

Se lleva a cabo la misma operación con el otro medio.

La temperatura y el período de incubación (14 días) son los mismos que para la prueba primaria.

- Subcultivo el día 7

El procedimiento descrito para "Subcultivo el día 3" se repite el día 7.

Incuba durante 14 días.

- Subcultivo el día 14

El procedimiento descrito para "Subcultivo el día 3" se repite el día 14.

Incuba durante 14 días.

- Subcultivo el día 21

El procedimiento descrito para "Subcultivo el día 3" se repite el día 21.

Incuba durante 7 días.

- Lectura; cálculo; resultados

Después de 3, 7, 14, 17, 21 y 28 días de incubación, se examinan todos los medios líquidos.

Después de 14, 17, 21 y 28 días de incubación, se examinan todas las placas al microscopio invertido con 100 aumentos

- Criterios de validez

La prueba es satisfactoria para una muestra determinada si:

- Ninguno de los controles negativos muestra crecimiento de *Mycoplasma* ni de otras colonias.
- Los controles positivos (*M. pneumoniae*, *M. orale* o *A. laidlawii*), para inoculación directa, muestran crecimiento al menos en un medio (Hayflick o Friis) para ambas condiciones de incubación.
- Los controles positivos (*M. pneumoniae*, *M. orale* o *A. laidlawii*), para todos los subcultivos, muestran crecimiento al menos en un medio (Hayflick o Friis) para ambas condiciones de incubación.
- Los controles positivos (*M. pneumoniae*, *M. orale* o *A. laidlawii*), para el medio líquido, muestran crecimiento al menos en un medio (Hayflick o Friis) para ambas condiciones de incubación.
- En ninguno de los cultivos inoculados con la muestra de prueba se observan crecimiento o colonias de *Mycoplasma*.

Si el medio líquido o si más de una placa muestra contaminación bacteriana o fúngica, repetir la prueba.





3.2.2.3 Prueba de detección de *Mycoplasma* mediante epifluorescencia en cultivo de células Vero

- Referencia

Esta prueba está basada en Ph. Eur. 2.6.7. "Mycoplasmas".

- Principio

La técnica se basa en el uso de células Vero que permiten amplificar los *Mycoplasmas* presentes en una muestra.

La muestra a analizar se inocula en células Vero sanas.

La prueba de epifluorescencia para *Mycoplasmas* permite:

- Amplificar los *Mycoplasmas* que puedan estar presentes en un producto.
- Eliminar el efecto citopatógeno inducido por los virus a concentraciones elevadas.
- Detener la inhibición del crecimiento de *Mycoplasma* inducida por antibióticos en el producto.

La prueba se lleva a cabo en tres pasos.

- Inoculación: el producto a analizar se inocula en una monocapa de células diana (Vero). Después se añade un medio de cultivo libre de antibióticos.
- Amplificación: las células diana (Vero) obtenidas en el paso de inoculación se cultivan en 2 pasajes sucesivos en un medio de cultivo libre de antibióticos.
- Detección: después del 2° pasaje, las células se transfieren a un sistema Lab-Tek. Se incuban durante 1 semana en medio específico de amplificación. Las capas celulares se manipulan en paralelo: se fijan y se tiñen con un agente intercalante (reactivo de Hoechst).

La capa celular fijada se tiñe con colorante de ADN de Hoechst derivado del bis-bencimidazol (2-[2-(4-hidroxifenil)-6-bencimidazolil]-6-(1-metil-4-piperacil)-bencimidazol) que se une específicamente al ADN (bases adenina y timina).

Los pasos de amplificación y detección se validan mediante un control negativo y dos positivos (*Mycoplasma orale* y *Mycoplasma hyorhinis*) preparados en las mismas condiciones que la muestra analizada.

- Equipo

Equipo estándar de laboratorio con:

- Microscopio de fluorescencia.
- Incubadora $+36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $6,5\% \pm 1,5\%$ CO_2 para cultivo celular.
- Cabinas de seguridad biológica (BSC); una cabina dedicada a la manipulación de los controles positivos.
- Campana de humos.





