



Los resultados de los cuatro lotes cumplen con los criterios de aceptación

5.3 Procedimientos analíticos

Los procedimientos utilizados para controlar el WSL se resumen en los siguientes párrafos. La prueba de identificación del antígeno HA se utiliza para controlar el MSL y el WSL.

5.3.1 Identificación del antígeno HA

El método utilizado para identificar el antígeno HA se describe en la sección 3.2.S.4.2. Procedimientos analíticos.

5.3.2 Identificación del antígeno NA

El método utilizado para identificar el antígeno NA se describe en la sección 3.2.S.4.2. Procedimientos analíticos.

5.3.3 Título infeccioso en huevos

5.3.3.1 Referencia

Método interno.

5.3.3.2 Principio del título infeccioso en huevos

Cuantificación del número de partículas infecciosas presentes en el producto por analizar. El título infeccioso corresponde a la inversa de la dilución del producto analizado que provoca un desarrollo viral en el 50 % de los huevos embrionados.

El desarrollo viral se detecta mediante una prueba de hemaglutinación entre una suspensión de eritrocitos de gallina y líquido alantoideo de huevos embrionados inoculados.

5.3.3.3 Equipo

Equipo habitual de laboratorio de virología.

5.3.3.4 Lista de reactivos

- Huevos embrionados (10-11 días)
- Medio de dilución: solución fisiológica con antibióticos
- Eritrocitos de gallina

5.3.3.5 Procedimiento operativo

Una vez homogeneizadas las muestras por analizar se diluyen 10 veces con medio de dilución, cada dilución se inocula en la cavidad alantoidea de huevos embrionados (10 u 11 días de



embriogénesis, 0,2 mL de dilución por huevo, 10 huevos por dilución). También se realizan controles negativos y positivos.

Tras 72 h de incubación a $+35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ los huevos se enfrían, se recolecta el líquido alantoideo y se deposita en placas de pocillos. Los 10 líquidos alantoideos para cada dilución analizada se distribuyen en la misma fila. Se analizan asimismo controles negativos y positivos de eritrocitos.

Luego se añade una suspensión de eritrocitos de gallina (1/1, v/v) a cada pocillo, seguido por una homogeneización.

Las placas se enfrían a $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ durante 1 hora antes de leer el número de pocillos que presentan hemaglutinación positiva.

5.3.3.6 Lectura, cálculos y resultados

Se determina el título infeccioso (EID_{50}) de acuerdo con la fórmula de Spearman y Kärber.

$$\text{Log}_{10} DI_{50} = |x_0| - d/2 + d\sum (r_i/n_i)$$

- x_0 = la inversa de la última dilución con el 100 % de los huevos infectados;
- d = \log_{10} del factor de dilución;
- n_i = número de huevos inoculados (restados los huevos muertos) para una dilución;
- r_i = número de huevos infectados para una dilución;

El título infeccioso final corresponde al promedio de dos determinaciones distintas.

5.3.3.7 Criterios de validez

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

- Los controles negativos deben ser negativos.
- Los controles positivos deben ser positivos.
- Las diluciones elegidas se encuentran entre las diluciones que incluyen el 100 % y el 0 % de huevos positivos.
- Las dos determinaciones deben ser homogéneas.

5.3.4 Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica

La esterilidad de cada WSL se determina de conformidad con el método n.º 2.6.1, (método de filtración por membrana) "Esterilidad" de la Ph. Eur., edición actual.

5.3.5 Prueba de micoplasmas

La detección de micoplasmas mediante cultivo microbiológico o por el método de cultivo de células indicadoras (epifluorescencia) se realiza de conformidad con el método n.º 2.6.7 "Micoplasmas" de la Ph. Eur., edición actual.



5.4 Estrategia de pruebas (justificación/fundamento)

Las pruebas realizadas en los lotes de siembra cumplen con la monografía n.º 0158 “Vacuna antigripal (virión fraccionado, inactivada)” de la Ph. Eur., edición actual, salvo para la determinación del título infeccioso, que es una prueba adicional. También se cubren los requisitos aplicables de la monografía n.º 0153 “Vacunas para uso humano” de la Ph. Eur., edición actual.

Las pruebas se realizan a fin de demostrar la identidad de la cepa, la pureza biológica y la potencia de los lotes de siembra:

- Los antígenos HA de cada lote de siembra deben identificarse como el virus gripal de la cepa adecuada mediante un método apropiado (monografía n.º 0158 “Vacuna antigripal [virión fraccionado, inactivada] de la Ph. Eur., edición actual). La identificación del antígeno HA en el MSL y en el WSL se realiza mediante el método de inhibición de la hemaglutinación (IHA). Los antígenos HA tienen una actividad biológica medible^a, que puede inhibirse con un antisuero dirigido contra el antígeno. Por consiguiente, se utilizó un método de inhibición inmunológica bien conocido, comparando la inhibición de la actividad biológica de la muestra analizada inducida por el antisuero con antígenos de referencia. También se realiza una prueba de caracterización mediante secuenciación genética de la HA para respaldar la identificación de la HA. Esta prueba permite evaluar que la cepa del virus de la gripe corresponde al lote previo al maestro recibido, y que es diferente de la cepa (mismo tipo/subtipo) de la variación antigénica anterior;
- Se identifica la secuencia de codificación del antígeno NA por RT-PCR (este método cumple con el método n.º 2.6.21 “Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos”, Ph. Eur., edición actual) para cada WSL.
- La prueba de esterilidad bacteriana y fúngica debe llevarse a cabo con cada lote de WSL para cumplir con la monografía n.º 0158 “Vacuna antigripal (virión fraccionado, inactivada)”, Ph. Eur., edición actual.
- Los análisis de micoplasmas, realizados en cumplimiento del método n.º 2.6.7 “Micoplasmas” de la Ph. Eur., edición actual, se llevan a cabo para verificar la ausencia de micoplasmas cultivables y no cultivables en el WSL.
- La determinación del título infeccioso es una prueba adicional realizada para dar seguimiento al proceso. El título infeccioso del WSL se controla a fin de asegurar la actividad viral mínima necesaria para inocular una cantidad suficiente de huevos para preparar el DS.

