



6) Marcación

a) Radiomarcación

i) Prehibridación de las membranas

Mezcla de prehibridación (p. ej. para 100 mL)

Formamida desionizada.....40 mL (conc. final 40 %)
SSPE [20 x C]..... 25 mL (conc. final 5 x C)
Leche descremada 0,5 g (conc. final 0,5 %)
SDS al 20 %.....5 mL (conc. final 1 %)
ADN desnaturalizado de esperma de salmón..... 5 mL (conc. final 5 %)
Agua libre de nucleasas hasta 100 mL

Deje reposar durante un mínimo de 3 horas o toda la noche en un baño de agua con agitación a $+42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

ii) Marcación y purificación de la sonda de HLA de clase I

Marque al menos 100 ng de sonda por membrana.

Desnaturalice la sonda y agréguela al tubo (por ejemplo: kit ROCHE):

- 1 μL de cada uno de los dNTP (dATP, dCTP, dTTP).
- 2 μL de mezcla (tampón + cebador).
- 5 μL de nucleótido dGTP marcado con ^{32}P .
- 1 μL de polimerasa Klenow

Incube durante 1 hora al baño de agua a $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Separe la sonda y los nucleótidos en una columna NICKTM (por ejemplo, Sephadex G50).

iii) Hibridación: lavado y autorradiografía

Agregue la sonda purificada desnaturalizada a la mezcla de hibridación (la misma que usó para la mezcla de prehibridación).

Hibride toda la noche a $+42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un baño de agua con agitación.

Enjuague de las membranas después de la hibridación:

- 2 x 15 minutos en una solución de SSPE [2 x C] - SDS al 0,1 % a temperatura ambiente con agitación.
- 15 minutos en la misma solución a $+65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y con agitación.
- 30 minutos en SSPE [1 x C] a $+65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y con agitación.

Seque al aire las membranas lavadas y coloque en el cartucho de película autorradiográfica.

Deje en contacto toda la noche o más y revele la película.

b) Marcación DIG

iv) Prehibridación de la membrana

Prehibride la membrana (500 cm²), 2 horas en 200 mL de DIG Easy Hyb (precalentado a +42 °C ± 1 °C) en un baño de agua con agitación a +42 °C ± 1 °C.

v) Hibridación: lavado

- Utilice 100 mL de DIG Easy Hyb y marque la membrana con al menos 10 ng por mL de DIG Easy Hyb.
- Hibride toda la noche a +42 °C ± 1 °C en un baño de agua con agitación.
- Lave 2 x 30 minutos en 200 mL de SSC [2 x C] – SDS (0,1 %).
- Lave 2 x 30 minutos en 200 mL de SSC [0,1 x C] – SDS (0,1 %) en un baño de agua con agitación a +65 °C ± 1 °C.

vi) Detección

- Lave la membrana brevemente en 500 mL de tampón de lavado.
 - Incube durante 30 minutos en 500 mL de tampón de bloqueo.
 - Incube durante 30 minutos en 100 mL de solución de anticuerpos.
 - Lave 2 veces durante 15 minutos en 500 mL de tampón de lavado.
 - Equilibre 3 minutos en tampón de detección.
 - Coloque la membrana en una bolsa de hibridación y aplique 5 mL de CDP-star durante 5 minutos. Exprima el exceso de líquido.
 - Coloque la membrana en el cartucho de película autorradiográfica con una película ECL.
 - Deje en contacto 6 minutos o más y revele la película.
- Lectura, cálculo, resultados

En un ensayo válido, el artículo de prueba se identifica como células Vero si no existe diferencia alguna entre los perfiles electroforéticos de las células Vero de control (ATCC) y las células Vero correspondientes al lote de producción.

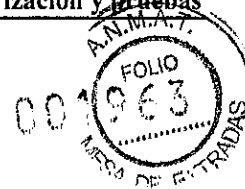
- Criterios de validez

La reacción se considera válida si se cumplen los siguientes requisitos:

- El fondo no interfiere con la lectura.
- Los perfiles electroforéticos de las células Vero de control y de las células de control MRC-5 o PER-C6 o CHO son diferentes con enzimas *Hind III*, *Pvu II* y *Taq I*.

Además, cualquier problema técnico observado (como la inversión de los tubos, error de manipulación...) debe ocasionar la invalidación de un análisis o de la muestra en cuestión (si el punto no afecta al análisis entero).

5.2 Métodos analíticos realizados en el pasaje 137° en sobrenadantes



5.2.1 Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica

La prueba de esterilidad bacteriana y fúngica se describe en la actual Ph. Eur. 2.6.1. "Sterility" (esterilidad).

5.2.2 Prueba de detección de *Mycoplasma* por el método de cultivo

Este método analítico se presenta en la sección 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios.

5.2.3 Prueba de detección de *Mycoplasma* mediante epifluorescencia en cultivo celular

Este método analítico se presenta en la sección 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios.