- Reactivos y medios
 - Células Vero.
 - Cepas de *Mycoplasma hyorhinis* y *Mycoplasma orale*.
 - Solución de fijación: ácido acético glacial + alcohol metílico (v/v).
 - Medio fijador: glicerol-PBS (4 v/1 v).
 - Solución de Hoechst: fluorocromo de bis-bencimida.
 - PBS [1 x C] sin calcio ni magnesio.

Preparación de PBS [1 x C] diluida en agua purificada ultrafiltrada:

Solución de PBS [10 x C] sin calcio ni magnesio.

- Tripsina-Versene [1 x C].

Preparación de tripsina-Versene [1 x C] diluida en agua purificada ultrafiltrada:

Solución de tripsina-Versene (EDTA) [10 x C].

Solución de PBS [10 x C] sin calcio ni magnesio.

- Medio de células Vero diluido en agua purificada ultrafiltrada.

MEM GIBCO [10 x C].

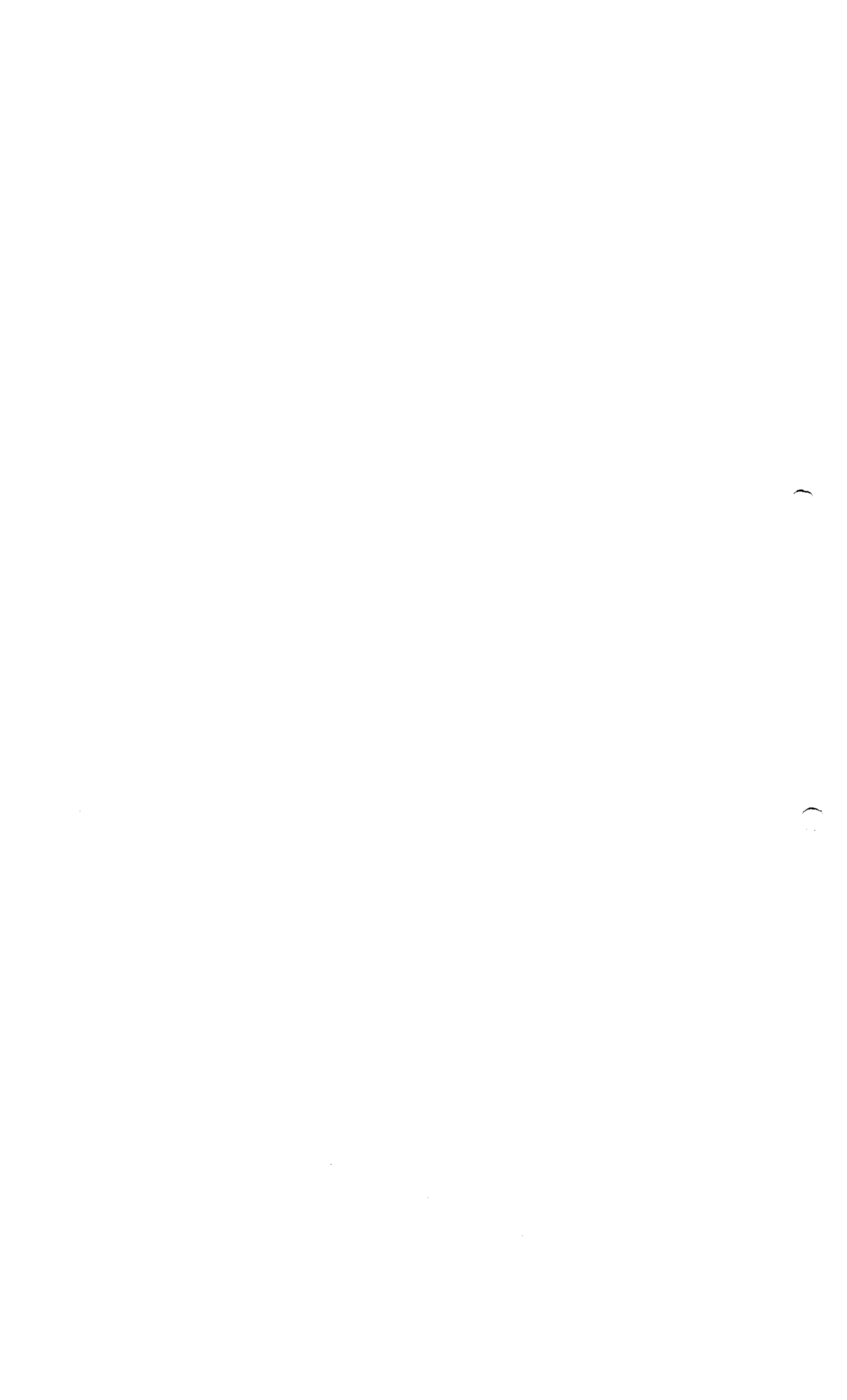
Suero fetal de ternero.

