



4.3 Procedimiento de control 9110.115: Ensayo de seguridad de vacunas de virus en ratón adulto y lactante

El Procedimiento de Control (CP) 9110.115 describe una Ensayo de pureza in vivo para la detección de agentes extraños. Esta Ensayo requiere la inoculación de ratones adultos y lactantes, con vacuna a granel o productos intermedios del granel, a fin de confirmar la ausencia de agentes virales infecciosos.

Esta Ensayo no ha sido validada debido a que los parámetros de validación típicos no pueden aplicarse significativamente a Ensayos in vivo, como la descrita en el CP 9110.115. Siguiendo la Política Corporativa 9 de Merck & Co., Inc (Merck); esto es, la Política Mundial de Merck sobre Cuidado y Uso de Animales, la compañía apoya la investigación de metodologías de Ensayo alternativas, científicamente válidas, y reduce al mínimo el número de animales para investigación al emplear alternativas científicamente válidas que no contemplen la utilización de animales cuando sea posible. En consecuencia, en lugar de la validación, el procedimiento ha sido revisado contra requerimientos y lineamientos regulatorios de todo el mundo (Tabla 18) para asegurar el cumplimiento a todas las regulaciones pertinentes.

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC

Firma: MARIA CECILIA CAMPOS
DIRECTORA TÉCNICA
MATRÍCULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

Dr. SANTIAGO RODRIGUE
DIRECTOR APODERADO PARA
ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS
MAT. NAC. 51.525



Tabla 18: Ensayo de seguridad de vacunas de virus en ratón adulto y lactante: comparación con los requerimientos y lineamientos regulatorios de todo el mundo

Parámetro	CP 9110.115 ^a	Ph. Eur. ^b	21 CFR ^c (630.35)
Número y tipo de animal	ratones adultos = 20 ratones lactantes ≥ 20 (<24 horas de edad, de 2 camadas)	ratones adultos ≥ 10 ratones lactantes ≥ 20	Igual que CP 9110.115 excepto que no se menciona el control negativo.
	control negativo = 3 adultos control negativo ≥ 5 lactantes	control negativo: N/A ^d	
	Subpasaje si es necesario: adultos = 5 lactantes = 5	Subpasaje: si es necesario ratones adultos ≥ 5 ratones lactantes ≥ 5	Subpasaje: si es necesario, igual que en CP 9110.115
	Pasaje ciego: sobrevivientes del grupo de lactantes original; mismos parámetros	N/A	Pasaje ciego: igual que en CP 9110.115
Rango de peso	ratones adultos = 15-20 g ratones lactantes: N/A (≤24 horas de edad)	Igual que CP 9110.115	Igual que CP 9110.115
Vía y volumen inyectado (por animal)	ratones adultos: 0.03 ml Intracerebralmente 0.5 ml intraperitonealmente ratones lactantes: 0.01 ml Intracerebralmente 0.1 ml intraperitonealmente	Igual que en CP 9110.115	Igual que en CP 9110.115
Etapa del producto en la Ensayo	ratones adultos = 21 días ratones lactantes = 14 días	Lote de semilla de virus (madre y de trabajo)	Graneles de vacuna de virus
Días a Ensayo	ratones adultos = 21 días ratones lactantes = 14 días	Igual que en CP 9110.115	Igual que en CP 9110.115
Ensayo válida y de parámetros de aprobación/fracaso	Ensayo Inicial, subpasaje y pasaje ciego: satisfactorio si ≥ 80% de los ratones sobreviven el período de observación y ningún animal muestra evidencia de una condición patológica atribuible a la muestra de la Ensayo.	Igual que en CP 9110.115	Igual que en CP 9110.115