^a El método detallado en este capítulo podría adaptarse según las características de la cepa relevante en ese momento.



5.5 Resumen de la validación de los métodos de CC y conclusiones

La validación de los métodos de control de calidad consiste en demostrar que los métodos utilizados para analizar los lotes de siembra son adecuados para su liberación. Las pruebas de CC se enumeran en la Tabla 11. Para obtener más detalles sobre la validación de estos métodos, vea el resumen de los estudios de validación en la ubicación indicada en la Tabla 11.

Tabla 11: Lista de los resúmenes de validación para los procedimientos de CC

Pruebas de control de calidad	Referencia al resumen de validación
Identificación del antígeno HA	3.2.S.4.3 Validación de los procedimientos analíticos
Identificación del antígeno NA	3.2.S.4.3 Validación de los procedimientos analíticos
Título infeccioso en huevos	Vea el apartado 5.5.1.
Esterilidad bacteriana y fúngica	3.2.S.4.3 Validación de los procedimientos analíticos
Prueba para detección de micoplasmas por cultivo microbiológico	Vea el apartado 5.5.2
Prueba para detección de micoplasmas por epifluorescencia en cultivo celular	Vea el apartado 5.5.2

5.5.1 Título infeccioso en huevos

5.5.1.1 Panorama

Los análisis se realizan de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 5.3.3. El lote de siembra seleccionado como modelo para la prueba es la cepa A/Panama/2007/99 (lote FA038937).

Se han evaluado las siguientes características de validación:

- La especificidad del método se demuestra durante cada prueba verificando lo siguiente:
 - Se detecta hemaglutinación positiva en la muestra de control positivo (líquido alantoideo en presencia del virus de la gripe).
 - No se detecta hemaglutinación en la muestra de control negativo.
- Precisión (repetibilidad y precisión intermedia);
- linealidad,
- exactitud.

En la Tabla 12 se resumen los criterios de aceptación y los resultados de validación para cada característica de validación.



Tabla 12: Resumen de los resultados de validación

Características	Criterio de aceptación	Resultado
Especificidad	/	La especificidad se comprueba para cada prueba con muestras de control negativo y positivo.
Precisión	Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia: $\leq \pm 0,7 \log_{10} \text{EID}_{50}/\text{mL}$	Coefficiente de variación: 3,2 % Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 corrida con 2 mediciones realizadas: $\pm 0,35 \log_{10} \text{EID}_{50}/\text{mL}$
Linealidad	$P_{\text{linealidad}} < 0,01$ $P_{\text{desviación de la linealidad}} > 0,05$	$P_{\text{linealidad}} < 0,0001$ $P_{\text{desviación de la linealidad}} = 0,59$ Después de un ajuste lineal de Y (título infeccioso medido) en función de X (dilución teórica) en un sistema log-log, la ecuación obtenida es la siguiente: $Y = 8,923 + 0,964 \cdot X$ Rango de linealidad: $[10^{5,3}, 10^{9,4}] \text{EID}_{50}/\text{mL}$
Exactitud	El porcentaje medio de recuperación calculado para los tres niveles de dilución teórica se encuentra entre el 80 % y el 120 %.	La recuperación porcentual promedio y sus límites de confianza son, respectivamente: 95 % [87 %; 104 %]

La técnica es específica, lineal y exacta en el rango de $[10^{5,3}, 10^{9,4}] \text{EID}_{50}/\text{mL}$ con una recuperación promedio del 95 %.

El método es preciso con coeficientes de variación de repetibilidad y precisión intermedia del 3,2 % y un intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia de $\pm 0,35 \log_{10} \text{EID}_{50}/\text{mL}$ para 1 corrida (2 medidas) de rutina.

De manera rutinaria, un operador realiza 2 mediciones. Considerando la variabilidad del método, las 2 mediciones se consideran homogéneas si la proporción entre las dos determinaciones es $\leq 10^{0,97} \text{EID}_{50}/\text{mL}$.

5.5.1.2 Resultados y análisis

5.5.1.2.1 Especificidad

La especificidad se comprueba para cada prueba con muestras de control negativo y positivo.

