortando el nylon con la tijera, y sacar las placas, disponiéndolas sobre la mesada, boca arriba.

6.8.2 Se repite este procedimiento con cada bolsa de placas, abriéndolas de a una hasta finalizar con el total de volumen de medio de cultivo.

6.8.3 Destapar la botella de medio de cultivo y la placa.

6.8.4 Volcar un volumen de medio de cultivo suficiente, dentro de la placa, entre 17 y 19 ml.

6.8.5 Tapar nuevamente la placa.

6.8.6 Repetir el procedimiento con todas las placas, de a una por vez, hasta acabar el medio de cultivo.

6.8.7 Rotular las placas, según ANEXO

6.8.8 Se deben apartar, 4 placas de AT y 4 placas de AS (ocho placas en total), que corresponderán a los controles positivos y negativos de los medios de cultivo.

CNEA	PREPARACIÓN DE PLACAS DE PETRI PARA CONTROLES MICROBIOLÓGICOS AMBIENTALES	PO-ATN3102-003 Rev.:0 Página 8 de 10
-------------	--	--

6.8.9 Las placas DEBEN SER INCUBADAS 24 HS en estufa de cultivo para verificar su esterilidad, a la temperatura que corresponda según el medio de cultivo.

6.8.10 Luego del periodo de incubación, revisar una por una para ver la presencia de colonias. Descartar las que evidencien cualquier tipo de crecimiento y las que generen alguna duda.

6.9 Prueba de promoción de crecimiento

6.9.1 Se utilizarán dos placas de Petri por cada medio de cultivo y rotular las placas de agar Saboureaud como "hongos" y las placas con TSA como "bacterias", agregando la fecha del día en que se pone a incubar.

6.9.2 Inocular, cada una de las placas de agar Saboureaud con un número pequeño de microorganismos, no más de 100 ufc de algunos de los siguientes microorganismos: *Aspergillus Niger*, *Bacillus subtilis* ó *Candida Albicans*. Incubar en estufa a una temperatura de 22,5 +/- 2,5 °C durante 5 a 7 días.

6.9.3 Inocular cada una de las placas rotulado como "Bacterias", no más de 100 ufc de alguno de los siguientes microorganismos: *Staphylococcus Aureus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes* ó *Pseudomonas aeruginosa*. Incubar en estufa a una temperatura de 32,5 +/- 2,5 °C durante 3 a 5 días.

6.9.4 Los medios son adecuados si se produce crecimiento comparable al obtenido anteriormente con una partida de medio analizada y aprobada previamente .

6.10 Acondicionamiento de las placas para envío o almacenamiento

El método de acondicionamiento que se describe a continuación es común, variando únicamente el número de placas por bolsa, según sea el requerimiento para la aplicación.

Para el control ambiental del Ciclotrón: Acondicionarias, en grupos de 6 placas cada uno.

6.10.1 utilizan bolsas de nylon para tal fin, y/o las mismas bolsas en las que vienen las placas.

6.10.2 El acondicionamiento consta de dos bolsas, una por afuera de la otra, cerrando cada una con cinta ancha. Realizar un dobléz en un extremo de la cinta pegada para facilitar su apertura en el momento de uso.

6.10.3 Ambas bolsas, interna y externa, deben estar rociadas en su interior con solución sanitizante 70:30 de alcohol etílico y agua.

CNEA	PREPARACIÓN DE PLACAS DE PETRI PARA CONTROLES MICROBIOLÓGICOS AMBIENTALES	PO-ATN31C2-003 Rev.:0 Página 9 de 10
-------------	--	--

6.10.4 Rotular la bolsa externa con tipo de medio de cultivo, número de lote de placas y fecha de vencimiento.

6.10.5 Guardar las bolsas con placas en la heladera del laboratorio de preparación y esterilización de medios (número 20) hasta su uso, sin que el tiempo de almacenado en la heladera supere los siete días.