^aCP: Procedimiento de control

^bPh. Eur.: Farmacopea Europea

^cCFR: Código de Regulaciones Federales

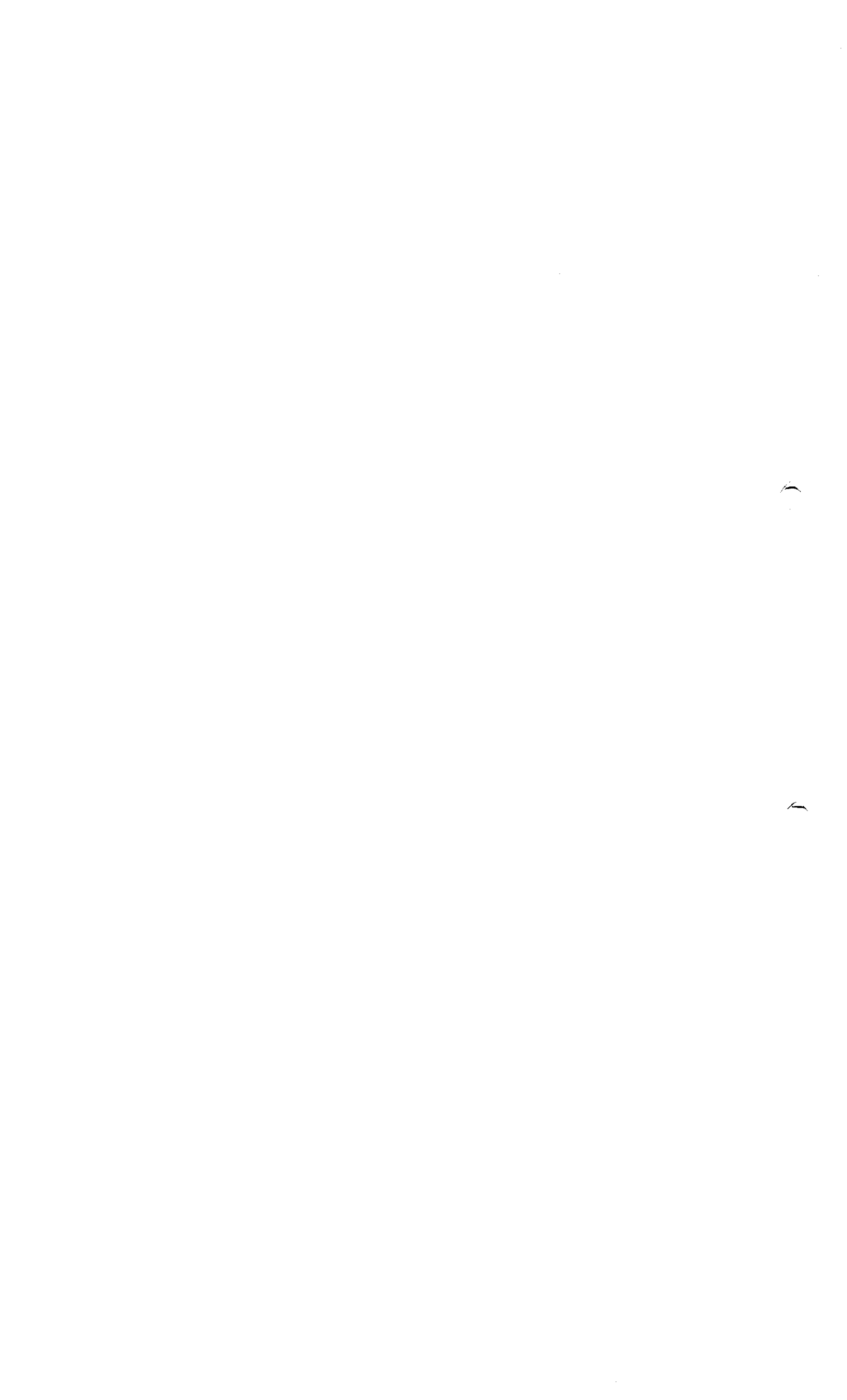
^dN/A: No aplica

Conclusiones

El CP 9110.115 satisface los requerimientos de la *Farmacopea Europea (Ph. Eur.)* y del *Título 21 del Código de Regulaciones Federales (CFR) 630.35* Estándares para vacunas virales - Ensayo de seguridad. Los requerimientos establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), *Requerimientos para sustancias biológicas No. 47 (1994)*, especifican que para la Ensayo de seguridad de vacunas virales únicamente se requiere la Ensayo in vitro de agentes extraños, sin que se mencionen

Farm. MARIA CECILIA CAMPOS
DIRECTORA TÉCNICA
MATRICULA NACIONAL 12374

DR. SANTIAGO RODRIGUE
DIRECTOR APODERADO PARA
ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS
MAT. NAC. 51.525



otros lineamientos. El granel sonicado y preclarificado, la semilla de almacenamiento sonificada y la semilla madre sonificada se consideran como aptas para usarse como muestras en el CP 9110.115.

4.4 Procedimiento de control 9110.117: Ensayo para micobacterias in vitro

El Procedimiento de Control (CP) 9110.117 describe una Ensayo de pureza in vitro para la detección de agentes extraños, que se emplea para verificar la ausencia de contaminación por micobacterias, incluyendo *Mycobacterium tuberculosis*, en productos intermedios del granel y vacuna a granel.

La Ensayo para *Mycobacterium tuberculosis* es un método de Ensayo compendial, consistente con la *Farmacopea Europea (Ph. Eur.)*, la *Farmacopea de Estados Unidos (USP)* y el *Código de Regulaciones Federales de Estados Unidos (CFR)*. En consecuencia, no se evaluaron por completo los parámetros de validación. La validación de este ensayo fue culminada por un proveedor calificado y consistió en la calificación de la muestra de semilla de almacenamiento sonificada, de acuerdo con el Procedimiento de Control de Merck & Co., Inc. (Merck). El granel preclarificado y sonicado, el banco de células de trabajo del fabricante (MWCB) y la semilla madre preclarificada y sonificada se calificaron mediante equivalencia con esta muestra.

En la [Tabla 19] se lista un resumen de cada parámetro evaluado durante la validación del método. Los parámetros abordados en el ensayo fueron especificidad, precisión interensayo, límite de detección (LOD) y repetibilidad. Durante la validación de este ensayo no se evaluaron la exactitud, precisión intra-ensayo, límite de cuantificación (LOQ), linealidad, rango y robustez.

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

Farm. MARIA CECILIA CAMPOS
DIRECTORA TECNICA
MATRICULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

