

CAPÍTULO 4.8.

RECOLECCIÓN Y MANIPULACIÓN DE EMBRIONES/OVOCITOS DE GANADO Y CABALLOS PRODUCIDOS *IN VITRO*

Artículo 4.8.1.

Objetivos del control

La producción de embriones *in vitro* abarca la recolección de ovocitos de los ovarios de hembras donantes, la maduración *in vitro* y la fecundación de los ovocitos, seguido del cultivo *in vitro* hasta la etapa de mórula o blastocito en que están listos para ser transferidos a las hembras receptoras. El objetivo del control sanitario oficial de los embriones producidos *in vitro* para la exportación es garantizar la ausencia de gérmenes patógenos específicos que pueden hospedar los embriones y evitar la contaminación de las hembras receptoras y de su descendencia. Las condiciones esbozadas en el presente capítulo también son aplicables a efectos del transporte de ovocitos madurados *in vitro*.

Artículo 4.8.2.

Condiciones aplicables al equipo de producción de embriones

El equipo de producción de embriones es un grupo de técnicos capacitados para proceder a la recolección y al tratamiento de ovarios/ovocitos así como a la producción y a la conservación de embriones producidos *in vitro*. El equipo comprende por lo menos un *veterinario* y reúne las siguientes condiciones:

1. El equipo deberá ser aprobado por la *Autoridad Competente*.
2. El equipo debe estar supervisado por un *veterinario* miembro del mismo.
3. El *veterinario* del equipo es responsable de todas las actividades del equipo, que incluyen las extracciones de ovarios y ovocitos en condiciones de higiene apropiadas y todos los demás procedimientos inherentes a la producción de embriones destinados a los intercambios internacionales.
4. El personal del equipo debe estar debidamente adiestrado para aplicar las técnicas y los principios de control de *enfermedades* y debe respetar reglas de higiene estrictas para evitar la introducción de *infecciones*.
5. El equipo de producción debe disponer de las instalaciones y del material necesarios para:
 - a) la recolección de ovarios y/o ovocitos;
 - b) la manipulación de ovocitos y producción de embriones en un laboratorio fijo o móvil;
 - c) el almacenamiento de ovocitos y/o embriones.No es necesario que estas instalaciones estén situadas en el mismo lugar.
6. El equipo de producción de embriones debe llevar un registro de sus actividades, que conservará durante, por lo menos, los dos años consecutivos a la exportación de los embriones para presentarlo a la *Autoridad Veterinaria* en caso de inspección.
7. El equipo de producción de embriones será inspeccionado periódicamente al menos una vez al año por un *veterinario oficial* para asegurarse de que respeta las normas sanitarias durante la recolección y la manipulación de los ovocitos así como durante la producción y el almacenamiento de los embriones.

Artículo 4.8.3.

Condiciones aplicables a los laboratorios de manipulación

El laboratorio de manipulación utilizado por el equipo de producción de embriones puede ser móvil o fijo. Puede estar situado en las cercanías del lugar de extracción de los ovocitos o estar alejado del mismo. Es un local en el que los ovocitos extraídos de los ovarios son madurados y fecundados y en el que los embriones resultantes son después cultivados *in vitro*.

En este laboratorio, los embriones también pueden ser sometidos a cualquier tratamiento necesario, como el lavado, antes de ser conservados y aislados en cuarentena.

Además:

1. El laboratorio debe estar bajo la supervisión directa del *veterinario* del equipo y ser inspeccionado periódicamente por un *veterinario oficial*.
2. Durante las operaciones de producción que preceden la conservación de los embriones destinados a la exportación en ampollas, frascos o pajuelas, no deberá ser extraído ni manipulado en el mismo laboratorio ningún ovocito/embrión de condición sanitaria inferior.
3. El laboratorio debe estar protegido contra roedores e insectos.
4. El laboratorio debe estar construido con materiales que permitan una limpieza y una *desinfección* eficaces. Estas operaciones deberán efectuarse con frecuencia y siempre antes y después de cada manipulación de embriones para la exportación.

Artículo 4.8.4.

Condiciones aplicables a los animales donantes

Los ovocitos destinados a la producción de embriones *in vitro* se extraen de las hembras donantes básicamente de dos maneras diferentes: por recolección individual o por recolección de lotes. Las condiciones recomendadas en cada caso son distintas.

La recolección individual consiste generalmente en aspirar los ovocitos de los ovarios de *animales* vivos individuales y se realiza en la granja en que residen las hembras o en el laboratorio. A veces los ovocitos también pueden ser extraídos de animales vivos mediante ablación de los ovarios seguida de aspiración. Cuando se extraen ovocitos de animales vivos, las condiciones empleadas con las hembras donantes deben ser conformes a lo dispuesto en el Artículo 4.7.4.

En estos casos, la limpieza y la esterilización del material cada vez que se utilizan con una hembra donante (por ejemplo, sondas guiadas por ultrasonido) son operaciones especialmente importantes y deberán llevarse a cabo con arreglo a las indicaciones del Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS)¹.

