

Este informe recoge la opinión colectiva de un grupo internacional de especialistas y no representa necesariamente el criterio ni la política de la Organización Mundial de la Salud.

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD
SERIE DE INFORMES TECNICOS

Nº 200

**NORMAS PARA
LAS SUSTANCIAS BIOLÓGICAS**

**6. Normas Generales
de Esterilidad para las Sustancias Biológicas**

Informe de un Grupo de Estudio

	Página
1. Consideraciones generales	4
2. Problemas que deben ser objeto de nuevas investigaciones. .	5
Anexo. Normas generales de esterilidad para las sustancias biológicas (Normas para las Sustancias Biológicas Nº 6)	9

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD

PALAIS DES NATIONS

GINEBRA

1960

**GRUPO DE ESTUDIO SOBRE NORMAS GENERALES
DE ESTERILIDAD PARA LAS SUSTANCIAS BIOLÓGICAS**

Ginebra, 20-25 de abril de 1959

Miembros :

Dr. M. W. Bentzon, Departamento de Estadística, Statens Seruminstitut, Copenhague, Dinamarca

Dr. P. H. Bonnel, Médecin en Chef de la Marine, Centre de Transfusion-Réanimation de l'Armée, Clamart (Seine), et Direction Centrale des Services de Santé des Armées, París, Francia (*Relator*)

Dr. P. de Góes, Director, Instituto de Microbiología, Universidad de Brasil, Río de Janeiro, Brasil

Dr. M. Pittman, Division of Biological Standards, National Institutes of Health, Bethesda, Md, Estados Unidos de América (*Presidente*)

Dr. G. Penso, Jefe del Laboratorio de Microbiología, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia

Dr. R. H. Regamey, Professeur de Microbiologie médicale, Institut d'Hygiène de l'Université, Ginebra, Suiza

Dr. Sumiatno, Director del Instituto Pasteur, Bandung, Indonesia (*Vice-presidente*)

Dr. J. O'H. Tobin, Biological Standards Control Laboratories, Medical Research Council, Hampstead, Londres, Inglaterra (*Relator*)

Dr. G. V. Vygodchikov, Jefe de Departamento, Instituto de Epidemiología y Microbiología (N. F. Gamaleya), Moscú, Unión Soviética

Secretaría :

Dr. B. K. Bhattacharya, Médico, Servicio de Patrones Biológicos, OMS

Dr. N. K. Jerne, Médico Jefe, Servicio de Patrones Biológicos, OMS (*Secretario*)

NORMAS PARA LAS SUSTANCIAS BIOLOGICAS

6. Normas Generales de Esterilidad para las Sustancias Biológicas

Informe de un Grupo de Estudio

El Grupo de Estudio sobre Normas Generales de Esterilidad para las Sustancias Biológicas se reunió en Ginebra del 20 al 25 de abril de 1959.

El Dr. P. Dorolle, Director General Adjunto de la Organización Mundial de la Salud, declaró abierta la reunión en nombre del Director General y dio la bienvenida a los miembros del Grupo.

El Director General Adjunto indicó que la tarea encomendada al Grupo de Estudio era la de preparar una recomendación internacional sobre las condiciones generales que han de reunir las preparaciones biológicas para que pueda garantizarse su esterilidad. Los métodos de fabricación de muchas preparaciones biológicas deben ser objeto de una inspección meticulosa para evitar la presencia de microorganismos nocivos en el producto final.

En 1958 otro grupo de estudio formuló ciertas normas generales para las fábricas y para los laboratorios de inspección, en las que se indicaban las precauciones de carácter general que deben observarse en esos laboratorios; algunas de esas normas se refieren directamente a los procedimientos para evitar la contaminación de los productos biológicos. Otros grupos de estudio han formulado normas para las vacunas antipoliomielítica, antiamarilica, anticolérica y antivariólica, y todos sus informes contienen una sección sobre control de la esterilidad. Se pidió al presente Grupo de Estudio que formulara en su informe normas adecuadas para la protección de la esterilidad, aplicables a todas las preparaciones biológicas importantes en las que esa condición es indispensable. En esas normas había de figurar la indicación de métodos generales para garantizar la ausencia de contaminación vírica con la mayor seguridad posible. Aunque la esterilidad vírica es un problema reciente y de difícil solución, la importancia que está adquiriendo últimamente justificaba su inclusión en las deliberaciones del Grupo de Estudio.

1. CONSIDERACIONES GENERALES

El Grupo de Estudio tomó nota de las Normas Generales para Fábricas y Laboratorios de Inspección, que figuran en las Normas para Sustancias Biológicas Nº 1.¹ El Grupo convino en que algunas de esas recomendaciones podían aplicarse a la protección de la esterilidad en las preparaciones biológicas, pero que era preciso formular a este respecto ciertas normas suplementarias. También reconoció que las secciones relativas a la esterilidad de la vacuna antipoliomielítica, que figuran en las Normas para las Sustancias Biológicas Nº 2,¹ así como las normas de esterilidad para la vacuna antiamarilica (Normas para las Sustancias Biológicas Nº 3),² para la vacuna anticolérica (Normas para las Sustancias Biológicas Nº 4),² y para la vacuna antivariólica (Normas para las Sustancias Biológicas Nº 5).³

En el curso de sus deliberaciones sobre las normas generales de esterilidad para sustancias biológicas que podrían ser objeto de recomendación internacional, el Grupo de Estudio examinó el anteproyecto de normas generales,⁴ diversos documentos de trabajo y otros datos inéditos presentados al Grupo.⁵

El Grupo de Estudio examinó los reglamentos y normas vigentes en algunos países sobre inspección de la esterilidad,⁶ y analizó varios puntos de importancia para infundir confianza en la esterilidad de las preparaciones biológicas. El Grupo convino en que esa confianza dependía en parte

¹ *Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.*, 1959, 178

² *Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.*, 1959, 179

³ *Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.*, 1959, 180

⁴ Documento de trabajo inédito WHO/BS/IR/73

⁵ Bentzon, M. W., documento de trabajo inédito WHO/BS/IR/75; Bonnel, P. H., documento de trabajo inédito WHO/BS/IR/72; Eissner, G. & Bonin, O., documento de trabajo inédito WHO/BS/IR/36; Penso, G., documento de trabajo inédito WHO/BS/IR/18; Tobin, J. O'H., documento de trabajo inédito WHO/BS/IR/74

⁶ *British Pharmacopoeia*, ninth edition, 1958, London; Bonnefoi, A., Institut Pasteur, París, comunicación personal; Jefe del Laboratorio de Inspección, Statens Bakteriologiska Laboratorium, Estocolmo, comunicación personal; Dekking, F., Laboratorium voor de Gezondheidsleer, Universidad de Amsterdam, Países Bajos — comunicación personal; Japan (1958) Minimum Requirements of Biologic Products, Tokio, pág. 207; Lafontaine, A., Institut d'Hygiène et d'Epidémiologie, Bruselas, comunicación personal; Mayer, G., Gex, M. & Mayer, L. S. (1958) En: Maloine, S. A., ed., *Transfusion sanguine*, París, pág. 245; *Pharmacopoeia of the United States of America*, fifteenth revision, 1955, Washington, D.C., págs. 841-845; *Pharmacopoea Gallica*, septième édition, 1949, París, págs. 547, 1069 (también Supplément I, 1954, pág. 20); *Pharmacopoea Helvetica*, cinquième édition, deuxième supplément, 1954, Berne, pág. 147; *Pharmacopoea Polonica*, 3ª edición, 1954, Varsovia; *Pharmacopoeia of India*, 1955, New Delhi; Prigge, R., Paul-Ehrlich-Institut, Frankfurt del Main, comunicación personal; *Proceedings of the Third International Meeting of Biological Standardization*, 1957, Opatija; *Proceedings of the Fourth International Congress of Biological Standardization*, 1958, Bruselas; *Proceedings of the Seventh International Congress of Blood Transfusion*, 1958, Roma, pág. 317; *Transfusion*, 1958, 1, 55

de que en las pruebas de esterilidad de las preparaciones biológicas se utilice un número suficiente de muestras en sus envases definitivos y tomadas al azar, pero reconoció asimismo que las precauciones relativas a las materias primas y a los métodos de fabricación y la vigilancia continua de los procesos de preparación contribuyen considerablemente a inspirar confianza en la esterilidad de los productos biológicos terminados.