Bicarbonato sódico sin rojo de fenol al 5,6 %.

L-glutamina 200 mM.

- Procedimiento operativo

Descongele el producto. Homogeneice por agitación vorticial e inocule los productos y los controles en una monocapa de células Vero. Compruebe la confluencia de las células.



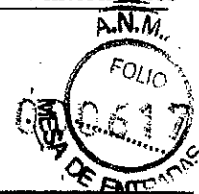


Tabla 8: Preparación de las células

Control negativo	Muestra de prueba	Control de <i>Mycoplasma hyorhinis</i>	Control de <i>Mycoplasma orale</i>
Deseche el medio invirtiendo el matraz o por aspiración			
Añada medio de cultivo fresco hasta 40 mL.	Añada al menos 1 mL del producto a analizar.	Añada 1 mL de medio de cultivo fresco e inóculo de control de <i>Mycoplasma hyorhinis</i> .	Añada 1 mL de medio de cultivo fresco e inóculo de control de <i>Mycoplasma orale</i> .
Incube durante 1 hora a +36 °C ± 1 °C, 6,5 % ± 1,5 % CO ₂			
/	Añada medio de cultivo fresco hasta 40 mL.	Añada medio de cultivo fresco hasta 40 mL.	Añada medio de cultivo fresco hasta 40 mL.
Incube durante 7 días a +36 °C ± 1 °C, 6,5 % ± 1,5 % CO ₂			

• Amplificación

Agregue 40 mL de medio de crecimiento celular a cada matraz secundario.

Deseche el medio de cultivo de los matraces primarios a tripsinizar por inversión o por aspiración.

Enjuague la capa celular con unos 10 mL de solución de PBS agitando los matraces de un lado a otro.

Deseche la solución de PBS en un recipiente específico por inversión del matraz o por aspiración.

Agregue unos 10 mL de solución de tripsina-Versene para cubrir la capa celular entera durante unos 40 segundos.

Deseche el exceso de tripsina-Versene en un recipiente específico por inversión del matraz o por aspiración.

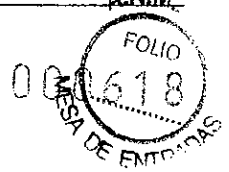
Cuando las células estén completamente dissociadas y ya no estén adheridas al matraz, agregue 10 mL de medio de crecimiento celular. Incube el matraz a +36 °C ± 1 °C, y después golpéelo suavemente.

Lleve a cabo aspiraciones y expulsiones sucesivas, utilizando una pipeta de 10 mL con un bulbo. Dispense 2 mL de la suspensión celular obtenida (diluida 1:5) en los matraces secundarios correspondientes. Incube los matraces secundarios a +36 °C ± 1 °C, 6,5 % ± 1,5 % CO₂ 96 % HR durante 3 o 4 días (2 pasajes por semana).

Tabla 9: Preparación de la amplificación

	Control negativo	Muestra de prueba	Control de <i>Mycoplasma hyorhinis</i>	Control de <i>Mycoplasma orale</i>
1.º pasaje	Tripsinización de dos matraces primarios (→ dos matraces "secundarios").			
2º pasaje	Tripsinización de dos matraces secundarios (→ dos matraces "secundarios 2").			





- Células de siembra en sistemas Lab-Tek

Tabla 10: Preparación de las células de siembra

Control negativo	Muestra de prueba	Control de <i>Mycoplasma hyorhinis</i>	Control de <i>Mycoplasma orale</i>
Tripsinice 2 matraces "secundarios 3".			
Agrupe las 2 suspensiones celulares.			
Prepare una suspensión de 5×10^4 células/mL.			
Sembre 300 µL de suspensión celular de control negativo.	Siembre 300 µL de suspensión celular correspondiente a la muestra de prueba.	Siembre 300 µL de suspensión celular de control de <i>Mycoplasma hyorhinis</i> .	Sembrar 300 µL de suspensión celular de control de <i>Mycoplasma orale</i> .
Incube durante 5 horas a $+36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, $6,5 \% \pm 1,5 \% \text{ CO}_2$			
Agregue 300 mL de medio de crecimiento celular.			
Incube durante 7 días a $+36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, $6,5 \% \pm 1,5 \% \text{ CO}_2$			

- Fijación y tinción:

Deseche el medio de cultivo celular.

