

CAPÍTULO 1.1.9.

PRUEBAS PARA COMPROBAR LA ESTERILIDAD Y LA AUSENCIA DE CONTAMINACIÓN DE LOS PRODUCTOS BIOLÓGICOS

INTRODUCCIÓN

La esterilidad se define como la ausencia de microorganismos vivos. Se logra por calentamiento, filtración, tratamiento con óxido de etileno o por radiaciones ionizantes, y realizando asépticamente cualquier proceso posterior. La ausencia de contaminación se define como la falta de seres vivos concretos. Esto se logra seleccionando los materiales a partir de fuentes que carezcan de microorganismos concretos y realizando asépticamente cualquier proceso posterior. Solo con un control adecuado de los productos primarios utilizados y de los procesos que se siguen, así como del almacenamiento, se pueden asegurar de forma adecuada la esterilidad y la ausencia de contaminación. Para comprobar que se ha logrado ese control, se requiere la realización de pruebas sobre el producto.

A. PROCEDIMIENTOS GENERALES

1. Los materiales originales deben obtenerse a partir de fuentes que estén libres de contaminación y que se manejen de tal modo que se reduzca la contaminación y la posibilidad de que se multiplique cualquier contaminante.
2. Los materiales que puedan esterilizarse sin que sus propiedades biológicas resulten excesivamente afectadas deben esterilizarse mediante un método efectivo para tales materiales. El método debe reducir el nivel de la contaminación hasta que esta sea indetectable, según se determine mediante una prueba de esterilidad adecuada (véase el párrafo B.3 más adelante).
3. Si se utiliza un procedimiento de esterilización, este deberá validarse para demostrar su conveniencia y controlarse de modo adecuado para demostrar que ha funcionado correctamente en cada ocasión.
4. Los materiales que no se hayan esterilizado y los sometidos a manipulación tras la esterilización, deberán manejarse de forma aséptica.
5. El ambiente en el que se realiza cualquier manipulación aséptica ha de mantenerse en estado de limpieza, protegerse de fuentes externas de contaminación y controlarse para evitar la contaminación interna.

B. VACUNAS CON VIRUS VIVOS PARA ADMINISTRACIÓN POR INYECCIÓN

1. Los materiales de origen animal deben (a) esterilizarse, (b) obtenerse de animales sanos que, en la medida de lo posible, deberán de estar libres de patógenos que puedan transmitirse desde la especie de origen a la especie que se va a vacunar, o a cualquier otra especie en contacto con ellas, o (c) el material debe estar exento de tales patógenos.
2. Los virus del inóculo inicial y los de cualquier línea celular continua utilizada para el crecimiento de los virus deben estar libres de bacterias, hongos, micoplasmas, virus no relacionados y otros patógenos que puedan transmitirse desde la especie de origen a la especie que se va a vacunar, o a cualquier otra especie en contacto con ellas. Para la producción de las vacunas aviares y para los procedimientos de control de dichas vacunas, se recomienda el uso de huevos embrionados de gallina libres de microorganismos patógenos.
3. Cada lote de vacuna debe superar una prueba de esterilidad similar a la de los métodos publicados (1–3, 6).

4. Cada lote de vacuna debe superar las pruebas adecuadas para demostrar que la vacuna está exenta de virus externos (tales pruebas incluyen los ensayos en cultivos celulares que sean sensibles a los virus de la especie a vacunar, las pruebas sobre huevos embrionados y, cuando sea necesario, las pruebas en animales).
5. Algunos países exigen que cada lote de vacuna supere una prueba de ausencia de micoplasmas. Se han publicado métodos adecuados para tal prueba (2–6).
6. Puede ser necesaria la realización de pruebas para determinar la ausencia de algunas bacterias específicas, por ejemplo, las pruebas para detectar *Salmonella*, *Mycobacterium tuberculosis* y *M. paratuberculosis*, *Brucella* spp. y *Leptospira* spp. (1, 2)

C. VACUNAS CON VIRUS VIVOS PARA SU ADMINISTRACIÓN CON EL AGUA DE BEBIDA, LA PULVERIZACIÓN, O LA ESCARIFICACIÓN CUTÁNEA

1. Resultan aplicables los párrafos B.1, 2, 4, 5, y 6.
2. Puede estar permitido un número limitado de bacterias no patógenas y hongos contaminantes (véase la sección J.2.5. más adelante)

D. VACUNAS CON VIRUS INACTIVADOS

1. Resultan aplicables los párrafos B.1., 2 y 3.
2. Cada lote de vacuna debe pasar una prueba de la inactivación del virus vacunal. Dicha prueba se realiza mediante la adición de un conservante. El proceso de inactivación y las pruebas utilizadas para detectar el virus vivo después de la inactivación deben ser validadas y debe demostrarse que son las apropiadas para el objetivo perseguido.
3. Puede ser necesaria la demostración de que el método de inactivación también inactiva a los patógenos representativos a no ser que la vacuna cumpla las condiciones de los párrafos B.4 y B.5.