Aun reconociendo que es muy difícil establecer normas generales de esterilidad vírica para las preparaciones biológicas, el Grupo convino en que la importancia cada vez mayor del problema obliga a formular algunas recomendaciones de carácter general sobre este aspecto del control de la esterilidad. En la actualidad se utilizan diversos tejidos animales para preparar vacunas de virus inactivados y de virus vivos. Desde el punto de vista del control de la esterilidad vírica se acostumbra considerar cada una de esas preparaciones como un problema independiente y se emplean métodos especiales para descubrir determinados virus contaminantes. El Grupo ha visto, sin embargo, que el Laboratorio de Microbiología del Istituto Superiore di Sanità de Roma utiliza métodos generales para comprobar la esterilidad vírica de las preparaciones de medicina humana y veterinaria.¹

Fundándose en los mencionados documentos y teniendo presentes las consideraciones expuestas, el Grupo de Estudio procedió a redactar las Normas Generales de Esterilidad para las Sustancias Biológicas (Normas para las Sustancias Biológicas N° 6), cuyo texto se reproduce en el Anexo del presente informe. En el curso de sus deliberaciones sobre las normas de esterilidad el Grupo se refirió sobre todo a las preparaciones biológicas inyectables que se emplean en medicina humana. Sin embargo, reconoció que la mayoría de las normas formuladas son aplicables también a las preparaciones veterinarias y que las pruebas de esterilidad recomendadas por el Grupo podrían ser de utilidad para todos aquellos que se dedican a la inspección de la esterilidad de las sustancias farmacéuticas.

2. PROBLEMAS QUE DEBEN SER OBJETO DE NUEVAS INVESTIGACIONES

2.1 Medios de cultivo

En vista de la gran variedad de medios de cultivo que se emplean en los distintos países para descubrir la presencia de una contaminación de las preparaciones biológicas por bacterias, levaduras u hongos, el Grupo de Estudio llegó a la conclusión de que la utilidad de las recomendaciones que se le pidieron aumentaría sin duda considerablemente si se incluyera en

¹ Penso, G., documento de trabajo inédito WHO/BS/JR/18

ellas una descripción de los diversos medios de cultivo adoptados a ese fin por los distintos institutos y laboratorios de inspección. En consecuencia, se ha añadido a las normas, en forma de apéndice, una lista de medios de cultivo; no obstante, el Grupo advierte que esa lista no es completa y que algunos medios que no figuran en ella podrían también emplearse en las comprobaciones de esterilidad.

El Grupo recomendó que se pida a los diversos laboratorios que practican habitualmente pruebas de esterilidad que intercambien medios de cultivo y datos sobre su preparación y empleo, y que emprendan un estudio experimental sistemático con objeto de obtener los datos necesarios para decidir qué medios son los más satisfactorios para estos fines.

2.2 Temperaturas y tiempos de incubación

El Grupo examinó los datos aportados por sus miembros sobre las temperaturas de incubación más adecuadas para descubrir la contaminación por bacterias y hongos, así como sobre el tiempo mínimo de incubación que debe transcurrir para que pueda observarse el desarrollo de agentes contaminantes. El Grupo convino en que podría alcanzarse un alto grado de seguridad si las pruebas generales de esterilidad se realizaran simultáneamente a dos temperaturas distintas, una entre 15 y 22°C y la otra entre 35 y 37°C, pero que puede admitirse la ejecución de una prueba general utilizando una temperatura intermedia entre 30 y 32°C. El Grupo convino en que la incubación a una temperatura entre 20 y 25°C es adecuada para descubrir la contaminación por levaduras y hongos.

El Grupo de Estudio recomendó que continuaran las investigaciones sobre las temperaturas de incubación óptimas para el descubrimiento de bacterias y hongos que presenten un peligro de contaminación. Sería conveniente combinar esas investigaciones con el estudio comparativo de los distintos medios de cultivo que se ha recomendado en la sección 2.1; además se podían obtener así nuevos datos sobre la conveniencia de prolongar el tiempo mínimo de observación que requieren las pruebas generales de esterilidad propuestas por el Grupo.

2.3 Obtención de muestras

El Grupo de Estudio examinó diversos métodos para la recogida de muestras de productos en sus envases definitivos, propuestos o adoptados en distintos países. El Grupo reconoció que no es posible decidir cuál de esos métodos es el más adecuado y que las Normas deben permitir la adopción de cualquiera de ellos, siempre que esté basado en los principios estadísticos de muestreo y se considere satisfactorio por las autoridades nacionales de inspección de los distintos países. A pesar de que varios países han adoptado procedimientos diferentes para la obtención de

muestras, esos métodos no presentan grandes diferencias en cuanto al número de recipientes definitivos recogidos ni en cuanto al volumen de producto sembrado. El Grupo decidió añadir a las presentes normas un cuadro con algunos de los métodos de obtención de muestras empleados habitualmente (véase Anexo, Apéndice 2, página 32).

Al examinar los principios que deben regir la recogida de muestras de los productos en sus envases definitivos, el Grupo tomó nota de una propuesta formulada por uno de sus miembros,¹ según la cual el número de envases de los que se toman muestras ha de ser proporcional a la raíz cuadrada del número total de envases de que consta determinado lote final. Esta regla está basada en la determinación de la distribución óptima de cualquier número total de muestras obtenidas de distintos lotes finales y permite reducir al mínimo el número de envases definitivos contaminados puestos en circulación, en el supuesto de que la incidencia de contaminación sea la más « desfavorable » posible. El término incidencia « desfavorable » de contaminación indica que el número de envases definitivos contaminados, sin ser insignificante, no es bastante grande para que pueda ser descubierto con un margen elevado de certidumbre. El Grupo observó que esta propuesta, según la cual el número de muestras debe ser proporcional a la raíz cuadrada del número de envases de que consta cada lote final, se situaba entre dos procedimientos adoptados en otras partes : el consistente en recoger un porcentaje fijo de envases definitivos de cada lote final y el de recoger siempre el mismo número de envases en los lotes finales cualquiera que sea la importancia numérica del lote.

El Grupo recomendó que se recaben otras opiniones de expertos acerca de la utilidad relativa de estos distintos procedimientos básicos para obtener un método óptimo de recogida de muestras para las pruebas de esterilidad. El Grupo reconoció la importancia de establecer con claridad y sin ambigüedades las definiciones del producto acabado a granel y de los lotes finales en envases definitivos que hayan de servir para la recogida de muestras, así como de los volúmenes mínimos que deben sembrarse para las pruebas de esterilidad a partir del material obtenido en calidad de muestra.

2.4 Recogida de nuevos datos

El Grupo reconoció que, aun cuando los numerosos laboratorios que efectúan pruebas de esterilidad han adquirido seguramente una gran experiencia de esta labor, son muy escasos los datos publicados hasta ahora sobre los resultados obtenidos en dichas pruebas.² Se convino en que

¹ Bentzon, M. W., documento de trabajo inédito WHO/BS/JR/75

² *Proceedings of the Third International Meeting of Biological Standardization*, 1957, Opatija; *Proceedings of the Fourth International Congress of Biological Standardization*, 1958, Bruselas; *Proceedings of the Seventh International Congress of Blood Transfusion*, 1958, Roma. pág. 317; *Transfusion*, 1958, 1, 55

una mayor abundancia de datos de esta clase facilitarían las decisiones sobre las reglas que deben adoptarse y el Grupo recomendó que se procure obtener esas informaciones, a fin de constituir una base objetiva que permita revisar ulteriormente las normas formuladas por él.

Es preciso analizar también la influencia del medio en que se producen y se someten a prueba las preparaciones biológicas, toda vez que el riesgo relativo de contaminación depende de los distintos climas y condiciones de preparación.

2.5 Formación profesional

Teniendo en cuenta que en todo el mundo se utilizan en gran escala las preparaciones biológicas y que es necesario garantizar la esterilidad de los productos fabricados con ese fin, el Grupo considera que sería muy conveniente que al personal dedicado en diversos países a estas actividades de inspección se le dieran facilidades para ponerse al corriente de las técnicas empleadas en los laboratorios especializados. La importancia de esa formación aumenta a medida que las técnicas necesarias para poner de manifiesto la presencia de virus contaminantes van siendo más delicadas y rigurosas. El Grupo recomienda, en consecuencia, que la Organización Mundial de la Salud estudie la posibilidad de facilitar la formación profesional adecuada en este aspecto de las actividades de los laboratorios de salud pública.