Fije con ácido acético glacial + alcohol metílico durante 15 minutos.

Seque los portaobjetos a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Sumerja los portaobjetos en un baño de solución de Hoechst durante 30 minutos en la oscuridad.

Enjuague los portaobjetos en 3 baños sucesivos de agua ultrafiltrada. Monte con solución de glicerol-PBS.

- Reading – Calculation - Results

La presencia o ausencia de *Mycoplasma* no cultivable se observa en microscopio de fluorescencia a 330 – 380 nm.

El *Mycoplasma* no cultivable aparece como pequeños cuerpos fluorescentes redondos.

- Criterios de validez

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

- Control positivo

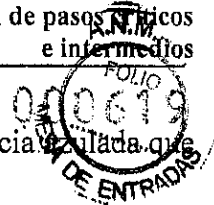
Las células infectadas por *Mycoplasma hyorhinis* y *Mycoplasma orale* deben mostrar una fluorescencia azulada que es característica de *Mycoplasmas*, en el espacio extracelular. La sensibilidad de las células diana se verifica por la prueba de detección de *Mycoplasmas* en los controles positivos.

- Control negativo

Los controles negativos están libres de cuerpos fluorescentes aparte de los presentes en el núcleo de las células Vero.

- Muestra de prueba





El resultado es negativo si ninguno de los pocillos Lab-Tek muestra una fluorescencia azulada que es característica de *Mycoplasmas*.

3.2.3 Pruebas realizadas sobre la cosecha única

Se presentan a continuación los métodos analíticos para las pruebas realizadas sobre la cosecha única.

3.2.3.1 Identificación de poliovirus (tipo 1, 2 o 3)

- Principio

Esta prueba se basa en la neutralización, por medio de un antisuero específico, del efecto citopático (CPE) producido por la suspensión viral en células sensibles (células Hep-2 Cincinnati).

- Equipo

Equipo estándar para laboratorio de virología.

- Reactivos

- Células: células Hep-2 Cincinnati.
- Medio de dilución y siembra: utilizado para la dilución de la suspensión viral y para la preparación de la suspensión celular a sembrar en microplacas: medio esencial mínimo (MEM) con rojo de fenol, FCS al 2 % y 2,2 g/L de bicarbonato de sodio.
- Suero: antisuero de conejo o de caballo de alta titulación.

- Procedimiento operativo

Prepare cuatro o cinco diluciones de 10 veces de la suspensión viral con medio de dilución.

Dispensar 0,05 mL de cada dilución:

- 0,05 mL/pocillo de medio de dilución.
- 0,05 mL/pocillo de antisuero diluido.
- Agregue 0,1 mL de medio de dilución a cada una de las 2 células de control.

Incube durante 1 hora a $+36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\% \pm 1\% \text{CO}_2$.

Después de una hora, agregue 0,1 mL de una suspensión celular (80 000 células/mL) en medio de siembra a cada pocillo.

Incube a $+36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\% \pm 1\% \text{CO}_2$.

- Lectura; cálculo; resultados

El efecto citopático se lee al microscopio óptico tras 7 u 8 días de incubación

- Criterios de validez

La prueba se considera satisfactoria si al final del período de incubación:





- Los cultivos celulares inoculados con las diluciones de virus no neutralizado producen un efecto citopático característico.
- Los cultivos celulares inoculados con el virus neutralizado no producen efecto citopático.
- La identificación es positiva si el efecto citopático es neutralizado al menos en dos diluciones de 10 veces en comparación con el control de virus.

3.2.3.2 Concentración de poliovirus (tipos 1, 2 y 3)

- Principio

La concentración de poliovirus se lleva a cabo por observación del efecto citopático (CPE) del poliovirus en células sensibles (células Hep-2 Cincinnati).

- Equipo

Equipo estándar para laboratorio de virología.