E. VACUNAS CON BACTERIAS VIVAS

1. Resulta aplicable el párrafo B.1.
2. Los inóculos bacterianos iniciales deben estar libres de otras bacterias así como de hongos y micoplasmas.
3. Cada lote de vacuna debe superar una prueba de pureza mediante el uso de medios sólidos e ignorando el crecimiento de la bacteria de la vacuna.
4. Algunos países exigen que cada lote de vacuna bacteriana supere una prueba de ausencia de micoplasmas. Se han publicado métodos adecuados para tal prueba (ref. 6 y, para micoplasmas aviares, ref. 2)

F. VACUNAS CON BACTERIAS INACTIVADAS

1. Resultan aplicables los párrafos B.1, B.3, y E.
2. Cada lote de vacuna debe superar una prueba para demostrar la inactivación de la bacteria contenida en la vacuna. Si resulta apropiado, puede utilizarse a tal efecto la prueba de esterilidad.

G. SUEROS PARA ADMINISTRAR A LOS ANIMALES

1. Resulta aplicable el párrafo B.1. Algunos países exigen la cuarentena, el certificado de sanidad y que se realicen las pruebas específicas de la enfermedad con todos los animales donantes de suero (1).

2. Si se usa un virus o una bacteria para la producción de los sueros, resultan aplicables los párrafos B.2 o E.2, según corresponda.
3. Cada lote de suero debe superar una prueba de esterilidad. Se han publicado métodos de ensayo adecuados (1–2).
4. Cada lote de suero debe superar las pruebas adecuadas que demuestren que el suero está exento de virus externos (tales pruebas incluyen ensayos en cultivos celulares que sean sensibles a los virus de la especie tratada, pruebas sobre huevos embrionados, y, cuando sea preciso, pruebas en animales).
5. Algunos países exigen que cada lote de vacuna supere una prueba de ausencia de micoplasmas. Se han publicado métodos adecuados para tal prueba (ref. 6, y para micoplasmas aviares ref. 2)

H. AGENTES DIAGNÓSTICOS PARA ADMINISTRACIÓN A ANIMALES

1. Resultan aplicables los párrafos B.1 y 3.
2. Si se utiliza un virus en la producción del agente diagnóstico, son aplicables los párrafos B.2 y D.2; si se usa una bacteria, resultan aplicables los párrafos E.2 y F.2.

I. EMBRIONES, ÓVULOS, Y SEMEN

En relación con el uso de embriones, óvulos y semen, se deben tomar precauciones especiales (4).

J. EJEMPLOS DE PROCEDIMIENTOS

1. Procedimientos generales

Son muchos los factores que influyen en los elementos y los requisitos necesarios de un programa de gestión de calidad. Dichos factores son: Los materiales utilizados en la producción de productos biológicos deben ser esterilizados y/o probados antes de su uso para asegurar la ausencia de contaminantes. También deben comprobarse las muestras del producto biológico final para la detección de bacterias, hongos o micoplasmas contaminantes.

Los ensayos que aquí se describen para las bacterias, hongos, micoplasmas y virus proceden de diversas fuentes y se ponen como ejemplo de los métodos que pueden emplearse con seguridad.

2. Detección de bacterias y hongos

Estos ensayos describen los materiales y los métodos que se utilizan para detectar bacterias y hongos mediante la técnica de filtración por membrana o mediante la inoculación directa en medios de cultivo líquido en el caso de materiales que no son adecuados para la filtración a través de membrana.

2.1. Procedimiento general para la estimación de bacterias y hongos viables

Las pruebas normalizadas para la detección de bacterias y hongos indeseables en materiales de partida, lotes de inóculo o en el producto final son: la prueba de la filtración en membrana o la prueba de la esterilidad por inoculación directa.

En la técnica de la filtración en membrana, se usa un filtro con un tamaño de poro nominal no superior a 0,45 µm y un diámetro de al menos 47 mm. Si el material es acuoso o débilmente lipídico se deben usar filtros de nitrato de celulosa; si el material tiene un elevado contenido alcohólico, lipídico o de adyuvantes lipídicos se deben usar filtros de acetato de celulosa. El filtro se humedece con 20–25 ml de diluyente A o B inmediatamente antes de verter el contenido del recipiente o recipientes que se vayan a ensayar.

Diluyente A – para los productos o materiales acuosos: Se disuelve 1 g de hidrolizado péptico de tejido animal en agua hasta completar un litro, se filtra o centrifuga para clarificar, se ajusta el pH a 7,1+ 0,2, se distribuyen en frascos alícuotas de 100 ml, y se esterilizan al vapor.

Diluyente B – para los materiales o productos lipídicos: Se añade 1 ml de polisorbato 80 a 1 litro de diluyente A, se ajusta el pH a 7,1+ 0,2, se distribuyen en frascos alícuotas de 100 ml, y se esterilizan al vapor.

Si la muestra biológica ensayada tiene propiedades antimicrobianas, se lava la membrana tres veces con aproximadamente 100 ml del diluyente apropiado (A o B) después de la aplicación de la muestra. A continuación se transfiere la membrana entera a los medios de cultivo, cortada asépticamente en partes iguales y colocadas en los medios, o bien los medios se transfieren a la membrana en el aparato de filtración. Cuando la muestra contenga mertiolato como conservante, se usa el medio de tioglicolato líquido (FTM) y la membrana se incuba tanto a 30–35°C como a 20–25°C. Si la muestra ensayada contiene un agente biológico inactivado sin mertiolato como conservante, se usa el medio FTM a 30–35°C y medio de soja y caseína hidrolizada (SCDM) a 20–25°C. Cuando se trata de una muestra biológica que se ha de analizar contenga virus vivos, se utiliza el medio SCDM para su incubación a ambas temperaturas. Recientemente se ha sugerido que se utilice agar sulfito-polimixina-sulfadiazina para potenciar la detección de *Clostridium* spp.