Anexo

**NORMAS GENERALES DE ESTERILIDAD PARA
LAS SUSTANCIAS BIOLÓGICAS
(NORMAS PARA LAS SUSTANCIAS BIOLÓGICAS Nº 6)**

	Página
Consideraciones generales	9
Parte A. Normas para las fábricas.	10
1. Definición.	10
2. Terminología	10
3. Precauciones generales para evitar la contaminación	11
4. Materias primas	12
5. Pruebas de esterilidad	13
6. Registros	22
7. Muestras adicionales	22
Parte B. Normas para la inspección nacional	23
Apéndice 1. Medios de cultivo	23
A. Medios de cultivo para investigar indistintamente bacterias aerobias y anaerobias	23
B. Medios de cultivo para la investigación de bacterias aerobias	28
C. Medios de cultivo para la investigación de bacterias anaerobias	29
D. Medios de cultivo para la investigación de levaduras y hongos	30
Apéndice 2. Obtención de muestras	
Número de muestras exigido en algunos países	32

Consideraciones generales

Las presentes recomendaciones sobre normas generales de esterilidad son aplicables a todas las sustancias biológicas que se emplean habitualmente en la profilaxis, el tratamiento y el diagnóstico de las enfermedades y para las cuales la esterilidad es un requisito esencial. Algunas de estas recomendaciones pueden aplicarse también a las preparaciones veterinarias y a las preparaciones farmacéuticas.

Las recomendaciones se fundan en la experiencia acumulada hasta hoy y en los métodos y técnicas empleadas habitualmente para garantizar la esterilidad de las preparaciones biológicas. En consecuencia, será necesario proceder a su revisión más adelante.

Las normas generales de esterilidad vírica que figuran en el presente documento representan un primer ensayo de normas para garantizar la

ausencia de virus contaminantes en las preparaciones biológicas que están sometidas a ese peligro.

El presente documento consta de varias secciones, cada una de las cuales es una recomendación. Las partes de cada sección que van impresas en grandes caracteres se han redactado de manera que las administraciones sanitarias que lo deseen puedan utilizarlas como normas nacionales definitivas, sin necesidad de introducir modificaciones. Las partes impresas en caracteres pequeños tratan de extremos sobre los cuales se ha juzgado conveniente hacer observaciones.

Se recomienda a los países que deseen adoptar las normas enunciadas como base de sus reglamentos nacionales de esterilidad que incluyan en ellas una disposición por la que se autorice a introducir modificaciones siempre que con ellas, a juicio de las autoridades nacionales de control, la garantía de esterilidad de una preparación biológica sea por lo menos igual a la que se obtendría siguiendo las normas que se formulan a continuación. En esos casos, la decisión adoptada deberá ponerse en conocimiento de la Organización Mundial de la Salud.

En las presentes normas, los términos « servicios nacionales de inspección » y « laboratorios nacionales de inspección » se refieren siempre al país en el que se fabrica la sustancia biológica.

Parte A. Normas para las fábricas

1. Definición

El presente documento contiene las normas generales de esterilidad aplicables a todas las preparaciones biológicas presentadas en forma inyectable y a cualquier otra preparación biológica que deba presentarse en condiciones de esterilidad.

El término esterilidad significa la ausencia de cualquier microorganismo capaz de reproducirse. En el caso de preparaciones constituidas precisamente por microorganismos vivos, las normas de esterilidad se referirán a una inspección de la pureza para comprobar la ausencia de microorganismos extraños.

Las normas generales habrán de completarse a fin de hacerlas aplicables a una serie de preparaciones biológicas que plantean problemas especiales desde el punto de vista de la inspección de la esterilidad.

2. Terminología

Contaminación : Presencia en una preparación biológica de microorganismos vivos extraños.

Microorganismos : Bacterias, levaduras, hongos o virus.

Producto acabado a granel : El producto biológico terminado y depositado en un recipiente a partir del cual se llenan los envases definitivos.

Lote final : Conjunto de envases definitivos, cerrados y homogéneos desde el punto de vista del riesgo de contaminación durante las maniobras de envase o desecación. En consecuencia, todo lote final debe haberse envasado y (en ciertos casos) desecado en una sola sesión de trabajo. El lote final es el conjunto de envases definitivos cerrados del que se eligen muestras para una prueba de esterilidad ; cuando los resultados de esta prueba no satisfagan los criterios de aceptación formulados en las presentes normas, el lote será retirado.

3. Precauciones generales para evitar la contaminación

Además de las precauciones generales formuladas en las Normas Recomendadas para Sustancias Biológicas N^o 1,¹ se observarán las siguientes.

3.1 Precauciones generales durante la fabricación

En el curso de la fabricación de sustancias biológicas deben tomarse todas las precauciones necesarias para evitar la contaminación por microorganismos.

Para garantizar la esterilidad de una preparación biológica no bastan las pruebas de esterilidad, pues los microorganismos muy exigentes desde el punto de vista de cultivo no pueden descubrirse a veces mediante las pruebas generales y además porque en las muestras obtenidas quizá no existan microorganismos contaminantes.

3.2 Precauciones en los establecimientos productores de vacunas de virus

Cada vacuna de virus debe prepararse en un local independiente y aislado de los demás departamentos.

El acondicionamiento de aire y el sistema de drenaje deben estar contruidos de tal modo que haga imposible el paso de los microorganismos de un local de fabricación a otro.

Debe hacerse una comprobación periódica de la eficacia de las medidas adoptadas para reducir la contaminación del aire, utilizando para ello un método adecuado de recogida de muestras de aire y vigilando cuidadosamente los sistemas de filtración aérea.

Todos los productos procedentes de los locales donde se preparan virus deben esterilizarse en autoclave antes de su envío a los departamentos de lavado y esterilización, tanto si cada local de preparación tiene sus propias instalaciones como si éstas son comunes a todo el establecimiento.

¹ *Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.*, 1959, 178

Cuando en un mismo local se fabriquen sucesivamente distintas vacunas, deberá hacerse una desinfección adecuada del local y de todo el material existente al terminar la preparación de una vacuna y antes de iniciar la preparación de la siguiente.

En todos los establecimientos donde se produzcan dos o más vacunas de virus podrá utilizarse un local común de lavado y esterilización para el material de vidrio y los medios de cultivo, siempre que en los locales de fabricación se utilicen sólo productos esterilizados por el calor y que cada local de fabricación posea su propio material correctamente marcado.

Todos los medios esterilizados únicamente por filtración deben prepararse en un local independiente que posea un material propio para estas operaciones. El material que se introduzca en este local procedente de los departamentos de lavado y esterilización deberá estar siempre esterilizado por el calor. Convendría que la esterilización del material que entre o salga de un local dado se realice mediante autoclaves de las llamadas « de dos entradas », empotradas en la pared de tal modo que la autoclave sea la única vía de comunicación entre el local que contiene material sin esterilizar y el que contiene material esterilizado.

Para preparar los cultivos de tejidos destinados a la producción de vacunas se utilizarán locales especiales, aislados de cualquier otro local en el que se opere con virus.

La extirpación de los riñones de mono destinados a la producción de cultivos celulares debe efectuarse en una sala dedicada exclusivamente a esta operación, que se limpiará y desinfectará concienzudamente cada vez que se haya tratado en ella a un grupo de monos. Todos los monos se operarán en condiciones de asepsia.

La extirpación de los riñones de mono debe hacerse con grandes precauciones para impedir que el material extirpado se contamine con virus y otros microorganismos procedentes del medio o del mismo animal.

La sala y el material usados para el envase de una vacuna de virus vivos deben emplearse únicamente para la vacuna de que se trate y tendrán que desinfectarse siempre que se utilicen para el envase de otras preparaciones biológicas.

4. Materias primas

Es preciso tomar todas las precauciones necesarias para evitar que las materias primas den lugar a una contaminación que pudiera afectar la esterilidad del producto final.

4.1 Cepas de microorganismos

Todas las cepas de microorganismos empleados para la producción de preparaciones biológicas deben conservarse de un modo que garantice la ausencia de microorganismos contaminantes.

4.2 *Animales*

Los productos de origen animal, como sangre, tejidos y embriones, empleados para la preparación de sustancias biológicas, deben obtenerse exclusivamente de animales en buen estado de salud.

Se observarán las normas que figuran en las secciones 2.5 y 3.5 de las Normas Generales para Fábricas y Laboratorios de Inspección (Normas para las Sustancias Biológicas N° 1)¹ y en la sección 3.1.2 de las Normas para la Vacuna Antipoliomielítica Inactivada (Normas para las Sustancias Biológicas N° 2).¹

La extracción de sangre de animales debe realizarse en condiciones de asepsia.

4.3 *Donantes humanos*

El plasma sanguíneo y otras sustancias obtenidas a partir de la sangre o de tejidos humanos no deben usarse para las preparaciones biológicas ni solos ni entre otros componentes, a menos que se trate de productos elaborados esencialmente con sangre o tejidos humanos o con sus componentes.

Se debe llevar a cabo la historia clínica y la exploración de los donantes de sangre para excluir en lo posible la hepatitis vírica y otros procesos transmisibles. Para atenuar aún más el peligro de hepatitis,² las mezclas de sangre deben ser de un número de donantes tan reducido como sea posible y en ningún caso más de diez. Es necesaria la formulación de normas que especifiquen las precauciones que se deben tomar al preparar plasma humano y otros productos con sangre o tejidos humanos.