- Reactivos:

- Células: células Hep 2 Cincinnati.
- Medio de dilución y siembra celular: MEM con rojo de fenol, FCS al 2 % y 2,2 g/L de bicarbonato sódico.
- Controles internos de validez viral: suspensiones virales de titulación conocida de los diferentes tipos de poliovirus.
 - Tipo 1: cepa Mahoney.
 - Tipo 2: cepa MEF 1.
 - Tipo 3: cepa Saukett.

- Procedimiento operativo

Se realizan 3 diluciones de orden diez de la muestra y normalmente se inocula un volumen de 0,1 mL de cada una de estas diluciones en 10 pocillos de una microplaca de cultivo celular con 0,1 mL de suspensión de células Hep-2.

Se utiliza el mismo procedimiento con una referencia viral interna de título conocido perteneciente al mismo tipo que la preparación analizada.

Tras 7 u 8 días de incubación a $+36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\% \pm 1\% \text{ CO}_2$, se registran los pocillos que presentan un efecto citopático.

- Lectura; cálculo; resultados

El efecto citopático se lee bajo el microscopio invertido.

Se utiliza el método de Spearman y Kärber u otro método estadístico equivalente (por ejemplo el método de mínimos cuadrados) para calcular la titulación de virus.

La titulación es la media de las 3 titulaciones.

3

4

La titulación se expresa en $DICC_{50}/mL$ (DICC como dosis infecciosa de cultivo celular)

- Criterios de validez

La prueba es válida si los controles celulares no presentan ninguna alteración.

3.2.3.3 Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica

La prueba de esterilidad bacteriana y fúngica se describe en la Ph. Eur. actual, 2.6.1. "Esterilidad".

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

Este método se presenta en el capítulo 3.2.2.2.

3.2.4 Pruebas realizadas sobre la suspensión viral purificada y concentrada

Se presentan a continuación los métodos analíticos para las pruebas realizadas sobre la suspensión viral purificada y concentrada de control.

3.2.4.1 Contenido proteico

- Referencia

Esta prueba está basada en Ph. Eur.2.5.16 "Protein in polysaccharide vaccines" [proteína en vacunas de polisacáridos].

Lowry O.M., Rosebrough N.J., Randall R., Protein measurement with the Folin Phenol reagent, J. Biol. Chem., 1951, 193, 265-275.

- Principio

La adición de una sal de cobre a un medio alcalino, seguida del reactivo de Folin CIOCALTEU, a una solución de proteínas produce un color azul oscuro, cuya intensidad se mide por espectrofotometría a 760 nm.

Dado que muchos compuestos no proteicos pueden afectar a la intensidad del color, la precipitación de las proteínas de antemano mejora la especificidad del análisis.

- Equipo

Equipo estándar de laboratorio y espectrofotómetro UV visible.

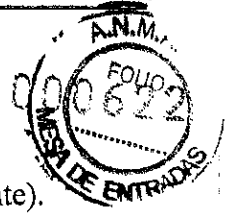
- Reactivos

Las cantidades son indicativas y se pueden multiplicar por o dividir entre un factor determinado, si es necesario.

- NaOH 0,1 N.
- Carbonato de sodio al 2 % p/v (reactivo A) diluido en agua purificada:

Carbonato de sodio anhidro.





Na OH.

Almacene a temperatura ambiente.

- Sulfato de cobre al 1 % p/v en agua purificada (almacene a temperatura ambiente).
- Tartrato de sodio al 2 % p/v en agua purificada (almacene a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$)
- Reactivo B: Sulfato de cobre al 1 % + tartrato de sodio al 2 % que se mezclarán extemporáneamente en volúmenes iguales.
- Reactivo C (solución alcalina de cobre): 50 volúmenes del reactivo A para 1 volumen del reactivo B. Mezcle. Prepare inmediatamente antes de usar.
- Ácido tricloroacético al 40 % (p/v) en agua purificada. Almacene a temperatura ambiente
- Reactivo de Folin Ciocalteu: el reactivo puro se almacena a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Se diluirá extemporáneamente a razón de 1/2 en agua purificada.
- Solución estándar de referencia de albúmina (proveedor 1) a razón de 1 g/L en NaOH 0,1 N. Almacene a $\leq -20^{\circ}\text{C}$.
- Solución estándar de referencia de trabajo de albúmina para el rango de calibración. Prepare inmediatamente antes de usar.