Si se elige la inoculación directa a los medios de cultivo, se emplea una pipeta estéril o una jeringa con aguja para transferir asépticamente el material biológico de modo directo a los medios líquidos. En caso de que la muestra ensayada tenga propiedades antimicrobianas, se debe determinar la proporción del inóculo respecto al volumen del medio de cultivo antes del comienzo de la prueba. Para determinar el volumen correcto de dicho medio a fin de invalidar la actividad antimicrobiana, se usan 100 unidades formadoras de colonias (CFU) de los microorganismos control indicados en el cuadro 1. Si la muestra analizada contiene mertiolato como conservante, se emplea el medio FTM en tubos de ensayo que se incuban tanto a 30–35°C como a 20–25°C. Después de un tiempo de incubación adecuado (véase la sección J.2.2), el crecimiento debería ser claramente visible. Si la muestra ensayada contiene un agente biológico inactivado sin mertiolato, o una bacteria viva, se usa el medio FTM a 30–35°C y el medio SCDM a 20–25°C. Si se trata de una muestra con virus vivos, se usa el medio SCDM a ambas temperaturas de incubación. Si la vacuna con bacterias inactivadas contiene clostridios, o algún componente de los clostridios, es preferible usar el medio FTM suplementado con 0,5% de extracto de carne (FTMB) en lugar de FTM. También puede ser aconsejable la utilización de FTM y SCDM en todas las pruebas.

Cuadro 1. Algunas cepas de la Colección Americana de Cultivos Tipo¹ con sus medios respectivos y condiciones de incubación

Medio	Microorganismo de referencia	Incubación	
		Temperatura (°C)	Condiciones
FTM	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC no. 6633	30–35	Aeróbicas
FTM	<i>Candida krusei</i> ATCC no. 6258	20–25	Aeróbicas
SCDM	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC no. 6633	30–35	Aeróbicas
SCDM	<i>Candida kusei</i> ATCC no. 6258	20–25	Aeróbicas
FTMB	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC no. 11437	30–35	Anaeróbicas
FTMB	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC no. 6538	30–35	Aeróbicas

Para las pruebas de esterilidad tanto mediante filtración por membrana como por inoculación directa, todos los medios se incuban durante al menos 14 días. Se examinan los recipientes de ensayo con intervalos durante la incubación y tras los 14 días de incubación para evidenciar el crecimiento microbiano. Este debería confirmarse mediante subcultivo y tinción de Gram.

2.2. Inducción del crecimiento y pruebas de interferencia

La esterilidad de los medios de cultivo debe confirmarse incubando recipientes representativos a las temperaturas adecuadas durante el tiempo especificado para cada prueba.

Cada vez que se realiza una prueba debe validarse para cada producto objeto de prueba y para cada partida o lote de medios de cultivo la capacidad de un medio de cultivo para mantener el crecimiento en presencia y en ausencia del producto, componentes del producto, células, inóculos, y otros materiales ensayados.

1 American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USA.

Para ensayar la capacidad de mantener el crecimiento en ausencia del material, los medios de cultivo deberían inocularse con 10–100 microorganismos control viables de las cepas sugeridas por la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), que se indican en el cuadro 1, e incubarlos de acuerdo con las condiciones especificadas.

Para ensayar la capacidad de los medios de cultivo de mantener el crecimiento en presencia del material a prueba, los recipientes deben ser inoculados simultáneamente con el material de prueba (véase la sección J.2.3.) y con 10–100 microorganismos control viables. El número de recipientes que se ha de usar debería ser al menos la mitad de los usados para ensayar el producto o los componentes del producto. Los medios son satisfactorios si a los 7 días existe clara evidencia del crecimiento de los microorganismos control en todos los recipientes con el medio. En el caso de que se aprecie crecimiento, debería identificarse el microorganismo para confirmar que se trata del microorganismo originalmente añadido al medio. La prueba de esterilidad no se considera válida si alguno de los medios muestra una respuesta inadecuada al crecimiento, o si el microorganismo detectado no es el microorganismo usado para inocular el material.

2.3. Número de muestras de prueba

El número de artículos de cada lote determina el número de recipientes que deberían ser sometidos a la prueba de esterilidad. Si el tamaño del lote no es superior a 100, debería ensayarse el 10%, o cuatro recipientes, si es mayor. Si el lote contiene entre 100 y 500 recipientes, deberían probarse diez. Si el lote tiene más de 500 recipientes, entonces el 2% o 20 recipientes, cualquiera que sea el menor, deberían ser sometidos a ensayo. Una alternativa es probar un máximo de 10 contenedores para todas las series que son diferentes de los productos autógenos. La cantidad de inóculo para la prueba de esterilidad está en función de la cantidad de muestra biológica presente en cada recipiente. Si la cantidad es menor de 1 ml, todo el contenido se divide para cada medio. Si la cantidad es de 1 a 4 ml, se usa entonces la mitad del contenido para cada medio. Si se encuentra entre 4 y 20 ml, se utiliza un inóculo de 2 ml para cada medio. Cuando la cantidad en cada recipiente está comprendida entre 20 y 100 ml, entonces se usa el 10% del contenido por medio. Finalmente, si la cantidad por recipiente supera los 100 ml, se usa para inocular cada medio el 10% o 50 ml, cualquiera que sea mayor.