5. Pruebas de esterilidad

En la ejecución de las pruebas de esterilidad se adoptarán las precauciones generales contra la contaminación que se indican en las Normas Generales para Fábricas y Laboratorios de Inspección (Normas para Sustancias Biológicas N° 1).³ Las pruebas se efectuarán en locales dedicados exclusivamente a estas operaciones e independientes de los de fabricación. En esos locales no debe haber nunca material superfluo.

El personal dedicado a las pruebas de esterilidad debe poseer la experiencia y los conocimientos científicos necesarios para llevar a cabo las operaciones que se le encomienden. Ese personal debe observar todas las reglas y precauciones previstas para los métodos de ensayo.

En el curso de la ejecución de las pruebas de esterilidad puede reducirse el peligro de contaminación accidental por el medio

¹ *Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.*, 1959, **178**

² *Org. mond. Santé Sér. Rapp. techn.; Wld Hlth Org. techn. Rep. Ser.*, 1953, **62**

³ *Org mund. Salud Ser. Inf. técn.*, 1959, **178**

con el empleo de lámparas germicidas, filtros de aire, ropas esterilizadas, etc.; se procurará además que los locales sean suficientemente espaciosos para el número de personas que trabajen en ellos, a fin de reducir al mínimo los desplazamientos de aire.

Con arreglo a las disposiciones formuladas en la sección 5.1, se tomará un número adecuado de muestras del producto y se determinará la esterilidad de esas muestras según los métodos expuestos en la sección 5.2 para la esterilidad bacteriana y en la sección 5.3 para la esterilidad micótica, aplicando los criterios que figuran en la sección 5.4.

En la sección 5.5 se describen sucintamente las pruebas de esterilidad vírica.

Aun cuando las pruebas de esterilidad bacteriana y micótica atañen sólo al producto acabado a granel y al producto en sus envases definitivos, se recomienda la comprobación de muestras recogidas en fases anteriores de la producción, a fin de garantizar la esterilidad durante todo el proceso de fabricación.

5.1 *Obtención de muestras*

De cada lote de una sustancia biológica se tomarán muestras del producto acabado a granel y del producto definitivamente envasado. De no disponerse otra cosa, la relación de las muestras se hará al azar.

5.1.1 *Recogida de muestras del producto acabado a granel*

Se tomará una muestra representativa de cada lote de producto acabado a granel una vez que éste haya sido bien mezclado. El volumen de la muestra ha de ser suficiente para la ejecución de las pruebas indicadas en las subsecciones 5.2.1.2 y 5.3.1.2.

Cuando no sea conveniente aplazar las operaciones de envase final hasta que se haya completado la prueba de esterilidad en el producto acabado a granel, el volumen de las muestras tomadas deberá ser suficiente para practicar todas las pruebas de esterilidad que se juzguen necesarias.

5.1.2 *Número de muestras de envases definitivos*

Las muestras de envases definitivos deben recogerse al azar en todos los lotes finales después de las operaciones de envase y cierre, pero procurando que su selección sea representativa de todo el periodo de envase.

El número de envases de cada lote que se tomen como muestra debe ser tal que quede reducido al mínimo el peligro de poner en circulación envases contaminados. El procedimiento de muestreo que se adopte deberá estar aprobado por los servicios nacionales de inspección.

En algunos países el número de envases definitivos de cada lote final que se recogen como muestra corresponde a un porcentaje fijo. En otros países se recoge siempre en cada lote

final un número fijo de envases sin tener en cuenta el volumen del lote. Quizás fuera preferible una solución intermedia.

En el Apéndice 2, página 32, figura una lista de los métodos de muestreo empleados actualmente.

5.2 Pruebas de esterilidad bacteriana

Todas las sustancias biológicas para las que se exige la esterilidad deben satisfacer las pruebas de esterilidad bacteriana que figuran en la sección 5.2.1, de acuerdo con los criterios de aceptación que se exponen en la sección 5.4.

Cuando los productos contienen factores bacteriostáticos o bien están formados por microorganismos vivientes, es preciso a veces utilizar pruebas especiales. En el caso de determinados productos puede ser necesario el empleo de pruebas especiales para excluir la posible presencia de ciertos agentes patógenos (véase la sección 5.2.2).

5.2.1 Prueba general de esterilidad bacteriana

5.2.1.1 Medios de cultivo

El medio o medios de cultivo empleados en esta prueba deben permitir el desarrollo de las bacterias contaminantes.

En todos los medios elegidos debe hacerse una prueba para comprobar sus propiedades nutritivas mediante una siembra de los microorganismos contaminantes más frecuentes. Es preciso demostrar también que los medios permiten cultivar ciertos microorganismos, como el *Staphylococcus aureus*, el *Streptococcus pyogenes* (Grupo A) y los anaerobios esporulados.

En el Apéndice 1, página 32, figuran las fórmulas y métodos de preparación de algunos medios empleados habitualmente. Se recomienda el empleo de un medio que permita el desarrollo de aerobios y anaerobios indistintamente.

5.2.1.2 Técnica de la prueba

De cada una de las muestras tomadas de cada lote final a granel se sembrarán 5 ml por lo menos en los distintos medios de cultivo elegidos, utilizando uno o varios recipientes para cada medio y para cada temperatura de incubación.

De cada uno de los envases definitivos tomados de un lote final como muestra se sembrará por lo menos un volumen de 1,0 ml del producto (25 mg por lo menos si el producto es sólido o, en cualquier caso, la mitad de la dosis humana recomendada por el fabricante, como mínimo) en uno o varios recipientes de cada medio de cultivo elegido y para cada temperatura de incubación.

Si la cantidad de producto en un recipiente definitivo es insuficiente para seguir este procedimiento, se utilizarán más envases, a no ser que las normas

para la sustancia biológica de que se trate permitan utilizar muestras más pequeñas. De ningún envase es preciso extraer para la prueba más de 10 ml de producto o, si éste es sólido, más de 500 mg.

La cantidad de medio empleada en cualquier recipiente debe ser bastante grande, en relación con la cantidad de material sembrado, para que no se produzca una disminución de las propiedades nutritivas del medio.

Todos los recipientes deben incubarse a la temperatura o temperaturas elegidas. Si se eligen dos temperaturas, deben ser las comprendidas entre 15°-22°C y 35°-37°C. Si se elige sólo una temperatura, debe ser la comprendida entre 30° y 32°C.

Todos los recipientes deben incubarse durante un periodo de siete días por lo menos ; a intervalos regulares, y también el último día de incubación, se examinarán para descubrir el desarrollo bacteriano.

Pueden ser necesarios periodos de incubación de más de siete días, según la naturaleza de la preparación y la clase de sustancia bacteriostática que se haya añadido.

Si el producto sembrado ha producido un enturbiamiento del medio tan intenso que haga difícil reconocer la multiplicación bacteriana, deben efectuarse resiembras, que se incubarán y observarán con arreglo a las mismas normas mencionadas para las primeras siembras.

Una rotulación adecuada permitirá identificar todos los recipientes sembrados. Deberá llevarse un registro en el que consten el nombre y el número de identidad del producto sometido a ensayo, las cantidades sembradas, el lote y el tipo de los medios de cultivo empleados, las temperaturas de incubación, las fechas de siembra y los resultados de las pruebas.

5.2.2 Otras pruebas

5.2.2.1 Factores bacteriostáticos

Para que no queden sin valor las pruebas de esterilidad bacteriana, se debe neutralizar el efecto de las preparaciones que matan o impiden el desarrollo de bacterias o que contienen sustancias bactericidas o bacteriostáticas añadidas, o bien se debe procurar que el volumen del medio en el que se siembren estas preparaciones para la prueba de esterilidad sea suficientemente grande para suprimir el efecto de los inhibidores del desarrollo.

Puede añadirse una sustancia que destruya o neutralice el inhibidor, siempre que esa sustancia, a la concentración empleada, no influya sobre el desarrollo bacteriano ; también puede utilizarse para la prueba un medio que directamente neutralice los inhibidores sin influir sobre el desarrollo bacteriano.

Los medios que contienen tioglicolato o hidrosulfito sódicos poseen un efecto inhibitor sobre ciertos agentes y sustancias conservadoras y bacteriostáticas; la intensidad de ese efecto, sin embargo, es muy variable.

La intensidad de la dilución necesaria para cada bacteriostático o bactericida puede investigarse sembrando una bacteria de prueba adecuada en el medio elegido, previa siembra en el mismo del producto sometido a ensayo.

Para comprobar la esterilidad de ciertos antibióticos es preciso recurrir a métodos especiales que superen el efecto inhibitor de esos productos.