5.2.4 Prueba de detección de agentes extraños en células

Este método analítico se presenta en la sección 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios.

5.2.5 Prueba de detección de *Mycobacteria in vitro*

- Referencia

Esta prueba se basa en la Ph. Eur. 2.6.2 "Mycobacteria" (micobacterias).

- Principio

El producto se analiza para detectar la presencia de *Mycobacteria* por inoculación directa en medios nutrientes sólidos y líquidos adecuados.

Los resultados se leen después de 56 días de incubación.

- Equipo

- Cabina de flujo laminar vertical de riesgo biológico
- Agitador de vórtice
- Gradillas
- Pipet-aid
- Pipetas estériles desechables
- Incubadora con control termostático a $+36,5\text{ °C} \pm 1,5\text{ °C}$.
- Autoclave para la descontaminación final

- Reactivos

Medios de cultivo:



- Medio líquido enriquecido DUBOS suministrado por AES o equivalente.
- Medio sólido LOWENSTEIN-JENSEN suministrado por BioMérieux o equivalente.
- Medio sólido MIDDLEBROOK 7H10 suministrado por DIFCO o equivalente.
- Medio sólido COLETSOS suministrado por BioMérieux o equivalente.

La capacidad de promoción del crecimiento de los medios es controlada por el fabricante. Se verifica también en presencia de un producto de prueba para determinar si se debe utilizar una sustancia neutralizante adecuada.

- Procedimiento operativo

El laboratorio recibe un vial que contiene un mínimo de 10 mL del producto que se someterá a prueba.

Inocule 2 medios sólidos seleccionados entre los 3 propuestos, 3 tubos por medio, 0,2 mL de muestra por tubo en bisel.

Inocule 3 viales con medio líquido enriquecido DUBOS: 0,5 mL de muestra por tubo.

Incube el medio de cultivo a $+36,5\text{ °C} \pm 1,5\text{ °C}$ durante 56 días (8 semanas).

Incube horizontalmente los tubos que contienen medio de agar, para que el líquido se distribuya sobre el medio. Durante 3 ó 4 días, mantenga las tapas roscadas de los tubos ligeramente flojas para que se evapore el exceso de líquido. Después apriete las tapas.

- Lectura, cálculo, resultados

Si crece algún microorganismo durante los 8 primeros días de incubación, repita el procedimiento y realice una prueba de esterilidad adicional, ya que dichos microorganismos no son las micobacterias en cuestión, sino otros contaminantes microbianos.

Si al final del período de incubación de 8 semanas ninguno de los medios muestra crecimiento de micobacterias, el producto sometido a prueba satisface el ensayo; en caso contrario, el crecimiento micobacteriano debe confirmarse por tinción de ZIEHL-NEELSEN bajo un microscopio con un objetivo de inmersión de 100 X: las micobacterias aparecen teñidas de rojo sobre un fondo azul claro.

5.2.6 Prueba de detección de *Mycobacteria in vivo*

- Principio

La vacuna se ensaya para detectar la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* por inoculación en cobayos.

- Equipo

Animalario y equipo de laboratorio estándar.

- Reactivos

- Siete cobayos DUNKIN-HARTLEY machos o hembras (pero del mismo sexo en cada prueba), con un peso de 350 a 450 g; 5 de ellos recibieron las muestras analizadas y 2 recibieron solución fisiológica.





- Solución fisiológica estéril (NaCl al 0,9 %).
- Procedimiento operativo

Inocule por vía intraperitoneal 5 mL de sobrenadante del cultivo de células Vero a cada uno de los 5 cobayos y 5 mL de NaCl al 0,9 % a cada uno de los 2 cobayos de control.

- Lectura, cálculo, resultados

Mantenga a los animales bajo observación durante un mínimo de 42 días.

Practique la autopsia de todos los animales que mueran después de las primeras 24 horas de la prueba o que muestren signos de enfermedad; examine los tejidos con detalle para establecer la causa de la muerte.

Sacrifique los animales que sobrevivan al período de observación y examínelos de modo similar.

- Criterios de validez

La prueba es válida si al menos el 80 % de los animales sigue sano y sobrevive al período de observación. Si más del 20 % de los animales muere por causas no especificadas, la prueba se considera inválida y se debe repetir.

5.3 Métodos analíticos realizados en el pasaje 147^o con células

5.3.1 Identificación de células de simio

El método analítico se describe en la sección 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios.

5.3.2 Identificación de la línea celular continua Vero (huella genética)

Este método analítico se presenta en el capítulo 5.1.6.

5.3.3 Observación al microscopio óptico tras la fijación y la tinción

Este método analítico se presenta en el capítulo 5.1.1. El método analítico es el mismo que se ha utilizado para la prueba de hemadsorción en el día 14.