2.4. Interpretación de los resultados de la prueba de esterilidad

Si existe crecimiento en cualquier medio pero puede demostrarse por controles que fueron defectuosos los medios o la técnica empleada, entonces el primer ensayo se considera no válido y debe repetirse. Si en un primer ensayo se detecta crecimiento microbiano en cualquiera de los recipientes del ensayo y no hay evidencia que lo invalide, se debe proceder a una segunda prueba. En tal caso, el número mínimo de recipientes con muestra biológica, recipientes de ensayo y filtros de membrana es el doble del número utilizado en la primera prueba. Cuando no se detecta un crecimiento en el primer ensayo ni en su repetición, la muestra satisface los requisitos de la prueba y se considera adecuada en cuanto a esterilidad. Si se detecta crecimiento microbiano en cualquiera de los recipientes del ensayo repetido, la muestra biológica se considera no apta en cuanto a la esterilidad. Sin embargo, cuando se demuestre mediante controles que los medios o la técnica fueron incorrectos en la repetición, debe procederse a una nueva repetición.

2.5. Procedimiento general para determinar la presencia de bacterias y hongos en las vacunas con virus vivos producidas en huevos y administradas mediante el agua de bebida, la pulverización o la escarificación cutánea

Cada lote de recipientes con una muestra biológica final debe tener una contaminación media no superior a una colonia de bacterias u hongos por dosis de vacuna recomendada en aves, o diez colonias por dosis en otros animales (véase la anterior sección J.2.3. para determinar el número de muestras a ensayar). De cada muestra de los recipientes se inoculan dos placas de Petri con una vacuna equivalente a diez dosis, si la vacuna es para las aves, o a una dosis si es para otros animales. A cada placa se añaden 20 ml de medio sólido de infusión de cerebro y corazón que contenga 0,007 UI (unidades internacionales) de penicilinas por ml. Una placa se debe incubar a 30–35°C durante 7 días y la otra a 20–25°C durante 14 días. El recuento del número de colonias se realiza al final de cada período de incubación. En cada condición de incubación se debe realizar una determinación promedio de colonias en todas las placas que representen un lote. Si en la prueba inicial la media del número de colonias en cada condición de incubación supera a una colonia por dosis de vacuna para las aves, o a diez colonias por dosis de vacuna para otros animales, se debe proceder a repetir la prueba para eliminar la posibilidad de fallos en la técnica, usando el doble de recipientes no abiertos de la muestra biológica final. Si en la prueba final la media del número de colonias por cada lote en cada incubación supera una colonia por dosis en el caso de la vacuna aviar, o diez colonias por dosis en el caso de la vacuna para otros animales, el lote de vacuna debe ser considerado como no satisfactorio.

2.6. Procedimiento general para determinar la pureza de los inóculos de bacterias y de los productos biológicos con bacterias vivas

Cada inóculo de bacterias o cada lote de material con bacterias vivas deben comprobarse su pureza mediante la inoculación en el medio SCDM, que se incuba a 20–25°C durante 14 días, y en el medio FTM, que se incuba a 30–35°C durante 14 días (véase la anterior sección J.2.3. para determinar el número de muestras que se han de ensayar y la cantidad de inóculo usado). Se utiliza una pipeta estéril o una jeringa con aguja para transferir directamente de modo aséptico la cantidad de muestra a los dos tipos de cultivo. La proporción mínima entre inóculo y medio de cultivo es de 1/15.

Si el inóculo o el crecimiento de la vacuna bacteriana vuelve turbio el medio, de tal modo que no es posible determinar la ausencia de crecimiento microbiano atípico, se debe proceder a hacer subcultivos a partir de los tubos turbios desde el día 3 al día 11. El subcultivo se hace transfiriendo 0,1–1,0 ml a medios diferenciales líquidos y sólidos e incubando durante el resto del período hasta 14 días. También se debería realizar un examen microscópico mediante la tinción de Gram.

Si no se detecta ningún crecimiento microbiano atípico en cualquiera de los recipientes de ensayo cuando se compara con un control positivo incluido en la prueba, el lote de muestra biológica puede considerarse satisfactorio en cuanto a su pureza. Si se detecta un crecimiento atípico pero se puede demostrar mediante control que los medios o la técnica fueron defectuosos, entonces se debe repetir la primera prueba. Si se detecta un crecimiento atípico, pero no existe evidencia que permita invalidar la prueba, se puede llevar a cabo una repetición. En esta repetición se usa un número doble de recipientes con muestra biológica y de recipientes para prueba respecto al primer ensayo. Si en dicha repetición no se detecta crecimiento atípico, la muestra se considera apta en cuanto a su pureza. Si en cualquiera de los recipientes de prueba se encuentra crecimiento atípico, la muestra se considera inadecuada en cuanto a pureza. Sin embargo, cuando en la repetición pueda demostrarse mediante controles que los medios o la técnica fueron defectuosos, la repetición debería a su vez repetirse.

