	<p align="center">Módulo 3. Calidad</p> <p align="center">3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</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 3 de 3</p>
<p>3.2.S.2.4. Control de pasos críticos y productos intermedios</p>		

- Renueve el medio de mantenimiento después de 7 días y examine con microscopio en busca de ECP.
- En el día 14, fije los tubos inoculados y los de control.
- Tiña las monocapas con HF.
- Examine los tubos bajo el microscopio en busca de ECP.
- Repita este procedimiento de modo similar para las células diploides humadas (MRC5) y las células de *Cynomolgus/Cercopithecus*.

Interpretación de resultados

- Examine los frascos de cultivo y los tubos en busca de ECP y hemadsorción. Si se observa alguno de ellos, los cultivos se deben subcultivar en células de *Cynomolgus*, células Vero o células diploides humadas (MRC5) para detectar la presencia de un agente infeccioso.

Validez de la prueba

- Al final del período de observación, el 80 % de los frascos de cultivo de tejidos de 150 cm² o los tubos Leighton que se enviaron deben estar en condiciones que aún permitan observar cualquier posible efecto citopatológico.
- Se pueden desechar como máximo el 20 % de los cultivos por razones no específicas, como la contaminación bacterial.

Requisito


No se puede observar ningún ECP en ninguno de los cultivos.

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

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





	<p>Módulo 3. Calidad</p> <p>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</p> <p>Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p>IPV/NC/AR/09-12</p> <p>Página 1 de 2</p>
<p>3.2.S.2.4. Control de pasos críticos y productos intermedios</p>		

Células de control de identidad

La prueba de identidad de las células Vero se lleva a cabo de acuerdo con la Farmacopea Europea.

La identidad de estas células se determina por análisis de isoenzimas. La prueba analiza la movilidad electroforética de la enzima nucleósido-fosforilasa para confirmar que las células utilizadas son células Vero y no de *Macaca fascicularis*.

(En el edificio donde se produce esta vacuna, únicamente hay células Vero y de *Macaca fascicularis*, de modo que solo comprobamos que estas células no se mezclen).

Procedimiento

- Las células se lavan una vez con solución salina y una vez con solución de extracción de células. Las células se pipetea hacia arriba y hacia abajo con una pipeta delgada para hacer un extracto celular. Este extracto se centrifuga y el sobrenadante que contiene las enzimas se mezcla con un estabilizador de enzimas.
- Luego la muestra se aplica en un gel de agarosa al lado de un extracto de células de control que se sepa que son células Vero y un extracto de células de *Macaca fascicularis*.
- Después de aplicar el gel durante 25 minutos, este se cubrirá con un sustrato de enzimas.
- Este sustrato de enzimas toma un color púrpura cuando es convertido por la enzima nucleósido-fosforilasa, de modo que aparecerá una franja púrpura, que marca la ubicación de esta enzima en el gel.
- La altura de la franja en la muestra se compara con aquella en las células de control.

Tamaño de la muestra y almacenamiento

10 x 10⁶ células, almacenadas a 2-8 °C.

Materiales

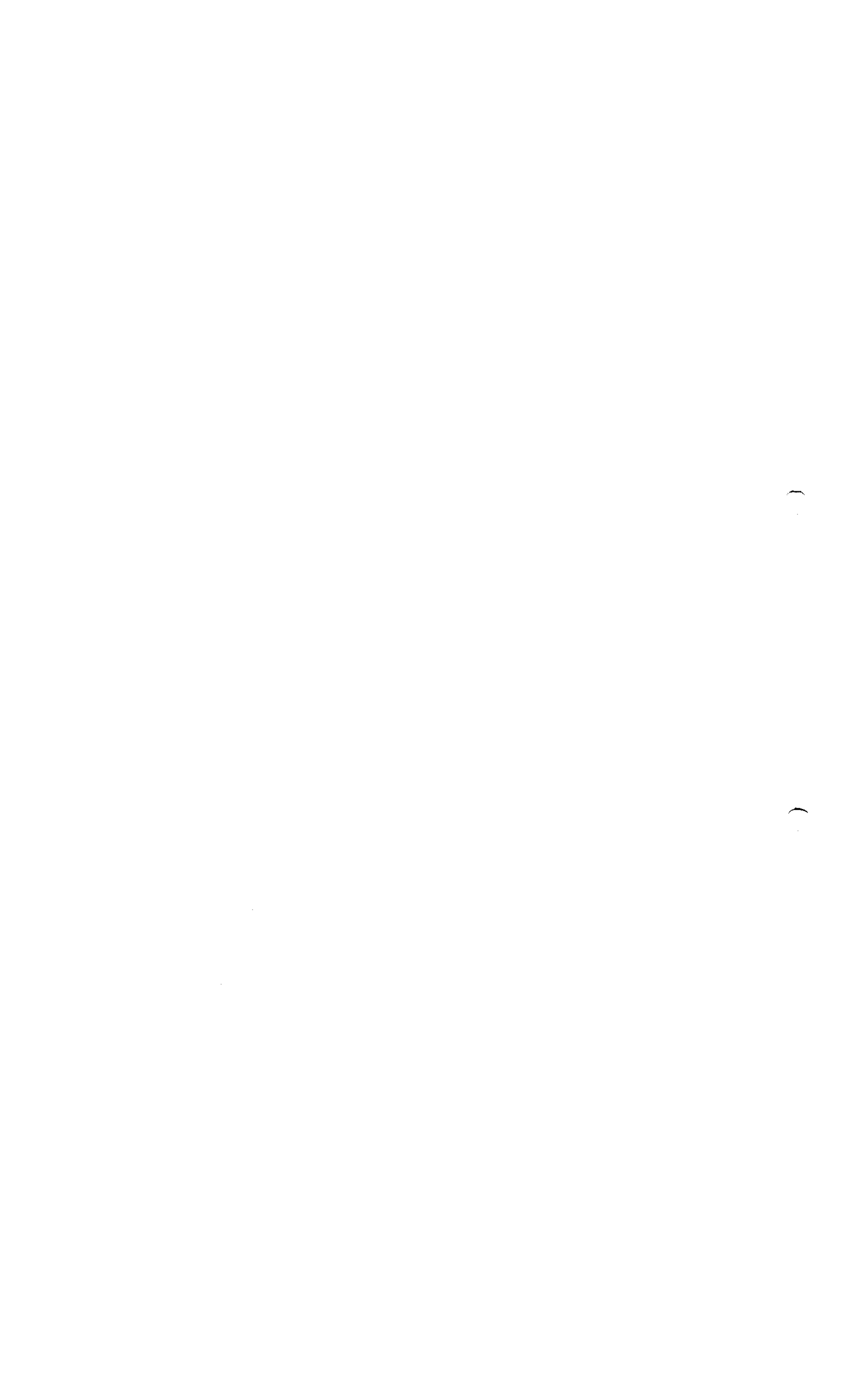
Células Vero, células de *Macaca fascicularis*, agua destilada, PBS.

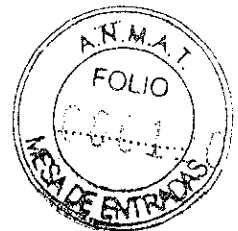
Solución amortiguadora de SAB Plus, de pH 8,6 (Innovative o equivalente, con 80 % de barbitol sódico y


12 % de barbitol).

Estabilizador de enzimas (Innovative o equivalente), reactivo de enzimas para nucleósido-fosforilasa (Innovative o equivalente), solución de extracción de células (Innovative o equivalente), HCL (37 %), Triton X-100, geles de agarosa (Innovative o equivalente).

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





	<p>Módulo 3. Calidad</p> <p>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</p> <p>Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p>IPV/NC/AR/09-12</p> <p>Página 2 de 2</p>
<p>3.2.S.2.4. Control de pasos críticos y productos intermedios</p>		

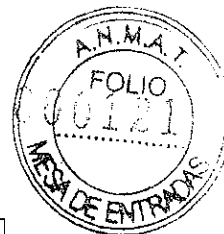
Validez de la prueba


La prueba será válida si aparece una clara franja púrpura en cada carril. La movilidad de la franja en las células Vero de control es 1,5 veces más lenta que aquella en las células de *Macaca fascicularis*. (La distancia de migración de la franja en las células Vero es de alrededor de 0,8 cm y aquella en las células de *Macaca fascicularis* es de alrededor de 1,5 cm).

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 18.148

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





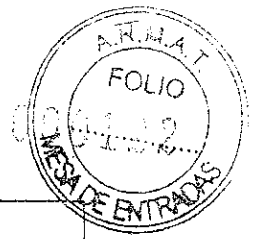
	<p>Módulo 3. Calidad</p> <p>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</p> <p>Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p>IPV/NC/AR/09-12</p> <p>Página 1 de 1</p>
<p>3.2.S.2.4. Control de pasos críticos y productos intermedios</p>		


Prueba de micoplasmas

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


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

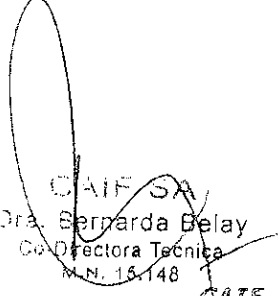




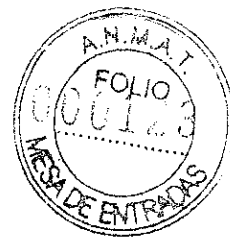
	<p>Módulo 3. Calidad</p> <p>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</p> <p>Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p>IPV/NC/AR/09-12</p> <p>Página 1 de 1</p>
<p>3.2.S.2.4. Control de pasos críticos y productos intermedios</p>		


Esterilidad

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


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





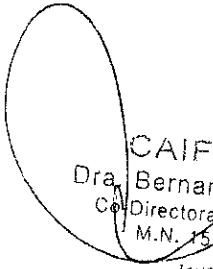
	<p align="center">Módulo 3. Calidad</p> <p align="center">3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</p> <p align="center">Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p align="center">IPV/NC/AR/09-12</p> <p align="center">Página 1 de 2</p>
<p>3.2.S.2.4. Control de pasos críticos y productos intermedios</p>		

Tipo de virus (identidad)


El método para determinar el tipo de virus se aplica de acuerdo con la Farmacopea Europea.

Breve descripción

- Se toman muestras de las mezclas monovalentes antes de empezar el procedimiento de inactivación.
- Las muestras se diluyen 1:100.000 en medio 199 suplementado con suero bovino, antibióticos y glutamina. Para conocer la composición exacta, consulte la sección sobre medios de cultivo.
- Las muestras se transfieren a tubos de ensayo y se incuban con uno de los siguientes antisueros específicos:
 - Antisuero contra el poliovirus tipo 1 (fuente: RIVM)
 - Antisuero contra el poliovirus tipo 2 (fuente: RIVM)
 - Antisuero contra el poliovirus tipo 3 (fuente: RIVM)
- Mezcla de los 3 antisueros contra el poliovirus.
- Se incluyen dos controles:
 - incubación de la muestra con medio (control del virus)
 - solo medio (control de células)
- Los tubos de ensayo incubados se colocan en un incubador de CO₂ a aproximadamente 37 °C durante 3 horas.
- Luego, las células Vero (banco de células de la OMS, pasaje 145) se agregan a las suspensiones en los tubos de ensayo.
- Se toman 3 muestras equivalentes de cada uno de los tubos de ensayo y se transfieren a un sistema de microprueba.
- El sistema de microprueba se incuba en un incubador de CO₂ a aproximadamente 37 °C, con 2,5 % de CO₂ y una humedad del 90 %, durante 3 a 5 días.
- El resultado se determina con un microscopio.


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



	<p>Módulo 3. Calidad</p> <p>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</p> <p>Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p>IPV/NC/AR/09-12</p> <p>Página 2 de 2</p>
<p>3.2.S.2.4. Control de pasos críticos y productos intermedios</p>		

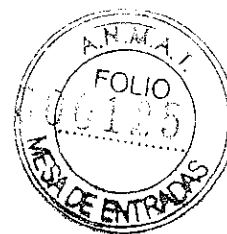
- Los resultados se califican como positivos o negativos.
- Para que el resultado sea positivo, el poliovirus debe dañar la monocapa celular (ECP).
- Para que el resultado sea negativo, no se debe observar ECP.


Interpretación de resultados

- Los pocillos en los que el virus se neutraliza con el suero homólogo deben ser claramente negativos.
- Los pocillos en los que el virus no se neutraliza con el suero heterólogo deben ser claramente positivos.

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

CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. María Bernarda Belay
Apoderada
IDN1 29378925



	Módulo 3. Calidad 3.2.S PRINCIPIO ACTIVO Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.	IPV/NC/AR/09-12 Página 1 de 3
3.2.S.2.4. Control de pasos críticos y productos intermedios		

Concentración viral

La concentración viral del poliovirus se determina de acuerdo con la Farmacopea Europea.

Para esto, diluciones al décimo del poliovirus y una preparación de referencia se analizan siguiendo el método CCID₅₀. El margen de dilución seleccionado incluye un mínimo de tres diluciones que infectarán entre el 10 % y el 90 % de los cultivos inoculados. Los cultivos se examinan para detectar la presencia de efecto citopático específico después de 7 días de incubación a 36 °C ± 1 °C. La concentración viral se calcula utilizando el método de Reed y Muench.

Materiales

- Poliovirus tipo 1, 2 y 3 almacenado a -70 °C o menos.
- Preparación de referencia: muestras de la preparación de referencia de trabajo de virus poliomiéltico vivo atenuado Sabin 1, 2 y 3 almacenadas a temperaturas de -70 °C o menos.
- Cultivos celulares: células Vero (banco de células de la OMS, pasaje 145), susceptibles a la poliomiéltis y analizadas para comprobar la esterilidad y la ausencia de micoplasmas. El nivel de pasaje de estas células se debe documentar y debe estar dentro de los 20 pasajes de la reserva analizada. La concentración que se utiliza es 1 x 10⁵ células por mililitro.
- Suero fetal bovino (SFB): analizado para detectar inhibidores del poliovirus, comprobar la esterilidad y la ausencia de micoplasmas.
- Diluyente: M199, amortiguado con HEPES 25 Mm.
- Aditivos: 5 % de suero fetal bovino, 1 % de combinación de antibióticos, 1 % de glutamina.
- Equipo estándar de laboratorio.

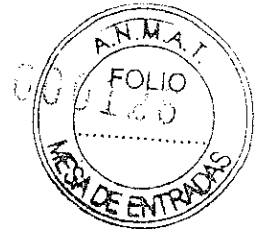
Procedimiento


Preparación de la serie de diluciones (preparación de referencia y del poliovirus).

- Determine la cantidad de tubos necesarios para preparar las diluciones.
- Etiquete cada tubo de ensayo por separado.
- Agregue 4,5 ml de diluyente a todos los tubos de ensayo etiquetados.
- Transfiera 500 µm de suspensión del virus al primer tubo (dilución de 1,0 log₁₀).

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





	<p align="center">Módulo 3. Calidad</p> <p align="center">3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</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 2 de 3</p>
<p>3.2.S.2.4. Control de pasos críticos y productos intermedios</p>		

- Mezcle la suspensión en un mezclador de vórtice.
- Cambie la punta de la pipeta después de cada dilución.
- Transfiera 500 µm de la dilución de 1,0 log₁₀ al siguiente tubo de ensayo (dilución de 2,0 log₁₀).
- Cambie la punta de la pipeta.
- Repita este procedimiento hasta completar la serie de diluciones.


Realización de la titulación

- Determine la cantidad de placas de microtitulación necesarias para la prueba.
- Etiquete cada placa por separado, con el número de código de la muestra de virus y el número de dilución.
- Agregue 100 µl de suspensión celular con una concentración de 1,0 x 10⁵ células por mililitro a todos los pocillos de las placas.
- Transfiera 50 µl de dilución del virus de los tubos a los pocillos de la placa de microtitulación que ya contiene 100 µm de suspensión celular.
- Mezcle las placas durante 30 segundos con un mezclador micrónico.
- Incube las placas a 36 °C ± 1 °C durante 7 días.
- Lea las placas con el microscopio y mantenga un buen registro de los resultados.
- Utilizando el método de Reed y Muench, el título se calcula y se expresa en CCID₅₀ por mililitro.

Requisitos


Para que la prueba sea válida:

- La monocapa en los pocillos de control de células (no se agrega virus), en la lectura final, debe estar en condiciones que permitan distinguir con claridad entre los pocillos positivos (ECP) y los pocillos negativos (sin ECP).
- No se deben observar efectos citotóxicos en las células.
- El progreso del efecto citopático inducido por poliovirus debe ser uniforme. El porcentaje de ECP debe progresar de manera uniforme de acuerdo con las diluciones utilizadas. Toda distribución irregular invalida la prueba.


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

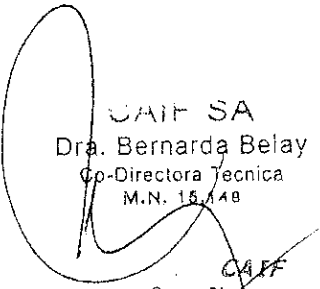




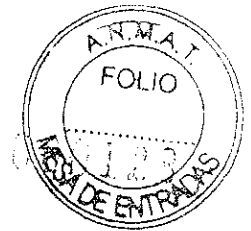
	<p>Módulo 3. Calidad</p> <p>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</p> <p>Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p>IPV/NC/AR/09-12</p> <p>Página 3 de 3</p>
<p>3.2.S.2.4. Control de pasos críticos y productos intermedios</p>		


- Para que el título calculado se acepte como válido, la media observada para la preparación de referencia debe estar dentro de los $0,5 \log_{10}$ de la media establecida para esta preparación. Esto se basa en la media geométrica de títulos de todos los ensayos válidos para la preparación de referencia que se llevan a cabo durante el período anterior.

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



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



	Módulo 3. Calidad 3.2.S PRINCIPIO ACTIVO Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.	IPV/NC/AR/09-12 Página 1 de 1
3.2.S.2.4. Control de pasos críticos y productos intermedios		

Curva de inactivación

Para monitorear la cinética de inactivación, la curva se determinará durante el proceso de inactivación. Durante dicho proceso, se tomarán muestras a $t=0$, $t=24$, $t=48$, $t=72$, $t=96$ y $t=120$ horas después de la adición de formaldehído. Se hará una curva de titulación de las muestras para poder determinar el valor $CCID_{50}$ de acuerdo con el método de cálculo de Reed y Muench.

Objetivo

El objetivo de la prueba es monitorear la cinética de inactivación y la consistencia del proceso de inactivación.

Materiales


- Células Vero, sensibles al poliovirus y analizadas para comprobar la esterilidad y la ausencia de micoplasmas.
- Medio de cultivo: M199 (amortiguado con HEPES 25 mM), 5 % de suero fetal bovino, 1 % de antibióticos, 1 % de glutamina.

Descripción del método

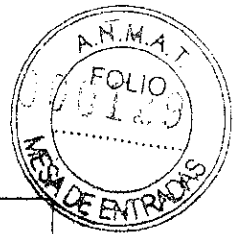
- Se toman muestras a $t=0$, $t=24$, $t=48$, $t=72$, $t=96$ y $t=120$ horas después de la adición de formaldehído.
- Las muestras de virus se diluyen en una serie de diluciones al décimo, lo que da como resultado una curva de titulación entre sin diluir y dilución 10^{11} , de acuerdo con la concentración de virus esperada.
- Se agregan 50 μ l de la muestra de virus diluida a la suspensión de células Vero (1×10^5 células/ml).
- Las suspensiones de células/virus se incuban durante 7 días a 36 ± 1 °C.
- Se determina el efecto citopático (ECP) y se calcula el $CCID_{50}/ml$ de acuerdo con el método de Reed y Muench.


Requisitos

No se permiten desviaciones en el ECP que indiquen la presencia de virus vivos 120 horas después de la adición de formaldehído.

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

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





	<p>Módulo 3. Calidad 3.2.S PRINCIPIO ACTIVO Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p>IPV/NC/AR/09-12 Página 1 de 1</p>
<p>3.2.S.2.4. Control de pasos críticos y productos intermedios</p>		

Determinación del nitrógeno proteico

Para medir la concentración de nitrógeno proteico de las mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, se utiliza un ensayo de determinación fotométrica del nitrógeno total por el método Kjeldahl.

Antes de determinar los aminogrupos primarios con el método Kjeldahl, la proteína se precipita con ácido tricloroacético. Después, la proteína se disuelve en solución de hidróxido de sodio y se transfiere con agua a un frasco volumétrico.

La muestra se destruye con ácido sulfúrico concentrado, con una tableta Kjeldahl y catalizador. El nitrógeno se convierte en sulfato de amonio. Se agrega hidróxido de sodio a la mezcla para liberar el amoníaco. El amoníaco pasa por una membrana de filtro de gas y se difunde en un flujo de solución indicadora. Esta solución indicadora contiene una mezcla de indicadores de ácidos bases, que reacciona con el gas amoníaco y genera un color a partir del cual la absorción se determina de manera fotométrica a 590 nm.

Se utiliza como estándar una serie de soluciones de sulfato de amonio (0-200 $\mu\text{mol/L}$).

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

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