5.3.4 Observación al microscopio electrónico (después de la inducción)

- Principio

La prueba consiste en comprobar las características morfológicas de las células Vero inducidas y la ausencia de agentes contaminantes exógenos y endógenos durante el período de observación del cultivo celular de control por microscopía electrónica de transmisión (TEM).

- Equipo

Equipo estándar utilizado en un laboratorio de cultivo celular y virología.

Estudios de TEM realizados por un laboratorio externo especializado.

- Reactivos





- Suspensión celular de control almacenada a $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.
- Medio de crecimiento suministrado por el laboratorio de producción.
- Tampón de cacodilato sódico 0,15 M (pH = 7,4) almacenado a $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.
- Solución de glutaraldehído al 3% en tampón de cacodilato sódico 0,15 M almacenada a $+5 \pm 3\text{ °C}$.
- 5-yodo-2'desoxiuridina (IDU).
- Procedimiento operativo
 - Siembre las células en matraces desechables (25 cm²) y cultive a temperatura adecuada.
 - Induzca las células con 30 ó 60 μmoL de IDU por matraz. Mantenga en paralelo un cultivo celular de control no inducido.
 - Fije el cultivo celular al menos en 2 momentos de medición (generalmente a las 24 y 48 horas) después de la inducción.
 - En cada momento:
 - Coseche el líquido sobrenadante celular, congele a -70 °C y analice para detectar transcriptasa inversa.
 - Añada solución de glutaraldehído al 3 % (v/v) al medio de crecimiento e incube durante 30 minutos a $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.
 - Deseche el líquido sobrenadante celular e incube con solución de glutaraldehído al 1,5 % durante 30 minutos a $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.
 - Deseche la solución de glutaraldehído y lave una vez con tampón de cacodilato sódico almacenado a $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.
 - Llene los matraces con tampón de cacodilato sódico y almacene a $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ hasta el momento de preparación de los cultivos celulares para los estudios por TEM.

- Lectura, cálculo, resultados

La lectura se lleva a cabo por TEM.

- Criterios de validez

La prueba es válida si al menos el 80 % de las células de control son observables y si el 20 % restante se rechaza sólo por motivos no específicos.

5.3.5 Prueba de detección de agentes extraños en animales (por vía intramuscular y por vía intracerebral)

- Principio

La prueba está diseñada para detectar agentes extraños por inyección en animales de las células continuas del banco de células de trabajo.

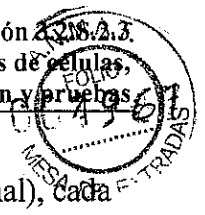
- Equipo

Animalario y equipo de laboratorio estándar.

- Reactivos

- Diez ratones lactantes de menos de 24 horas de edad + 2 adicionales, de dos camadas.





- Dos grupos de ratones adultos (uno de diez ratones y otro de diez + uno adicional), cada uno con un peso de 15 g a 20 g.
- Cinco conejos, cada uno con un peso de 1500 g a 2500 g.
- Cinco cobayos, cada uno con un peso de 350 g a 450 g.
- Procedimiento operativo

Se inocula lo antes posible una suspensión de células vivas, de acuerdo con las siguientes modalidades.

- Inoculación intramuscular

Ratones lactantes

Se utiliza una suspensión celular de 10^7 células por mL.

Se administran a cada animal 2 x 0,05 mL de la suspensión celular por vía intramuscular (es decir, 10^6 células por animal).

Ratones adultos

Se utiliza una suspensión celular de 10^7 células por mL.

Se administra a cada animal 0,1 mL de la suspensión celular por vía intramuscular (es decir, 10^6 células por animal).

Cobayos

Se utiliza una suspensión celular de 5×10^6 células por mL.

Se administra a cada animal 0,4 mL de la suspensión celular por vía intramuscular (es decir, 2×10^6 células por animal).

Conejos

Se utiliza una suspensión celular de 5×10^6 células por mL.

Se administra a cada animal 0,4 mL de la suspensión celular por vía intramuscular (es decir, 2×10^6 células por animal).

- Inoculación intracerebral en ratones adultos

El objeto de esta prueba es detectar la presencia del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCM).

Se utiliza una suspensión celular de $3,35 \times 10^7$ células por mL.

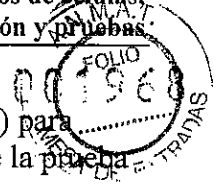
Se administra a cada animal 0,03 mL de la suspensión celular por vía intracerebral (es decir, 10^6 células por animal).

- Lectura, cálculo, resultados

Se mantiene a los animales en observación durante 4 semanas.

Se observa a cada animal experimental todos los días laborables y se registra la mortalidad y los signos de enfermedad.





Se utilizan animales adicionales (los 2 ratones lactantes adicionales y el ratón adicional) para sustituir a cualquier animal muerto en caso de postinoculación traumática. Se retiran de la prueba 24 h después de la inoculación si no mueren.