5.5.1.2.2 Precisión

El diseño experimental fue el siguiente:

- Precisión intermedia: se realizaron 4 grupos independientes de análisis por el mismo método, con una muestra inicialmente homogénea analizada por 4 operadores en días diferentes.
- Repetibilidad: dentro de cada uno de los grupos mencionados se realizaron 5 análisis. Los análisis (realizados por duplicado) se llevaron a cabo de forma independiente utilizando el mismo método, con una muestra primaria homogénea, en el mismo laboratorio, con el mismo equipo, en un intervalo corto de tiempo.



Los datos analizados son títulos infecciosos, expresados en EID₅₀/mL.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13: Precisión, títulos infecciosos

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Medida 1 EID ₅₀ /mL	10 ^{7,76}	10 ^{7,70}	10 ^{7,40}	10 ^{7,60}
	10 ^{8,00}	10 ^{7,70}	10 ^{7,70}	10 ^{7,50}
	10 ^{7,70}	10 ^{7,40}	10 ^{8,10}	10 ^{7,60}
	10 ^{7,88}	10 ^{7,18}	10 ^{7,40}	10 ^{7,70}
	10 ^{7,50}	10 ^{7,80}	10 ^{7,30}	10 ^{7,80}
Medida 2 EID ₅₀ /mL	10 ^{7,39}	10 ^{7,60}	10 ^{7,70}	10 ^{7,40}
	10 ^{7,30}	10 ^{7,60}	10 ^{7,70}	10 ^{7,00}
	10 ^{7,60}	10 ^{7,50}	10 ^{7,50}	10 ^{7,60}
	10 ^{7,52}	10 ^{7,50}	10 ^{7,40}	10 ^{7,80}
	10 ^{7,60}	10 ^{7,20}	10 ^{6,98}	10 ^{7,80}

Según el análisis estadístico realizado con los datos de la Tabla 13.

- La prueba de COCHRAN muestra que las varianzas de los 4 grupos son homogéneas.
- Los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia, así como el intervalo de confianza del 95 % para 1 corrida (2 medidas), se presentan en la Tabla 14.
- Media general: $\bar{m} = 7,56 \log_{10}(\text{EID}_{50}/\text{mL})$; en forma aritmética: 10^{7,56} EID₅₀/mL.

Tabla 14: Resultados de repetibilidad y precisión intermedia

	Desviación estándar	Coefficientes de variación	Intervalo de confianza del 95 % para 1 corrida (2 medidas)
Parámetros de repetibilidad	0,245	3,24 %	-
Parámetros de precisión intermedia	0,245	3,24 %	± 0,35 log ₁₀ (EID ₅₀ /mL)

5.5.1.2.3 Linealidad

El diseño experimental fue el siguiente: 3 operadores realizaron 3 series independientes en 3 días distintos.

Cada corrida incluyó el análisis de un rango de 4 niveles de dilución de la muestra.

Los datos analizados son títulos infecciosos, expresados en log EID₅₀/mL.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 15.



Tabla 15: Linealidad, títulos infecciosos medidos

Dilución teórica	Títulos infecciosos medidos, log (EID50/mL)		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
1	9,0	9,0	8,75
1/12	7,9	8,26	7,65
1/144	6,7	6,81	6,75
1/1728	5,98	5,80	5,75

Según el análisis estadístico realizado con los datos de la Tabla 15:

- La prueba de COCHRAN demuestra que las varianzas de los 4 niveles de dilución son homogéneas.
- La dependencia entre el título infeccioso teórico y el título infeccioso medido, así como la linealidad de esta relación, se verifican mediante una regresión lineal no ponderada utilizando el método de mínimos cuadrados. Se observa una pendiente significativa al nivel del 1 % y una desviación no significativa de la linealidad al nivel del 5 %.
- La ecuación de la recta de regresión se presenta en la Tabla 16.

Tabla 16: Resultados de linealidad

Ecuación de la recta de regresión	Coefficiente de correlación lineal	Rango lineal en EID ₅₀ /mL
$Y = (8,923 \pm 0,187) + (0,964 \pm 0,093) \cdot X$	0,9908 con 10 niveles de libertad	$[10^{5,3}, 10^{9,4}]$
Donde: X = diluciones teóricas expresadas en logaritmos Y = títulos infecciosos medidos expresados en log EID50/mL		

ROXANA MONTEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 APODERADA
 SANOFI PASTEUR S.A.

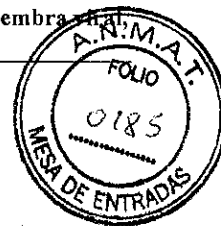
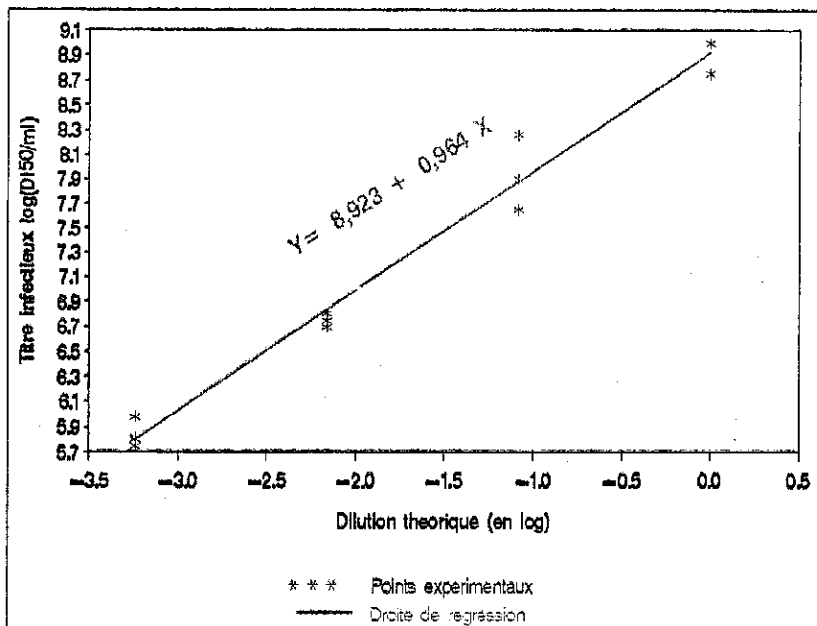