Dr. SANTIAGO RODRIGUE
DIRECTOR APODERADO PARA
ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS
MAT. NAC. 51.525

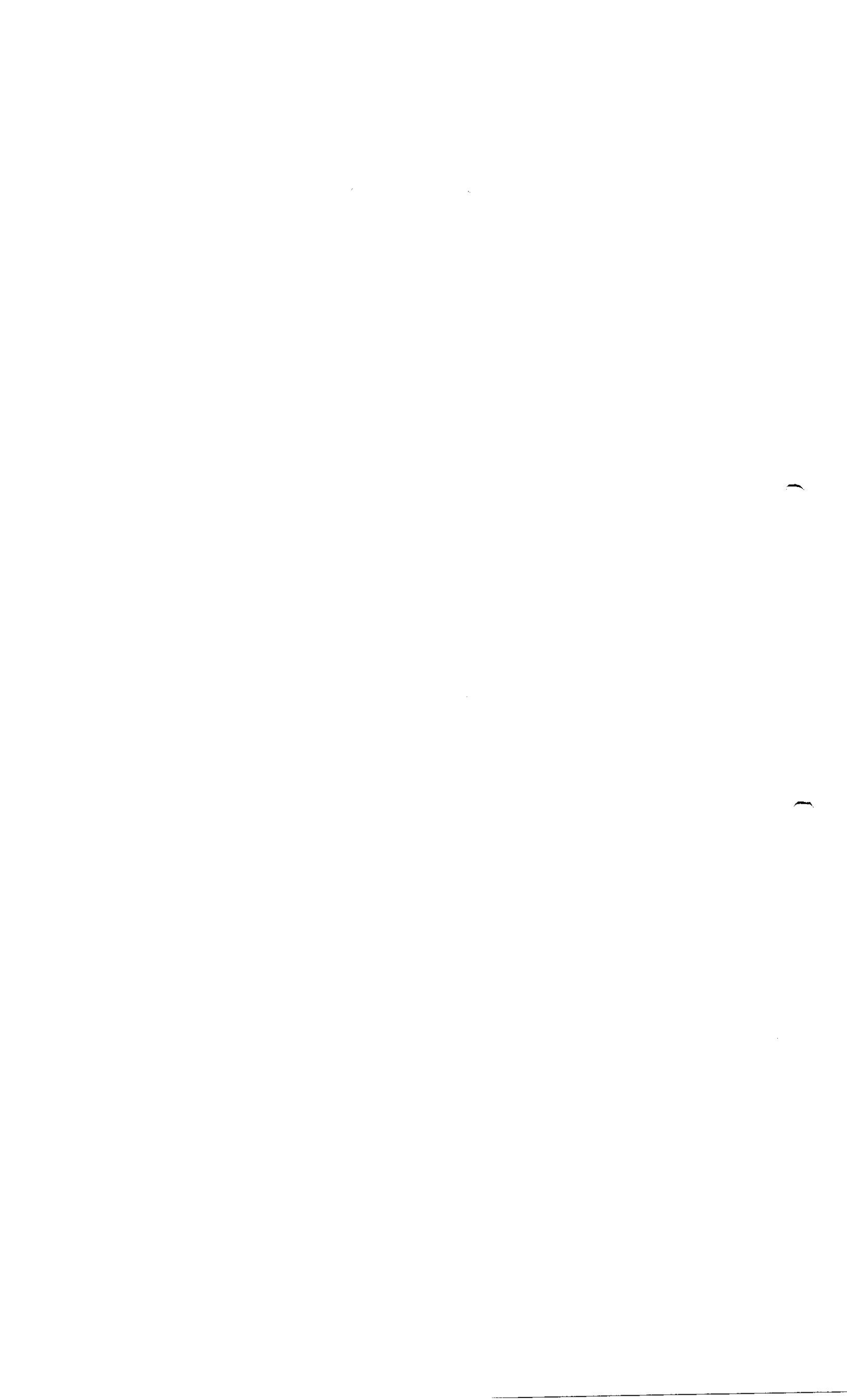


Tabla 19: Resumen de los resultados de validación para el procedimiento de control 9110.117:
Ensayo para micobacterias in vitro

Parámetro de validación	Criterios de aceptación	Resultado exacto
Especificidad	Las tres cepas de micobacterias, usadas en la cuantificación de las muestras, deben recuperarse.	Se inocularon <i>Mycobacterium phlei</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra y <i>Mycobacterium avium</i> a ≤ 1000 ufc ^a y se recuperaron en el medio para Ensayo en la presencia de la muestra de granel preclarificado.
Precisión intermedia (Precisión inter-ensayo)	Los resultados del control positivo deben ser repetibles usando medio de crecimiento aceptable.	El desempeño de los controles positivos fue satisfactorio en las Ensayos usando 29 lotes de medio en la presencia de distintas muestras de Ensayo, incluyendo el granel preclarificado.
Límite de detección	Las micobacterias presentes en la muestra a un nivel de ≤ 1000 ufc deben recuperarse en el ensayo.	<i>Mycobacterium phlei</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra y <i>Mycobacterium avium</i> se inocularon a ≤ 1000 ufc y se recuperaron en los medios de Ensayo.
Repetibilidad	El ensayo debe generar resultados similares al ejecutarse bajo una variedad de condiciones.	El desempeño de los controles positivos fue satisfactorio en las Ensayos usando 29 lotes de medio en la presencia de distintas muestras de Ensayo, incluyendo granel preclarificado.

^aufc: Unidad formadora de colonia

Conclusión

El CP 9110.117 es un método de Ensayo microbiológica válido para examinar muestras y comprobar la ausencia de micobacterias, incluyendo *Mycobacterium tuberculosis*. El microorganismo *Mycobacterium phlei* se incluyó en la calificación de la muestra, además de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra y *Mycobacterium avium*, y se determinó que tiene características de crecimiento similares a las de *Mycobacterium tuberculosis*. *Mycobacterium phlei* no es patogénico y es el organismo empleado como control positivo para cada Ensayo de rutina realizada en la vacuna a granel.

4.5 Procedimiento de control 9110.339: Procedimiento para tinción H (Hoechst) para detección de micoplasma.

El Procedimiento de Control (CP) 9110.339 describe una Ensayo de pureza in vitro para la detección de agentes extraños. Usando un sistema basado en cultivo celular, la Ensayo se lleva a cabo para confirmar la ausencia de micoplasma en productos intermedios de granel y la vacuna a granel.