Para la recolección de lotes se extraen los ovarios de los lotes de donantes sacrificados en el *matadero*; los ovarios se transportan seguidamente al laboratorio de manipulación, donde los ovocitos son recuperados de los folículos de los ovarios por aspiración. El inconveniente de la recolección de lotes es que por lo general no permite establecer ninguna relación entre los ovarios transportados al laboratorio y las hembras sacrificadas en el *matadero*. Sin embargo, es capital velar por la obtención de tejidos sanos exclusivamente y por su extracción de las hembras donantes y transporte al laboratorio en condiciones de higiene apropiadas.

Además:

1. La *Autoridad Veterinaria* debe tener datos sobre los *rebaños* o *manadas* de los que proceden los animales donantes.

2. Los animales donantes no deberán proceder de *rebaños* o *manadas* que sean objeto de restricciones en relación con la fiebre aftosa, la peste bovina y la peste de pequeños rumiantes, y no deberán extraerse ningún tejido ni aspirarse ovocitos en una *zona infectada* o que sea objeto de restricciones veterinarias en relación con las citadas *enfermedades*.
3. En caso de recolección de ovocitos de donantes vivos, las hembras donantes y sus *rebaños* o *manadas* deben ser sometidas después a una *vigilancia* basada en los períodos normales de incubación de las *enfermedades* consideradas, para determinar retrospectivamente su estado de salud.
4. En el caso de recuperación de ovocitos de lotes de ovarios recolectados de un *matadero*, este debe ser un *matadero* oficialmente autorizado y supervisado por un *veterinario* que velará por que los animales que pueden ser donantes sean sometidos a inspecciones *ante mortem* y *post mortem* y certificará que están libres de signos clínicos o patológicos de las *enfermedades* enumeradas en el anterior punto 2.
5. Los animales donantes no deben estar destinados al *sacrificio* por motivo de *enfermedad de declaración obligatoria* y no deberán sacrificarse al mismo tiempo que los donantes cuyos ovarios y otros tejidos deben ser extraídos.
6. Los lotes de ovarios y otros tejidos recolectados de un *matadero* no serán transportados al laboratorio de manipulación hasta que no se haya confirmado que los resultados de las inspecciones *ante mortem* y *post mortem* de los animales donantes son satisfactorios.
7. El material que se utilice para la extracción y el transporte de los ovarios o de otros tejidos deberá ser limpiado y esterilizado y servir exclusivamente para ese fin.
8. Se llevarán registros en los que se consigne la identidad y el origen de todos los donantes y se conservarán por lo menos dos años después de haber exportado los embriones para que la *Autoridad Veterinaria* pueda consultarlos en caso de inspección. Aunque resulte difícil hacerlo en el caso de una recolección de lote, se espera que se conservará la identidad de los *rebaños* o *manadas* de origen de los donantes.

Artículo 4.8.5.

Pruebas y tratamientos facultativos

Un método suplementario para asegurarse de que los embriones producidos *in vitro* no transmitan *enfermedades* es sometiendo a examen los diversos materiales para confirmar la ausencia de los gérmenes patógenos enumerados en el punto 2 del Artículo 4.8.4.

También se pueden realizar pruebas para asegurarse de que los procedimientos de control de calidad empleados en el laboratorio de manipulación son aceptables.

Se puede someter a examen el material siguiente:

- a) los ovocitos/embriones no viables: de alguna etapa del proceso de producción *in vitro* de los lotes destinados a la exportación;
- b) muestras del medio de maduración *in vitro* tomadas antes de mezclar el semen y los ovocitos para el proceso de fecundación;
- c) muestras del medio de cultivo de los embriones extraído inmediatamente antes de congelarlos.
- d) Sólo se introducirán en una misma ampolla, un mismo frasco o una misma pajuela los embriones procedentes de una misma hembra donante o de un mismo lote de embriones.

Estas muestras se conservarán a 4 °C y serán analizadas en un plazo de 24 horas. Si no pudieran ser analizadas en ese plazo, se conservarán congeladas a una temperatura igual o inferior a -70 °C.

Además:

1. El semen que se utilice para fecundar ovocitos *in vitro* deberá cumplir los requisitos y las normas sanitarias definidos en el Capítulo 4.6. para cada especie.

En caso de que el reproductor donante del semen utilizado para fecundar los ovocitos haya muerto o de que en el momento de la toma del semen se desconozca el estado de salud del reproductor donante respecto de una *enfermedad* infecciosa o de *enfermedades* contra las que conviene protegerse, se podrán exigir exámenes complementarios de los embriones inutilizados para comprobar que esas *enfermedades* infecciosas no han sido transmitidas. Otro método puede consistir en analizar una parte alícuota del semen tomado en la misma fecha.