Figura 2: Gráfico de linealidad



5.5.1.2.4 Exactitud

El diseño experimental fue el siguiente: 3 operadores realizaron 3 series independientes en 3 días distintos. Cada corrida incluyó el análisis de un rango de 4 niveles de dilución de la muestra.

Los resultados utilizados para la evaluación de la exactitud se presentan en la Tabla 15.

Los porcentajes de recuperación se calculan para cada nivel de concentración teórica prevista y para cada grupo del siguiente modo:

$$\text{Percent recovery (\%)} = \frac{\text{Measured Dilution Factor}}{\text{Theoretical Dilution Factor}} \times 100$$

El factor de dilución medido es la diferencia entre el título infeccioso obtenido para cada dilución y el título infeccioso obtenido para la muestra pura.

El factor de dilución teórico es el logaritmo de la dilución teórica.

Los factores de dilución teóricos y medidos se presentan en la Tabla 17.

ROXANA MONTEMLONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 APODERADA
 SANOFI PASTEUR S. A.

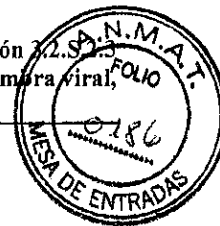


Tabla 17: Exactitud, factores de dilución

Dilución	Factor de dilución teórica	Factor de dilución medida		
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
1/12	-3,24	-3,02	-3,20	-3,00
1/144	-2,15	-2,30	-2,19	-2,00
1/1728	1,08	-1,10	-0,74	-1,10

El análisis estadístico se realiza en 3 niveles de títulos infecciosos, ya que no se incluyen los resultados obtenidos para la muestra pura:

- La prueba de COCHRAN muestra que las varianzas de los 3 niveles son homogéneas.
- El análisis de varianzas permite concluir que las medias interniveles son iguales.
- La recuperación promedio y sus límites de confianza del 95 % se presentan en la Tabla 18.

Tabla 18: Resultados de exactitud

Recuperación promedio	Límites de confianza del 95 %
95 %	[87 - 104]%

5.5.1.3 Homogeneidad de los dos resultados

El límite de la diferencia entre los dos títulos infecciosos utilizados como criterios de validez se estableció de conformidad con la norma ISO 5725-6 "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results" [exactitud (veracidad y precisión) de los métodos y resultados de medición], parte 6: "Use in practice of accuracy values" [uso de valores de exactitud en la práctica].

Se calculó el rango crítico en el nivel de probabilidad del 99,5 % ($CR_{0,995(n)}$). Como la prueba del título infeccioso incluye dos mediciones realizadas por el mismo operador (es decir, $k = 1$ y $n = 2$ mediciones), este rango crítico se calcula con la siguiente fórmula:

$$CR_{0,995(n)} = f(n) * \sqrt{s_r^2}$$

Donde:

- n : número de mediciones que se van a comparar (es decir, $n = 2$);
- $f(n)$: valor crítico del rango de muestras de una distribución normal (con un nivel de probabilidad del 99,5 %). Se presenta en el manual "Handbook of statistical tables" de Donald Bruce Owen - Addison-Wesley Pub. Co., 1962;
- s_r^2 : varianza de la repetibilidad de los procedimientos analíticos obtenida durante la validación.

ROXANA MOTTEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 APODERADA
 SANOFI PASTEUR S.A.



Para dos mediciones, se compara el rango calculado correspondiente a la diferencia entre el resultado máximo y el resultado mínimo, con el rango crítico en el nivel de probabilidad del 99,5 % $CR_{0,995(2)}$:

- Si $X_{\text{máx}} - X_{\text{mín}} \leq CR_{0,995(2)}$, los 2 resultados son homogéneos.
- Si $X_{\text{máx}} - X_{\text{mín}} > CR_{0,995(2)}$, los 2 resultados son heterogéneos.

Para la prueba de titulación infecciosa que incluye dos mediciones realizadas por un operador ($n = 2$):

- La varianza de la repetibilidad obtenida para la validación es $s_r^2 = 0,060016$ con 36 grados de libertad.
- El factor $f(n)$ para $n = 2$ es 3,970.

El rango crítico en el nivel de probabilidad del 99,5 % $CR_{0,995(2)}$ es:

$$CR_{0,995(2)} = 3.970 * \sqrt{0.060016} = 0.97258 \log_{10} (\text{EID}_{50}/\text{mL})$$

De manera rutinaria, un operador realiza dos mediciones. Las dos mediciones se consideran homogéneas si la proporción entre las dos determinaciones es $\leq 10^{0,97} \text{EID}_{50}/\text{mL}$.