En la [Tabla 20] se lista un resumen de cada parámetro evaluado durante la validación del método. Los parámetros abordados en el ensayo fueron especificidad, precisión inter-ensayo y repetibilidad. La robustez, límite de cuantificación (LOQ), límite de detección (LOD), linealidad y rango no se evaluaron

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

Farm. MARIA CECILIA CAMPOS
DIRECTORA TÉCNICA
MATRICULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

Dr. SANTIAGO RODRIGUE
DIRECTOR APODERADO PARA
ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS
MAT. NAC. 51.528



durante la validación del ensayo debido a la naturaleza cualitativa de este

último. Tampoco se evaluaron la exactitud y la precisión intra-ensayo durante esta validación del ensayo.

Tabla 20: Resumen de los resultados de la validación para el Procedimiento de Control 9110.339: Procedimiento para tinción H (Hoechst) para detección de micoplasma

Parámetro de validación	Criterios de aceptación	Resultado exacto
Especificidad	<ul style="list-style-type: none"> El control positivo debe mostrar fluorescencia típica del micoplasma. El control negativo no muestra fluorescencia. 	<ul style="list-style-type: none"> Los controles positivos de <i>Mycoplasma hyorhinis</i> mostraron fluorescencia típica de esta cepa. Las células sin inocular (controles negativos) no mostraron evidencia de fluorescencia típica de <i>Mycoplasma hyorhinis</i>.
Precisión intermedia (Inter-ensayo)	<ul style="list-style-type: none"> La detección al 100% de ≥ 100 UFF^a de micoplasma por muestra debe ser detectada en ensayos independientes. 	<ul style="list-style-type: none"> Detección consistente de ≥ 100 UFF de <i>Mycoplasma hyorhinis</i> en siete ensayos independientes.
Repetibilidad	<ul style="list-style-type: none"> Sin efecto sobre la confiabilidad del ensayo para detectar 100 UFF de micoplasma por muestra. Evaluación de la variabilidad de técnico a técnico y respecto al día del ensayo y la línea celular. 	<ul style="list-style-type: none"> Detección repetida de ≤ 100 UFF de <i>Mycoplasma hyorhinis</i> en células MRC-5 y RK-13. La variabilidad de técnico a técnico no tuvo impacto No hubo impacto al cambiar el día de lectura del ensayo

^aUFF: Unidades formadoras de fluorescencia

Conclusión:

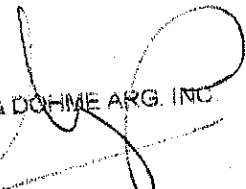
El CP 9110.339 es una Ensayo válida para confirmar la ausencia de micoplasma en la muestra de Ensayo usando un sistema de Ensayo basado en célula. Se cumplieron todos los criterios de aceptación para la validación de este ensayo.

4.6 Procedimiento de control 9110.527: Ensayo de hemadsorción de células de control de producción - vacunas de virus vivo y hepatitis A

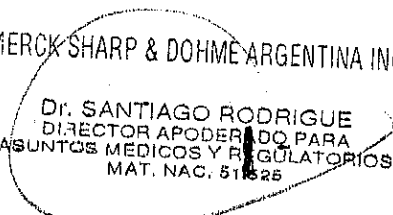
El Procedimiento de Control (CP) 9110.527 describe una Ensayo de pureza in vitro para la detección de agentes extraños. La Ensayo se usa para verificar la ausencia de agentes extraños virales hemadsorbentes en cultivos celulares de control para producción.

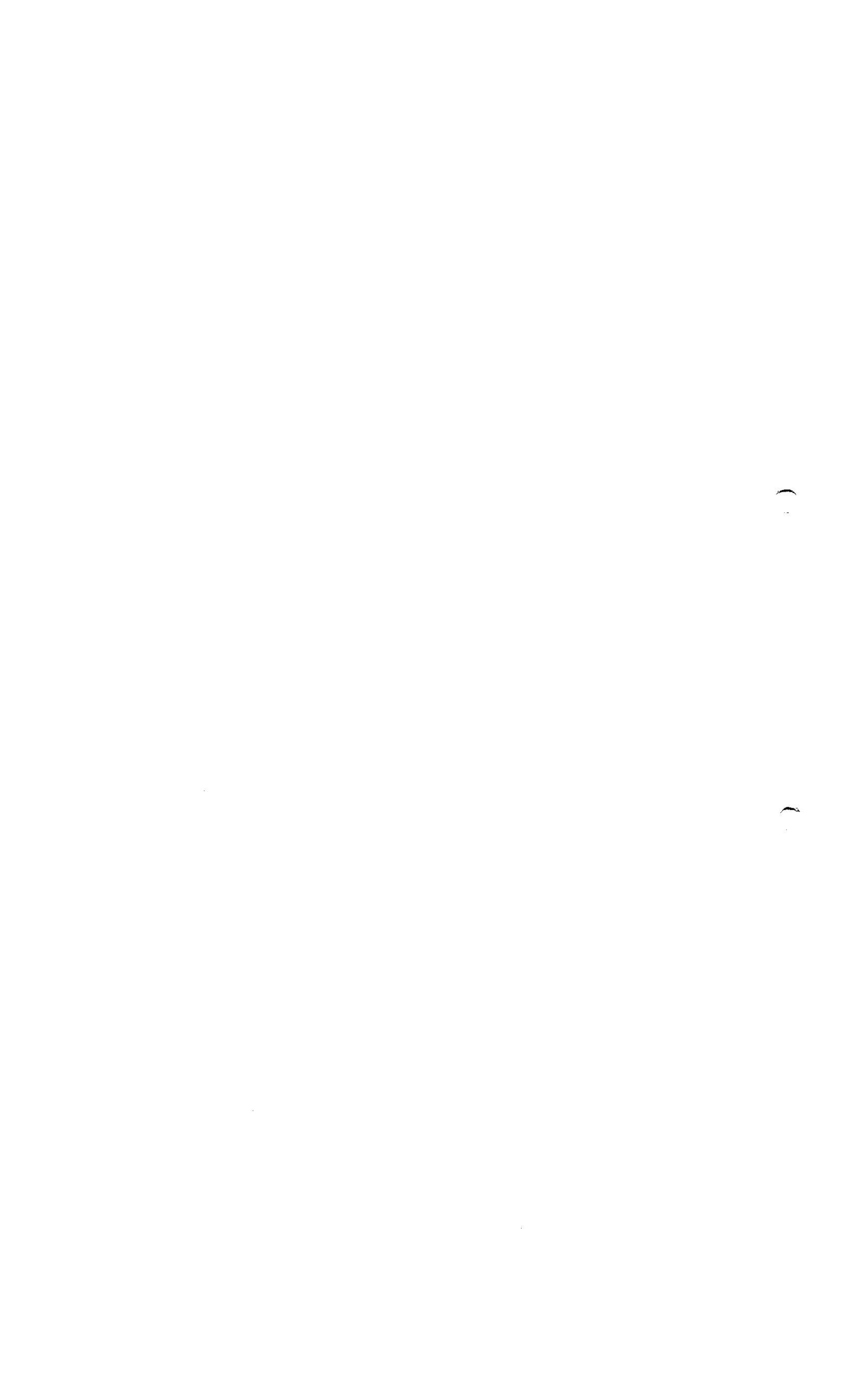
En la [Tabla 21] se lista un resumen de cada parámetro evaluado durante la validación del método. Los parámetros de ensayo abordados fueron especificidad, precisión inter-ensayo, repetibilidad y robustez. Debido a la naturaleza cualitativa del ensayo, no se evaluaron la exactitud, límite de detección (LOD),