5.2.2.2 *Pruebas específicas para ciertas bacterias*

En el caso de vacunas de bacterias muertas debe hacerse una prueba para excluir la posibilidad de que alguna de esas bacterias haya resistido al tratamiento bactericida. La prueba general de esterilidad que se describe en la sección 5.2.1 es un procedimiento adecuado, a no ser que las bacterias requieran especiales condiciones de desarrollo, en cuyo caso debe hacerse una prueba complementaria con un medio adecuado.

En algunos casos será también necesario complementar la prueba general de esterilidad bacteriana con otras pruebas específicas para ciertas bacterias que son especialmente peligrosas para determinadas sustancias biológicas.

En las preparaciones de bacterias vivas (la BCG, por ejemplo) será preciso modificar la prueba general de esterilidad. Estas pruebas se describirán en las normas especiales para las distintas sustancias biológicas que plantean ese problema.

5.3 *Pruebas de esterilidad micótica*

Todas las sustancias biológicas para las que se exige la esterilidad deben satisfacer las pruebas de esterilidad micótica que figuran en la sección 5.3.1, de acuerdo con los criterios de aceptación que se exponen en la sección 5.4.

Si el producto contiene factores fungistáticos, puede ser preciso practicar pruebas especiales (véase la sección 5.3.2).

5.3.1 *Prueba general de esterilidad micótica*

5.3.1.1 *Medios de cultivo*

El medio de cultivo empleado en esta prueba debe permitir el desarrollo de las levaduras y hongos contaminantes.

El medio elegido debe someterse a una prueba especial para comprobar sus propiedades nutritivas.

En el Apéndice 1, página 23, figuran las fórmulas y métodos de preparación de algunos medios usados actualmente.

5.3.1.2 *Técnica de la prueba*

De la muestra del producto acabado a granel se siembran 5 ml por lo menos en uno o varios recipientes del medio de cultivo elegido.

De cada uno de los envases definitivos tomados como muestra de un lote final, se sembrarán 1,0 ml por lo menos (o 25 mg como mínimo si el producto es sólido) en uno o varios recipientes del medio de cultivo elegido. Si la cantidad de material que contiene el envase definitivo es insuficiente, se deben tomar muestras de otros envases, a menos que la sustancia biológica que se ensaya permita utilizar un menor volumen.

La cantidad de medio contenida en cualquier recipiente debe ser lo bastante grande, en relación con el volumen del material sembrado, para no reducir las propiedades nutritivas del medio.

Todos los recipientes deben incubarse a una temperatura de 20 a 25°C durante catorce días por lo menos; a intervalos regulares y el último día de incubación se efectuarán observaciones del crecimiento de los hongos.

Una rotulación adecuada permitirá identificar todos los recipientes sembrados. Debe llevarse un registro en el que consten el nombre y el número de identidad del producto en ensayo, las cantidades sembradas, el lote y el tipo de los medios de cultivo empleados, la temperatura de incubación, las fechas de siembra y los resultados de las pruebas.

5.3.2 *Factores fungistáticos*

Para que no queden sin valor las pruebas de esterilidad micótica, se debe neutralizar el efecto de las preparaciones que matan o impiden el desarrollo de las levaduras y hongos o que contienen sustancias fungicidas o fungistáticas añadidas, o bien se debe procurar que el volumen del medio en el que se siembran estas preparaciones sea suficientemente grande para suprimir el efecto de los inhibidores del desarrollo.

En el caso de que se emplee el método de la dilución, se investigará la intensidad de la dilución necesaria sembrando una suspensión muy diluida de *Candida albicans* en el medio elegido, en el que se habrá sembrado previamente el producto en ensayo. En este cultivo de referencia debe observarse crecimiento bacteriano durante las 48 horas siguientes.

5.4 *Criterios de aceptación*

Todas las sustancias biológicas deben satisfacer los criterios enunciados en la subsecciones 5.4.1 y 5.4.2, salvo cuando el fabricante demuestre, a satisfacción de los servicios nacionales de inspección, que se ha empleado otro método para comprobar la esterilidad, tan bueno o mejor que el propuesto en las presentes Normas, o cuando los servicios nacionales de inspección decidan que una determinada prueba de esterilidad es innecesaria

o impracticable o que por la naturaleza de una determinada sustancia biológica puede admitirse cierto grado de contaminación por microorganismos no patógenos.

5.4.1 *Criterio de aceptación para el producto acabado a granel*

Si en ninguno de los recipientes sembrados para las pruebas de esterilidad enunciadas en las secciones 5.2 y 5.3 se observa el desarrollo de microorganismos, se considerará que el producto acabado a granel ha pasado satisfactoriamente la prueba de esterilidad.

Si hay desarrollo de microorganismos en algunos de los recipientes sembrados, se considerará que el producto acabado sin envasar no ha cumplido la prueba, o bien se practicará una segunda prueba en el medio de cultivo, utilizando la temperatura de incubación en la que se produjo el desarrollo. Si en esta segunda prueba no hay desarrollo, se considerará que el producto acabado a granel ha pasado satisfactoriamente la prueba de esterilidad; si se produce un nuevo desarrollo de microorganismos, se considerará que el preparado no ha cumplido la prueba.

Si se demuestra de un modo concluyente que la contaminación observada en los recipientes del medio de cultivo durante la prueba de esterilidad procede de una fuente distinta de las mismas muestras, la prueba se considerará inválida y habrá de repetirse.

5.4.2 *Criterios de aceptación para un lote final de envases definitivos*

Si en ninguno de los recipientes sembrados para las pruebas de esterilidad enunciadas en las secciones 5.2 y 5.3 se observa desarrollo de microorganismos, se considerará que el lote final de envases definitivos ha pasado satisfactoriamente la prueba de esterilidad.

Si aparece desarrollo en los recipientes sembrados con el producto obtenido en tres o más envases definitivos de un lote final, se considerará que este lote no ha pasado la prueba de esterilidad.

Si aparece desarrollo en los recipientes sembrados con el producto obtenido de uno o dos envases definitivos de un lote final, se considerará que dicho lote no ha cumplido la prueba, o bien se realizará una segunda prueba en los medios de cultivo, utilizando la temperatura en la que se produjo el desarrollo de los microorganismos, con muestras del mismo número de recipientes definitivos, como en la primera prueba. Si en esta segunda prueba no se observa desarrollo, se considerará que el lote final ha pasado satisfactoriamente la prueba de esterilidad. Si aparece desarrollo en más de uno de los recipientes sembrados para esta segunda prueba, se considerará que el lote final no ha cumplido la prueba de esterilidad.

Si en la segunda prueba sólo se observa desarrollo en un recipiente, en vez de considerar que el lote final no ha cumplido la prueba de esterilidad,

puede hacerse también una tercera prueba a condición de que se haya demostrado que el microorganismo descubierto en la segunda no es ninguno de los observados en la primera. Si en la tercera prueba no hay desarrollo, se considerará que el lote final ha pasado satisfactoriamente la prueba de esterilidad; si los microorganismos se multiplican de nuevo, se considerará que el lote final no ha cumplido la prueba.

Si se demuestra de un modo concluyente que la contaminación observada en los recipientes del medio de cultivo durante la prueba de esterilidad procede de una fuente distinta de las mismas muestras, la prueba se considerará inválida y habrá de repetirse.

5.5 *Pruebas para investigar la presencia de virus*

Las siguientes pruebas de esterilidad vírica se aplican sobre todo a las vacunas de virus y rickettsias. En general, estas pruebas no son necesarias para las sustancias biológicas preparadas con productos en los que no puede producirse la multiplicación de estos agentes.

Desde el punto de vista de la inspección de esterilidad vírica, un gran número de problemas proceden de las materias primas empleadas en la fabricación y preparación del producto. Las pruebas sólo pueden aplicarse en el caso de aquellos virus capaces de producir algún efecto sensible en ciertos medios auxiliares de diagnóstico como el animal, los huevos embrionados, los cultivos de tejido, etc. No se conoce la capacidad patogénica que algunos de los agentes de contaminación que se observan durante la fabricación de vacunas de virus tienen para el hombre. Quizá en el futuro adquiera importancia la exclusión de ciertos virus desconocidos hoy y para cuyo descubrimiento no se dispone de ningún medio.

Los principios generales de las pruebas de esterilidad vírica se refieren sobre todo a las vacunas; las técnicas concretas que se usen dependerán de la vacuna de que se trate.

Cuando se sospeche que las materias primas utilizadas para la preparación de vacunas están infectadas, habrá que emplear a veces métodos especiales de prueba.