5.5.1.4 Conclusión

El método es:

- específico,
- lineal en el rango de $[10^{5,3}, 10^{9,4}] \text{EID}_{50}/\text{mL}$;
- exacto en el mismo rango de la linealidad, con una recuperación promedio del 95 %.

El método es preciso con coeficientes de variación de repetibilidad y precisión intermedia del 3,2 % y un intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia de $\pm 0,35 \log_{10} \text{EID}_{50}/\text{mL}$ para 1 corrida (2 medidas) de rutina.

5.5.2 Prueba para detección de micoplasmas

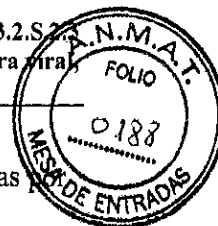
Esta prueba se realiza de acuerdo con los requisitos del método n.º 2.6.7 "Micoplasmas" de la Ph. Eur., edición actual.

5.6 Estándar de referencia

El estándar de referencia utilizado para realizar la prueba de identidad de HA en el MSL y en el WSL se describe en la sección 3.2.S.5 Estándares o materiales de referencia.

6 Caracterización

Cada virus gripal de referencia ha sido preparado por un Centro Colaborador de la OMS. Vea la sección 3.2.S.2.3 Fuente, historia y generación de las cepas virales vacunales para obtener



información sobre la derivación y caracterización de las cepas virales de referencia realizadas en los Centros Colaboradores de la OMS correspondientes.

6.1 Identidad

6.1.1 Identidad del antígeno HA

La identificación del antígeno HA en el MSL y el WSL se realiza mediante el método de inhibición de la hemaglutinación (IHA) (vea el apartado 5.3.1) para confirmar la identidad de la cepa del virus de la gripe que se multiplicó. También se realiza una prueba de caracterización mediante secuenciación genética de la HA para respaldar la identificación de la HA. Esta prueba permite determinar que la cepa del virus de la gripe corresponde al lote previo al maestro recibido, y que es diferente de la cepa (igual tipo/subtipo o linaje) de la variación antigénica anterior; A continuación se presenta una descripción del método.

6.1.1.1 Principio del método

La secuencia del gen de la hemaglutinina se determina mediante secuenciación del ácido ribonucleico (ARN) que codifica el antígeno HA. Se amplifica el gen que codifica HA mediante reacciones superpuestas de RT-PCR que cubren como mínimo dos veces el gen en su totalidad. A continuación, después de la purificación, se secuencian todos los productos de la PCR en ambas hebras de ADN por el método de Sanger utilizando tecnología BigDye Terminator. El diseño se realiza de modo que cada nucleótido del gen quede cubierto por al menos dos reacciones de PCR distintas, lo que da lugar a al menos cuatro reacciones distintas de secuenciación que cubren cada nucleótido a lo largo del gen.

6.1.1.2 Lista de reactivos

- Los cebadores específicos de PCR se diseñan mediante software.
- La secuencia de referencia del gen de HA es la secuencia obtenida internamente a través de la secuenciación del pre-MSL suministrado por un Centro Colaborador de la OMS o una secuencia disponible en bases de datos publicados, en caso de que la secuencia interna no esté disponible.

6.1.1.3 Procedimiento operativo

El procedimiento consiste en cuatro pasos sucesivos que se detallan a continuación:

- **Extracción del ARN**

El ARN viral se extrae utilizando un kit de extracción de ARN según las instrucciones del proveedor del kit.

- **Amplificación del gen de HA**

Después de la extracción, se realiza la transcripción inversa del ARN en el ADN complementario (ADNc), que luego se amplifica mediante PCR con un conjunto de cebadores.



En primer lugar, se prepara la mezcla de la reacción RT-PCR, que contiene una transcriptasa inversa capaz de retrotranscribir el ARN viral y la polimerasa de ADN utilizada para la amplificación del ADNc, junto con los otros componentes necesarios para las reacciones, como una solución tampón, un cofactor enzimático, solución de trifosfato de desoxirribonucleósidos y los cebadores oligonucleotídicos.

Todos los componentes se disuelven en agua sin nucleasas. A continuación, se colocan los tubos de PCR en una máquina de PCR con la configuración operativa elegida de conformidad con las instrucciones del proveedor del kit de amplificación de RT-PCR y específicas para la cepa que se desea identificar. Los ciclos térmicos consisten en las siguientes fases: transcripción inversa, desnaturalización, amplificación (desnaturalización-hibridación-extensión del cebador) que se repiten un número definido de ciclos.

- **Secuenciación por el método de Sanger**

Después de la purificación, se secuencian los productos amplificados de PCR por el método de Sanger utilizando la tecnología BigDye Terminator. Este consiste en iniciar la síntesis del ADN usando un oligonucleótido corto (cebador) complementario a los extremos que rodean el fragmento de ADN que se va a secuenciar. Los 4 desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) se agregan con una concentración baja de los 4 didesoxinucleótidos (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) etiquetados con 4 fluoróforos diferentes. La incorporación de los didesoxinucleótidos evita una extensión y síntesis adicionales de los fragmentos del ADN. Esto provoca una longitud variable del ADN, que luego se purifica y separa por medio de cromatografía capilar. La fluorescencia de los fragmentos etiquetados permite determinar la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN sometido a análisis. El ciclo térmico consiste en las siguientes fases: desnaturalización, amplificación (desnaturalización-hibridación-extensión del cebador) que se repiten un número definido de ciclos.