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.


 PAMELA MARÍA CECILIA CAMPOS
 DIRECTORA TÉCNICA
 MATRICULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.


 Dr. SANTIAGO RODRIGUE
 DIRECTOR APODERADO PARA
 ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS
 MAT. NAC. 51625



límite de cuantificación (LOQ), linealidad y rango durante la validación de este ensayo. Tampoco se evaluó la precisión intra-ensayo.

Tabla 21: Resumen de los resultados de la validación para el Procedimiento de Control 9110.527: Ensayo de hemadsorción de células de control de producción, vacunas de virus vivos y hepatitis A

Parámetro de validación	Criterios de aceptación	Resultado exacto
Especificidad	<ul style="list-style-type: none"> HAd^a en controles positivos Sin HA^d en controles negativos 	<ul style="list-style-type: none"> Se observó HAd en los cultivos de control positivo. No se observó HAd en los cultivos de control negativo
Precisión Intermedia (Inter-ensayo)	<ul style="list-style-type: none"> En los controles positivos la HAd debe ser consistente. No debe haber HAd en los controles negativos. Si se observa una respuesta HAd en las infecciones de control con virus de varicela, ésta debe observarse de manera consistente en todos los experimentos. 	El patrón observado en los cultivos positivo y negativo para HAd fue el mismo en todos los experimentos.
Repetibilidad	<p>Distintos técnicos deben obtener los mismos resultados bajo las condiciones siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> Realización en diferentes laboratorios Realización en días distintos Realización con distintas preparaciones de GR^b 	Se obtuvieron los mismos resultados, sin importar el laboratorio, los reactivos y el personal participante en la realización de la Ensayo
Robustes	<ul style="list-style-type: none"> Se deben obtener los mismos resultados con preparaciones de GR de distintas edades (frescas y a 7 días después de la preparación) y en diferentes volúmenes de GR en las botellas roller de producción. Optimación de los búferes para enriquecer el desempeño del ensayo (no es parte del criterio de validación original) 	<ul style="list-style-type: none"> Se obtuvieron los mismos resultados sin importar la edad o el volumen de los GR empleados en la realización de la Ensayo. La solución salina amortiguada con fosfato sin magnesio y calcio dio como resultado un desempeño óptimo del ensayo.

^aHAd: Hemadsorción

^bGR: Glóbulos rojos

Conclusión:

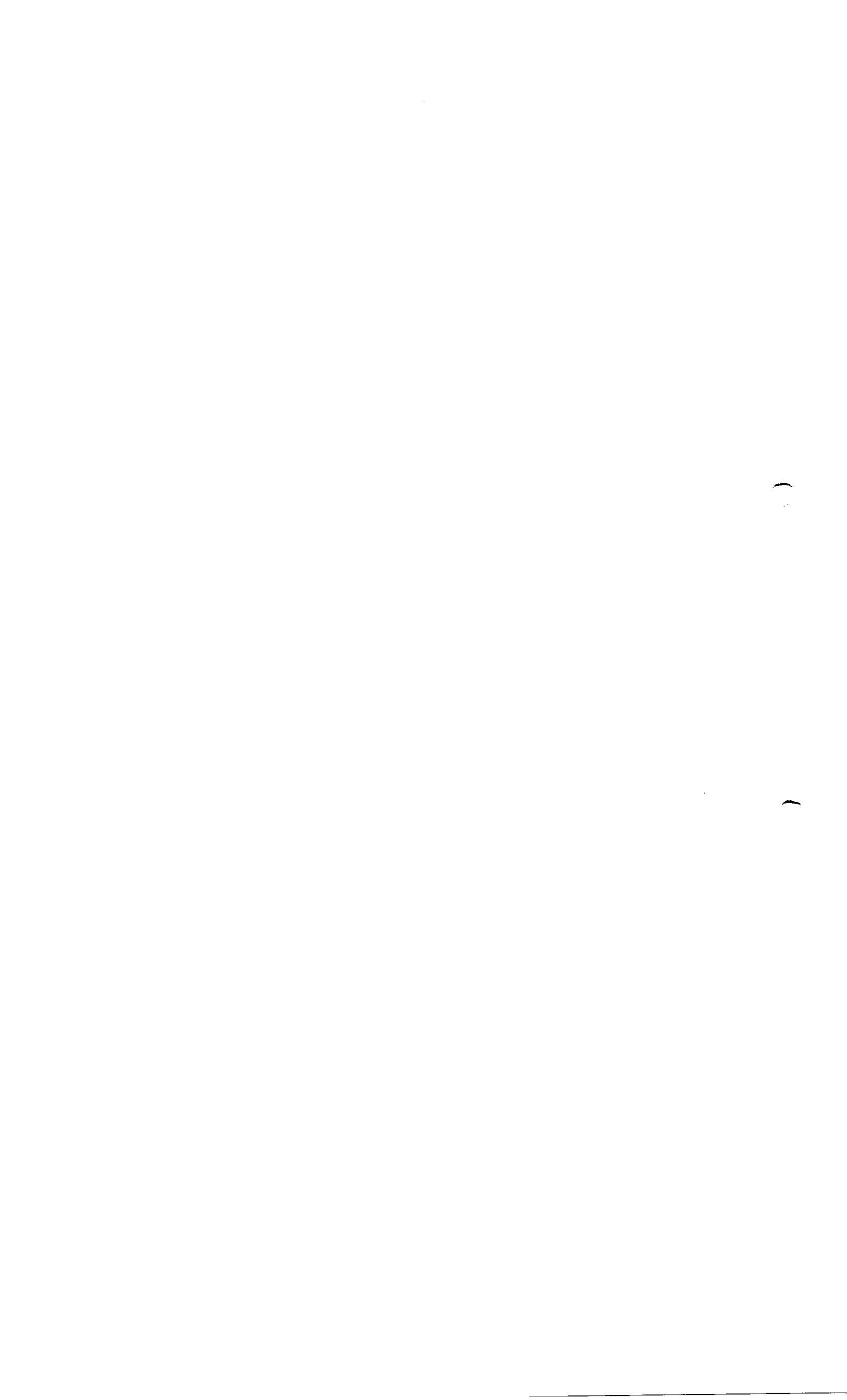
El CP 9110.527 es un ensayo validado consistente con los requerimientos regulatorios para probar células de control, células de control de semilla de almacenamiento y células de control de semilla madre empleadas en la producción de las vacunas con virus de varicela-zóster (VVZ).

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

F. MARI. MARIA CECILIA CAMPOS
DIRECTORA TÉCNICA
MARRICOLA NACIONAL 12379

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

DR. SANTIAGO RODRIGUE
DIRECTOR APODERADO PARA
ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS
MAT. NAC. 51-528

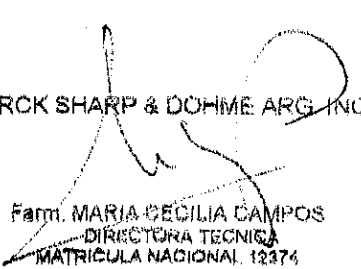


4.7 Procedimiento de control 9110.551: Ensayo en placa para vacuna de varicela en cultivos celulares MRC-5 para potencia, identidad y examen de fluido de control 123

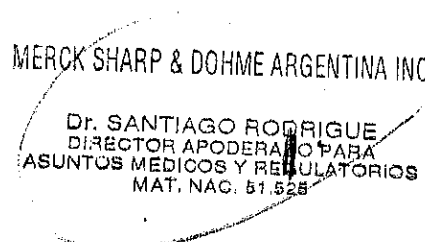
El Procedimiento de Control (CP) 9110.551 describe una Ensayo para la identificación y determinación cuantitativa del ingrediente activo. Esta Ensayo se usa para confirmar la identidad y determinar la potencia de los productos intermedios del granel y la vacuna a granel.

En la [Tabla 22] se lista un resumen de cada parámetro evaluado durante la validación del método. Los parámetros de ensayo abordados fueron especificidad, exactitud, precisión inter-ensayo, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), linealidad, rango, repetibilidad y robustez. Durante la validación de este ensayo no se evaluó la precisión intra-ensayo.

MERCK SHARP & DOHME ARG INC


Mariela Cecilia Campos
DIRECTORA TÉCNICA
MATRÍCULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.