6.10.6 Completar los datos en el cuaderno de preparación de medios de cultivo (ver REGISTRO DE DATOS).

6. REGISTROS

Cuaderno de registro de datos de la preparación de medios de cultivo para microbiología:

Se utilizará un cuaderno de tapa dura, foliado con una etiqueta en la tapa, Registro de datos de la preparación de medios de cultivo, y el número del mismo, ejemplo: 01, 02, 03 etc en orden correlativo a medida que se vayan completando los cuadernos.

Cada hoja debe rayarse con diez columnas en las cuales se deben registrar los siguientes datos:

- Fecha de preparación de medios de cultivo y placas con el formato dd/mm/aa.
- Nombre del técnico ó auxiliar que preparó y esterilizó los medios de cultivo.
- Número de lote de medio de cultivo Agar Sabureau: consta de varias cifras y se encuentra en el envase del producto.
- Número de lote de medio de cultivo Agar Triptosado de soja: consta de varias cifras y se encuentra en el envase del producto.

NOTA: Si se llegara a trabajar con otros medios de cultivo, se deben agregar el número de columnas correspondiente para poder registrar los números de lote de todos los medios de cultivo con los que se trabaje.

- Volumen de medio de cultivo AS preparado ej 500 ml.
- Volumen de medio de cultivo AT preparado ej. 500ml.
- pH del medio AS.
- pH del medio AT.
- Cantidad de placas AS preparadas.
- Cantidad de placas AT preparadas.
- Número de lote de placas: con el formato nn / aa, donde nn simboliza el número correspondiente a ese lote de placas, correlativo al anterior y aa simboliza los dos últimos dígitos del año en curso. Ej 07/09
- Nombre del técnico que midió el pH de los medios de cultivo y realizó el plaqueado.

CNEA	PREPARACIÓN DE PLACAS DE PETRI PARA CONTROLES MICROBIOLÓGICOS AMBIENTALES	PO-ATN31C2-003 Rev.:0 Página 10 de 10
-------------	--	---

- Observaciones: se debe anotar cualquier alteración en el proceso, dato etc que se considere necesario registrar.

7. ANEXO

Anexo A: Rotulado de placas.

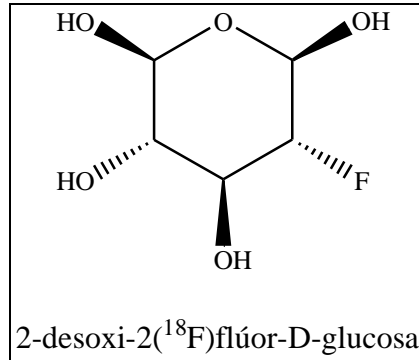
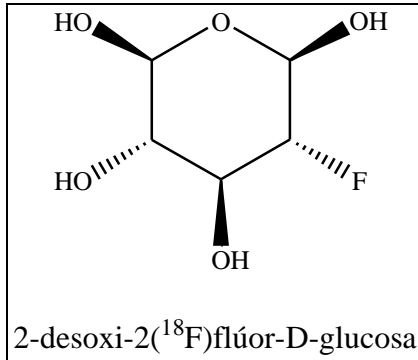
- Las placas que contengan medio agar Sabureau se rotulan con marcador indeleble negro.
- Las placas que contengan medio agar **Triptosado de soja** se rotulan con marcador indeleble **rojo**.
- Los rótulos deben escribirse en la tapa de cada placa.
- Se rotulan todas las placas.
- En el rótulo, luego de preparadas las placas, debe constar la siguiente información:
 - . Número de lote de placas (esta información se obtendrá del cuaderno de laboratorio de microbiología. Punto 7).
 - . Tipo de medio de cultivo que contenga la placa (AT ó AS según corresponda).
- Las placas de controles positivo y negativo (8 placas en total) de los medios se rotulan con la siguiente información:
 - . Número de lote de placas.
 - . Tipo de medio de cultivo que contenga la placa (AT ó AS según corresponda).
 - . Cont.+ y cont.- (para AT) y cont.+ y cont.- (para AS)
 - . Fecha de preparación.