5.5.1 *Pruebas generales aplicables a las vacunas de virus*

5.5.1.1 *Virus de siembra*

Deben practicarse las pruebas necesarias para comprobar si los lotes de siembra de virus empleados para la producción de vacunas están exentos de virus extraños.

Se encontrarán ejemplos del empleo de los sistemas de lotes de siembra en las Normas para la Vacuna Antiamebiana (Normas para las Sustancias Biológicas Nº 3)¹ y en las Normas para la Vacuna Antivaricélica (Normas para las Sustancias Biológicas

¹ *Org. mund. Salud. Ser. Inf. técn.*, 1959, 179

Nº 5).¹ Se ensayarán partes alicuotas de esos lotes *in vivo* o *in vitro* en los mismos sistemas de cultivo empleados para la producción de esos lotes, después de neutralizar el lote de siembra de virus con un suero homotípico exento de cualquier inhibidor de virus extraños que pueda contener el producto, o bien en otros sistemas como aquellos que resisten al virus de siembra, pero no a los virus de contaminación a que va destinada esta prueba.

5.5.1.2 *Cultivo en tejidos*

En los casos en que sea necesario, se practicarán pruebas para comprobar la ausencia de virus contaminantes en los sistemas empleados para cultivar el virus destinado a la vacuna.

Estas pruebas se practicarán siempre que exista alguna duda sobre la ausencia de virus transmisibles en los tejidos animales utilizados para cultivar el virus destinado a la vacuna.

5.5.1.3 *Vacuna terminada*

Siempre que sea necesario, las pruebas para la investigación de virus contaminantes se efectuarán en muestras del producto final o en la última fase de fabricación que permita practicar pruebas apropiadas.

Este procedimiento ha de comprender las pruebas que se efectúan con el mismo sistema empleado para la producción del material vírico destinado a las vacunas, independientemente de que la inactivación del virus destinado a la vacuna se comprobe en otro sistema de células. La investigación de virus contaminantes extraños en las vacunas vivas se efectuará por métodos análogos a los indicados en la subsección 5.5.1.1.

Todos los sistemas de prueba estarán exentos de inhibidores de los virus investigados.

No debe usarse suero en los cultivos de tejidos a menos que su falta determine una disminución de la sensibilidad de esas preparaciones. Antes de usar un suero cualquiera, hay que hacer las pruebas necesarias para averiguar si contiene sustancias inhibitoras. Siempre que sea posible, la preparación de sueros neutralizantes monotípicos hiperinmunes se hará en huéspedes distintos de los empleados para extraer el material de cultivo usado para la producción de virus.

5.5.2 *Otras pruebas aplicables a las vacunas preparadas en cultivos de tejidos de mono*

Antes de inocular el virus, debe hacerse un examen macroscópico de todos los cultivos celulares a fin de desechar todos los que presenten signos evidentes de contaminación.

¹ *Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.*, 1959, 180

Conviene que el material destinado a la inactivación esté exento de cualquier microorganismo que no sea el que sirve de base para la vacuna.

Las muestras del medio primitivo empleado para iniciar los cultivos celulares deben obtenerse de cada recipiente de cultivo al cambiar el medio y antes de sembrarlo con el virus. A continuación debe reunirse una cantidad adecuada de muestras de cada recipiente, que se mezclarán y someterán a las pruebas de esterilidad para hongos y bacterias.

Según sea el método de fabricación empleado, la investigación de virus extraños se hará por observación microscópica de los recipientes o por resiembra de una porción tomada de una mezcla de esas muestras en un cultivo recientemente preparado de células renales de mono. En las mezclas destinadas a la inactivación no deben utilizarse los líquidos procedentes de frascos infectados. Si es preciso, esas mezclas se someterán antes de la inactivación a una prueba para investigar la presencia de virus B.

Los métodos antes recomendados no son apropiados para comprobar la esterilidad de los tejidos o células empleados para la producción de vacunas de virus vivos. Los cultivos habrán de someterse a una inspección rigurosa y se efectuarán pruebas para la investigación de posibles virus de contaminación utilizando cantidades adecuadas del producto.

5.5.3 *Vacunas mixtas*

En las vacunas mixtas o combinadas debe hacerse una prueba de esterilidad en cada uno de los componentes mediante un método adecuado antes de realizar la mezcla.

Después de la mezcla, las pruebas de esterilidad de los envases definitivos pueden reducirse a las de esterilidad bacteriana y micótica, siempre que lo aprueben los servicios nacionales de inspección.

6. Registros

Se observarán las normas generales sobre registros que figuran en la sección 6 de la Parte A de las Normas Generales para Fábricas y Laboratorios de Inspección (Normas para Sustancias Biológicas N° 1).¹

7. Muestras adicionales

Se observarán las normas generales sobre muestras adicionales que figuran en la sección 7 de la Parte A de las Normas Generales para Fábricas y Laboratorios de Inspección (Normas Recomendadas para las Sustancias Biológicas N° 1).¹

¹ *Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.* 1959, 178

Parte B. Normas para la Inspección Nacional

1. Normas generales

Se observarán las normas generales sobre laboratorios de inspección establecidas en la Parte B de las Normas Generales para Fábricas y Laboratorios de Inspección (Normas Recomendadas para las Sustancias Biológicas N° 1).¹

Apéndice 1

Fórmulas y métodos de preparación de varios medios que han dado resultados satisfactorios y se emplean habitualmente para las pruebas de esterilidad en diversos laboratorios de inspección

Algunos de los medios indicados a continuación pueden adquirirse en el comercio en forma desecada ; basta añadir agua destilada a la sustancia, distribuir el producto resultante en los recipientes adecuados y esterilizarlo a continuación. Esto evita tener que preparar los medios de cultivo a partir de sus elementos constituyentes.

Como ya se ha indicado en la Parte A (secciones 5.2.1.1 y 5.3.1.1) del presente documento, todo lote debe someterse a una prueba previa para determinar sus propiedades nutritivas.

A. Medios de cultivo para investigar indistintamente bacterias aerobias y anaerobias

A.1 Medio líquido con tioglicolato ^{2, 3, 4}

Fórmula :

L-Cistina	0,5 g
Cloruro sódico	2,5 g
Dextrosa (C ₆ H ₁₂ O ₆ · H ₂ O)	5,5 g
Agar en gránulos (índice de humedad inferior al 15 %, en peso)	0,75 g
Extracto de levadura (hidrosoluble)	5,0 g
Digerido pancreático de caseína	15,0 g
Agua destilada	1000 ml
Tioglicolato sódico	0,5 g
o ácido tioglicólico	0,3 ml
Resazurina (solución recientemente preparada al 0,10 %)	1,0 ml
pH final = 7,1 ± 0,1	

¹ *Org. mund Salud Ser. Inf. técn.* 1959, 178

² Pharmacopoeia of the United States of America, fifteenth revision, 1955, Washington, D.C., pág. 841

³ American Pharmaceutical Association (1955) *National Formulary*, 10th ed., Washington, D.C., pág. 720

⁴ National Institutes of Health (1955) *Memorandum on culture media for the sterility test*, fourth revision, Bethesda, Md.

Preparación :

Todos los ingredientes, a excepción del tioglicolato y la resazurina, se introducen y mezclan en un mortero donde se trituran cuidadosamente a medida que son añadidos ; el orden de introducción es el arriba indicado. El producto se agita añadiendo una parte del agua, que previamente se habrá calentado, y después se deposita en un recipiente adecuado y se añade el agua restante ; la solución se completa calentando el recipiente en un baño de María hirviente. Se añade entonces el tioglicolato sódico. Se ajusta después la reacción con solución de hidróxido sódico 1 N, de modo que el pH del medio terminado y esterilizado sea de $7,1 \pm 0,1$. Se recalienta la solución (sin llegar a la ebullición), se filtra, si es necesario, a través de un papel filtrante humedecido y se añade la solución de resazurina. El medio se distribuye luego en recipientes adecuados que se esterilizan en autoclave durante 18-20 minutos a una temperatura de 121° - 123° C (de 15 a 17 libras de presión). Por último, se enfría con rapidez a 25° C y se almacena a una temperatura de 20 a 30° C, evitando que reciba una luz excesiva. La aparición de un color rosado en más del 30 % de la porción superior indica que el medio no está en condiciones de empleo. En ese caso puede conseguirse una restauración rápida del producto calentándolo en un baño de María hirviente hasta que se produzca la desaparición de la coloración rosada. No deben emplearse medios cuya preparación date de más de tres semanas, a menos que hayan estado conservados en un recipiente hermético.