Dr. SANTIAGO RODRIGUE
DIRECTOR APODERADO PARA
ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS
MAT. NAC. 51.525

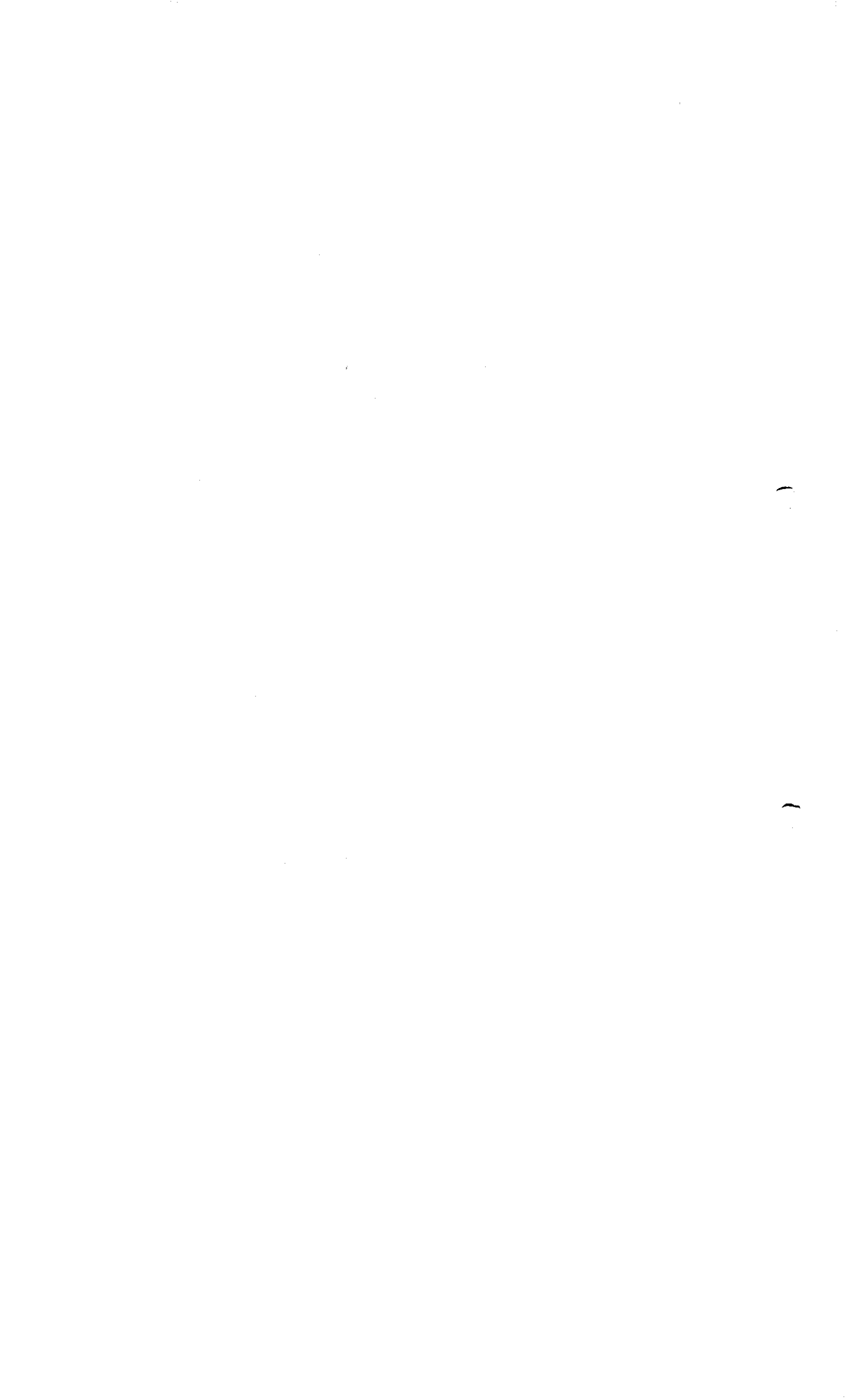


Tabla 22: Resumen de los resultados de la validación para el Procedimiento de Control 9110.551: Ensayo en placa para vacuna de varicela en cultivos celulares MRC-5 para potencia, identidad y examen de fluido de control

Parámetro de validación	Criterio de aceptación	Resultado exacto
Especificidad	Sin interferencia en la capacidad de dilución de las muestras en medio estabilizador o de suspensión.	No se observó un efecto matriz en una serie de diluciones.
Exactitud	La exactitud relativa es demostrada por la capacidad de dilución.	Se demostró una capacidad de dilución aceptable mediante una disminución lineal en las cuentas de placa que fue proporcional al aumento en el nivel de dilución.
Precisión intermedia (Precisión inter-ensayo)	Variación entre las réplicas y entre las Ensayos caracterizada por el desempeño del estándar de referencia.	La variabilidad del estándar de referencia, ensayada por más de 2 años, fue de 1.46-1.56 veces.
Límite de detección	El límite de detección es el título que consistentemente genera por lo menos 1 placa en volumen de inóculo.	El límite de detección para el ensayo es 3 UFP*/ml ^b
Límite de cuantificación	El límite de cuantificación es el título de muestra sin diluir en el extremo inferior del rango de conteo de placa aceptable, o 20 placas por lámina de ensayo.	El límite de cuantificación para el ensayo es 200 UFP/ml ^b .
Linealidad	La proporcionalidad de la relación entre la dilución y el título.	La linealidad es 20-200 placas/lámina ^b .
Rango	Establecer los conteos superior e inferior de placas para reducir la variabilidad del ensayo.	El rango de conteo es de 20-80 placas/lámina ^b .
Repetibilidad y robustez	La estabilidad del ensayo no es afectada por el cambio de lotes de los componentes del ensayo o por cambiar de operadores.	Los datos para el estándar de referencia fueron consistentes durante un período de 3 años.

*UFP: Unidades formadoras de placa

^bLos resultados de todas las placas se promedian para una dilución determinada.