3. Detección de la contaminación por *Mycoplasma*

3.1. Procedimiento general para la detección de la contaminación por *Mycoplasma*

Cada lote de vacuna con virus vivos, cada lote de inóculo vírico original (MSV), cada lote de células primarias y originales en stock (MCS), y todos los componentes de origen animal que no hayan sido esterilizados al vapor deben ser sometidos a pruebas para determinar la ausencia de micoplasmas. Deberían utilizarse medios sólidos y líquidos capaces de mantener el crecimiento de pequeñas cantidades de microorganismos de referencia, tales como los típicos microorganismos contaminantes *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma arginini*, *M. fermentans*, *M. hyorhinis*, *M. orale* y *M. synoviae*. Las propiedades nutritivas del medio sólido deberían de ser tales que, cuando se inoculan aproximadamente 200 CFU (unidades formadoras de colonias) por placa, no aparezcan menos de 100 CFU para cada microorganismo de referencia. Cuando se inoculan aproximadamente 20 CFU de cada microorganismo en los medios líquidos, debe originarse un cambio de color adecuado. La capacidad de los medios de cultivo para mantener el crecimiento en presencia de los productos debe validarse para cada producto objeto de prueba y para cada nuevo grupo o lote de medios de cultivo.

Una muestra de cada lote de vacuna, MSV, etc., debe someterse a la prueba. Se inoculan cuatro placas de medio sólido con 0,25 ml de la muestra a examinar y se inoculan, por otra parte, 100 ml de medio líquido con 10 ml de la muestra. Una alternativa es inocular cada una de las placas con 0,1 ml e inocular 100 ml de medio líquido con 1 ml de la muestra que se está ensayando. Se incuban durante 28 días dos placas a 35–37°C en condiciones aerobias (una atmósfera con un 5–10% de CO₂ y una humedad adecuada) y otras dos en condiciones anaerobias (una atmósfera de nitrógeno con un 5–10% de CO₂ y una humedad adecuada). A los 3 o 4 días de su inoculación, se subcultiva 0,25 ml del medio líquido mediante resiembra en dos placas de medio sólido. Se incuba a 35–37°C una placa en condiciones aerobias y otra en condiciones anaerobias hasta 28 días. Se repite el proceso de subcultivo por resiembra los días 6, 7 u 8, y de nuevo los días 13 ó 14. Un método alternativo consiste en subcultivar en una placa de medio sólido los días 3, 5, 10 y 14. Todas las placas de subcultivo se incuban durante 10 días excepto para el subcultivo del día 14, que se incuba durante 14 días. Observar el medio líquido cada 2–3 días y, si ocurre cualquier cambio de color, se procede a subcultivar inmediatamente.

3.2. Interpretación de los resultados de la prueba para *Mycoplasma*

Al final del período de incubación (día 28), se examinan microscópicamente todos los medios sólidos inoculados para comprobar la presencia de colonias de micoplasmas. La muestra ensayada supera la prueba si se ha producido un crecimiento de colonias de micoplasmas en los controles positivos y si no se ha producido en ninguno de los medios sólidos inoculados con el material de prueba. Si se rompiera o contaminara accidentalmente con bacterias u hongos más de una placa en cualquier fase de la prueba,

esta se consideraría no válida y debería repetirse. Si aparecen colonias de micoplasmas en cualquiera de las placas con medio sólido, debería repetirse una vez la prueba para confirmar la contaminación por micoplasmas. En esta nueva prueba se puede usar el doble de volumen (0,5 ml) de material biológico objeto de la prueba. Si en alguna placa de esta repetición se detectan colonias de micoplasmas, la muestra de la prueba debe considerarse como no apta debido a la contaminación por micoplasmas. Algunos micoplasmas no pueden cultivarse, en cuyo caso los lotes de MSV y MCS tienen que comprobarse utilizando una línea celular indicadora (células Vero), o los métodos de tinción de ADN o basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

4. Detección de la contaminación por *Salmonella*

Ningún lote de material biológico con virus vivos producidos en huevos debe estar contaminado. Estas pruebas deben realizarse antes de añadir los agentes bacteriostáticos o bactericidas. Se deben probar cinco muestras de cada lote; 5 ml de muestra o la mitad del contenido de un recipiente, cualquiera que sea menor, se inoculan en 100 ml de caldo de triptosa y caldo de tetrionato. Estos medios líquidos inoculados se incuban a 35–37°C durante 18–24 horas. A partir de estos caldos se debe resembrar en los medios sólidos MacConkey y *Salmonella*–*Shigella*, se incuba por 18–24 horas y se examina. Si no se advierte el típico crecimiento de *Salmonella*, las placas deben incubarse durante 18–24 horas adicionales y examinarse de nuevo. Si entonces se observan colonias típicas de *Salmonella*, se debe proceder a un subcultivo en un medio diferencial adecuado para realizar una identificación positiva. Si se encuentra *Salmonella*, el lote de muestra biológica no es apto.

5. Detección de virus en muestras biológicas

Los materiales biológicos que son susceptibles de contaminación vírica y que no pueden ser esterilizados antes de su uso, como el caso de algunos ingredientes de origen animal (por ejemplo, suero), las células de cultivo primario, las líneas celulares o los stocks de virus para inoculación, deben ser ensayados antes de su correspondiente uso. Existen pruebas descritas para detectar virus contaminantes mediante el efecto citopático (CPE), la hemoadsorción, la hemoaglutinación, las técnicas con anticuerpos fluorescentes u otros métodos adecuados, como por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el enzoinmunoensayo (técnicas ELISA). Todos los materiales biológicos deben ensayarse de forma específica para la detección de pestivirus. Los productos aviares y las vacunas deben inocularse en células de cultivo aviares primarias, en huevos y/o en polluelos para la detección del virus aviar. Además de examinar el efecto citopático (ECP) y las patologías celulares en estas células, o huevos o pollos inoculados, deben incluirse las pruebas para detectar virus hemoadsorbentes y hemoaglutinantes.