Todos los animales que mueren después de las primeras 24 horas de la prueba se someten a necropsia y se efectúa un examen detallado de los órganos lo que permite establecer la causa de la muerte.

Los animales que presentan signos de enfermedad se sacrifican y se someten a necropsia de la misma manera.

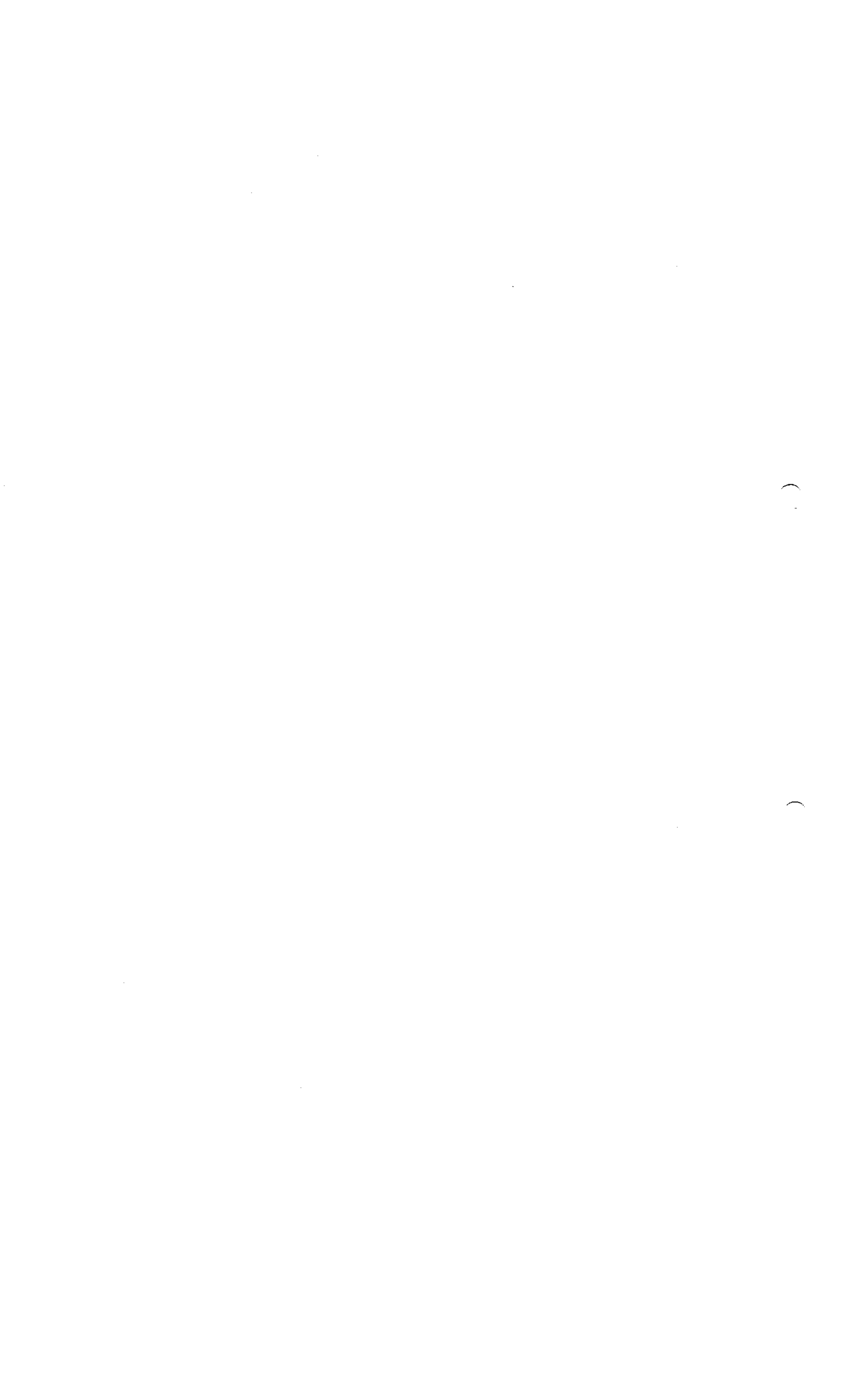
- Criterios de validez

La prueba es válida si al menos el 80 % de los animales de cada grupo sigue sano y sobrevive al período de observación.

Si más del 20 % de los animales de un grupo muere por causas no especificadas, la prueba se considera inválida y se repite en el grupo en cuestión.

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





5.3.6 Prueba de agentes extraños en huevos de gallina embrionados

- Principio

Inoculación de alrededor de 10^7 células viables en huevos embrionados.

El inóculo (alrededor de 10^6 células/huevo) se inyecta en la cavidad alantoidea y en la membrana corioalantoidea de 10 huevos embrionados de gallina, de 9 a 11 días de edad, y en el saco vitelino de 10 huevos embrionados de gallina de 9 días de edad.