- **Ensamble y análisis de la secuencia**

A continuación, todas las secuencias se ensamblan juntas para reconstruir la secuencia completa codificadora del gen de HA, y se compara con la secuencia de referencia por alineación. Este trabajo se lleva a cabo utilizando un software específico.

Notas:

- La calidad de la secuenciación se aseguró realizando una cobertura mínima de 2x en las regiones objetivo (2x significa al menos dos lecturas a partir de dos productos independientes de la PCR). Dado que cada producto de la PCR dio origen a 2 lecturas de secuenciación (una para cada hebra de ADN), en teoría, un mínimo de 4 reacciones de secuenciación cubren cada nucleótido.
- Se desarrollaron 3 diseños específicos para los cebadores de secuenciación y cebadores de RT-PCR para las 3 cepas del virus de la gripe (A/H3N2, A/H1N1 y B). Teniendo en cuenta las posibles mutaciones del virus, se podría adaptar la elección del cebador para la secuenciación de una nueva cepa.

6.1.1.4 Criterios de validez

La prueba se considera válida si:



- cada nucleótido se asigna mediante al menos 2 lecturas de 2 productos de PCR independientes;
- la cobertura de la secuencia de consenso obtenida es total en comparación con la secuencia de referencia a fin de obtener la secuencia completa del gen codificador de la HA.

6.1.1.5 Resultados

El objetivo de este estudio era establecer y comparar las secuencias completas del gen que codifica la HA del MSL y del WSL con la secuencia de referencia a fin de respaldar la identidad de la HA de las 4 cepas de la vacuna antigripal tetravalente (QIV).

Los resultados de la secuenciación se importaron por separado en el software y se ensamblaron todas las reacciones de las secuencias a fin de crear cóntigos individuales para cada una de las muestras analizadas. Se generó un total de 2 secuencias de consenso a partir de los cóntigos ensamblados, uno para cada uno de los lotes secuenciados.

Los estudios para cada cepa se presentan a continuación.

Nota:

- La secuenciación no se realizó con el virus de la vacuna candidata, recibido del Centro Colaborador de la OMS (es decir, pre-MSL). De hecho, las cuatro cepas de QIV se recibieron antes de la nueva estrategia de identificación de la HA (antes de noviembre de 2014), por lo que no había ningún pre-MSL disponible. Por ende, las secuencias del MSL y del WSL se analizaron con respecto a una secuencia de referencia proveniente de una base de datos pública.

6.1.1.5.1 Resultados para la cepa A/California/7/2009 (NYMC X-179A)

La secuenciación se llevó a cabo en el lote de MSL FA353744 y en el lote de WSL FA356399.

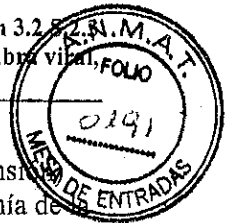
Como no había pre-MSL disponible, la secuencia de referencia (1701 nucleótidos de extensión) utilizada para generar la secuencia de consenso en el programa y en la alineación final provenía de la base de datos de NCBI Genbank, registro n.º GQ214335.

La secuencia final ensamblada que cubría la totalidad del gen de la HA tenía una extensión de 1701 para cada muestra analizada. Posteriormente, las dos secuencias de consenso obtenidas para cada muestra secuenciada (MSL y WSL) se alinearon para visualizar las posibles variaciones genéticas con la secuencia de referencia. Las tres secuencias mostraron una identidad de secuencia del 100 % en un total de 1701 nucleótidos a lo largo del gen que codifica la HA.

El gen completo de la HA del MSL y del WSL se comparó con la secuencia de referencia y no se mostró ninguna diferencia en la codificación de la secuencia genómica completa de la HA entre los tres lotes comparados. Por lo tanto, los resultados confirman la identidad de la HA de los lotes de siembra de A/California/7/2009 (H1N1) para el lote de MSL FA353744 y para el lote de WSL FA356399.

6.1.1.5.2 Resultados para la cepa A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2)

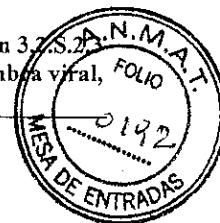
La secuenciación se lleva a cabo en el lote de MSL FA488262 y en el lote de WSL FA492096.



Como no había pre-MSL disponible, la secuencia de referencia (1701 nucleótidos de extensión) utilizada para generar la secuencia de consenso en el programa y la alineación final provenía de la base de datos de GISAID EPIflu, registro n.º EPI407126.

La secuencia final ensamblada que cubría la totalidad del gen de la HA tenía una extensión de 1701 para cada muestra analizada. Posteriormente, las dos secuencias de consenso obtenidas para cada muestra secuenciada (MSL y WSL) se alinearon para visualizar las posibles variaciones genéticas con la secuencia de referencia. Las tres secuencias mostraron una identidad de secuencia del 100 % en un total de 1701 nucleótidos a lo largo del gen que codifica la HA.