Las células se ensayan de la siguiente manera. El día inicial, las células primarias o congeladas que se van a ensayar se siembran en frascos de 75 cm³ (o en contenedores similares); 7 días después, se preparan a partir de él al menos dos frascos de 75 cm³. En el día 14, un frasco se utiliza para pruebas celulares de citopatología, hemoadsorción, y tinción con anticuerpos fluorescentes (los procedimientos se describen más adelante). El otro frasco se resiembrar por segunda vez, y el día 21 se somete a tres ciclos de congelación y descongelación. Un método alternativo es congelar y descongelar las células hasta 26 días en vez de 21 días. Después del tercer ciclo de congelación y descongelación, las células se centrifugan a 2.000 **g** durante 10 minutos, y el sobrenadante se usa para inocular células adecuadas que sean sensibles a los virus, es decir, células susceptibles a los virus que puedan estar presentes en la especie animal de la que proceden las células, células susceptibles a los virus que puedan presentarse en los animales en los que se aplicará el producto y células susceptibles a los pestivirus. Luego estas células son sembradas dos veces a intervalos de 7 días, y comprobados su efecto citopático, hemoadsorción, y tinción con anticuerpos fluorescentes.

Los componentes de origen animal se prueban tanto en células de riñón de mono verde africano (células Vero) como en líneas celulares o células primarias de la misma especie que el componente sometido a la prueba. Se emplean frascos de 72 cm³, y se inoculan las células en 25 ml de medio con 3,75 ml del material ensayado o con 15% de dicho material, o inferior. Las células se resiembran dos veces a intervalos de 7 días y se comprueba su efecto citopático, hemoadsorción y tinción con anticuerpos fluorescentes. Deben observarse las células cada 2 o 3 días y antes de cada subcultivo a lo largo del período de incubación con la finalidad de comprobar si hay efecto citopático.

Los lotes de inóculos víricos originales (MSV) se comprueban sobre células Vero, líneas celulares o células primarias de la especie para la que está diseñado el producto, y sobre las líneas celulares o las células primarias de la especie en la que se prepara el producto (si es diferente de la especie en la que se aplicarán).

Para cada tipo celular utilizado en la prueba, se descongela o reconstituye 1 ml del MSV ensayado y se neutraliza mediante la adición de 1 ml de anticuerpo mono específico. El suero debe carecer de anticuerpos frente a cualquiera de los contaminantes que se pretende poner de manifiesto en la prueba. Deberían probarse los antisueros para los efectos inhibidores inespecíficos. Siempre resulta necesario un mínimo de al menos dos tipos celulares, de modo que se requiere un mínimo de 2 ml de MSV y 2 ml de antisuero. El antisuero se pone en

contacto durante una hora a temperatura ambiente con el MSV para que lo neutralice. A continuación, se inoculan 2 ml de esta mezcla de MSV/antisuero en frascos de 75 cm³ que contengan las células adecuadas. Si se sabe que el MSV presenta un título alto o que es un agente difícil de neutralizar, o cuando se sabe que el suero bloqueante tiene un título bajo, se puede añadir antisuero bloqueante al medio de crecimiento a una concentración final de 1–5%. Se deben resembrar las células al menos dos veces durante un período de 14 días, y el cultivo final se examina para comprobar su efecto citopático, hemoadsorción y tinción con anticuerpos fluorescentes.

Para detectar el efecto citopático causado por los virus contaminantes, se usa normalmente el procedimiento de tinción de May-Grünwald-Giemsa. Las monocapas se suelen preparar en un portaobjetos para cultivos de tejidos de dos cámaras y se incuban por 7 días. Se excavan los pocillos de plástico de los portas dejando la junta de goma unida al porta. Se lavan los portaobjetos con la solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (PBS) templada, se fijan en alcohol y se colocan en un dispositivo de tinción. A continuación, se tiñen los portas durante 15 minutos a temperatura ambiente con colorante May-Grünwald diluido 1/5 con metanol absoluto. El colorante May-Grünwald se elimina mediante la inversión de los portas. Luego se tiñen estos durante 20 minutos con colorante Giemsa diluido a 1/15 con agua desionizada. El colorante Giemsa se elimina invirtiendo los portas y lavándolos con agua desionizada durante 10-20 segundos. Se secan los portas al aire, y se aplica aceite de parafina y un cubreobjetos. La tinción de May-Grünwald-Giemsa tiñe de modo diferente las nucleoproteínas con ADN o ARN. Las nucleoproteínas con ADN se colorean de rojo-púrpura, mientras que las nucleoproteínas con ARN se colorean de azul. Las monocapas se examinan con un microscopio convencional para observar la presencia de cuerpos de inclusión, un número anormal de células gigantes, o cualquier efecto citopático atribuible a un virus contaminante. Las monocapas inoculadas se comparan con las monocapas no inoculadas. Si se detecta un efecto citopático específico debido a un virus contaminante, el material ensayado debería considerarse como no apto.