Se examinan los embriones y se analiza el líquido alantoideo para detectar hemaglutininas.

Los huevos se observan todos los días desde el día 0 hasta el día 7 después de la inoculación.

- Equipo

Equipo de laboratorio de virología.

Incubadora de huevos a $+35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}/70\% \pm 10\%$ de humedad.

- Reactivos

- Huevos embrionados, de 9 a 11 días de edad, incubados a $+35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.
- Suspensión de eritrocitos de pollo al 0,5 % preparada de forma extemporánea a partir de una suspensión concentrada de eritrocitos (10 %) y almacenada a $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.
- Suspensiones de eritrocitos de cobayo al 0,4 % almacenadas a $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.

- Procedimiento operativo

- Cavidad alantoidea

Inocule cada uno de los 10 huevos embrionados, de 9 a 11 días de edad, por vía alantoidea con 0,2 mL de una suspensión celular con alrededor de 5×10^6 células/mL.

Inocule 10 huevos con el medio en el que estaban suspendidas las células. Incube los huevos durante 7 días a $+35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

Compruebe la viabilidad de los embriones. Recoja los líquidos alantoideos.

Analice los líquidos alantoideos individuales, la agrupación de estos líquidos y la agrupación de líquidos alantoideos de los huevos de control para detectar la presencia de agentes hemaglutinantes utilizando suspensiones de eritrocitos de pollo al 0,5 % y de cobayo al 0,4 %.

- Saco vitelino

Inocule cada uno de los 10 huevos embrionados, de 9 días de edad, con 0,2 mL de la suspensión celular (5×10^6 células/mL) en el saco vitelino.

Inocule cada uno de los 10 huevos de control con 0,2 mL del medio utilizado para preparar la suspensión celular.

Incube los huevos durante 7 días. Compruebe la viabilidad de los embriones todos los días. El aspecto de los embriones de los huevos inoculados con la suspensión celular debe ser idéntico al aspecto de los embriones de los huevos de control.

- Membrana corioalantoidea

Inocule cada uno de los 10 huevos embrionados, de 9 a 11 días de edad, con 0,2 mL de la suspensión celular (5×10^6 células/mL) en la membrana corioalantoidea.

En las mismas condiciones, inocule cada uno de los 10 huevos de control con 0,2 mL del medio utilizado para producir la suspensión celular.

Incube los huevos inoculados durante 7 días a $+35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Compruebe la viabilidad de los embriones todos los días. El aspecto de los embriones de los huevos inoculados con la suspensión celular debe ser idéntico al aspecto de los embriones de los huevos de control.

- Lectura, cálculo, resultados

Al final de las incubaciones (día 7):

- Compruebe la viabilidad de los embriones y exprese esta viabilidad como el número de embriones vivos en contraste con el número de huevos embrionados.
- Observe las membranas corioalantoideas para determinar la ausencia de lesiones (pústulas, vesículas).
- Lea las reacciones de la prueba de hemaglutinación.
- Criterios de validez

La prueba se considera válida si se cumplen los siguientes requisitos:

- Menos del 20 % de los huevos embrionados muere por causas no especificadas.
- La mortalidad después de un día está relacionada con la inoculación y no con la contaminación por agentes extraños.

5.3.7 Cocultivo de células intactas con células continuas Vero, células diploides humanas MRC-5 y células primarias de riñón de mono

- Principio

La prueba consiste en comprobar la ausencia de contaminantes virales en células de control por cocultivo con:

- Células diploides humanas MRC-5
- Células primarias de riñón de mono
- Células Vero

La inspección para determinar la presencia de contaminantes virales inductores de un efecto citopático (CPE) o de hemadsorción se lleva a cabo por microscopía óptica.

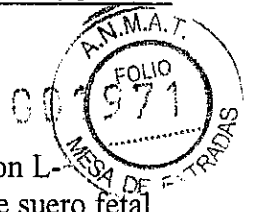
- Equipo

Equipo estándar utilizado en un laboratorio de cultivo celular y virología.

- Reactivos

- Monocapa confluyente de:
 - Células diploides humanas MRC-5





- Células primarias de riñón de mono
Células Vero
 - Medio de crecimiento: medio esencial mínimo (MEM) Eagle (sales Earle) con L-glutamina, 3,5 % de solución de bicarbonato sódico al 5,6 % y 5 % - 10 % de suero fetal de ternero, almacenado a $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - Medio de mantenimiento: medio esencial mínimo (MEM) Eagle (sales Earle) con L-glutamina, 4 % de solución de bicarbonato sódico al 5,6 % y 1 % - 2 % de suero fetal de ternero, almacenado a $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - Solución salina tamponada con fosfato (PBS) [1 x C] sin calcio ni magnesio, almacenada a $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - Suspensión de eritrocitos de cobayo al 0,4 % en PBS [1 x C], almacenada a $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - Solución de tripsina al 0,25 % en tampón PBS [1 x C].
 - Azul trípano.
- Procedimiento operativo

Todas las operaciones se llevan a cabo en condiciones estériles.