2. Todos los productos biológicos de origen animal, incluidas las células de co-cultivo y los componentes de los medios utilizados para la recolección de los ovocitos, la maduración, la fecundación, el cultivo, el lavado y la conservación deben estar exentos de patógenos vivos. Los medios se esterilizarán antes de ser utilizados con métodos reconocidos, conforme a las indicaciones del Manual de la IETS¹, y se manipularán de modo que permanezcan estériles. Se agregarán antibióticos a todos los líquidos y medios, conforme a las recomendaciones del Manual de la IETS¹.
3. Todo el material utilizado para la recolección, la manipulación, el cultivo, el lavado, la congelación y la conservación de los ovocitos/embriones debe ser nuevo o ser limpiado y esterilizado antes de ser utilizado, conforme a las recomendaciones del Manual de la IETS¹.

Artículo 4.8.6.

Gestión del riesgo

En lo que concierne la transmisión de *enfermedades*, la transferencia de embriones producidos *in vitro* es un método de intercambio de material genético animal que entraña muy poco riesgo, aunque el riesgo no es tan bajo como para los embriones recolectados *in vivo*. Cabe señalar que la clasificación de la IETS en *enfermedades*/agentes patógenos, descrita en el Artículo 4.7.14. para embriones recolectados *in vivo*, no se aplica en el caso de embriones producidos *in vitro*. Independientemente de la especie animal considerada, el proceso de transferencia de embriones comprende tres fases que determinan el nivel definitivo de riesgo:

1. La primera fase comprende el riesgo potencial de contaminación de los ovarios/ovocitos/embriones, la cual depende:
 - a) de la situación zoonosaria del *país exportador* y/o de la zona de exportación;
 - b) del estado sanitario de los *rebaños* o *manadas* y de las hembras donantes de las que son extraídos los ovarios/ovocitos/embriones;
 - c) el poder patógeno de los agentes patógenos específicos enumerados en el punto 2 del Artículo 4.8.4.
2. La segunda fase corresponde a la disminución del riesgo mediante la utilización de procedimientos de tratamiento de embriones internacionalmente reconocidos y definidos en el Manual de la IETS¹. Dichos procedimientos son los siguientes:
 - a) los embriones serán lavados 10 veces por lo menos con diluciones de 1/100 por lo menos entre cada lavado, y para transferir los embriones de un lavado a otro se utilizará una pipeta nueva;
 - b) sólo se lavarán juntos los embriones procedentes de una misma hembra donante (en el caso de recolección individual) o de un mismo lote (en el caso de recolección por lote), y no más de diez embriones a la vez;
 - c) cuando la inactivación o la supresión de ciertos virus (herpesvirus-1 de los bovinos y virus de la enfermedad de Aujeszky, por ejemplo) sea necesaria, se modificará el procedimiento estándar de lavado y se harán lavados suplementarios con tripsina, de acuerdo con las indicaciones del Manual de la IETS¹;
 - d) después del lavado se examinará toda la superficie de la zona pelúcida de cada embrión con lentes que aumenten por lo menos 50 veces su tamaño y se certificará que está intacta y exenta de materia adherente.

3. La tercera fase, que se aplica a las *enfermedades* enumeradas en el punto 2 del Artículo 4.8.4., incluye las reducciones del riesgo resultantes de:
 - a) la *vigilancia* de los animales donantes y de sus *rebaños* o *manadas* de origen después de la recolección de los embriones, basándose en los períodos normales de incubación de las *enfermedades* consideradas, para determinar retrospectivamente el estado de salud de los animales donantes mientras los embriones son almacenados en el *país exportador* (si se trata de especies que pueden ser conservadas mediante crioconservación). La *vigilancia* de donantes después de la recolección no es posible, por supuesto, en el caso de recolección por lote de un *matadero*, aunque sí sea posible la *vigilancia* de los *rebaños* o *manadas* de origen;
 - b) análisis en un laboratorio de los ovocitos/embriones, células de cocultivo, medios y otras muestras, como la sangre, para detectar la presencia de agentes patógenos específicos (según se contempla en el Artículo 4.8.5.).

Artículo 4.8.7.

Condiciones aplicables al almacenamiento y el transporte de embriones

1. Sólo se almacenarán juntos en una misma ampolla, un mismo frasco o una misma pajuela los embriones procedentes de la misma hembra donante o del mismo lote de recolección.
2. Si fuese posible, según la especie, los embriones se congelarán en nitrógeno líquido fresco o cualquier otro crioconservante y luego se almacenarán en crioconservante fresco dentro de tanques o contenedores limpiados y esterilizados, respetando condiciones de higiene rigurosas, y se depositarán en un lugar de almacenamiento.
3. Las ampollas, los frascos o las pajuelas se precintarán en el momento de la congelación y se etiquetarán conforme a las indicaciones del Manual de la IETS¹.
4. Los contenedores de nitrógeno líquido se precintarán en el *país exportador* antes de ser expedidos.
5. Los embriones no deberán exportarse hasta que no se hayan ultimado los certificados veterinarios pertinentes.

Artículo 4.8.8.

Micromanipulación

Cuando los embriones deban ser objeto de micromanipulaciones, éstas se emprenderán una vez concluido el tratamiento descrito en el punto 2 del Artículo 4.8.6. y de conformidad con lo dispuesto en el Capítulo 4.9.

1 Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones.