	<b>Módulo 3. Calidad</b> <b>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</b> Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.	IPV/NC/AR/09-12 Página 7 de 54
<b>3.2.S.2.3. Control de materiales</b>		

Un método para investigar materiales biológicos por ME de transmisión es el uso de cortes ultradelgados de tejido deshidratado e incluido en plástico, comparable con una preparación estándar del mismo tejido con respecto a las siguientes características: proliferación celular, envejecimiento celular, muerte celular y restos celulares, apoptosis, actividad lisosomal, actividad de síntesis, diferenciación de membrana plasmática y homogeneidad.

El método es el siguiente: primero, una muestra se trata con tripsina; después, las células separadas se fijan con un fijador de Karnovsky modificado; a continuación, se llevan a cabo la deshidratación con etanol, la inclusión en resina epoxi y la polimerización de dicha resina. Se hacen cortes ultradelgados (1  $\mu\text{m}$ ) de los trozos de tejido obtenidos. Después los cortes se analizan por microscopía electrónica. Cada corte contiene aproximadamente 500 células.

Preparación de la muestra

1. Tratamiento con tripsina
2. Fijación de las células

*Preparación del fijador (fijador de Karnovsky modificado)*

Se puede usar cualquiera de las siguientes soluciones amortiguadores madre:

- Cacodilato de sodio, ajustada a pH 7,4 con 0,1 M de HCL\*
- Solución amortiguadora de fosfato, ajustada a pH 7,2-7,4 con solución X o Y

Para preparar una solución de paraformaldehído al 10 %, coloque 10 g de paraformaldehído en 100 ml de agua destilada y caliente a 60-65 °C. Acláre la solución agregando gotas de 0,1 M de NaOH. Deje enfriar.

El fijador se prepara de la siguiente manera:

0,2 M de solución amortiguadora madre	50 ml
solución de paraformaldehído al 10 %	20 ml
glutaraldehído al 25 %	10 ml

Ajuste a 100 ml con agua destilada. Determine la osmolaridad.

\* Para lograr una mejor estabilización de las membranas celulares, a la solución amortiguadora de cacodilato de sodio se pueden agregar 1-3 mM de solución de cloruro de magnesio o calcio.

3. Deshidratación de las células fijadas

Se utilizan los siguientes niveles de etanol deshidratado:


30 % etanol	5-10 min
-------------	----------

**CAIF**  
 Compañía Argentina de  
 Investigaciones Farmacéuticas S.A.  
*Dra. María Bernarda Belay*  
 Apoderada  
 DNI 29378925

**CAIF SA**  
*Dra. Bernarda Belay*  
 Co-Directora Técnica  
 M.N. 15.148





	<p align="center"><b>Módulo 3. Calidad</b></p> <p align="center"><b>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</b></p> <p align="center">Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p align="center">IPV/NC/AR/09-12</p> <p align="center">Página 8 de 54</p>
<p><b>3.2.S.2.3. Control de materiales</b></p>		

50 % etanol	5-10 min
70 % etanol	10 min
90 % etanol	10 min
95 % etanol	10 min
100 % etanol (sin agua)	2x 15-30 min
óxido de propileno	2x 10-15 min

4. Impregnación de cubos celulares con resina epoxi

Como medio de inclusión se utiliza éter glicídico.

Impregne los cubos celulares a 60 °C, de la siguiente manera:

Con óxido de propileno:resina epoxi – 1:1	30-60 min
Con óxido de propileno:resina epoxi – 1:3	60-120 min
Con resina epoxi	2 horas o toda la noche
Con resina epoxi con acelerador	2 horas

5. Inclusión de trozos de tejido

Las cápsulas de gelatina se llenan con trozos de tejido impregnados en resina epoxi y luego se terminan de llenar con resina epoxi (con acelerador) y se cierran.

6. Polimerización

La polimerización se lleva a cabo en un horno a 60 °C.

**Identidad/pureza por análisis de huella genética de ADN**

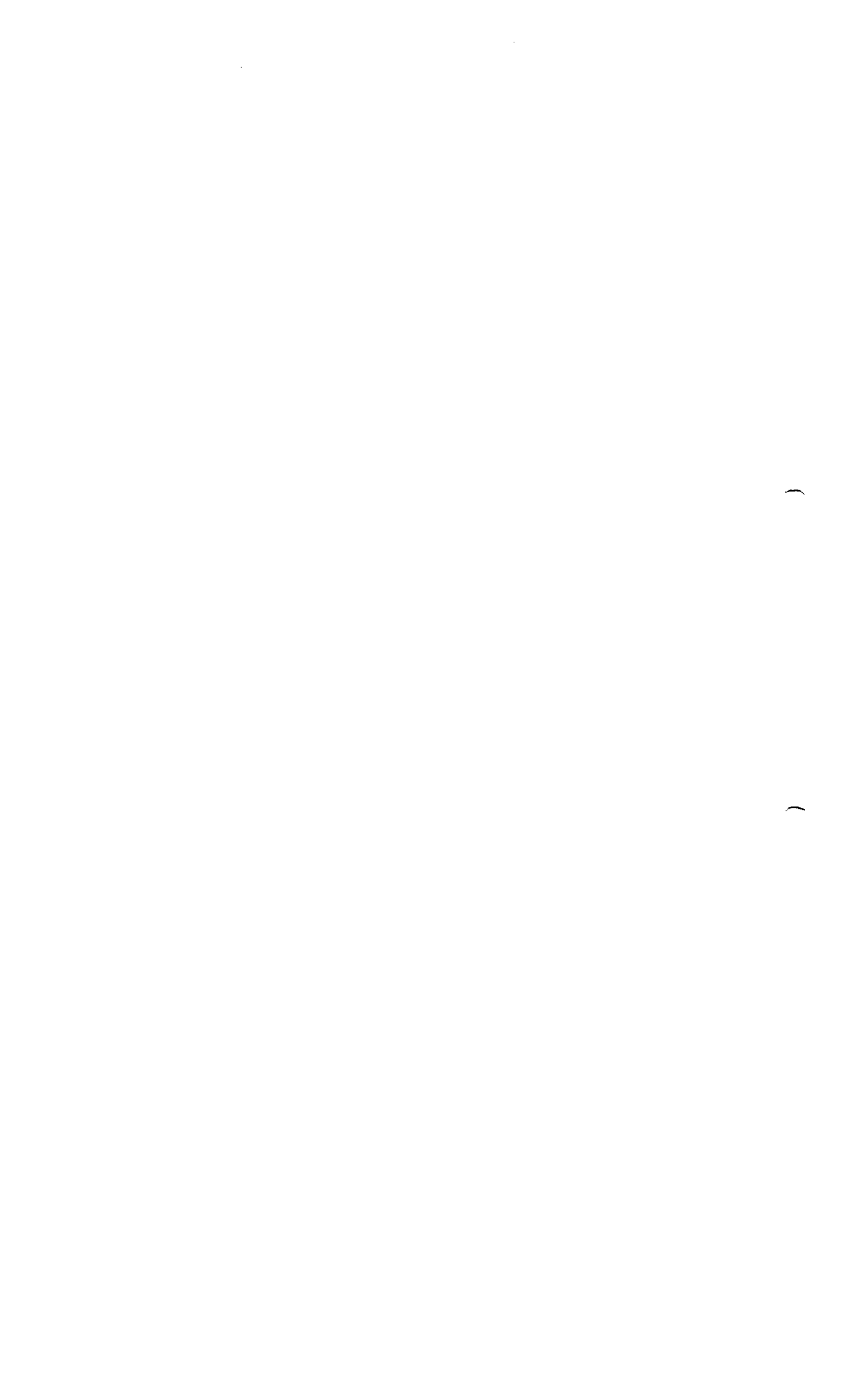
Fundamento

La huella genética de ADN proporciona información detallada específica de la secuencia, que es útil para la caracterización e identificación de líneas celulares. Es posible monitorear la contaminación entre especies y dentro de ellas, y el control de calidad de los bancos de células. Las sondas multilocus derivadas de regiones minisatélites hipervariables específicas del genoma humano se hibridan en secuencias de ADN repetitivas, distribuidas en los genomas de diversas especies. Estas secuencias de ADN repetitivas están compuestas por secuencias de repeticiones cortas en tándem, cuya cantidad varía según cada individuo (número variable de repeticiones en


Compañía Argentina de Investigaciones Farmacéuticas S.A.  
**Dra. María Bernarda Belay**

Apoderada  
DNI 25348925

**CAIP SA**  
**Dra. Bernarda Belay**  
Co-Directora Técnica  
M.N. 15.148





	<p style="text-align: center;"><b>Módulo 3. Calidad</b></p> <p style="text-align: center;">3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</p> <p style="text-align: center;">Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p style="text-align: center;">JPV/NC/AR/09-12</p> <p style="text-align: center;">Página 9 de 54</p>
<p><b>3.2.S.2.3. Control de materiales</b></p>		

tándem: NVRT). El uso de estas sondas en ADN digerido por endonucleasas e inmovilizado en una membrana de nailon genera perfiles de huella genética de ADN/bandas que son exclusivos de cada línea celular.

#### Procedimiento de prueba

Se centrifugan las células del espécimen de prueba y las células de control positivo, y se lisan los sedimentos.

Se purifica el ADN del lisado.

La concentración de ADN se evalúa por espectrometría y la calidad de digestión se determina por electroforesis con gel.

El ADN del espécimen de prueba y el ADN de control positivo se tratan con enzimas de restricción *Hae III* y *Hinf I* para digerir el ADN.

Las digestiones del ADN del espécimen de prueba y del ADN de control positivo consisten en 2 alícuotas con 10 µm de ADN digerido, que se someten a electroforesis en geles separados. Se utilizan marcadores de peso molecular en cada gel.

Los fragmentos de ADN se transfieren a filtros de nailon mediante la técnica de hibridación de Southern. Cada filtro se expone a una de las sondas de ADN estándar (33.15 o 33.6) y se les hace una autorradiografía.

#### Controles

Para determinar el tamaño del ADN, se utiliza por duplicado una escalera de ADN de 1 Kb, que oscila entre 12,2 Kb y 1 Kb, y se utiliza una línea celular estándar con cada muestra.

Las sondas de ADN que se utilizan son las sondas multilocus 33.15 y 33.6 de Jeffrey.

#### Validez de la prueba

La prueba se considera válida cuando la hibridación de las sondas multilocus 33.5 y 33.15 al ADN estándar y del espécimen de prueba genera un perfil de banda de ADN que es claro y legible, y la línea celular de control produce el perfil esperado.

#### Resultados de las pruebas

Los resultados de las pruebas brindarán la siguiente información:

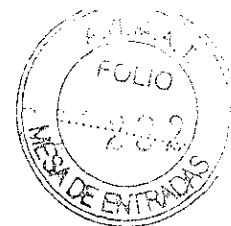
- Verificación de que el espécimen de prueba es idéntico a la línea celular estándar: comparación de los perfiles de huella genética de ADN obtenidos del espécimen de prueba y de la línea celular estándar. Las líneas celulares idénticas tienen huellas genéticas idénticas.


**CAIF**  
Compañía Argentina de  
Investigaciones Farmacéuticas S.A.  
*Dra. María Bernarda Belay*  
ApoDERADA  
DNI 29378925

**CAIF SA**  
Dra. Bernarda Belay  
Co-Directora Técnica  
M.N. 15.146

10

11



	<p align="center"><b>Módulo 3. Calidad</b> <b>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</b> Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p>IPV/NC/AR/09-12 Página 10 de 54</p>
<b>3.2.S.2.3. Control de materiales</b>		

- Detección de deriva genética: el informe compara las huellas genéticas de ADN obtenidas de una línea celular sometida a varios pasajes en relación con el pasaje original en cada punto temporal. La deriva genética se detecta por un cambio en las huellas genéticas.

#### **Análisis de isoenzimas**

Consulte el Módulo 3.2.S.2.4: Control de pasos críticos y productos intermedios.

#### **Agentes extraños**

La prueba se lleva a cabo de acuerdo con la Farmacopea Europea.

#### **Cocultivo**

La prueba se lleva a cabo de acuerdo con la Farmacopea Europea: Sustratos celulares para la producción de vacunas de uso humano.

#### **Prueba en ratones lactantes**

La prueba se lleva a cabo de acuerdo con la Farmacopea Europea: Sustratos celulares para la producción de vacunas de uso humano.

#### **Prueba en ratones adultos**

La prueba se lleva a cabo de acuerdo con la Farmacopea Europea: Sustratos celulares para la producción de vacunas de uso humano.

#### **Prueba en células de *Cercopithecus***

La prueba se lleva a cabo de acuerdo con las instrucciones de la Farmacopea Europea vigente: Pruebas de detección de agentes extraños en vacunas virales de uso humano.

#### **Retrovirus**

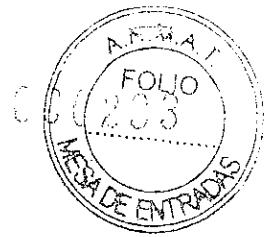
#### **Microscopía electrónica**


**CAIF**  
Compañía Argentina de  
Investigaciones Farmacéuticas S.A.  
**Dra. María Bernarda Belay**  
ApoDERADA  
DNI 29378925



**CAIF SA**  
Dra. Bernarda Belay  
Co-Directora Técnica  
M.N. 15.148





	<p align="center"><b>Módulo 3. Calidad</b></p> <p align="center"><b>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</b></p> <p align="center">Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p align="center">IPV/NC/AR/09-12</p> <p align="center">Página 11 de 54</p>
<p><b>3.2.S.2.3. Control de materiales</b></p>		

Para conocer el método, consulte la sección "Morfología por microscopía electrónica de transmisión".

Ensayo de transcriptasa inversa potenciada por el producto (PERT)

Fundamento

El ensayo PERT es extremadamente sensible y se utiliza para detectar actividad de transcriptasa inversa (TI). Se trata de un ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) con TI y, por lo tanto, combina la especificidad general de los ensayos de TI convencionales con la alta sensibilidad de la RCP. Al igual que los ensayos de TI convencionales, se utiliza para detectar actividad de TI en el interior de partículas retrovirales extracelulares. El ensayo implica convertir un molde de ARN en ADNc y amplificar el ADNc utilizando cebadores específicos. Puesto que no se agrega actividad de TI exógena, el ADNc solamente se generará si la propia muestra contiene actividad de TI. Si no se observa actividad de TI, no se detectará ningún producto. El estudio utiliza tecnología TaqMan® de alto rendimiento con detección en tiempo real del producto específico de la reacción PERT en un sistema de detección de secuencias ABI Prism® 7700 o GeneAmp® 5700, o uno equivalente. Durante la amplificación con cebadores para RCP, la sonda oligonucleotídica fluorogénica específica, con un colorante delator y un colorante inhibidor adheridos, se aparea con el producto amplificado entre los amplímeros. La reacción de detección utiliza la actividad nucleasa 5' de la polimerasa de ADN AmpliTaq Gold® para partir el colorante delator de la sonda, lo que provoca una mayor fluorescencia cuando hay transcriptasa inversa.

Preparación de las muestras de prueba

Entre 10 y 30 ml de sobrenadante de cultivo de células Vero maestras se clarifican dos veces repitiendo el siguiente procedimiento: centrifugación de la muestra a aproximadamente 12.000 rpm (17.000 x g) durante 10 minutos; paso por un filtro estéril de 0,45 µm para eliminar los restos; y sedimentación de las partículas virales por ultracentrifugación a 24.000 rpm (100.000 x g) durante 60 minutos.

Cada sedimento se resuspende en solución amortiguadora de ruptura celular para liberar la actividad de TI.


Procedimiento del ensayo

El ensayo PERT incluye dos reacciones: (i) una actividad de TI en el interior de la muestra convierte un molde de ARN del virus del mosaico del bromo (VMB) en ADNc, utilizando un cebador específico del molde que se encuentra presente en la mezcla de reacción; y (ii) un paso de amplificación, en el que se utilizan cebadores específicos del producto

**CAIF**  
Compañía Argentina de  
Investigaciones Farmacéuticas S.A.  
**Dra. María Bernarda Belay**  
Aptoderada  
DNI 29378925  
**CAIF SA**  
**Dra. Bernarda Belay**  
Co-Directora Técnica  
M.N. 15.148





	<p align="center"><b>Módulo 3. Calidad</b></p> <p align="center"><b>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</b></p> <p align="center">Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p>IPV/NC/AR/09-12</p> <p>Página 12 de 54</p>
<p><b>3.2.S.2.3. Control de materiales</b></p>		

en un ensayo de RCP para amplificar el ADNc. Se agregan alícuotas de muestras no diluidas y diluidas 1/10 a las reacciones PERT con TaqMan® y los tubos se transfieren a un sistema adecuado de detección de secuencias.

Las alícuotas de muestras no diluidas y diluidas 1/10 se analizan en reacciones PERT fluorescentes de la siguiente manera:

- (i) En presencia de ADN activado de timo de ternera. Esto interfiere con la actividad de la polimerasa de ADN similar a la actividad de TI, lo que reduce al mínimo las señales de falsos positivos.
- (ii) En ausencia de ADN activado de timo de ternera, para indicar el nivel de actividad de polimerasa de ADN que se observa en las muestras.

Las reacciones RCP se monitorean midiendo el aumento en la fluorescencia de las reacciones PERT, mediante el uso de cinética en tiempo real.

Controles

*Controles negativos*

El agua destilada sirve como control sin molde (sin TI).

En todas las etapas de preparación de las muestras, hay centinelas para el control de la contaminación atmosférica, que consisten en tubos abiertos que contienen todos los reactivos y amplímeros. Se procesan junto con las muestras de prueba. Los controles sin molde y por centinelas se analizan en presencia de ADN de timo de ternera.

*Controles positivos*

Los controles positivos consisten en reservas adecuadas de virus con actividad TI y recuentos de partículas conocidos. Las diluciones que contienen partículas retrovirales  $10^5$  y  $10^3$  funcionan como controles positivos.

A las muestras de prueba puras se agregan partículas retrovirales  $10^5$  y  $10^3$  para garantizar que no contengan inhibidores del ensayo PERT.

Los especímenes de prueba con virus agregado y los controles positivos se analizan en presencia de ADN de timo de ternera.

*Controles de contaminación*

Puesto que el VMB no tiene una etapa intermedia de ADN en su ciclo de vida, se reduce al mínimo el riesgo de contaminación con ADN amplificable.

**CAIF**  
Compañía Argentina de  
Investigaciones Farmacéuticas S.A.  
**Dra. María Bernarda Belay**  
Apoderada  
DNI 29378925

**CAIF SA**  
**Dra. Bernarda Belay**  
Co-Directora Técnica  
M.N. 15.148






11

12



	<p style="text-align: center;"><b>Módulo 3. Calidad</b></p> <p style="text-align: center;"><b>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</b></p> <p style="text-align: center;">Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p>IPV/NC/AR/09-12</p> <p>Página 15 de 54</p>
<p><b>3.2.S.2.3. Control de materiales</b></p>		

Preparación de las muestras de prueba

Se extrae ADN de una alícuota de células del espécimen de prueba lisadas en solución amortiguadora de lisis con 100  $\mu$ m de proteinasa K. El ADN desproteinizado se extrae con fenol, fenol-cloroformo-isoamil-alcohol y se precipita con etanol en presencia de acetato de amonio. El rendimiento y la pureza del ADN se determinan por espectrometría.

1 Para la amplificación se utilizan alícuotas de ADN de 2  $\mu$ m (equivalentes a aproximadamente  $2 \times 10^5$  células).

Reacción RCP y análisis del producto

A una solución de reacción con amplímeros de VIS y polimerasa Taq o AmpliTaq Gold se agregan los siguientes componentes:

- centinelas
- ADN de control negativo
- ADN de control negativo con cantidades conocidas de ADN de VIS
- ADN del espécimen de prueba
- ADN del espécimen de prueba adicionado con control positivo

Y se hace la desnaturalización. Las mezclas de reacción se someten a 30 ciclos de amplificación en un termociclador. Una fracción del producto amplificado se analiza por electroforesis con gel y se examina por tinte con bromuro de etidio, antes de la inmovilización en una membrana de hibridación de nailon.

Condiciones de la reacción RCP

Las condiciones de la reacción al VIS son las siguientes:

Si se utiliza AmpliTaq Gold, se lleva a cabo un paso inicial de activación de AmpliTaq a 95 °C durante 10 minutos.


RCP del *pol* de VIS<sub>mac</sub>: 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto, apareamiento a 55 °C durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 1 minuto. Se hace una extensión final del ADN durante 10 minutos a 72 °C una vez terminado el ciclo.

RCP del *pol* de VIS<sub>agm</sub>: 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto, apareamiento a 60 °C durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 1 minuto. Se hace una extensión final del ADN durante 10 minutos a 72 °C una vez terminado el ciclo.

CAIF  
Compañía Argentina de  
Investigaciones Farmacéuticas S.A.  
Dra. María Bernarda Belay  
Apoderada  
DNI 29378925

CAIF SA  
Dra. Bernarda Belay  
Co-Directora Técnica  
M.N. 10.148



	<p align="center"><b>Módulo 3. Calidad</b></p> <p align="center"><b>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</b></p> <p align="center">Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p>IPV/NC/AR/09-12</p> <p>Página 16 de 54</p>
<p><b>3.2.S.2.3. Control de materiales</b></p>		

Hibridación y autorradiografía

El filtro se prehibrida durante un mínimo de 1 hora.

La sonda oligonucleotídica se marca con alta actividad específica y se agrega a la solución de hibridación. La hibridación se realiza durante aproximadamente 16 horas a la temperatura adecuada. Después de la hibridación, las transferencias se enjuagan brevemente a temperatura ambiente y se lavan en condiciones de adecuada rigurosidad.

El filtro se prepara para la autorradiografía y se expone a una película de rayos X en un chasis con una o más pantallas intensificadoras.

Controles

Controles por centinelas: mezcla de reacción sin molde de ADN.

Control negativo: extractos de ADN de células sin VIS o mezcla de sustrato y reacción.

Control positivo: control negativo adicionado con ADN recombinante derivado de una variedad de concentraciones de VIS ( $10^3$ ,  $10^2$  y  $10^1$ ) que se incluyen para evaluar la sensibilidad del ensayo. Además, alícuotas de ADN del espécimen de prueba se adicionan con ADN de control positivo para garantizar que el espécimen no sea inhibitorio para la reacción RCP.

VIS<sub>mac</sub>: el control positivo de VIS<sub>mac</sub> consiste en la mitad 5' del genoma proviral del VIS<sub>mac</sub> 239 más 256 pb del clon p239SpSp5' que flanquea el ADN celular.


VIS<sub>agm</sub>: el control positivo del VIS<sub>agm</sub> consiste en el pVIS<sub>agm</sub> 2,8, un fragmento de ADN del gen *pol* del VIS<sub>agm</sub> de 2793 pb clonado molecularmente en el vector plasmídico pMOSBlue. Para el molde derivado de células, se utiliza un control positivo adicional que consiste en amplímeros para una secuencia genómica, para evaluar la calidad del ADN del espécimen de prueba. Para los especímenes de prueba no celulares, se omite esta RCP de control genómico interno.

VIS<sub>mac</sub>: tres alícuotas de ADN de control negativo se adicionan con diluciones del ADN plasmídico del p239SpSp5' del VIS<sub>mac</sub>, equivalente a  $10^3$  equivalentes de genoma (gE) (9fg),  $10^2$  gE (900ag) y 10 gE (90ag). Además, una alícuota de ADN del espécimen de prueba se adiciona con  $10^2$  gE, (900ag) de ADN plasmídico del p239SPSp5'. Luego se agregan a la mezcla de reacción RCP del *pol* de VIS<sub>mac</sub>.

VIS<sub>agm</sub>: tres alícuotas de ADN de control negativo se adicionan con diluciones del ADN plasmídico del pVIS<sub>agm</sub> del VIS<sub>agm</sub>, equivalente a  $10^3$  equivalentes de genoma (gE) (6,23fg),  $10^2$  gE (623ag) y 10 gE (62,3ag). Además, una alícuota de ADN del espécimen de prueba se

CAIF  
Compañía Argentina de  
Investigaciones Farmacéuticas S.A.  
Dra. María Bernarda Belay  
Apoderada  
DNI 29378925  
CAIF SA  
Dra. Bernarda Belay  
Co-Directora Técnica  
M.N. 15.148



	<p align="center"><b>Módulo 3. Calidad</b></p> <p align="center"><b>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</b></p> <p align="center">Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p>IPV/NC/AR/09-12</p> <p>Página 17 de 54</p>
<p><b>3.2.S.2.3. Control de materiales</b></p>		

adiciona con  $10^2$  gE (623ag) de ADN plasmídico de pVIS<sub>agm</sub>. Luego se agregan a la mezcla de reacción RCP del *pol* de VIS<sub>agm</sub>.

Criterios de validez de la prueba

Una prueba se define como válida cuando se detecta una amplificación adecuada de las secuencias diana en el ADN de control positivo pertinente y no se observa en todos los controles negativos. Además, se debe detectar la amplificación de la secuencia de control genómico interno si corresponde.

Límite de la detección

Aproximadamente  $10^2$  gE por cada  $2 \times 10^5$  células.

Resultados

*Prueba positiva*

Una muestra de prueba se considera positiva cuando se detecta una amplificación adecuada de las secuencias diana en dos muestras de ADN del espécimen. Un resultado positivo se confirma con un conjunto de cebadores independientes o con un método alternativo.

*Prueba negativa*

Una muestra de prueba se considera negativa cuando no se observa una amplificación de las secuencias diana.

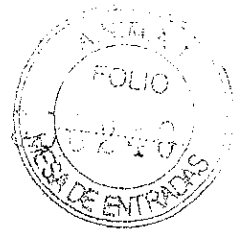
**Agentes extraños: detección del virus linfotrópico de células T del simio (STLV) por RCP**


Fundamento

El STLV presenta una amplia homología de secuencia con el HTLV-1 y es un virus muy relacionado. Por lo tanto, los cebadores específicos para el HTLV-1 detectarán el STLV. El procedimiento del ensayo RCP utiliza dos amplimeros específicos que flanquean un fragmento de ADN. La secuencia interna se amplifica por repetición de ciclos de desnaturalización del molde de ADN por calor, apareamiento de los cebadores con sus secuencias complementarias en cada cadena de ADN y extensión de los cebadores apareados con una polimerasa Taq termoestable.

  
**CAIF**  
 Compañía Argentina de  
 Investigaciones Farmacéuticas S.A.  
*Dra. María Bernarda Belay*  
 Apoderada  
 DNI 29378925  
**CAIF SA**  
 Dra. Bernarda Belay  
 Co-Directora Técnica  
 M.N. 15.148





	<p style="text-align: center;"><b>Módulo 3. Calidad</b></p> <p style="text-align: center;"><b>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</b></p> <p style="text-align: center;">Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p style="text-align: center;">IPV/NC/AR/09-12</p> <p style="text-align: center;">Página 18 de 54</p>
<p><b>3.2.S.2.3. Control de materiales</b></p>		

Las secuencias amplificadas se identifican por hibridación con una sonda oligonucleotídica, específica para el STLV. Con las condiciones usadas, típicamente el procedimiento detecta 100 genomas virales.

Preparación de las muestras de prueba

Las muestras de prueba, los controles de extracción por centinelas y el control negativo se preparan en un gabinete con aire limpio, donde no se han manipulado células infectadas con el STLV. El gabinete se irradia con luz UV para inducir la formación de dímeros de timina en cualquier ADN suelto, lo que reduce el material amplificable por RCP.

Se extrae ADN de una alícuota de células del espécimen de prueba lisadas en solución amortiguadora con un contenido de 100 µm/ml de proteínaasa K. El ADN desproteínizado se extrae con fenol, fenol-cloroformo-isoamil-alcohol y se precipita con etanol en presencia de acetato de amonio. Para la amplificación se utilizan el rendimiento y la pureza del ADN (equivalentes a aproximadamente  $2 \times 10^5$  células).

Reacción RCP y análisis del producto

Antes de la preparación del espécimen de prueba y las muestras de control negativo, se preparan por triplicado reacciones de control por centinelas, que consisten en la mezcla de reacción sin molde de ácido nucleico. Los tubos se dejan abiertos mientras dure la manipulación de las muestras, para evaluar la posible contaminación.

A una solución de reacción con los amplímeros de STLV y polimerasa Taq o AmpliTaq Gold se agregan los siguientes componentes:


- centinelas
- ADN de control negativo
- ADN de control negativo con cantidades conocidas de ADN de VIS
- ADN del espécimen de prueba
- ADN del espécimen de prueba adicionado con control positivo

Y se hace la desnaturalización. Las mezclas de reacción se someten a 30 ciclos de amplificación en un termociclador. Una fracción del producto amplificado se analiza por <sup>CATF</sup>

Compañía Argentina de  
Investigaciones Farmacéuticas S.A.  
**Dra. María Bernarda Belay**  
Apoderada  
DNI 29378925

**CATF SA**  
**Dra. Bernarda Belay**  
Co-Directora Técnica  
M.N. 15.148



	<b>Módulo 3. Calidad</b> <b>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</b> Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.	IPV/NC/AR/09-12 Página 19 de 54
<b>3.2.S.2.3. Control de materiales</b>		

electroforesis con gel y se examina por tñido con bromuro de etidio, antes de la inmovilización en una membrana de hibridación de nailon.

Condiciones de la reacción RCP

Las condiciones de la reacción al STLV son las siguientes:

Si se utiliza AmpliTaq Gold, se lleva a cabo un paso inicial de activación de AmpliTaq a 95 °C durante 10 minutos.

30 ciclos, cada uno de los cuales consiste en la desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto, el apareamiento a 53 °C durante 45 segundos y extensión a 68 °C durante 1 minuto. Se realiza una extensión final del ADN durante 10 minutos a 68 °C después del ciclado.

Los cebadores y la sonda se derivan del gen *pol* y se amplifican e hibridan con una secuencia específica del STLV de 186 pb. La sonda oligonucleotídica del STLV se ubica en el interior de los amplímeros.

Hibridación y autorradiografía

El filtro se prehibrida durante un mínimo de 1 hora.

Las sondas oligonucleotídicas se marcan con alta actividad específica y se agregan a la solución de hibridación. La hibridación se realiza durante aproximadamente 16 horas a una temperatura mínima de 50 °C. Después de la hibridación, las transferencias se enjuagan brevemente a temperatura ambiente y se lavan en condiciones de adecuada rigurosidad.

El filtro se prepara para la autorradiografía y se expone a una película de rayos X en un chasis con una o más pantallas intensificadoras.

Controles

Control por centinelas: mezcla de reacción sin molde de ADN.

Control negativo: extractos de ADN de células sin STLV o mezcla de sustrato y reacción.

Control positivo: control negativo con aproximadamente 100 ng, 10 ng, 1 ng y espécimen de prueba adicionado con 10 ng de ADN genómico del STLV para garantizar que el espécimen de prueba no sea inhibitorio para la reacción RCP.

Segundo control positivo (utilizado si corresponde): amplímeros para una secuencia genómica P-globina/G3PDH para evaluar la adecuación del ADN del espécimen de prueba celular para la amplificación por RCP.


Criterios de validez de la prueba

CAIF  
Compañía Argentina de  
Investigaciones Farmacéuticas S.A.  
Dra. *Maria Bernarda Belay*  
Apoderada  
DNI 29378925

CAIF SA  
Dra. *Bernarda Belay*  
Co-Directora Técnica  
M.N. 15.148





	<p align="center"><b>Módulo 3. Calidad</b></p> <p align="center"><b>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</b></p> <p align="center">Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p align="center">IPV/NC/AR/09-12</p> <p align="center">Página 20 de 54</p>
<p><b>3.2.S.2.3. Control de materiales</b></p>		

Una prueba se define como válida cuando se detecta una amplificación adecuada de las secuencias diana en el ADN de control positivo pertinente y no se observa en todos los controles negativos. Además, se debe detectar la amplificación de la secuencia de control genómico interno si corresponde.

Límite de la detección

Aproximadamente  $10^2$  gE por cada  $2 \times 10^5$  células.

Resultados

*Prueba positiva*

Una muestra de prueba se considera positiva cuando se detecta una amplificación adecuada de las secuencias diana en dos muestras de ADN del espécimen. Un resultado positivo se confirma con un conjunto de cebadores independientes o con un método alternativo.

*Prueba negativa*

Una muestra de prueba se considera negativa cuando no se observa una amplificación de las secuencias diana.

**Tumorigenicidad in vivo**

La prueba se lleva a cabo de acuerdo con la Farmacopea Europea.

Para la preparación de vacunas vivas, la línea celular no debe ser tumorigénica en ningún nivel de duplicación de la población utilizado para la fabricación de vacunas. Aunque la vacuna antipoliomielítica es inactivada, la prueba de tumorigenicidad del banco maestro de células Vero se realiza en el pasaje 156 en ratas recién nacidas que han recibido tratamiento con globulina antitímocítica (ARTG). El banco celular maestro tiene un nivel de pasaje 141 y el banco celular de trabajo tiene un nivel de pasaje 143. La producción tiene un máximo de 3 pasajes. El pasaje 156 se puede considerar un nivel alto de pasaje.

El pasaje 142 del banco maestro de células Vero se subcultiva hasta el pasaje 156. Para la prueba se utiliza una suspensión celular con pasaje 156 (concentración de  $10^7$  células/ml).


Como control positivo, se utilizan células HeLa (concentración de  $10^7$  células/ml).

CAIF  
Compañía Argentina de  
Investigaciones Farmacéuticas S.A.  
*Dra. María Bernarda Beíay*  
Apoderada  
DNI 29378925

CAIF SA  
*Dra. Bernarda Beíay*  
Co-Directora Técnica  
M.N. 151148





	<p><b>Módulo 3. Calidad</b></p> <p><b>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</b></p> <p>Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p>IPV/NC/AR/09-12</p> <p>Página 21 de 54</p>
<p><b>3.2.S.2.3. Control de materiales</b></p>		

El sistema de animales empleado consiste en nidos de ratas con LPE recién nacidas (cada grupo incluye 10 animales, con menos de 48 horas de vida, nacidos de madres de nuestra propia cría).

### 1.3.3 Preparación del banco celular maestro

#### Reconstitución de la semilla celular

Descongele una ampolla de la semilla celular (nivel de pasaje 136) a 37 °C. Diluya el contenido de la ampolla en proporción 1:20 con medio de cultivo celular precalentado. Centrifugue las células para eliminar de la semilla celular congelada el medio que contiene DMSO y resuspéndalas en 100 ml de medio de cultivo celular.

#### Cultivo en frascos de cultivo de tejidos

Inocule un frasco de cultivo de tejidos de 150 cm<sup>2</sup> con la suspensión celular reconstituida e incúbelo durante aproximadamente 4 días a 37 °C hasta que la confluencia se observe con el microscopio. Rompa la monocapa con una solución de tripsina y luego centrifugue la suspensión. Resuspenda las células en medio de cultivo celular a una concentración de aproximadamente 100.000 células/ml, inocule la suspensión en frascos de cultivo de tejidos de 150 cm<sup>2</sup> e incúbelos a 37 °C hasta que la confluencia se observe con el microscopio. Repita la tripsinización, centrifugación, resuspensión e incubación, lo que da como resultado una suspensión celular con un nivel de pasaje 138.

#### Cultivo en un biorreactor


Inocule un biorreactor de 15 litros con la suspensión celular del paso anterior en aproximadamente 5 litros de medio de cultivo celular que contenga microportadores a 37 °C durante alrededor de 5 días hasta que las células se encuentren en el final de la fase logarítmica de crecimiento. Tripsinice el cultivo e inocule un biorreactor de 50 litros que contenga 50 litros de medio de cultivo celular con microportadores. Vuelva a cultivar aproximadamente 5 días hasta que las células se encuentren en la fase logarítmica de crecimiento tardía y luego tripsinice el cultivo, lo que da como resultado un nivel de pasaje 141.

CAIF  
Compañía Argentina de  
Investigaciones Farmacéuticas S.A.  
**Dra. María Bernarda Belay**  
Apoderada  
DNI 29378925

CAIF SA  
Dra. Bernarda Belay  
Co-Directora Técnica  
M.N. 15.148





	<p><b>Módulo 3. Calidad</b></p> <p><b>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</b></p> <p>Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p>IPV/NC/AR/09-12</p> <p>Página 22 de 54</p>
<p><b>3.2.S.2.3. Control de materiales</b></p>		

#### Procedimiento de almacenamiento

Recolecte las células por centrifugación y resuspéndalas a una concentración final de  $20 \times 10^6$  células por mililitro en medio de congelación con 5 % de DMSO. Transfiera la suspensión a viales de 15 ml. Congele y almacene a  $-135^\circ\text{C}$ .

#### 1.3.4 Medio de cultivo celular y equipos

La preparación y las especificaciones del medio de cultivo celular, los microportadores y las soluciones de tripsina se describen en la sección 3.

#### Biorreactor de 15 y de 50 litros

Los biorreactores utilizados son recipientes de vidrio o de acero inoxidable que se esterilizan por vapor en el lugar. Las células se cultivan con los siguientes puntos de consigna: OD: 25 %, temperatura:  $37^\circ\text{C}$ ; pH: 7,20; flujo total de gas: 7,20; agitador: 40-100 rpm.

Después de su uso, los biorreactores se desinfectan con esterilización por vapor, se limpian con Rogypon (o un agente limpiador equivalente) y luego se enjuagan con agua.

#### 1.3.5 Preparación del cultivo de pasaje de BCM o BCT del final de la producción


Descongele una ampolla del BCM o del BCT en un baño de agua a  $36^\circ\text{C}$  y luego transfiera el contenido a un frasco con medio de cultivo celular a una concentración de  $50-100 \times 10^3$  células por mililitro. Incube los cultivos a  $36^\circ\text{C}$  hasta que la confluencia se observe con el microscopio. Disocie la monocapa con una solución de tripsina y luego centrifugue la suspensión. Cuente las células, resuspéndalas en medio de cultivo celular a una concentración de  $50-100 \times 10^3$  células por mililitro y repita el cultivo, la tripsinización y la centrifugación hasta obtener un cultivo con nivel de pasaje 156. (El banco celular maestro tiene un nivel de pasaje 141 y el banco celular de trabajo tiene un nivel de pasaje 143. La producción tiene un máximo de 3 pasajes. El pasaje 156 se puede considerar un nivel alto de pasaje).

Llene los formularios de trabajo y calcule la cantidad de duplicaciones por pasaje y la cantidad total de duplicaciones celulares.

CAIF  
Compañía Argentina de  
Investigaciones Farmacéuticas S.A.  
Dra. *María Bernarda Belay*  
Acreditada  
DNI 28378925

CAIF SA  
Dra. *Bernarda Belay*  
Co-Directora Técnica  
M.N. 15.148



	<p align="center"><b>Módulo 3. Calidad</b></p> <p align="center"><b>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</b></p> <p align="center">Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p align="center">IPV/NC/AR/09-12</p> <p align="center">Página 23 de 54</p>
<p><b>3.2.S.2.3. Control de materiales</b></p>		

**1.3.6 Datos de análisis de lotes del BCM**

Los datos de análisis de dos bancos celulares con nivel de pasaje 141 se incluyen en el apéndice IPVV.3.2.S.2.3: Datos de análisis de lotes de los bancos maestros de células Vero. El BCTF-1 se ha utilizado únicamente para la preparación de lotes de virus semilla de trabajo. El BCTF-2 se ha utilizado para la producción de la vacuna antipoliomielítica y se lo ha designado el banco celular maestro para la fabricación de futuros bancos celulares de trabajo.

**1.4 Banco celular de trabajo (BCT)**

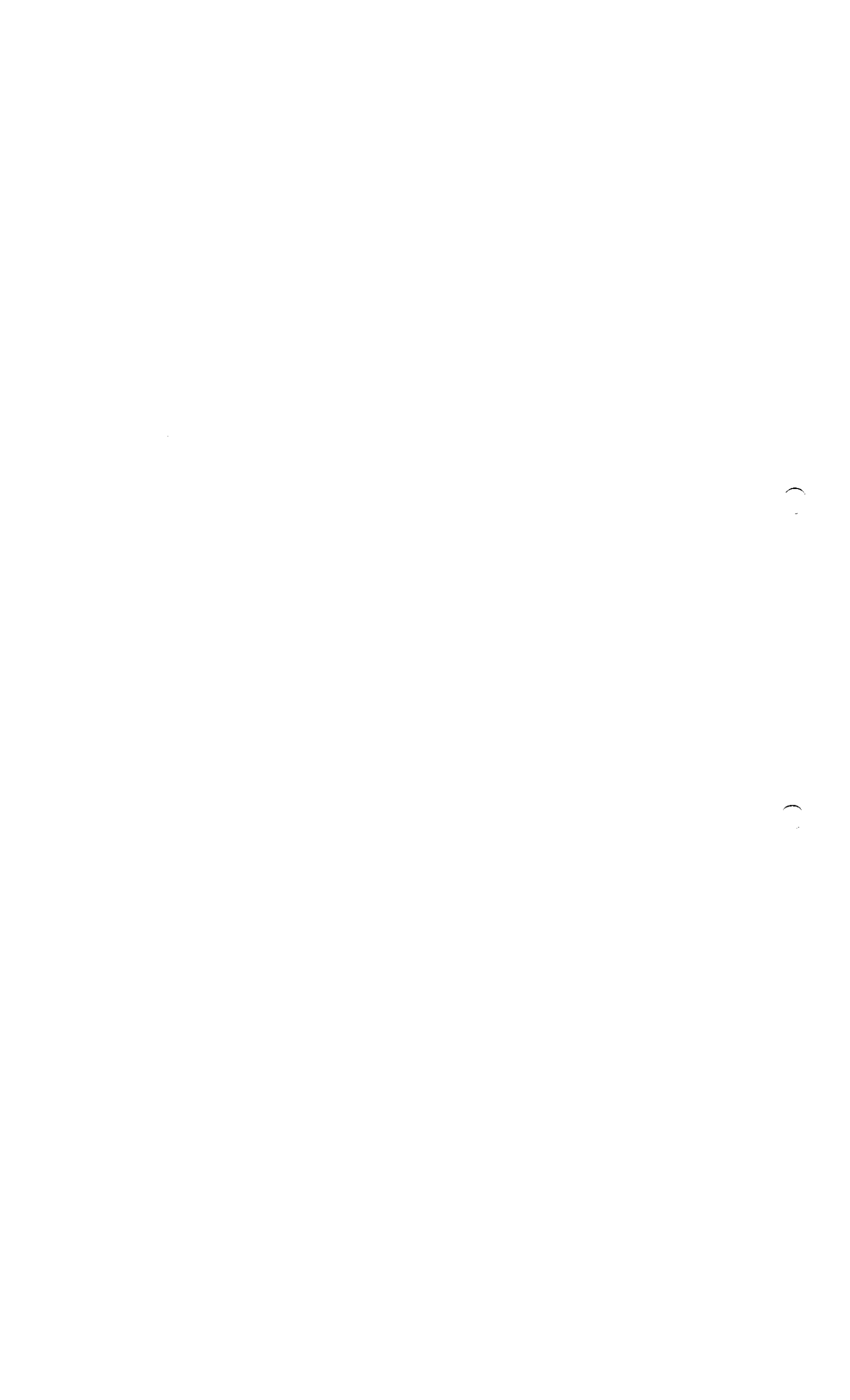
**1.4.1 Especificaciones del banco celular de trabajo**

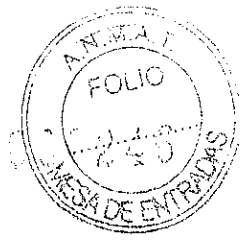
*Tabla 2: Especificaciones del banco celular de trabajo*

Especificación	Método	Requisito
Esterilidad	Esterilidad	Ningún crecimiento
Micoplasmas	Micoplasmas	Ningún crecimiento de micoplasmas
Agentes extraños - ECP - HAD - Células de riñón de conejo - Células de <i>Cercopithecus</i> - Células MRC5	Prueba de detección de agentes extraños	Ningún efecto citopatogénico No se detecta hemadsorción No se detecta el virus del herpes B No se detecta SV-40 No se detectan virus externos
Morfología	Morfología por microscopía electrónica (ME) de transmisión	Células Vero
Identidad	Identidad/pureza por análisis de huella genética de ADN	Células Vero
Identidad	Análisis de isoenzimas	Células Vero

CAIF  
Compañía Argentina de  
Investigaciones Farmacéuticas S.A.  
Dra. María Bernarda Belay  
Apoderada  
ONI 29278925

CAIF SA  
Dra. Bernarda Belay  
Co-Directora Técnica  
M.N. 1.5.148





	<p align="center"><b>Módulo 3. Calidad</b></p> <p align="center"><b>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</b></p> <p align="center">Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p>IPV/NC/AR/09-12</p> <p>Página 24 de 54</p>
<p><b>3.2.S.2.3. Control de materiales</b></p>		

<p><i>Se deben realizar las siguientes pruebas en un nivel de pasaje como mínimo superior en uno con respecto al utilizado en la producción</i></p>		
Cocultivo	Cocultivo	No se detectan virus externos
Prueba en ratones lactantes	Prueba en ratones lactantes	No se detectan virus externos
Prueba en ratones adultos	Prueba en ratones adultos	No se detectan virus externos
Prueba de detección de LCM en ratones adultos	Prueba de detección de LCM en ratones adultos	No se detecta LCM
Prueba en huevos LPE	Prueba en huevos LPE	No se detectan virus externos
Prueba en células de <i>Cercopithecus</i>	Prueba en células de <i>Cercopithecus</i>	No se detectan virus externos
Prueba en cultivos de células de riñón de conejo	Prueba en cultivos de células de riñón de conejo	No se detectan virus externos

Antes de su uso, la viabilidad del BCT se monitorea mediante el recuento de la cantidad de células vivas después del descongelamiento en relación con la cantidad de células presentes antes del almacenamiento. Esta viabilidad debe ser del 50 % como mínimo.

**1.4.2 Pruebas de control del banco celular de trabajo**

**Esterilidad**

Consulte el Módulo 3.2.S.4.2: Procedimientos analíticos.

**Micoplasmas**

Consulte el Módulo 3.2.S.2.4: Control de pasos críticos y productos intermedios.

**Agentes extraños**

La prueba se lleva a cabo de acuerdo con la Farmacopea Europea.

  
**CAIF**  
 Compañía Argentina de  
 Investigaciones Farmacéuticas S.A.  
**Dra. María Bernarda Belay**  
 Apoderada  
 DNI 29278925  
  
**CAIF SA**  
 Dra. Bernarda Belay  
 Co-Directora Técnica  
 M.N. 15.148





	<p><b>Módulo 3. Calidad</b></p> <p><b>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</b></p> <p>Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p>IPV/NC/AR/09-12</p> <p>Página 25 de 54</p>
<p><b>3.2.S.2.3. Control de materiales</b></p>		

#### Morfología

Consulte la sección 1.3.2 (Pruebas de control del banco celular maestro): Identidad.

#### Identidad/pureza por análisis de huella genética de ADN

Consulte la sección 1.3.2 (Pruebas de control del banco celular maestro): Identidad/pureza por análisis de huella genética de ADN.

#### Análisis de isoenzimas

Consulte el Módulo 3.2.S.2.4: Control de pasos críticos y productos intermedios.

#### Cocultivo

La prueba se lleva a cabo de acuerdo con la Farmacopea Europea: Sustratos celulares para la producción de vacunas de uso humano.

#### Prueba en ratones lactantes

La prueba se lleva a cabo de acuerdo con la Farmacopea Europea: Sustratos celulares para la producción de vacunas de uso humano.

#### Prueba en ratones adultos

La prueba se lleva a cabo de acuerdo con la Farmacopea Europea: Sustratos celulares para la producción de vacunas de uso humano.

#### Prueba en células de *Cercopithecus*

La prueba se lleva a cabo de acuerdo con las instrucciones de la Farmacopea Europea vigente: Pruebas de detección de agentes extraños en vacunas virales de uso humano.

CAIF  
Compañía Argentina de  
Investigaciones Farmacéuticas S.A.  
*Dra. María Bernarda Belay*  
Apoderada  
DNI 29378925

*[Handwritten Signature]*

CAIF SA  
Dra. Bernarda Belay  
Co-Directora Técnica  
M.N. 15.148



	<p align="center"><b>Módulo 3. Calidad</b></p> <p align="center"><b>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</b></p> <p align="center">Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p>IPV/NC/AR/09-12</p> <p>Página 26 de 54</p>
<p><b>3.2.S.2.3. Control de materiales</b></p>		

**1.4.3 Preparación del banco celular de trabajo (BCT)**

**Reconstitución del BCM**

Descongele una ampolla del banco celular maestro (nivel de pasaje 141) a 37 °C. Diluya el contenido de la ampolla en proporción 1:20 con medio de cultivo celular precalentado. Centrifugue las células para eliminar de la semilla celular congelada el medio que contiene DMSO y resuspéndalas en 100 ml de medio de cultivo celular.

**Cultivo en frascos de cultivo de tejidos**

Inocule un frasco de cultivo de tejidos de 150 cm<sup>2</sup> con la suspensión celular reconstituida e incúbelo durante aproximadamente 4 días a 37 °C hasta que la confluencia se observe con el microscopio. Rompa la monocapa con una solución de tripsina y luego centrifugue la suspensión. Resuspenda las células en medio de cultivo celular a una concentración de aproximadamente 100.000 células por mililitro, inocule la suspensión en frascos de cultivo de tejidos de 150 cm<sup>2</sup> e incúbelos a 37 °C hasta que la confluencia se observe con el microscopio. Repita la tripsinización, centrifugación, resuspensión e incubación, lo que da como resultado una suspensión celular con un nivel de pasaje 143.

**Cultivo en un biorreactor**

Inocule un biorreactor de 15 litros con la suspensión celular del paso anterior en aproximadamente 5 litros de medio de cultivo celular que contenga microportadores a 37 °C durante alrededor de 5 días hasta que las células se encuentren en el final de la fase logarítmica de crecimiento. Tripsinice el cultivo e inocule un biorreactor de 50 litros que contenga 50 litros de medio de cultivo celular con microportadores. Vuelva a cultivar aproximadamente 5 días hasta que las células se encuentren en la fase logarítmica de crecimiento tardía y luego tripsinice el cultivo.


El banco celular de trabajo tiene un nivel de pasaje 143.

**Procedimiento de almacenamiento**

Recolecte las células por centrifugación y resuspéndalas a una concentración final de 20 x 10<sup>6</sup> células por mililitro en medio de congelación con 5 % de DMSO. Transfiera la suspensión a viales de 10 ml. Congele y almacene a -135 °C.

**CAIF**  
 Compañía Argentina de  
 Investigaciones Farmacéuticas S.A.  
**Dra. María Bernarda Belay**  
 Responsable  
 CNI 29378925  
  
**CAIF SA**  
**Dra. Bernarda Belay**  
 Co-Directora Técnica  
 M.N. 15.148



	<p align="center"><b>Módulo 3. Calidad</b></p> <p align="center"><b>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</b></p> <p align="center">Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p>IPV/NC/AR/09-12</p> <p>Página 27 de 54</p>
<p><b>3.2.S.2.3. Control de materiales</b></p>		

**1.4.4 Medio de cultivo celular y equipos**

La preparación y las especificaciones del medio de cultivo celular, los microportadores y las soluciones de tripsina se describen en la sección 3.

**Biorreactor de 15 y de 50 litros**

Los biorreactores utilizados son recipientes de vidrio o de acero inoxidable que se esterilizan por vapor en el lugar. Las células se cultivan con los siguientes puntos de consigna: OD: 25 %, temperatura: 37 °C; pH: 7,20; flujo total de gas: 7,20; agitador: 40-100 rpm.

Después de su uso, los biorreactores se desinfectan con esterilización por vapor, se limpian con Rogypon (o un agente limpiador equivalente) y luego se enjuagan con agua.

**1.4.5 Datos de análisis de lotes del BCT del fabricante**

Los datos de análisis del BCT del fabricante con nivel de pasaje 143 se incluyen en el apéndice IPVV.3.2.S.2.3: Datos de análisis del BCTF-7.01. El BCTF-7 se ha utilizado para la producción de la vacuna antipoliomielítica. Los lotes se han sometido a pruebas de acuerdo con los requisitos actuales. Los certificados de análisis de compuestos procedentes de rumiantes utilizados para la fabricación de los bancos celulares de trabajo se incluyen en el siguiente apéndice IPVV.3.2.S.2.3:

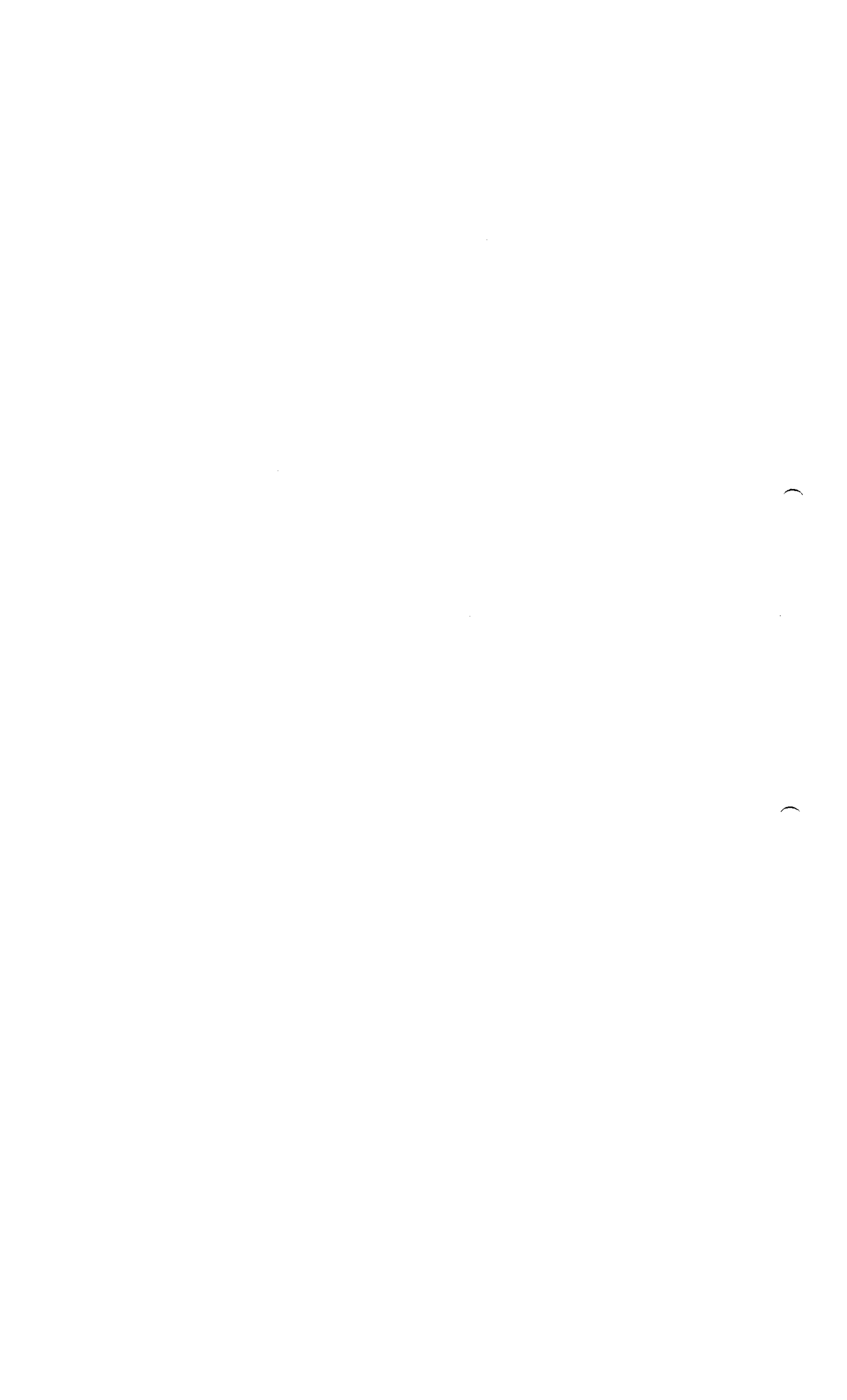
Suero fetal de ternera

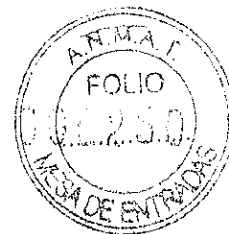
Suero de donante bovino


Tripsina

CAIF  
Compañía Argentina de  
Investigaciones Farmacéuticas S.A.  
*Dra. María Bernarda Belay*  
Apoderada  
DNI 29378925

*CAIF SA*  
Dra. Bernarda Belay  
Co-Directora Técnica  
M.N. 15.148





	<b>Módulo 3. Calidad</b> <b>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</b> Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.	IPV/NC/AR/09-12 Página 28 de 54
<b>3.2.S.2.3. Control de materiales</b>		

2 Virus de siembra de la poliomielitis

2.1 Número de identificación de la cepa de producción

Virus poliomiélfico tipo 1

Cepa	Mahoney
Origen y fuente	Dr. J. Salk (compañía Pitman & Moore)
Lote semilla maestro	PM14
Fecha de preparación	6-2-1958
Primer pasaje (en CRM)	58/3/B1
Segundo pasaje (en CRM)	77/3/B2 (fecha: 01-12-1977)
Tercer pasaje (en CRM)	79/2/B3 (fecha: 13-07-1979)
Cuarto pasaje (en células Vero)	79/2/B3+1 o UPC 91-06 (fecha: 08-1991)
Quinto pasaje (en células Vero)	03/1/B5 (fecha: 02-2003)

Los tres primeros pasajes se realizaron en cultivos de células de riñón de mono (CRM). Los monos y las CRM se han sometido a pruebas de acuerdo con los métodos y requisitos descritos en el apéndice IPVV.3.2.S.2.3: Pruebas en monos y en CRM. El cuarto y el quinto pasajes se han realizado en células Vero. El quinto pasaje está diseñado como un lote semilla de trabajo. El material viral se almacena a -70 °C.

Virus poliomiélfico tipo 2

Cepa	MEF1
Origen y fuente	Statens Serum Institute, Copenhagen
Lote semilla maestro	P451
Fecha de preparación	16-03-1956
Primer pasaje (en CRM)	58/3/B1
Segundo pasaje (en CRM)	64/2/B2 (fecha: 31-05-1964)
Tercer pasaje (en CRM)	68/2/B3 (fecha: 06-06-1968)
Cuarto pasaje (en células Vero)	68/2/B3+1 o UPC-91-07 (fecha: 08-1991)
Quinto pasaje (en células Vero)	01/2/B5 (date: 09-2001)

CAIF  
Compañía Argentina de  
Investigaciones Farmacéuticas S.A.  
Dra. María Bernarda Belay  
Apostada  
DNI 29378925

CAIF SA  
Dra. Bernarda Belay  
Co-Directora Técnica  
M.N. 15.148





	<p align="center"><b>Módulo 3. Calidad</b></p> <p align="center"><b>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</b></p> <p align="center">Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p align="center">IPV/NC/AR/09-12</p> <p align="center">Página 29 de 54</p>
<p><b>3.2.S.2.3. Control de materiales</b></p>		

Los tres primeros pasajes se realizaron en cultivos de células de riñón de mono (CRM). Los monos y las CRM se han sometido a pruebas de acuerdo con los métodos y requisitos descriptos en el apéndice IPVV.3.2.S.2.3: Pruebas en monos y en CRM. El cuarto y el quinto pasajes se han realizado en células Vero. El quinto pasaje está diseñado como un lote semilla de trabajo. El material viral se almacena a -70 °C.

**Virus poliomiélfítico tipo 3**

Cepa	Saukett
Origen y fuente	Statens Serum Institute, Copenhagen
Lote semilla maestro	7 TV261
Fecha de preparación	30-11-1964
Primer pasaje (en CRM)	64/7/B1
Segundo pasaje (en CRM)	71/2/B2 (fecha: 27-01-1971)
Tercer pasaje (en CRM)	83/11/B3 (fecha: 1983-12-21)
Cuarto pasaje (en células Vero)	83/11/B3+1 o UPC 91-08 (fecha: 09-1991)
Quinto pasaje (en células Vero)	01/3/B5 (fecha: 2001-09)

Los tres primeros pasajes se realizaron en cultivos de células de riñón de mono (CRM). Los monos y las CRM se han sometido a pruebas de acuerdo con los métodos y requisitos descriptos en el apéndice IPVV.3.2.S.2.3: Pruebas en monos y en CRM. El cuarto y el quinto pasajes se han realizado en células Vero. El quinto pasaje está diseñado como un lote semilla de trabajo. El material viral se almacena a -70 °C.

**2.2 Genética del desarrollo**

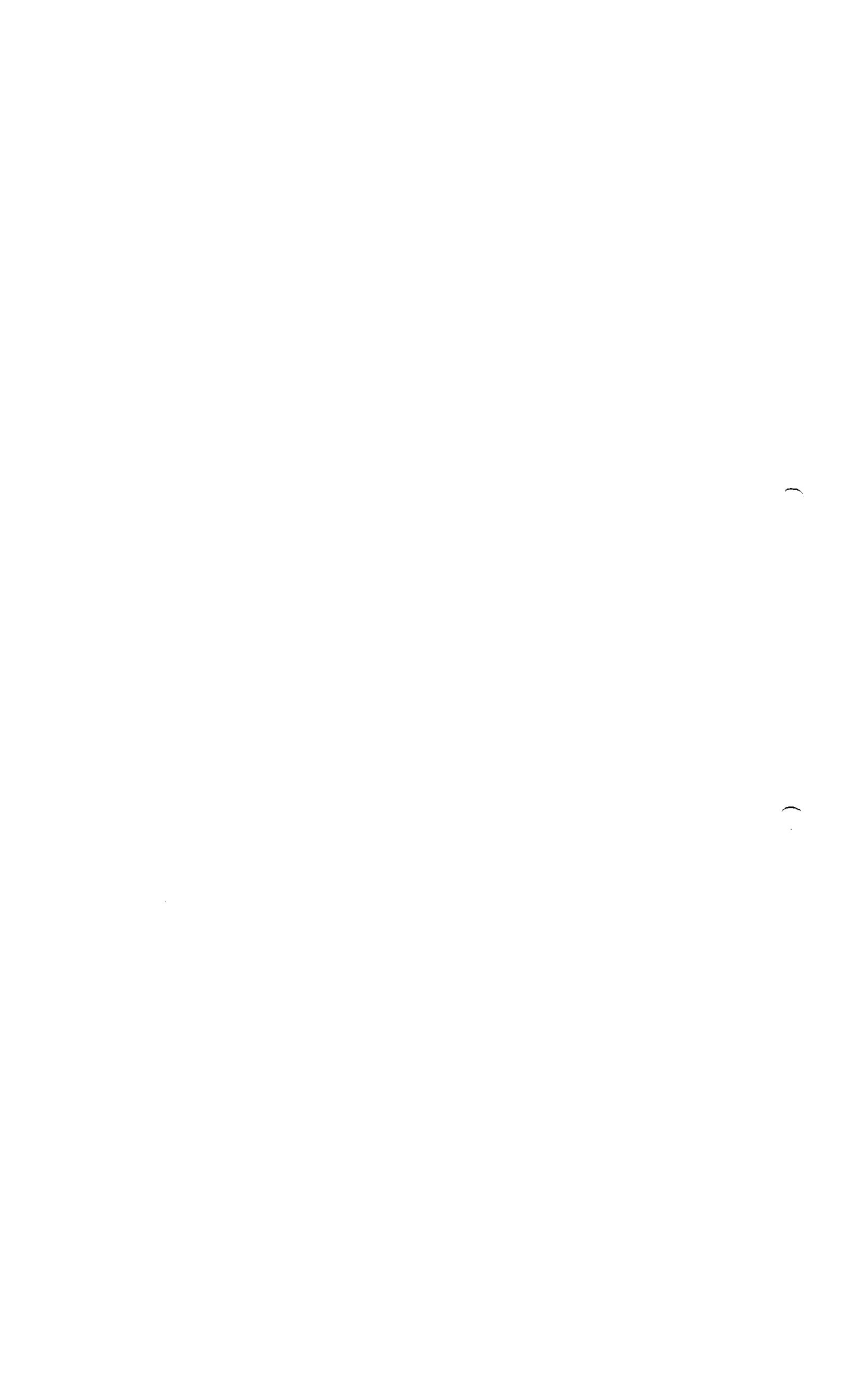
No corresponde.

**2.3 Lotes semilla de trabajo**


El modo de fabricación de los lotes semilla de trabajo (LST) es similar al de las cosechas monovalentes de la VPI. El virus de siembra se multiplica en células Vero del BCT del fabricante.

**CAIF**  
Compañía Argentina de  
Investigaciones Farmacéuticas S.A.  
*Dra. María Bernarda Belay*  
Boderada  
CNI 29378925

**CAIF SA**  
*Dra. Bernarda Belay*  
Co-Directora Técnica  
M.N. 15.148





	<p align="center"><b>Módulo 3. Calidad</b></p> <p align="center"><b>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</b></p> <p align="center">Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p align="right">IPV/NC/AR/09-12</p> <p align="right">Página 30 de 54</p>
<b>3.2.S.2.3. Control de materiales</b>		

La historia y el nivel de pasaje de los LST se han descrito en la sección 2.1 anterior y se ejemplifican en el apéndice IPVV.3.2.S.2.3: Comparación de LST con niveles de pasaje 4 y 5.

Las células se cultivan y el virus se multiplica como se describe en el Módulo 3.2.S.2.2: Descripción del proceso de fabricación y de los controles del proceso. El virus se cosecha aproximadamente 48 horas después de la inoculación, con un filtro de 75 µm, y se almacena a 2-8 °C durante un máximo de 14 días para permitir que los restos celulares se asienten. Una vez terminadas la prueba de esterilización y la titulación del virus, la suspensión del virus de siembra se coloca en frascos de 1000 ml o 100 ml correctamente etiquetados y se almacena a -70 °C.

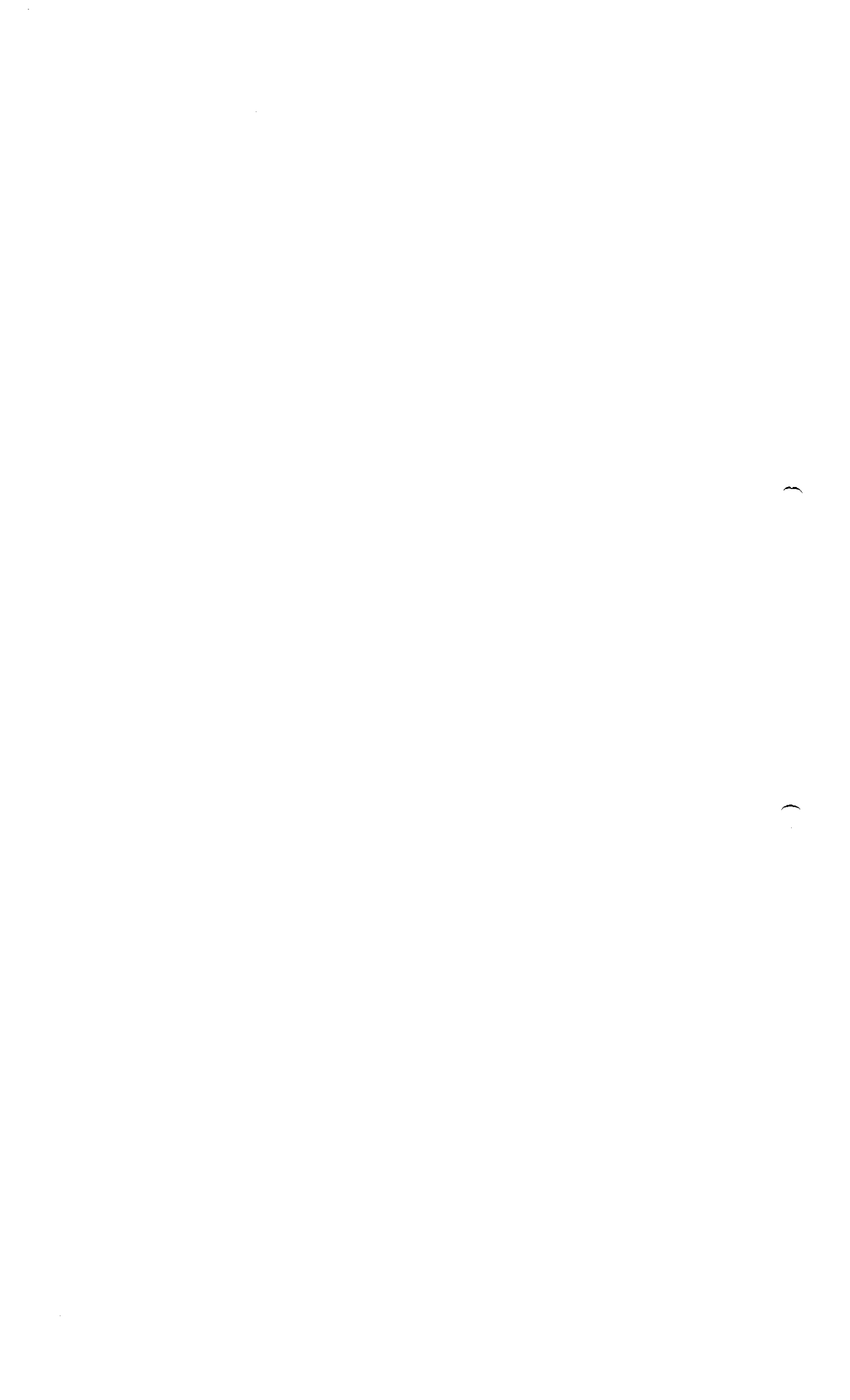
Los datos de análisis de los lotes semilla de trabajo de los tres tipos se incluyen en el apéndice IPVV.3.2.S.2.3: Datos de análisis de los LST. Los lotes se han sometido a pruebas de acuerdo con los requisitos vigentes en el momento de realización de dichas pruebas y se vuelven a analizar ahora de acuerdo con los requisitos actuales enumerados en la próxima sección. Los certificados de análisis de compuestos procedentes de rumiantes utilizados para la fabricación de los bancos celulares de trabajo también se incluyen en este módulo.


**2.3.1 Especificaciones de los lotes semilla de trabajo**

*Tabla 3: Especificaciones de los lotes semilla de trabajo*

Prueba	Método	Requisito
<i>Cultivos celulares</i>		
Prueba de detección de agentes extraños	De acuerdo con la Ph. Eur.	No se observan indicios de ECP o agentes de hemadsorción en ninguno de los cultivos celulares
Identidad	Células de control de identidad	Células Vero
<i>Lote de virus semilla de trabajo</i>		
Identificación del virus	Prueba de identificación del virus	Confirmación de poliovirus tipo 1, 2 o 3

**CAIF**  
Compañía Argentina de  
Investigaciones Farmacéuticas S.A.  
*Dra. María Bernarda Belay*  
Apoderada  
DNI 29378925  
**CAIF SA**  
Dra. Bernarda Belay  
Co-Directora Técnica  
M.N. 15.148




	<p align="center"><b>Módulo 3. Calidad</b></p> <p align="center"><b>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</b></p> <p align="center">Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p align="center">IPV/NC/AR/09-12</p> <p align="center">Página 31 de 54</p>
<p><b>3.2.S.2.3. Control de materiales</b></p>		

Prueba	Método	Requisito
Concentración viral	Concentración viral	La concentración viral se emplea para determinar la cantidad que se debe utilizar para la inoculación de cultivos celulares de producción
Esterilidad	Esterilidad	No hay indicios de crecimiento microbiano
Micoplasmas	Prueba de micoplasmas	Ningún crecimiento de micoplasmas
Micobacterias	Prueba de micobacterias	Ningún crecimiento de micobacterias
Agentes extraños	Prueba en cultivos de células Vero y MRC5	No hay indicios de ningún agente extraño
	Prueba en ratones adultos	No hay indicios de infección atribuible al lote semilla. Como mínimo, deben sobrevivir el 80 % de los ratones
	Prueba en ratones lactantes	No hay indicios de infección atribuible al lote semilla. Como mínimo, deben sobrevivir el 80 % de los ratones
	Prueba en conejillos de indias	No hay indicios de infección atribuible al lote semilla. Como mínimo, deben sobrevivir el 80 % de los conejillos de indias

**CAIF**  
 Compañía Argentina de  
 Investigaciones Farmacéuticas S.A.  
**Dra. María Bernarda Belay**  
 Aboderada  
 DNI 29378925

**CAIF SA**  
**Dra. Bernarda Belay**  
 Co-Directora Técnica  
 M.N. 15.148



	<b>Módulo 3. Calidad</b> <b>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</b> Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.	IPV/NC/AR/09-12 Página 32 de 54
<b>3.2.S.2.3. Control de materiales</b>		

**2.3.2 Pruebas de control del cultivo celular**

**Prueba de detección de agentes extraños en el cultivo celular**

Consulte el Módulo 3.2.S.2.4: Control de pasos críticos y productos intermedios (células de control).

**Identidad**

Consulte el Módulo 3.2.S.2.4: Control de pasos críticos y productos intermedios.

**2.3.3 Pruebas de control en el lote semilla de trabajo**

**Identificación del virus**

Consulte el Módulo 3.2.S.2.4: Control de pasos críticos y productos intermedios (cosecha única, concentrada y purificada).

**Concentración viral**

Consulte el Módulo 3.2.S.2.4: Control de pasos críticos y productos intermedios (cosecha única, concentrada y purificada).