- Lleve a cabo la tripsinización de las células diploides humanas MRC-5, de las células primarias de riñón de mono y de las células Vero. Suspéndalas en medio de crecimiento.
 - Cuente las células viables por el método de exclusión con azul trípano.
 - Siembre al menos 10^7 células del ensayo que serán sometidas a análisis mezcladas con una cantidad adecuada de células MRC-5, células primarias de riñón de mono y células Vero (Vero de otro banco de células de trabajo) en medio de crecimiento. Utilice tantos matraces como sea necesario.
 - En paralelo, introduzca cultivos de control de cada tipo de célula.
 - Mantenga los cultivos celulares a $+36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un mínimo de 14 días para las células primarias de riñón de mono y para las células Vero, 28 días para las MRC-5. Cambie el medio al menos una vez por semana con medio de mantenimiento.
 - Examine los cultivos celulares bajo un microscopio invertido (ampliación de 40 a 200 veces) al menos antes de cada cambio de medio.
 - Tras la lectura final, lleve a cabo una prueba de hemadsorción utilizando una suspensión de eritrocitos de cobayo al 0,4 % a $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a $+20\text{ }^{\circ}\text{C} - +25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min, al menos en el 25 % de la superficie del cultivo celular.
- Lectura, cálculo, resultados

Los resultados se expresan como ausencia (0) o presencia (+) de efecto citopático (CPE) y/o hemadsorción.

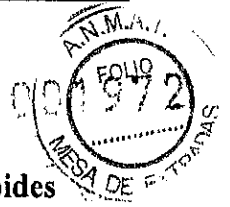
- Criterios de validez

La prueba se considera válida si se cumplen los siguientes requisitos:

- Se puede observar al menos el 80 % de la superficie celular al final de la prueba.



- Menos del 20 % de los cultivos celulares se rechazan por causas no específicas (contaminación bacteriana o viral, matraz roto, matraz abierto...).



5.3.8 Cocultivo de células fragmentadas con células continuas Vero, células diploides humanas MRC-5 y células primarias de riñón de mono

- Principio

La prueba consiste en comprobar la ausencia de contaminantes virales en las células de control fragmentadas sometidas a análisis por cocultivo con:

- Células diploides humanas MRC-5
- Células primarias de riñón de mono
- Células Vero

La inspección para determinar la presencia de contaminantes virales inductores de un efecto citopático (CPE) o de hemadsorción se lleva a cabo por microscopía óptica.

- Equipo

Equipo estándar utilizado en un laboratorio de cultivo celular y virología.

- Reactivos

- Monocapas confluentes de:
 - Células diploides humanas MRC-5
 - Células primarias de riñón de mono
 - Células Vero
- Medio de mantenimiento:
 - Para MRC-5 y Vero: medio esencial mínimo (MEM) Eagle (sales Earle) con L-glutamina, 3,5 % de solución de bicarbonato sódico al 5,6 % y 5 % de suero fetal de ternero, almacenado a $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - Para las células primarias de riñón de mono: medio 199 con solución de Hanks, 3,5 % de solución de bicarbonato sódico (al 5,6 %) y 1 % al 2 % de suero fetal de ternero, almacenado a $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Solución salina tamponada con fosfato (PBS) [1 x C] sin calcio ni magnesio, almacenada a $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Suspensiones de eritrocitos de cobayo, gallina, mono y ser humano al 0,4 % en PBS [1 x C], almacenadas a $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

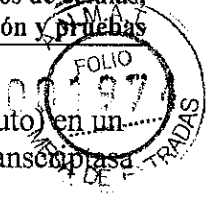
- Procedimiento operativo

Prepare una suspensión de las células de control fragmentadas que serán sometidas a análisis, congelando/descongelando tres veces a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ o en una mezcla de hielo seco y alcohol, sobre la base de un mínimo de 10^6 células por mL.

Elimine los fragmentos celulares por centrifugado (20 min, 800 rev./min.). Coseche el sobrenadante lisado.



La intensidad de la radiactividad recogida en el filtro se mide en cpm (conteos por minuto) en un contador B de centelleo líquido y es proporcional al número de moléculas activas de transcrito inversa.



- Equipo

Equipo estándar de laboratorio con:

- Ultracentrífuga
 - Congelador
 - Incubadora
 - Contador de radiactividad beta
- Reactivos
 - H₂O destilada.
 - HCl (1 N).
 - Tris (1 M) pH 7,8.
 - Tampón N.T.E. (NaCl 0,1 M - Tris 0,01 M - EDTA 0,001 M).
 - Tampón de lisis (N.T.E - Tritón 0,1 %)
 - MgCl₂ (0,5 M)
 - MnCl₂ (0,1 M)
 - KCl (1 M)
 - DTT (20 mM)
 - Poli-rA
 - Cebador (dT) 15
 - Líquido de centelleo
 - Ácido tricloroacético al 20%
 - Ácido tricloroacético al 5%
 - Alcohol desnaturalizado
 - PPNa (0,1 M) en TCA al 5 %
 - Ácido nucleico de levadura (0,5)
 - Trifosfato de 3H-TTP timidina 1,11 Bq/m mol - 37 MBq/mL
 - Procedimiento operativo

Todos los artículos de prueba se conservan a ≤ -70 °C antes de su procesamiento.