La prueba para detectar virus contaminantes que producen hemoadsorción en las células infectadas se lleva a cabo normalmente en monocapas de la segunda resiembra de cultivos celulares inoculados con el material probado y en cultivos celulares no inoculados. Las monocapas se disponen, por lo general, en frascos de plástico de 25 cm³. La sangre de cobaya, de pollo o de cualquier otro origen que se use en este ensayo se mezcla con un volumen igual de solución de Alsever. La sangre puede conservarse hasta 7 días a 4°C si se lava varias veces con solución de Alsever antes del almacenarse en un volumen igual de dicha solución. Inmediatamente antes de su uso, los eritrocitos guardados se lavan de nuevo añadiendo 5 ml de sangre en solución de Alsever a 45 ml de PBS libre de calcio y magnesio y se centrifuga a 500 *g* durante 10 minutos en un tubo de centrifuga de 50 ml. Se elimina el sobrenadante resultante mediante succión y los eritrocitos se suspenden en PBS y se vuelven a centrifugar. Este proceso de lavado se repite al menos dos veces hasta que el sobrenadante resulte claro. Los eritrocitos de cada especie se combinan añadiendo 0.1 ml de cada tipo de células sanguíneas empaquetadas a 100 ml de PBS. Los eritrocitos de las diferentes especies pueden mantenerse separados o combinados, según se desee. A cada frasco se añaden 5 ml de la suspensión de eritrocitos y se incuban los frascos a 4°C durante 30 minutos. Las monocapas se lavan dos veces con PBS y se examina su hemadsorción. Si no se observa hemadsorción, se añaden 5 ml de la suspensión de eritrocitos a cada frasco, se incuban de nuevo a 20–25°C por 30 minutos, se lavan como antes, y se vuelven a examinar para detectar la hemadsorción. Si se desea, se pueden usar frascos distintos para cada temperatura. Las monocapas se examinan para detectar la presencia de hemadsorción tanto a simple vista (usando un transiluminador encendido) como al microscopio. Es importante comparar las monocapas no inoculadas con las monocapas de la prueba para detectar la existencia de hemadsorción no específica que puede ocurrir con algunos tipos de células. El uso de PBS libre de calcio y de magnesio y de eritrocitos frescos debería evitar, en gran medida, la existencia de una hemadsorción no específica. Si se detecta una hemadsorción específica atribuible a un virus contaminante, el material ensayado debería ser considerado no apto.

Las pruebas para detectar a los virus contaminantes con anticuerpos fluorescentes utilizan generalmente monocapas de segunda resiembra de cultivos celulares inoculados con el material ensayado y cultivos celulares no inoculados. Las monocapas se disponen normalmente en portaobjetos de cultivos celulares con ocho cámaras. Para cada conjugado antivirico se prepara un porta como control positivo (formado por ocho monocapas) inoculando cada monocapa con aproximadamente 100 DICT₅₀ (dosis infectiva del 50% en cultivo del tejido) del virus apropiado. Se tiñen tres grupos de monocapas con cada conjugado antivirico. Estos son, Grupo 1 – la segunda resiembra de los cultivos celulares inoculados con el material que está siendo ensayado; Grupo 2 – la segunda resiembra de los cultivos celulares no inoculados; y Grupo 3 – la segunda resiembra de los cultivos celulares no inoculados (para producción de cultivos celulares como control positivo). A la hora de teñir, se eliminan los pocillos de plástico de los portas, dejando la junta de goma unida al porta. Se lavan los portas con PBS de Dulbecco, se fijan a 4°C con acetona durante al menos 10 minutos, y se secan. Se deposita aproximadamente 0,1 ml de cada conjugado sobre cada pocillo de un porta de los Grupos 1 y 2, y sobre el porta correspondiente al control positivo del Grupo 3. Los portas se incuban luego a 37°C en una cámara con humedad por 30 minutos, se lavan una vez con PBS de Dulbecco, y se colocan en un contenedor con PBS de Dulbecco durante 10 minutos. Se lavan cuidadosamente los portas con agua desionizada y se secan. Se examina la fluorescencia atribuible a cada virus específico en todos los portas. Se comparan los tres portas de cada grupo

con el mismo conjugado. Si el porta que contiene las células inoculadas con el material ensayado muestra alguna evidencia de fluorescencia vírica específica, el MSV se considerará como no apto.

REFERENCIAS

1. CODE OF FEDERAL REGULATIONS (2007). Animals and Animal Products, Title 9, Parts 1–199. The Office of the Federal Register, National Archives and Records Administration. US Government Printing Office, Washington DC, USA.
2. COUNCIL OF EUROPE (2006). European Pharmacopoeia, Quinta Edición. Editions of the Council of Europe, Strasbourg, France. ISBN 92-871-4587-3.
3. EUROPEAN UNION (1999). The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. Eudralex, Vols 4–9. Office Publications of the European Communities, Luxembourg.
4. HARE W.C.D. (1985). Diseases transmissible by semen and embryo transfer techniques. OIE Technical Series No. 4. OIE, Paris, France. ISBN 92-9044-164-1.
5. TELLEZ S., CASIMIRO R., VELA A.I., FERNANDEZ-GARAYZABAL J.F., EZQUERRA R., LATRE M.V., BRIONES V., GOYACHE J., BULLIDO R., ARBOIX M. & DOMINGUEZ L. (2005). Unexpected inefficiency of the European pharmacopoeia sterility test for detecting contamination in clostridial vaccines. *Vaccine*, **24**, 1710–1715.
6. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (1998). WHO Expert Committee on Biological Standardization. World Health Organization Technical Report Series, Report No. 858. World Health Organization, Geneva, Switzerland. ISBN 92-4-120878-3.