A.2 Medio semilíquido con hidrosulfito sódico ¹**Fórmula :**

Cloruro sódico	2,5	g
Dextrosa ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$)	5,5	g
Extracto de levadura	5,0	g
Peptona	15,0	g
Hidrosulfito sódico ($Na_2S_2O_4 \cdot 2H_2O$) . .	0,5	g
Agar en fibra	1,3	g
Resazurina	0,001	g
Agua destilada	1000	ml

pH final = $7,1 \pm 0,1$

Preparación :

A 1000 ml de agua destilada se añaden el cloruro sódico, la peptona, el extracto de levadura y a continuación el agar, que habrá permanecido

¹ Bonnel, P. H. & Raby, C. (1957) En : *Proceedings. Third International Meeting of Biological Standardization. 2-6 September 1957, Opatija, pág. 327*

en maceración durante 12 horas. Para hacer que la solución sea completa se la calienta en un baño de María hirviendo. Con una solución de hidróxido sódico al 40 % se ajusta la reacción a un pH de 7,3-7,5. Se lleva la solución a la autoclave (a 120°) durante 30 minutos y después se filtra en caliente. Se añade a continuación la dextrosa y el hidrosulfito sódico (las preparaciones de hidrosulfito sódico para usos técnicos poseen un grado de pureza aceptable). Si es necesario, para conseguir la disolución puede calentarse el producto a 80°C, evitando la ebullición. A continuación se comprueba el pH y se ajusta la reacción con solución de hidróxido sódico al 40 %, de modo que el pH del medio terminado y esterilizado sea de $7,1 \pm 0,1$. Se añade la resazurina y se mezcla meticulosamente durante 10 a 15 minutos. El producto se distribuye en porciones de 15 ml, en tubos de un diámetro interior de 15 a 17 mm, que se esterilizan a continuación a una temperatura de 110°C durante 30 minutos, y entonces los tubos esterilizados se enfrían rápidamente introduciéndolos en agua fría.

El medio debe conservarse a una temperatura de 20 a 30°C. Podrá usarse siempre que la coloración rosada sólo alcance el 30 % del medio (véase lo dicho respecto del medio A.1.). De lo contrario, puede conseguirse rápidamente su regeneración mediante ebullición durante 15 minutos en un baño de María. Enfríese rápidamente después del calentamiento.

A.3 Medio con líquido de maceración de maíz y tioglicolato sódico ¹

Fórmula :

Líquido de maceración de maíz (solución al 10 %)	300	ml
Extracto de carne	5,0	g
Dextrosa ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$)	15,0	g
Cloruro sódico	7,0	g
Tioglicolato sódico	1,0	g
Hidrosulfito sódico ($Na_2S_2O_4 \cdot 2H_2O$)	0,5	g
Agar en gránulos	0,7	g
Resazurina	0,002	g
Agua destilada	700	ml

Esterilícese en autoclave durante 20 minutos a 115°C

pH final = $7,0 \pm 0,1$

Preparación :

Se prepara una solución al 10 % de líquido de maceración de maíz y después de ajustar la reacción con hidróxido sódico a un pH de 7,2 se calienta durante 10 minutos a 120°C. A continuación se filtra en caliente

¹ Penso, G. (documento de trabajo inédito WHO/BS/IR/18)

a través de un papel filtrante humedecido. Las demás sustancias se disuelven en el agua destilada y se añade la solución de líquido de maceración de maíz. Esterilícese en autoclave durante 20 minutos a 115°C.

La adición de extracto de carne facilita la multiplicación de *Clostridia* proteolíticos sin influir sobre la reproducción de otras cepas extraordinariamente exigentes como el *Corynebacterium diphtheriae*.

A.4 Medio de Romanov con D-hidrosulfito ¹

Fórmula :

Infusión de carne 1:2	750	ml
D-peptona	250	ml
Agar en fibra	0,75	g
Dextrosa (C ₆ H ₁₂ O ₆ .H ₂ O)	5,5	g
Hidrosulfito sódico (Na ₂ S ₂ O ₄ .2H ₂ O)	1,0	g
Azul de metileno	0,002	g
Esterilícese en autoclave		

pH final = 7,2 ± 0,1

La D-peptona es un producto autoproteolítico que se obtiene con estómago de cerdo picado y levadura viva joven en presencia de ácido clorhídrico libre a 50°C.

Este medio se ideó para comprobar la esterilidad de las preparaciones que contienen mertiolato.

A.5 Medio de Brewer modificado ²

Fórmula :

Infusión de carne de buey	500,0	g
Peptona	10,0	g
Dextrosa (C ₆ H ₁₂ O ₆ .H ₂ O)	5,5	g
Cloruro sódico	5,0	g
Fosfato dipotásico	2,0	g
Tioglicolato sódico	0,5	g
Agar en fibra	0,5	g
Azul de metileno	0,002	g
Agua destilada	1000	ml
Esterilícese en autoclave durante 20 minutos a 121°C		

pH final = 7,2 ± 0,1

¹ Didenko, S. J. (1957) En: *Proceedings. Third International Meeting of Biological Standardization, 2-6 September 1957, Opatija*, pág. 359

² Pittman, M., National Institutes of Health, Bethesda, Md., comunicación personal

A.6 Medio a base de infusión de corazón y cerebro ¹*Fórmula :*

Cerebro de ternera, infusión de	200,0 g
Corazón de buey, infusión de	250,0 g
Peptona	10,0 g
Dextrosa (C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O)	2,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
Fosfato disódico	2,5 g
Agar en fibra	1,2 g
Agua destilada	1000 ml

Esterilícese en autoclave durante 20 minutos a 121°C

pH final = 7,4 ± 0,1

A.7 Caldo con tioglicolato ²*Fórmula :*

L-cistina	0,5 g
Cloruro sódico	2,5 g
Dextrosa (C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O)	5,5 g
Extracto de levadura (hidrosoluble)	5,0 g
Digerido pancreático de caseína	15,0 g
Agua destilada	1000 ml
Tioglicolato sódico	0,5 g
o ácido tioglicólico	0,3 ml

pH final = 7,1 ± 0,1

Preparación :

Se prepara como el medio A.1, pero no se añaden ni agar ni resazurina. Se ajusta la reacción con solución de hidróxido sódico 1 N, de modo que el pH, después de esterilizar, sea de 7,1 ± 0,1. A continuación se filtra, si es necesario, y se reparte en tubos de fermentación de Smith. Se esteriliza en autoclave durante 20 minutos a 120°C. Cuatro horas antes de su uso, caliéntense los tubos en un baño de María hirviente a fin de que el oxígeno se sitúe en la parte profunda del medio.

Este medio puede usarse en preparaciones viscosas o semilíquidas.

¹ American Pharmaceutical Association (1950) *National Formulary*, 9th ed., Washington, D.C., pág. 619. (En la fórmula que figura en esta obra se prescinde del agar.)

² National Institutes of Health (1955) *Memorandum on culture media for the sterility test*, fourth revision, Bethesda, Md.

B. Medios de cultivo para la investigación de bacterias aerobias**B.8 Caldo de peptona ¹***Fórmula :*

Extracto de carne de buey	5,0 g
Peptona	10,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
Agua destilada	1000 ml

pH final = 6,9 ± 0,1

Preparación :

Se calientan los ingredientes a fuego lento, agitándolos hasta que se consigue la solución. Se filtra la mezcla en caliente, utilizando un papel filtrante de buena calidad. Se ajusta la reacción añadiendo solución de hidróxido sódico 1 N de modo que el pH, después de esterilizar, sea de 6,8 a 7,0. Se lleva la solución a la autoclave (cinco minutos a 120°C) a fin de precipitar los fosfatos. Se filtra en caliente a través de un filtro de muselina. Se reparte en tubos de ensayo a razón de 15 ml por cada tubo, y se esteriliza en autoclave a 115°C durante 20 minutos. El tiempo de esterilización empieza a contarse a partir del momento en que la temperatura llega a 115°C.

B.9 Caldo de peptona glucosado ²*Fórmula :*

Extracto de carne de buey	5,0 g
Peptona	10,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
Dextrosa (C ₆ H ₁₂ O ₆ · H ₂ O)	5,0 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación :

Se prepara el caldo de peptona del modo indicado en el párrafo anterior (medio B.8). Antes de repartir el caldo en los tubos de ensayo, se añade la dextrosa y después se esteriliza durante 20 minutos a 115°C.