- Preparación de los microgránulos de ultracentrifugación

- Descongele rápidamente el artículo de prueba a temperatura ambiente.
- Transfiera 1 mL del artículo de prueba a un tubo de RT.
- Homogeneice.

10

11

Ácido nucleico de levadura (0,5%).....

TCA (20 %, hasta llenar el tubo)..... hasta 3 mL

- Almacene a $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un mínimo de 10 minutos.
 - Prepare un tambor de filtración colocando filtros dentro de cada pocillo.
 - Humedezca con TCA al 5 % y conecte el vacío.
 - Vacíe el contenido de cada tubo en el filtro.
 - Enjuague los tubos de hemólisis 2 veces con TCA al 5 % que se sobrecarga en los filtros.
 - Enjuague los filtros una última vez con alcohol desnaturalizado puro.
 - Retire los filtros.
 - Seque los filtros, cada uno durante 60 min. en horno entre $+50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $+70\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - Ponga los filtros secos en viales de centelleo preidentificados de 6 mL.
 - Con un distribuidor automático, distribuya 2 mL de líquido de centelleo en cada vial.
 - Deje 1 minuto/vial para el conteo.
- Lectura, cálculo, resultados
 - La señal recibida se expresa en cpm/mL.
 - La reacción de RT se considera positiva cuando la señal recibida para el artículo de prueba analizado es al menos diez veces mayor que el ruido medio de fondo observado con los testigos.
 - Criterios de validez

El ensayo es válido cuando la actividad de RT del negativo es al menos diez veces menor que el ruido medio de fondo observado con los testigos.

El ensayo es válido cuando la actividad de RT del positivo es al menos diez veces mayor que el ruido medio de fondo observado con los testigos.

Para cada producto que se someterá a análisis, la presencia o ausencia de inhibidores de la RT debe comprobarse con experimentos de adición.

5.4.2 Prueba de detección de transcriptasa inversa (PERT)

- Principio

La transcriptasa inversa estimulada con productos fluorescentes (FPERT) es un ensayo extremadamente sensible para la detección de actividad de transcriptasa inversa (RT). Es un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y por tanto combina la amplia especificidad de los ensayos de RT convencionales con la elevada sensibilidad de la PCR. Al igual que los ensayos de RT convencionales, se utiliza para detectar la actividad de RT empaquetada en partículas retrovirales extracelulares.

El ensayo FPERT comprende dos reacciones:

- Una reacción de transcriptasa inversa, donde la actividad de RT dentro de la muestra convierte una plantilla de ARN del virus del mosaico del *Bromus* (BMV) en ADNc,

utilizando un cebador de ADN específico de la plantilla presente en la mezcla de reacción.

- Un paso de amplificación, donde se utilizan cebadores específicos del producto en un ensayo de PCR para amplificar el ADNc.

Como no se añade ninguna actividad de RT exógena, solo se generará ADNc si la propia muestra contiene actividad de RT. La ausencia de detección de actividad de RT indica la ausencia de detección de retrovirus.

Las reacciones de PCR se controlan midiendo el aumento de fluorescencia de las reacciones de FPERT mediante cinética en tiempo real. Durante la amplificación con cebadores de PCR, una sonda oligonucleotídica fluorógena específica con un colorante indicador y otro extintor unidos se hibrida con el producto amplificado entre los amplímeros. La reacción de detección utiliza la actividad de 5' nucleasa de la ADN polimerasa AmpliTaq Gold para escindir el colorante indicador de la sonda, lo cual ocasiona un aumento de la fluorescencia cuando existe RT.

- Muestras

Las siguientes muestras se analizan en paralelo:

- Alícuotas de muestra sin diluir y diluida 1:10 en presencia de ADN activado de timo de ternero (esto interfiere con la actividad similar a RT de la ADN polimerasa, reduciendo al mínimo la señal falsa positiva).
- Alícuotas de muestra sin diluir y diluida 1:10 en ausencia de ADN activado de timo de ternero (para indicar el nivel de actividad de ADN polimerasa presente en las muestras).
- Controles negativos (medio DMEM, agua libre de nucleasas y controles centinela¹). Los controles negativos se analizan en presencia de ADN de timo de ternero.
- Controles positivos (10^3 partículas de un virus de la leucemia murina y una muestra con agregado de 10^3 partículas retrovirales). Los controles positivos se analizan en presencia de ADN de timo de ternero.
- Controles de contaminación (la amplificación del ADNc de BMV se lleva a cabo en presencia de dUTP en lugar de dTTP y se utiliza uracilo N⁷-glucosilasa [UNG] AmpErase con las reacciones de FPERT. La UNG AmpErase actúa sobre el ADN de cadena simple y doble que contiene dU e impide la reamplificación de cualquier producto de arrastre de la PCR).