LECTURAS ADICIONALES

Para más detalles sobre métodos y medios de cultivo, pueden consultarse los siguientes libros así como los catálogos comerciales correspondientes.

- A. BARROW G.I. & FELTHAM R.K.A., eds. (1993). Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, Third Edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- B. CODE OF FEDERAL REGULATIONS (2003) Subchapter E. Viruses, serums, toxins, and analogous products; organisms and vectors. *In*: Code of Federal Regulation, Animals and Animal Products, Title 9, Parts 101–124. The Office of the Federal Register, National Archives and Records Administration. US Government Printing Office, Washington, DC, USA, 557–737.
- C. COLLINS C.H., LYNE P.M. & GRANGE J.M., eds. (1995). Collins and Lyne's Microbiological Methods, Seventh Edition. Butterworth Heinemann, Oxford, UK.
- D. MURRAY P.R., ed. (2003). Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition. American Society for Microbiology Press, Washington DC, USA.

*

* *

ANÁLISIS DE RIESGOS PARA LOS PRODUCTOS BIOLÓGICOS DE USO VETERINARIO DISTINTOS DE LAS VACUNAS

INTRODUCCIÓN

Para los fines de este capítulo, el término “productos biológicos” significa “productos biológicos de uso veterinario distintos de las vacunas veterinarias”.

CATEGORIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS BIOLÓGICOS

La categorización proporciona un medio para facilitar el análisis de riesgo de los productos biológicos en el comercio internacional.

El sistema de categorización deberá tener en cuenta la fuente, la naturaleza y la finalidad explícita de los productos biológicos. Mediante la realización del análisis de riesgo genérico y la elaboración del certificado genérico y de la garantía de calidad, se puede proporcionar el suministro continuo de los productos sin necesidad de repetir las evaluaciones de riesgos que son costosas y consumen una importante cantidad de recursos. Una vez realizada la evaluación de riesgo, esta puede asociarse con los parámetros de fabricación y de prueba adecuados. Las categorías de los productos biológicos para uso veterinario a las que se puede aplicar la evaluación genérica de riesgos, podrían incluir (no en orden de riesgo):

1. material sintético;
2. aminoácidos, alcoholes, ésteres, azúcares y vitaminas;
3. cosméticos;
4. extractos de plantas y sustancias bioquímicas de origen vegetal procesadas;
5. productos derivados mediante fermentación microbiana;
6. kits de diagnóstico, analíticos e inmunoquímicos para uso in-vitro;
7. material de origen humano;
8. terapéutica;
9. implantables de origen animal;
10. anticuerpos e inmunoglobulinas;
11. ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), enzimas de restricción y otros productos de biología molecular;
12. líneas celulares e hibridomas;
13. proteínas animales, hormonas, enzimas, albúminas, extractos de tejido y medio de cultivo que contenga material animal;
14. suero animal;

15. microorganismos (convencionales o modificados genéticamente);
16. probióticos;
17. muestras conservadas, portas y frotis;

Todos estos materiales pueden contener patógenos, dependiendo de su origen y de los procedimientos del procesamiento.

INFORMACION QUE DEBE ENVIARSE CUANDO SE SOLICITA UNA LICENCIA DE IMPORTACIÓN

A la hora de llevar a cabo un análisis de riesgo de los productos biológicos, las Autoridades veterinarias deben seguir el *Manual de animales terrestres*. El fabricante o la Autoridad veterinaria del país exportador debe proporcionar una información detallada, de forma confidencial si es necesario, del origen de los materiales utilizados en la fabricación del producto (por ejemplo, los sustratos). Deben proporcionar detalles del método de fabricación (y, cuando proceda, de inactivación) de los sustratos y materiales integrantes, los procedimientos para asegurar la calidad en cada etapa del proceso, los regímenes de prueba del producto final y la farmacopea por la que se rige el producto en el país de origen. También deben proporcionar los microorganismos de desafío, sus biotipos y sueros de referencia, y otros medios para el ensayo adecuado de los productos.

PROCESO DE ANÁLISIS DE RIESGO

El análisis de riesgo debe ser tan objetivo y transparente como sea posible y debe realizarse de acuerdo con la sección 2 del Código de animales terrestres, y la certificación debe hacerse de acuerdo con la sección 5 del Código de animales terrestres. Necesariamente, las evaluaciones del país, los factores del mercado y las medidas de reducción del riesgo se basarán en gran parte en los datos de los fabricantes. Estos datos dependen más de la garantía de calidad en todas las etapas de fabricación que de las pruebas sobre el producto final exclusivamente.

La exposición doméstica puede estar influenciada por los usos autorizados del producto. Las Autoridades veterinarias pueden restringir el uso de algunos productos (por ejemplo, restringiendo el uso a solo las instituciones con bioseguridad adecuada).

BIOCONTENCIÓN

Puede ser necesaria una biocontención adecuada para muchas clases de productos biológicos. En particular, la importación de microorganismos exóticos debe llevarse a cabo de acuerdo con el capítulo 1.1.2 Bioprotección y seguridad humana en los laboratorios veterinarios de microbiología y en las instalaciones de los animales.

*
* *