¹ Fórmula basada en la práctica corriente de laboratorio

² Fórmula basada en la práctica corriente de laboratorio

C. Medios de cultivo para la investigación de bacterias anaerobias ***C.10 Medio de carne cocida ¹**

Introdúzcanse 500 g de picadillo de corazón de buey recientemente preparado en 500 ml de agua destilada hirviendo y añádanse 1,5 ml de solución 1 N de sosa. Hiérvase a fuego lento durante 20 minutos ; al cabo de este tiempo es indudable que se habrá conseguido la neutralización de ácido láctico. Sepárese el líquido mediante un filtro de muselina y, sin esperar a que se enfríe, prénsese el picadillo de carne en un trapo y séquese parcialmente, extendiéndolo sobre un paño o un papel de filtro ; de ese modo puede introducirse el picadillo en tubos sin que se ensucie. Introdúzcase en un tubo de 30 ml el picadillo desecado hasta una altura de 1 cm y recúbrase con 10 ml de una infusión de peptona, que se prepara añadiendo peptona (0,5 %) y cloruro sódico (0,25 %) al líquido filtrado de la carne. Esterilícese a corriente de vapor durante 20 minutos. Añádase 1,0 ml de ácido clorhídrico puro y fíltrese. Ajustese la reacción del filtrado a un pH de 8,2, esterilícese a corriente de vapor durante 30 minutos y ajústese de nuevo la reacción a un pH de 7,7 ó 7,8. Repártase en tubos (a ser posible, con tapón a rosca) y esterilícese en autoclave durante 20 minutos a 120°C. Después de la esterilización, el pH del medio debe ser de 7,4 a 7,5. Antes de la siembra, caliéntese durante 15 minutos en agua hirviendo y enfríese.

C.11 Medio de carne semilíquida ²

Se añade al caldo de peptona, preparado según las normas enunciadas (medio B.8), agar en fibra al 0,2 %.

C.12 Caldo de hígado (medio de Tarrozzi) ³

Fórmula :

Hígado de ternera triturado	500 g
Agua	1000 ml
Peptona	10 g
Fosfato dipotásico	1 g

pH final = 9,0 = 0,1

* En estos medios también pueden desarrollarse los gérmenes aerobios.

¹ Fórmula basada en la práctica corriente de laboratorio

² Fórmula basada en la práctica corriente de laboratorio

³ Fórmula basada en la práctica corriente de laboratorio

Preparación :

Durante toda la noche anterior a la preparación se mantiene el hígado en maceración en 1 litro de agua, colocándolo en un refrigerador. Elimínese la grasa sobrenadante. Esterilícese en autoclave durante 10 minutos a una presión de 15 libras. Filtrese a través de estopilla de algodón y sepárese la carne. Añádase al caldo la peptona y el fosfato dipotásico y caliéntese a 100°C. Ajustese el pH a 9,0, filtrese en papel de filtro y complétese con agua hasta un volumen final de 1 litro. Introdúzcase en cada tubo de ensayo una pequeña cantidad de carbonato cálcico ; añádase después carne hasta una altura de 1 cm. Introdúzcase a continuación el caldo hasta que alcance una altura total de 5 cm. Esterilícese los tubos en autoclave durante 20 minutos a 121°C.

D. Medios de cultivo para la investigación de levaduras y hongos

Incluido en los medios que se indican a continuación, el extracto de malta facilita el desarrollo de levaduras y hongos por la acción de las vitaminas del grupo B.

D.13 Medio de Sabouraud¹*Fórmula :*

Maltosa	40 g
Peptona	10 g
Agar en fibra	20 g
Agua destilada	1000 ml

$$\text{pH final} = 5,25 \pm 0,25$$

En vez de maltosa puede usarse extracto de malta o dextrosa pura.

Preparación :

Mézclense todos los ingredientes en un recipiente adecuado con la suspensión de agar preparada con 24 horas de antelación. Colóquese la mezcla en autoclave y caliéntese lentamente hasta alcanzar la temperatura de 120°C. Enfríese a 40°C. Agítese el recipiente. Filtrese en caliente a través de un papel de filtro de buena calidad. Introdúzcase el medio en tubos de cultivo apropiados y esterilícese durante 20 minutos a 115°C. Los tubos se mantendrán en posición inclinada.

¹ Fórmula basada en la práctica corriente de laboratorio

D.14 Medio de malta¹*Fórmula :*

Malta (cebada triturada)	200 g
Dextrosa (C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O)	10 g
Agar en fibra	20 g
Agua destilada	1000 ml

pH final = 6,0 ± 0,2

En lugar de los 200 g de malta, se pueden usar 20 g de extracto de malta.

Preparación :

Añádase a la malta una parte del agua destilada y caliéntese la mezcla en un baño de María a 45°C. Auméntese la temperatura al ritmo de 1° por minuto hasta alcanzar 70°C y manténgase a ese nivel durante 10 minutos hasta que haya desaparecido todo el almidón. Verifíquese el punto final de la reacción con yodo. (Esta primera fase de la preparación es innecesaria cuando se emplea extracto de malta). Añádase la dextrosa y el agar y complétese hasta un volumen total de 1 litro con el agua destilada restante. Ajústese la reacción de modo que el pH, después de la esterilización, esté comprendido entre 5,8 y 6,2. Filtrese en caliente con un papel de filtro de buena calidad. Repártase la mezcla en tubos de ensayo, en porciones de 15 ml, y esterilícese en autoclave durante 20 minutos a 115°C. Los tubos se mantendrán en posición inclinada.

D.15 Agar con extracto de malta²*Fórmula :*

Extracto de malta	20 g
Peptona	1 g
Dextrosa (C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O)	20 g
Agar granulado	25 g
Agua destilada	1000 g

pH final = 5,65 ± 0,15

Preparación :

Disuélvanse los ingredientes por calentamiento en un baño de vapor. Ajústese la reacción de modo que el pH, después de la esterilización, esté comprendido entre 5,5 y 5,8. Filtrese si es necesario. Repártanse porciones de 20 ml del medio en tubos de cultivo. Esterilícese durante 20 minutos a 121°C y déjese solidificar el medio manteniendo los tubos en posición inclinada, a fin de mantener una abundante superficie de siembra.

¹ Bonnel, P. H., Centre de Transfusion-Réanimation de l'Armée, Clamart (Seine) et Direction Centrale des Services de Santé des Armées, Paris — comunicación personal

² Penso, G., Documento de trabajo inédito WHO BS.1R.18

Apéndice 2
 Número de envases definitivos de un lote final (N) que se exige como muestra en algunos países

Número de envases definitivos (N) en el lote final	Bélgica ²	Brasil ³	Italia ⁴	Japón ⁵	Suiza ⁶	Reino Unido ⁷	EE.UU. ⁸	Yugoslavia ⁹	Cálculo según la regla aconsejada ¹⁰
< 100 ¹	—	—	—	3	—	—	—	2	—
100	3	3	—	3	5	2	10	2	4
200	6	4	—	5	7	4	20	4	6
500	15	10	—	10	13	10	20	10	9
1 000	20	12	30	10	20	20	20	10	13
2 000	20	12	30	12	20	20	20	11	20
5 000	20	12	30	12	20	20	20	14	28
10 000	20	12	30	12	20	20	20	19	40
50 000	20	12	30	12	20	20	20	59	89
> 50 000	20	12	$\frac{N}{1\ 000}$	12	20	20	20	$9 + \frac{N}{1\ 000}$	$\frac{4}{10} \sqrt{N}$

¹ Disposiciones especiales formuladas para el ensayo de lotes finales en un número de recipientes definitivos inferior a 100

² *Pharmacopée belge*, 4ª edición, 1931, Bruxelles, página 606. (Cuando el producto se esteriliza por el calor, el número máximo de muestras exigidas es 10.)

³ De Góes, P., Instituto de Microbiología, Universidad de Brasil, Rio de Janeiro, comunicación personal

⁴ Penso, G., *Sterility test* (Documento de trabajo inédito WHO/BS/IR/18)

⁵ *Minimum Requirements of Biological Products*, Japón, Tokio, 1958, página 217

⁶ *Pharmacopoea Helvetica V*, Supplément 11, 1955, Berne. (Los números de muestras indicados sólo tienen valor cuando la cantidad de producto que contiene cada recipiente definitivo es de 1 ml. El número de muestras varía cuando los recipientes definitivos contienen una cantidad de 0,5, 2 o más de 2 ml.)

⁷ United Kingdom (1953) *The Therapeutic Substances Regulations, 1952, Statutory Instruments*, Nº 1937, London

⁸ United States of America, Federal Regulations, Title 42, Chapter 1, Part 73, Federal Register, 25, 77, 3397

⁹ Ilic, D.: Instituto de Inspección de Sueros y Vacunas, Zagreb, comunicación personal; Benkovic, J. y Higy-Mandic, L. J. (1957) En: *Proceedings of the Third International Meeting of Biological Standardization, 2-6 September 1957*, Opatija, pag. 373

¹⁰ Fórmula 0.41/N (véase la sección 2.3, página 6 del presente informe) — Bentzon, M. W., *Note on sampling for sterility control* (documento de trabajo inédito WHO/BS/IR/76)