6. BIBLIOGRAFÍA

- S Yu. Review of ^{18}F -FDG synthesis and quality control. Biomed Imaging Interv J 2006;2 (4):e57
- United States Pharmacopeia - National Formulary. USP 34 - NF 29 (2011)
- Método de Control - Control de Calidad PPR - MC PT 004/01 ATN31-C2 Rev: 0 - Control microbiológico ambiental en la producción de ^{18}F FDG. Planta de Producción de Radioisótopos. Gerencia de Área Aplicaciones de la Tecnología Nuclear. Centro Atómico de Ezeiza. Comisión Nacional de Energía Atómica. Año 2009.
- Procedimiento operativo - Control de Calidad PPR - PO ATN31C-027 Rev: 0 - Ensayo de esterilidad - Planta de Producción de Radioisótopos. Gerencia de Área Aplicaciones de la Tecnología Nuclear. Centro Atómico de Ezeiza. Comisión Nacional de Energía Atómica Año 2009.
- Monografía presentada ante la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) para la aprobación del producto "Preparación Radiofarmacéutica - Producto para diagnóstico de uso in vivo denominado ^{18}F - FDG - CNEA". Disposición ANMAT 0203

Fe de erratas.

- En la página 2, en lugar de:



Debe ir:

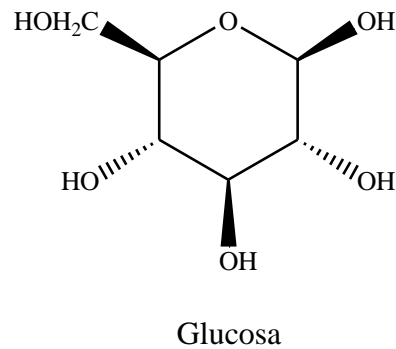
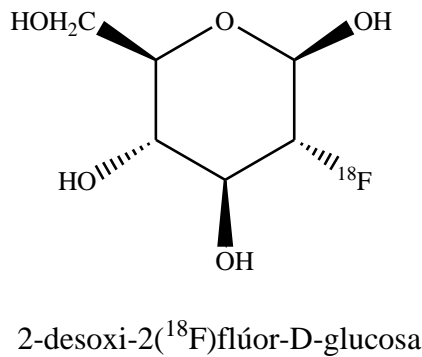


Figura 1.1 Forma estructural de la glucosa y su análogo.

- En la página 5, en lugar de:

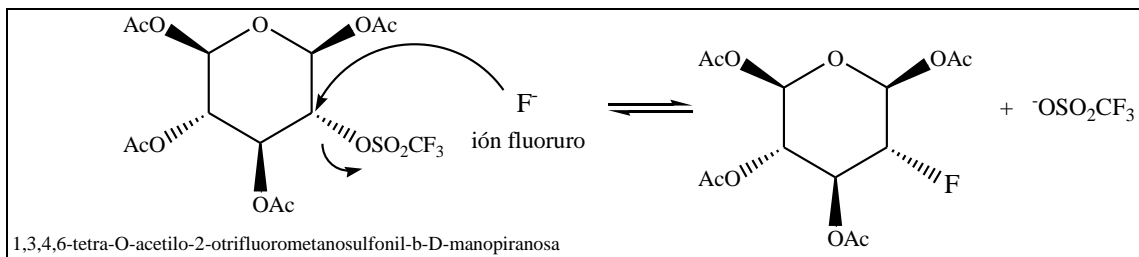
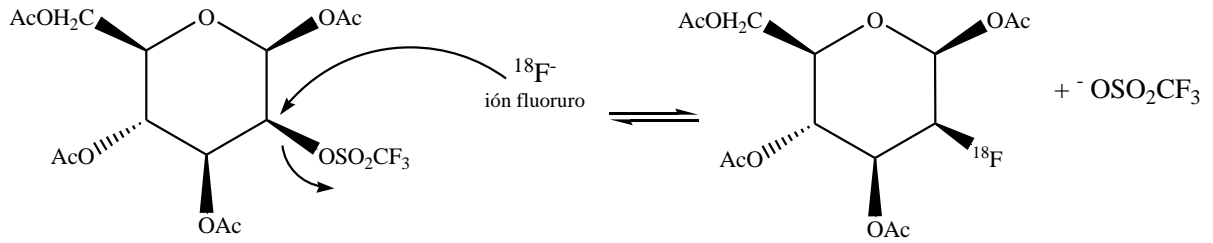