**Esterilidad**

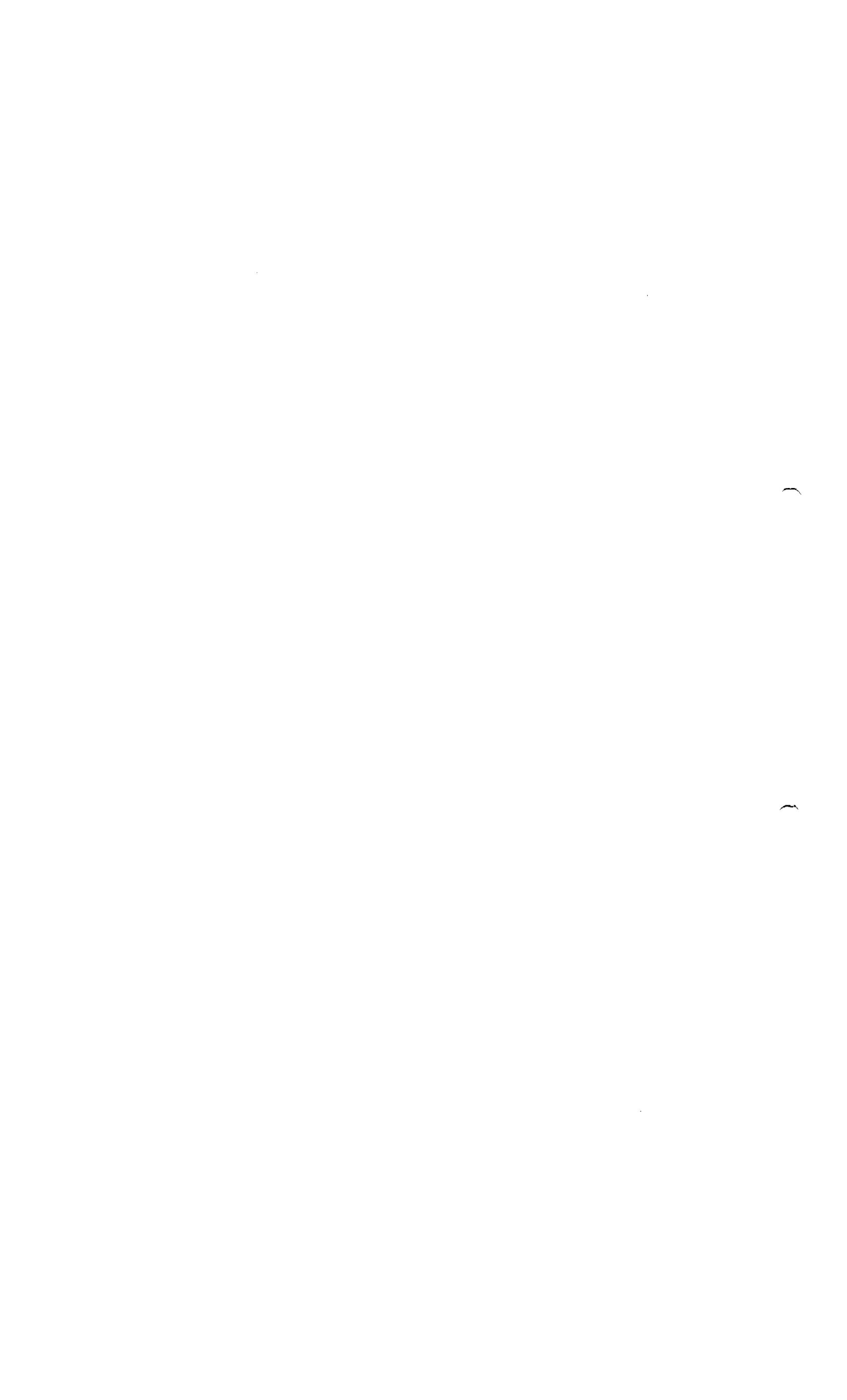
Consulte el Módulo 3.2.S.4.2: Procedimientos analíticos. Se analizan 10 ml del lote semilla en cada uno de los medios (tioglicolato y caldo triptona de soja).


**Prueba de micoplasmas**

Consulte el Módulo 3.2.S.2.4: Control de pasos críticos y productos intermedios.

*CAIF*  
Compañía Argentina de  
Investigaciones Farmacéuticas S.A.  
*Dra. María Bernarda Belay*  
Asoderada  
DNI 29378925

*CAIF SA*  
Dra. Bernarda Belay  
Co-Directora Técnica  
M.N. 15.148



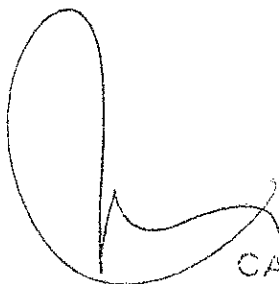
	<p><b>Módulo 3. Calidad</b> <b>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</b> Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p>IPV/NC/AR/09-12 Página 33 de 54</p>
<p><b>3.2.S.2.3. Control de materiales</b></p>		

**Micobacterias**

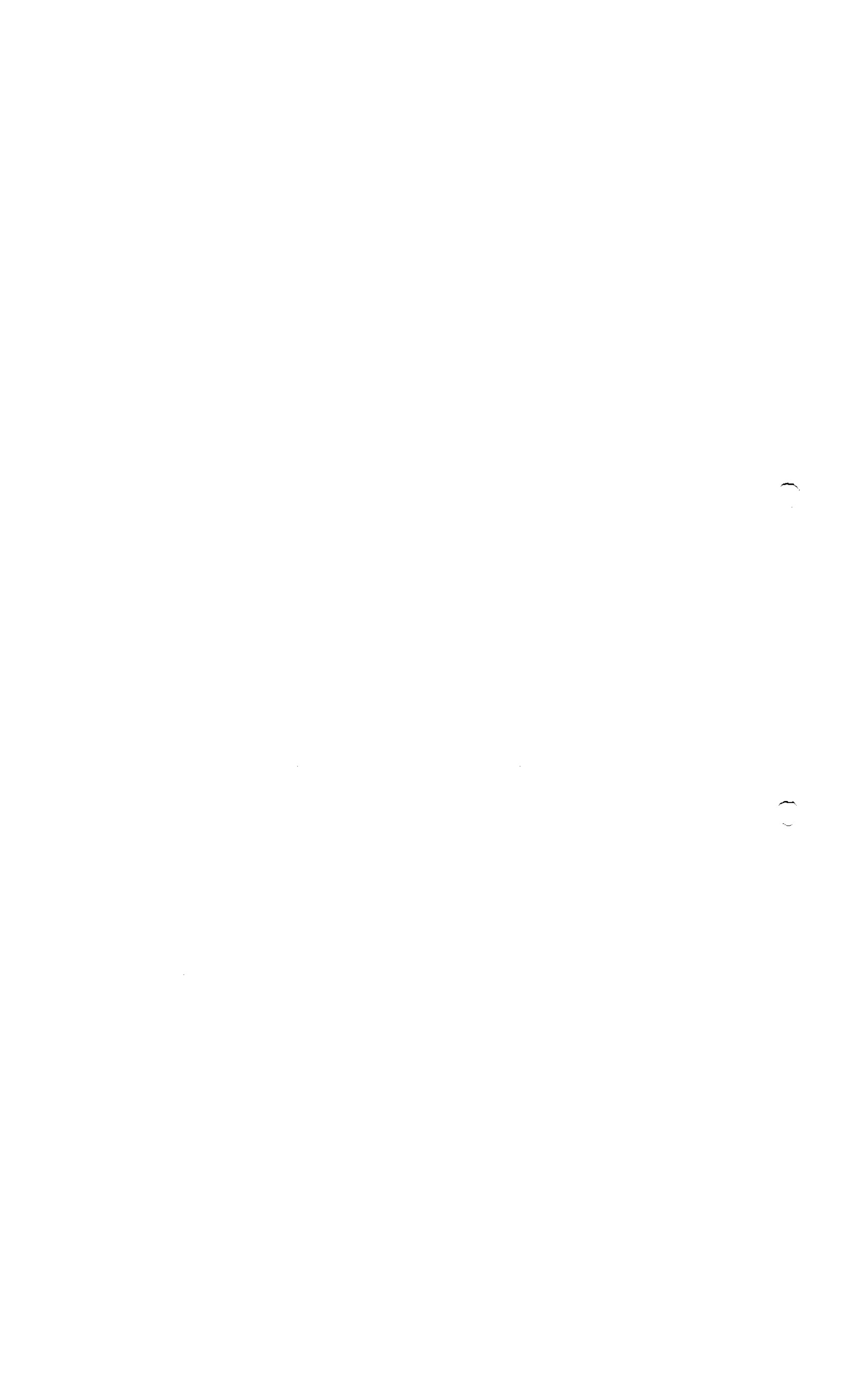
La prueba cumple con la Farmacopea Europea. Se analizan 7,5 ml del lote semilla con medios de Loewenstein, 7H10 y Tween-albúmina.


**Agentes extraños**

Las pruebas para detección de agentes extraños (prueba en cultivos de células Vero y MRC5, prueba en ratones adultos, prueba en ratones lactantes y prueba en conejillos de indias) se llevan a cabo de acuerdo con la Farmacopea Europea.

  
CAIF SA  
Dra. Bernarda Belay  
Co-Directora Técnica  
M.N.J. 15.148

CAIF  
Compañía Argentina de  
Investigaciones Farmacéuticas S.A.  
Dra. María Bernarda Belay  
ApoDERADA  
DNI 29278925



	<b>Módulo 3. Calidad</b> <b>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</b> Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.	IPV/NC/AR/09-12  Página 34 de 54
<b>3.2.S.2.3. Control de materiales</b>		

**3 Medios de cultivo y aditivos**

En esta sección, se describen la preparación, la composición y las especificaciones del medio de cultivo celular y del medio de cultivo del virus.

**3.1 Medio de cultivo celular**

El medio de cultivo celular se utiliza en los pasos 1 a 6 del proceso. Consulte el Módulo 3.2.S.2.2: Descripción del proceso de fabricación y de los controles del proceso.

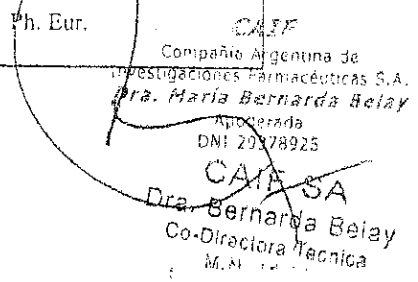
**3.1.1 Preparación del medio de cultivo celular**

El medio de cultivo celular se puede preparar en diferentes recipientes de acuerdo con el tamaño del lote (el tamaño del lote, a su vez, depende del paso de producción que se debe llevar a cabo).

El medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) se prepara por dilución de una solución madre EMEM concentrada de 10x (madre E) y una solución madre concentrada (madre T). La solución madre T contiene amortiguador de fosfato, antibióticos, MEM con aminoácidos no esenciales, suero bovino, L-glutamina y NaHCO<sub>3</sub> en agua para inyectables. La composición completa del medio de cultivo celular se muestra en la tabla a continuación. Los ingredientes están agrupados de acuerdo con la composición de su respectiva solución madre, que se indica con títulos dentro de la tabla. También se indican las especificaciones de los ingredientes.

*Tabla 4: Composición del medio de cultivo celular por litro*

Ingrediente	Cantidad	Especificación
<i>Ingredientes de la solución madre EMEM (madre E)</i>		
Acido clorhídrico (25 %)	0,11 ml	Ph. Eur.
L-cisteína	0,024 g	Ph. Eur.
L-tirosina	0,036 g	Ph. Eur.
Cloruro de sodio	8 g	Ph. Eur.
Cloruro de potasio	0,40 g	Ph. Eur.


  
 CAIFA SA  
 Compañía Argentina de Investigaciones Farmacéuticas S.A.  
 Dra. Bernarda Belay  
 Apoderada  
 DNI 20.278.925  
 Dra. Bernarda Belay  
 Co-Directora Técnica  
 M.M. 12.12.12