- Procedimiento operativo

El sobrenadante de cultivo se prepurifica mediante una etapa de centrifugado lento y una filtración (0,45 μ m). Este paso se lleva a cabo dos veces para eliminar la actividad de ADN polimerasa. Después se concentran las partículas virales en microgránulos por ultracentrifugación y cada microgránulo se suspende en un tampón de fragmentación para liberar la actividad de RT. Se lleva a cabo la reacción de FPERT.

¹ Se prefijan controles centinela para la contaminación atmosférica, que consisten en tubos abiertos que contienen todos los reactivos y amplímeros, en todas las etapas de la preparación de muestras. Estos se procesan junto con las muestras de prueba.



- Criterios de validez

La prueba se considera válida si se cumplen los siguientes requisitos:

- No se detecta producto específico en los controles negativos (valores de C_T entre 40,0 y 40,0).
- Se detecta producto específico en las reacciones de FPERT de control positivo y de muestra de prueba con agregado (C_T inferior a 35,69).
- El control positivo de 10^3 es, al menos en tres de cuatro reacciones, inferior a 35,69 para garantizar que la sensibilidad del ensayo está cumpliendo las especificaciones.







6 Resultados de control

De la tabla 10 a tabla 12 y de la tabla 13 a tabla 16 se presentan los resultados de control obtenidos para LS-10, LS-11 y LS-12, respectivamente.

Todos los resultados cumplen con el perfil de control de calidad.

6.1 Resultados de control obtenidos para LS-10

Tabla 10: Resultados para el banco de células Vero de trabajo LS-10 (en el pasaje 137° sobre células)

Pruebas	Criterios de aceptación	Resultados
Observación al microscopio electrónico	No se observan virus, partículas parecidas a virus, <i>Mycoplasma</i> , hongos, levaduras ni bacterias.	Cumple
Observaciones en el día 14	Ausencia de efecto citopático	Cumple
Hemadsorción en el día 14	Ausencia de hemadsorción	Cumple
Identificación de células de simio	Identificación positiva	Cumple
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Sin crecimiento microbiano	Cumple
Prueba de <i>Mycoplasma</i> cultivables	Ausencia de <i>Mycoplasma</i> cultivables	Cumple

Tabla 11: Resultados para el banco de células Vero de trabajo LS-10 (en el pasaje 137° en sobrenadantes)

Pruebas	Criterios de aceptación	Resultados
Prueba de <i>Mycoplasma</i> cultivables	Ausencia de <i>Mycoplasma</i> cultivables	Cumple
Prueba de <i>Mycoplasma</i> no cultivables	Ausencia de <i>Mycoplasma</i> no cultivables	Cumple
Prueba de detección de agentes extraños con células: - células continuas Vero - células diploides humanas MRC-5 - células primarias de riñón de mono	Ausencia de efecto citopático para cada tipo de célula. Ausencia de hemadsorción para cada tipo de célula.	Cumple



Tabla 12: Resultados para el banco de células Vero de trabajo LS-10 (en el pasaje 14)

Pruebas	Criterios de aceptación	Resultados
Observación al microscopio electrónico (después de la inducción)	No se observan virus, partículas parecidas a virus, <i>Mycoplasma</i> , hongos, levaduras ni bacterias antes y después de la inducción por IUDR.	Cumple
Prueba de detección de agentes extraños en animales: por vía intramuscular: - ratones lactantes - ratones - cobayos - conejos por vía intracerebral: - ratones	Sin evidencia de agentes extraños	Cumple
Prueba de agentes extraños en huevos de gallina embrionados: - cavidad alantoidea - saco vitelino - membrana corioalantoidea	Sin evidencia de agentes extraños	Cumple
Cocultivo de células intactas con: - células diploides humanas MRC-5 - células primarias de riñón de mono	Ausencia de efecto citopático para cada tipo de célula. Ausencia de hemadsorción para cada tipo de célula.	Cumple
Cocultivo de células fragmentadas con: - células diploides humanas MRC-5 - células primarias de riñón de mono	Ausencia de efecto citopático para cada tipo de célula. Ausencia de hemadsorción para cada tipo de célula.	Cumple
Prueba de tumorigenicidad en ratas recién nacidas	Ausencia de tumorigenicidad	Cumple
Prueba de tumorigenicidad en células 3T3	≤ 0,005 focos/μg	Cumple
Prueba de detección de transcriptasa inversa	Ausencia de actividad de transcriptasa inversa	Cumple