Figura 2.1 Reacción de marcación: Sustitución nucleofílica bimolecular.

Debe ir:



1,3,4,6-tetra-O-acetilo-otrifluorometanosulfonil- β -D-manopiranosas

Figura 2.1 Reacción de marcación: Sustitución nucleofílica bimolecular.

- En la página 6, en lugar de:

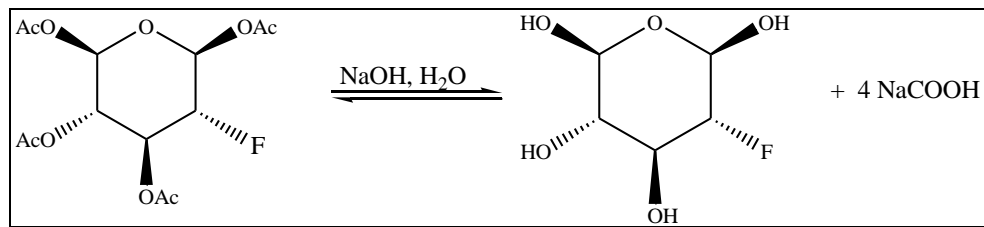


Figura 2.2. Hidrólisis básica

Debe ir:

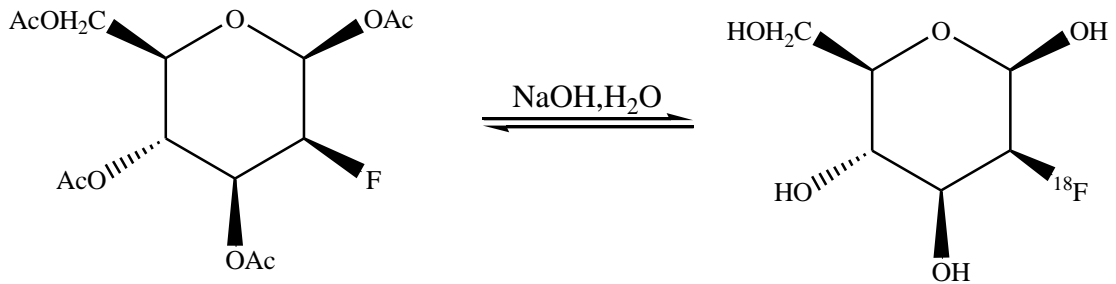


Figura 2.2. Hidrólisis básica

- En la página 26, en lugar de:

$$MG = \text{Antilog} \left(\frac{\log 0,03 + \log 0,06 + \log 0,06 + \log 0,125}{4} \right) = 0,0606$$

La media geométrica tiene un valor de 0,0606, el cual se ubica dentro del intervalo mencionado. Por lo tanto, el lisado es sensible a endotoxinas bacterianas.

Debe decir:

$$MG = \text{Antilog} \left(\frac{\log 0,06 + \log 0,06 + \log 0,125 + \log 0,125}{4} \right) = 0,0866$$

La media geométrica tiene un valor de 0,0866, el cual se ubica dentro del intervalo mencionado. Por lo tanto, el lisado es sensible a endotoxinas bacterianas.