Solución estándar de referencia de trabajo n.º 1 a razón de 50 mg/L

Solución estándar de referencia de albúmina a razón de 1 g/L.

NaOH 0,1 N.

Solución estándar de referencia de trabajo n.º 2 a razón de 200 mg/L

Solución estándar de referencia de albúmina a razón de 1 g/L.

NaOH 0,1 N.

- Solución de control interno de albúmina (proveedor 2): Prepare una solución de 80 mg/L en agua purificada de la solución de albúmina al 96 %. Almacene a $\leq -20^{\circ}\text{C}$.
- Procedimiento operativo
 - Preparación de soluciones

Rango de calibración

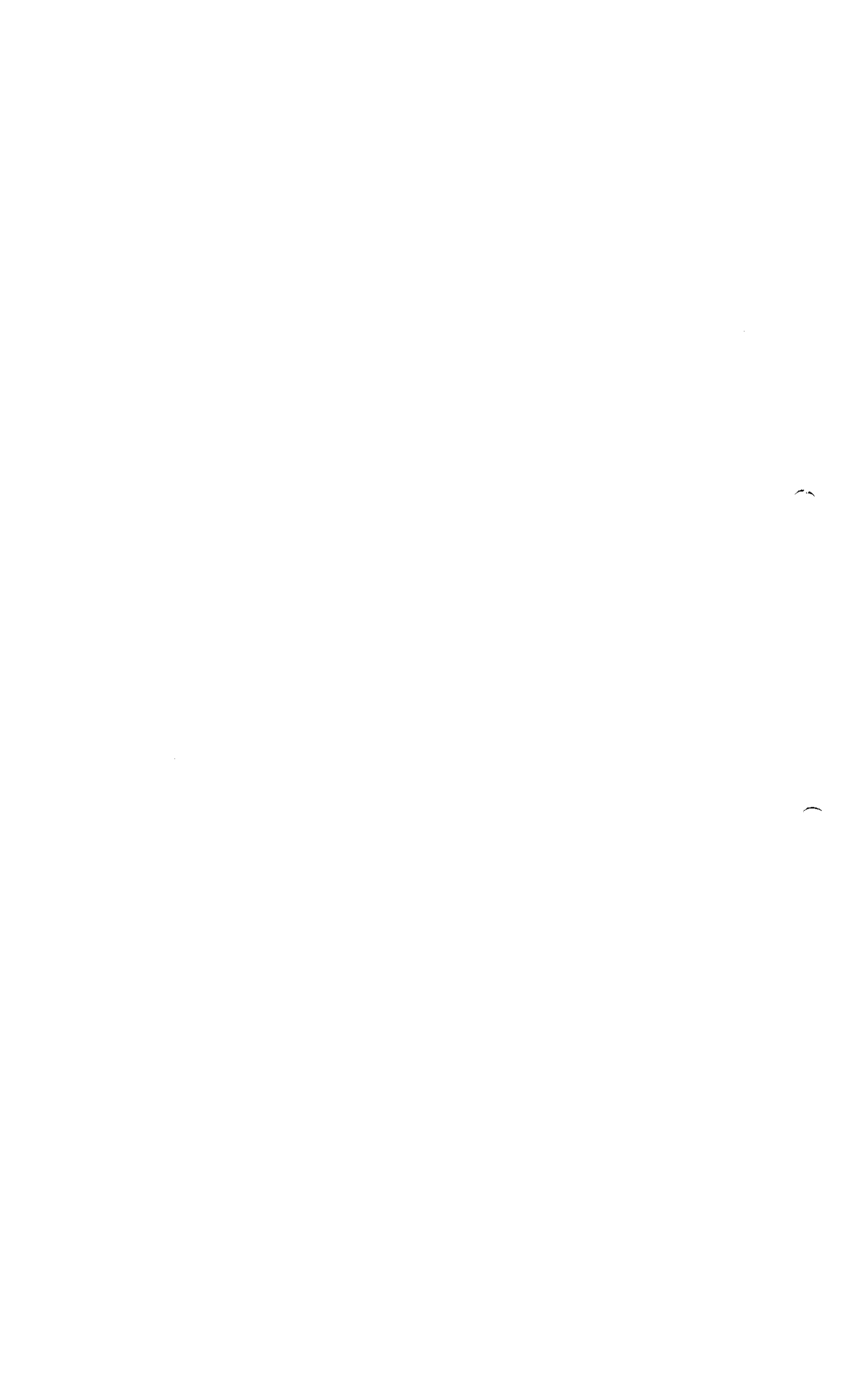




Tabla 11: Preparación del rango de calibración

	Control	1	2	3	4	5	6
Solución estándar de referencia de trabajo de albúmina (1) mL	/	0,1	0,2	0,4	/	/	/
Solución estándar de referencia de trabajo de albúmina (2) mL	/	/	/	/	0,15	0,2	0,25
NaOH 0,1 N mL	0,4	0,3	0,2	/	0,25	0,2	0,15
Reactivo C mL	2	2	2	2	2	2	2
Mezcle y almacene 10 min. a temperatura ambiente							
Reactivo de Folin 1/2 mL	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Mezcle invirtiendo los tubos. Almacene 30 min. a temperatura ambiente en la oscuridad. La coloración es estable durante 60 minutos.							
Albúmina (µg en la muestra de prueba)	0	5	10	20	30	40	50

Solución de control interno

Realice dos análisis comenzando con muestras de prueba de 0,1 mL y 0,4 mL.

Muestras

Si es necesario, diluya la muestra en agua purificada para obtener de 5 a 50 µg en la muestra de prueba.

Agregue 0,15 mL de reactivo de precipitación a la muestra de prueba que, de ser necesario, se completa a 1 mL con agua purificada. Almacene 15 minutos a temperatura ambiente. Centrifugue y elimine el sobrenadante. Limpie la superficie interna de los tubos. Vuelva a disolver el microgránulo en 0,4 mL de NaOH 0,1 N.

Realice 4 análisis en paralelo.

- Lectura, cálculo, resultados

Verifique la ausencia de opalescencia en cada tubo. Si es necesario, centrifugue. Mida la DO de cada tubo por fotometría a 760 nm con respecto al control.

Grafique la curva de calibración.