Conclusión:

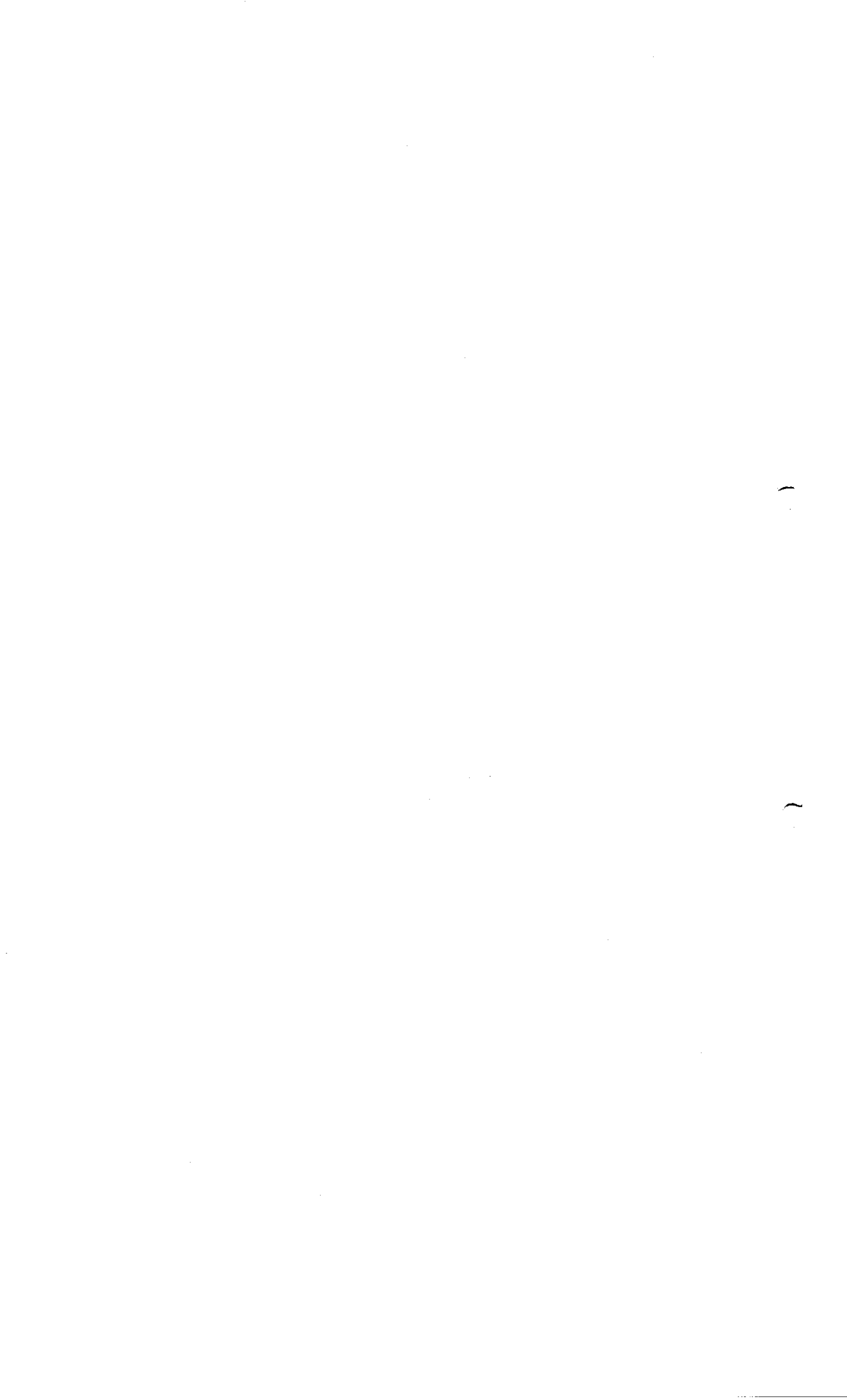
El Procedimiento de Control 9110.551 es un ensayo validado, consistente con los requerimientos regulatorios, para asignar la potencia y determinar la identidad del VVZ en vacunas de virus vivo. Toda la vacuna a granel y productos intermedios del granel han sido calificados como muestras mediante este método.

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC

Firm. MARIA CECILIA CAMPOS
DIRECTORA TÉCNICA
MATRICULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

Dr. SANTIAGO RODRIGUE
DIRECTOR APROBADO PARA
ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS
MAT. NAC. 51.525



4.8 Procedimiento de control 9110.582: Observación microscópica de muestras de vacuna contra virus a granel para ausencia de células intactas

El Procedimiento de Control (CP) 9110.582 describe una Ensayo para la detección de impurezas derivadas del proceso. Esta Ensayo usa examen microscópico para confirmar la ausencia de células intactas en vacuna a granel.

Debido a que en este ensayo se usa observación microscópica para obtener resultados, no se pueden aplicar significativamente los parámetros de validación típicos a este procedimiento de Ensayo.

Calificación de la muestra:

El granel final es considerado como muestra para uso en el CP 9110.582 debido a que no se observaron células intactas durante una revisión de los datos históricos.

Conclusión:

Se considera que el granel final está calificado como muestra para uso en este Procedimiento de Control.

4.9 Procedimiento de control 9110.654: Ensayo de antígeno de varicela (ELISA de glicoproteína competitiva)

El Procedimiento de Control (CP) 9110.654 describe una Ensayo para identificar y cuantificar el ingrediente activo, antígeno de glicoproteína del virus de varicela zóster (VVZ) en vacuna a granel.

En la [Tabla 23] se encuentra un resumen de cada parámetro evaluado durante la validación del método. Los parámetros de ensayo abordados fueron especificidad, exactitud relativa, precisión intra-ensayo, precisión inter-ensayo, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), repetibilidad, robustez, linealidad y el rango utilizable.

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

Farm. MARÍA CECILIA CAMPOS
DIRECTORA TÉCNICA
MATRICULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

Dr. SANTIAGO RODRIGUE
DIRECTOR APODERADO PARA
ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS
MAT. NAC. 61.625