El gen completo de la HA del MSL y del WSL se comparó con la secuencia de referencia y no se mostró ninguna diferencia en la codificación de la secuencia genómica completa de la HA entre los tres lotes comparados. Por lo tanto, los resultados confirman la identidad de la HA de los lotes de siembra de A/Texas/50/2012 (H3N2) para el lote de MSL FA488262 y para el lote de WSL FA492096.



6.1.1.5.3 Resultados para la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria)

La secuenciación se lleva a cabo en el lote de MSL FA338855 y en el lote de WSL FA413887.

Como no había pre-MSL disponible, la secuencia de referencia (1795 nucleótidos de extensión) utilizada para generar la secuencia de consenso en el programa y en la alineación final provenía de la base de datos de NCBI Genbank, registro n.º CY115151.

La secuencia final ensamblada que cubría la totalidad del gen de la HA tenía una extensión de 1795 para cada muestra analizada. Posteriormente, las dos secuencias de consenso obtenidas para cada muestra secuenciada (MSL y WSL) se alinearon para visualizar las posibles variaciones genéticas con la secuencia de referencia.

La comparación de las secuencias mostró que:

- Se presentó una variación observada en la posición 641 de la etapa de WSL del gen de HA en comparación con la secuencia de referencia. Se observaron dos variaciones en el MSL en comparación con la secuencia de referencia, en las posiciones 640 y 641.

El cambio de nucleótidos en 1 o 2 posiciones entre los 1795 nucleótidos para los lotes de siembra analizados no pone en duda la identidad de la cepa. Por lo tanto, los resultados confirman la identidad de la HA de los lotes de siembra de B/Brisbane/60/2008 para el lote de MSL FA338855 y para el lote de WSL FA413887.

6.1.1.5.4 Resultados para la cepa B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata)

La secuenciación se lleva a cabo en el lote de MSL FA477285 y en el lote de WSL FA490508.

Como no había pre-MSL disponible, la secuencia de referencia (1755 nucleótidos de extensión) utilizada para generar la secuencia de consenso en el programa y la alineación final provenía de la base de datos de GISAID Epiflu, registro n.º EPI438406.

La secuencia final ensamblada que cubría la totalidad del gen de la HA tenía una extensión de 1755 para cada muestra analizada. Posteriormente, las dos secuencias de consenso obtenidas para cada muestra secuenciada (MSL y WSL) se alinearon para visualizar las posibles variaciones genéticas con la secuencia de referencia. Las tres secuencias mostraron una identidad de secuencia del 100 % en un total de 1755 nucleótidos a lo largo del gen que codifica la HA.

Por lo tanto, los resultados confirman la identidad de la HA de los lotes de siembra de B/Massachusetts/2/2012 para el lote de MSL FA477285 y para el lote de WSL FA490508.

6.2 Pureza, características especiales y estabilidad genética

La información sobre la fuente, la derivación y las características de las cepas virales vacunales se presenta en la sección 3.2.S.2.3 Fuente, historia y generación de la cepa viral vacunal.

Conforme a lo establecido en la Guideline on Influenza Vaccines - Quality module ([guía sobre vacunas antigripales: módulo de calidad] EMA/CHMP/BWP/310834/2012), la estabilidad genética de cada nueva cepa de virus se evaluará mediante secuenciación de los genes codificadores de HA y NA de cada lote nuevo de siembra (MSL y/o WSL) con el pre-MSL del



que se obtuvieron. La secuenciación se realiza por el método de Sanger, descrito en el apartado 6.1.1.

7 Almacenamiento

El MSL y el WSL se almacenan a ≤ -60 °C.

8 Composición de reactivos preparados para la elaboración de los lotes de siembra

La composición de los distintos reactivos preparados se presenta en las siguientes tablas. Las materias primas utilizadas para preparar estos reactivos se tratan en la sección 3.2.S.2.3 Lista y controles de las materias primas.

Tabla 19: Solución tampón del inóculo destinada a la preparación de lotes de siembra y a la dilución de los lotes de siembra viral

Componente	Cantidad para 1 litro	Etapas de elaboración
Cloruro de sodio	8,5 g	Inoculación y dilución del lote de siembra (etapa 4)
Fosfato disódico dihidrato	0,43 g	
Dihidrogenofosfato de potasio	0,13 g	Filtración del WSL (etapa 10)
Al menos agua purificada*	c.s.p. 1 litro	

* Agua purificada, agua ultrapurificada o agua para inyectables

Tabla 20: Solución salina tamponada con fosfato (PBS)

Componente	Cantidad para 1 litro	Etapas de elaboración
Cloruro de sodio	8 g	Concentración (etapa 9 de la preparación del WSL)
Cloruro de potasio	0,2 g	
Fosfato disódico dihidrato	1,15 g	
Dihidrogenofosfato de potasio	0,2 g	
Al menos agua purificada*	c.s.p. 1 litro	

* Agua purificada, agua ultrapurificada o agua para inyectables

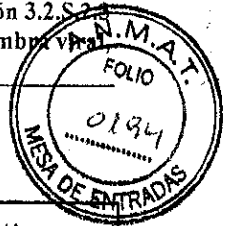
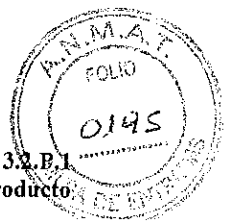