Con base en la DO de prueba, utilice la ecuación de la línea de calibración para deducir la concentración de proteína de la muestra (µg/TS).

La concentración del análisis en µg/mL se obtiene con la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de proteínas en } \mu\text{g/mL} = \frac{C \times D}{TS}$$

Donde:

C: concentración del análisis (µg/TS)

D: dilución

TS: Muestra de prueba (mL).

Determine la concentración media en µg/mL y la desviación calculada en las concentraciones.





- Criterios de aceptación

La prueba se considera válida si:

- El valor de cada prueba de muestra y el control interno (promedio de dos determinaciones) debe estar dentro de los límites establecidos por el gráfico de control.
- La desviación relativa entre los análisis dependientes de cada prueba de muestra debe ser menor o igual que 15%.

3.2.4.2 Contenido de antígeno D (mediante el método sigmoideo)

Este método se presenta en la sección 3.2.P.5.2 Procedimientos analíticos.

3.2.4.3 Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica

La prueba de esterilidad bacteriana y fúngica se describe en la Ph. Eur. actual

3.2.4.4 Pureza (actividad específica)

La pureza antigénica corresponde a la proporción entre el contenido proteico y el contenido de antígeno D.

3.2.5 Pruebas realizadas sobre el monovalente tipo 1, 2 o 3

A continuación se presentan los métodos analíticos para las pruebas realizadas sobre el monovalente tipo 1, 2 o 3.

3.2.5.1 Contenido proteico

Este método se presenta en el capítulo 3.2.4.1 con muestras de prueba de 0,5 y 1 mL.

3.2.5.2 Contenido de antígeno D (mediante el método sigmoideo)

Este método se presenta en la sección 3.2.P.5.2 Procedimientos analíticos.

3.2.5.3 Pureza

La pureza antigénica corresponde a la proporción entre el contenido proteico y el contenido de antígeno D.

3.2.5.4 Contenido de formaldehído residual

Este método se presenta en la sección 3.2.P.5.2 Procedimientos analíticos.

3.2.5.5 Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica

La prueba de esterilidad bacteriana y fúngica se describe en la Ph. Eur. actual