Tabla 21: Solución de sacarosa al 34 %

Componente	Cantidad para 1 litro	Etapas de elaboración
Solución PBS	760 mL	Concentración (etapa 9 de la preparación del WSL)
Cloruro de sodio	9 g	
Sacarosa	389,8 g	

Tabla 22: Solución de sacarosa al 60 %

Componente	Cantidad para 1 litro	Etapas de elaboración
Solución PBS	550 mL	Concentración (etapa 9 de la preparación del WSL)
Cloruro de sodio	9 g	
Sacarosa	771,9 g	



Sección 3.2.P.1 Descripción y composición del producto farmacéutico

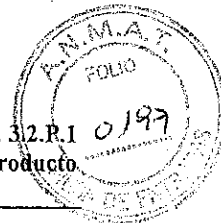
Índice

Lista de tablas	2
1 Descripción del producto farmacéutico.....	3
2 Composición.....	3
3 Descripción del sistema de cierre del envase	4
3.1 Jeringa con aguja acoplada	4
3.2 Jeringa sin aguja acoplada	5



Lista de tablas

Tabla 1: Composición del DP: 15 µg de antígeno HA/dosis de 0,5 mL por cada cepa4



Lista de abreviaturas: vea la sección 2.3 Resumen general de calidad, Introducción.

1 Descripción del producto farmacéutico

La vacuna antigripal tetravalente (QIV), (vacuna de virión fraccionado, inactivada), es una suspensión estéril del virus de la gripe, que contiene 15 µg por dosis de antígeno hemaglutinina (HA) de dos cepas A (H1N1 y H3N2) y dos cepas B (linaje Victoria y linaje Yamagata). Las siembras virales, correspondientes a cada una de las 4 cepas, se multiplican en huevos embrionados, se concentran y purifican mediante ultracentrifugación isopícnica en un gradiente de sacarosa, se fraccionan con octoxinol 9 y se inactivan con formaldehído, lo que da como resultado 4 principios activos (DS). El producto farmacéutico (DP) se obtiene mediante la formulación de los 4 DS en una solución salina tamponada con fosfato (PBS). Es un líquido incoloro opalescente presentado en una jeringa prellenada que contiene una dosis de 0,5 mL.

Elección de las cepas vacunales

La Organización Mundial de la Salud (OMS) examina anualmente la situación epidemiológica mundial para el hemisferio norte (HN) y para el hemisferio sur (HS) y, si es necesario, recomienda nuevas cepas correspondientes a las pruebas epidemiológicas prevalentes.

La vacuna cumple con las recomendaciones de la OMS y de la Farmacopea; monografía n.º 158 "Vacuna antigripal (virión fraccionado, inactivada)", Ph. Eur., edición actual.

2 Composición

La composición cualitativa y cuantitativa del DP se presenta en la Tabla 1.

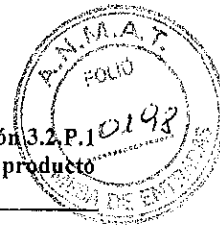


Tabla 1: Composición del DP: 15 µg de antígeno HA/dosis de 0,5 mL por cada cepa

Componente	Cantidad por unidad	Función	Referencia a las normas de calidad
Cepa del virus de la gripe A/H1N1, virión fraccionado, inactivada	15 µg de antígeno HA + excedente*	Principio activo	Ph. Eur. 0158, edición actual.
Cepa del virus de la gripe A/H3N2, virión fraccionado, inactivada	15 µg de antígeno HA + excedente*	Principio activo	Ph. Eur. 0158, edición actual.
Cepa del virus de la gripe B (linaje Victoria), virión fraccionado, inactivada	15 µg de antígeno HA + excedente*	Principio activo	Ph. Eur. 0158, edición actual.
Cepa del virus de la gripe B (linaje Yamagata), virión fraccionado, inactivada	15 µg de antígeno HA + excedente*	Principio activo	Ph. Eur. 0158, edición actual.
Solución PBS†	Agente tampón y diluyente		

* Cantidad de excedente: del 7 al 23 %.

† Composición de la solución PBS, por 1000 mL:

Cloruro de sodio8,00 g
 Cloruro de potasio.....0,20 g
 Fosfato disódico dihidrato.....1,15 g
 Dihidrogenofosfato de potasio.....0,20 g
 Agua para inyectables (WFI).....c. s. p. 1004 g (ya que la densidad de masa de la PBS es de 1004 g/cm³ a +20 °C)

3 Descripción del sistema de cierre del envase

3.1 Jeringa con aguja acoplada

Envase

Jeringa de vidrio tipo I con aguja acoplada de 25G 5/8 de acero inoxidable.

Método de cierre

- Tapón-émbolo fabricado de elastómero (clorobutilo o bromobutilo).
- Protector de aguja de elastómero (poliisopreno sintético) y protector rígido de seguridad de polipropileno traslúcido.



3.2 Jeringa sin aguja acoplada

Envase

Jeringa de vidrio tipo I.

Método de cierre

- Tapón-émbolo fabricado de elastómero (clorobutilo o bromobutilo).
- Capuchón (isopreno-bromobutilo sintético).



Sección 3.2.P.2.1 Componentes del producto farmacéutico

Índice

1	Principio activo	2
2	Excipientes	2

