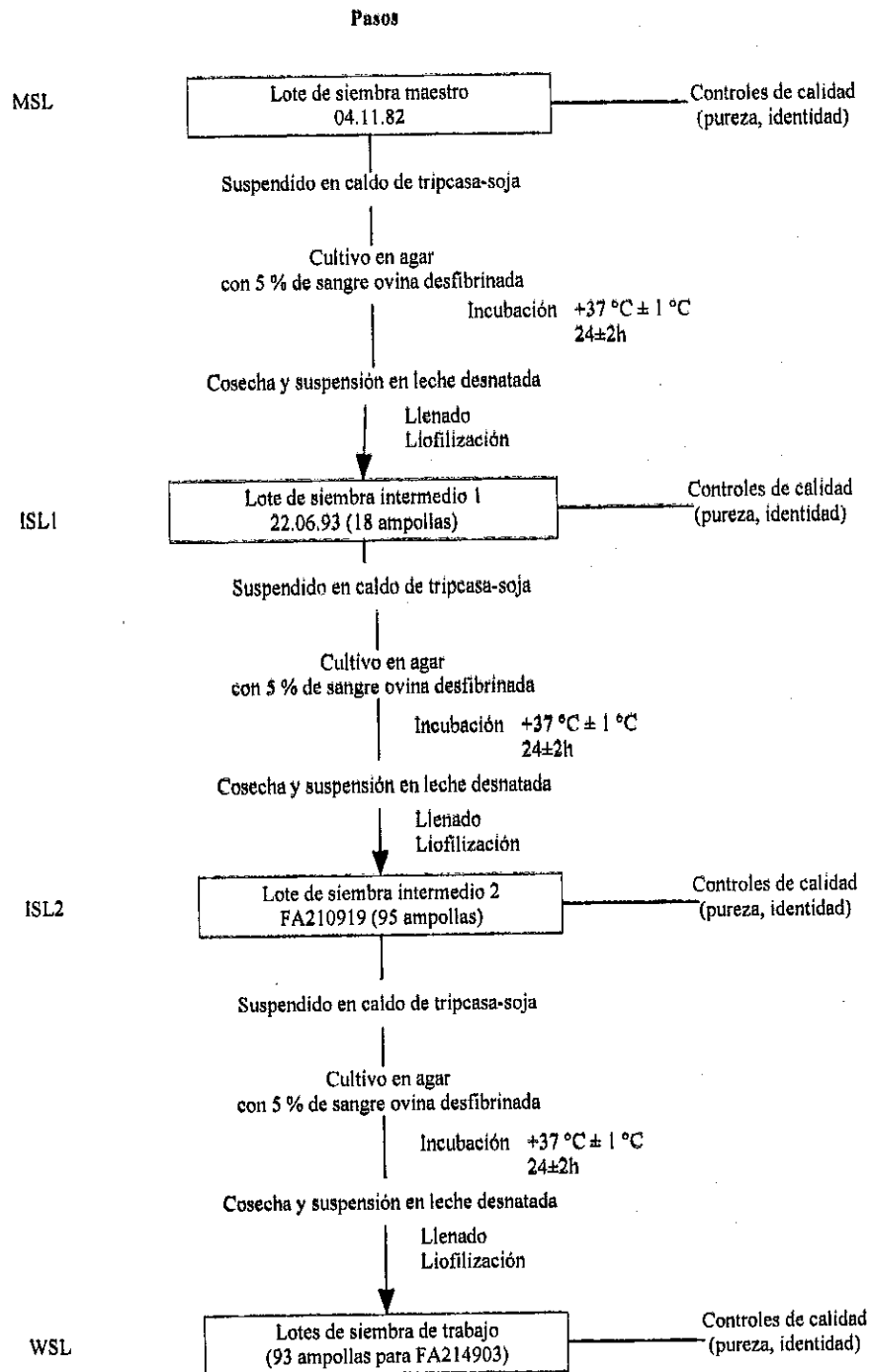




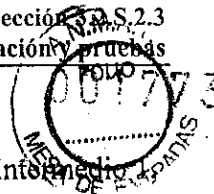
Figura 3: Preparación de los lotes de siembra de trabajo



La preparación del WSL consta de tres pasos:

- 1) Preparación del lote de siembra intermedio 1 (ISL1) a partir del lote de siembra maestro,





- 2) Preparación del lote de siembra intermedio 2 (ISL2) a partir del lote de siembra intermedio 1 (ISL1).
- 3) Preparación del lote de siembra de trabajo a partir del lote de siembra intermedio 2.

Tanto el proceso como los materiales de inicio empleados en la producción de los lotes ISL1, ISL2 y WSL son los mismos en cada paso.

1) Preparación del lote de siembra intermedio 1 (ISL1)

- Inóculo: una ampolla liofilizada de MSL.
- Preparación: la ampolla liofilizada de MSL se resuspende en caldo de trip casa de soja, se inocula en agar con 5 % de sangre ovina desfibrinada y se incuba a $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 2 h. Luego se resuspende el cultivo en leche descremada estéril.
- Llenado: se llenan las ampollas con esta suspensión, bajo flujo de aire laminar vertical.
- Liofilización: la suspensión se liofiliza y las ampollas se sellan al vacío.

2) Preparación del lote de siembra intermedio 2 (ISL2)

- Inóculo: una ampolla liofilizada de ISL1.
- Preparación: la ampolla liofilizada de ISL1 se resuspende en caldo de trip casa de soja, se inocula en agar con 5 % de sangre ovina desfibrinada y se incuba a $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 2 h. Luego se resuspende el cultivo en leche descremada estéril.
- Llenado: se llenan las ampollas con esta suspensión, bajo flujo de aire laminar vertical.
- Liofilización: la suspensión se liofiliza y las ampollas se sellan al vacío.

3) Preparación de los lotes de siembra de trabajo (WSL)

- Inóculo: una ampolla liofilizada de ISL2.
- Preparación: la ampolla liofilizada de ISL2 se resuspende en caldo de trip casa de soja, se inocula en agar con 5 % de sangre ovina desfibrinada y se incuba a $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 2 h. Luego se resuspende el cultivo en leche descremada estéril.
- Llenado: se llenan las ampollas con esta suspensión, bajo flujo de aire laminar vertical.
- Liofilización: el WSL se distribuye en ampollas de vidrio tipo I de 0,5 mL. La suspensión se liofiliza y las ampollas se sellan al vacío.

Las ampollas liofilizadas de ISL y de WSL se conservan a $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El número de ampollas de ISL1, ISL2 y WSL producidas se presenta en la figura 3.





2 Medios de cultivo y soluciones utilizadas para la elaboración de lotes de siembra

2.1 Leche descremada

- Leche descremada en polvo
- Agua purificada

La solución se trata con vapor a alta temperatura.

2.2 Caldo de tripcasa de soja

Éste es un caldo listo para usarse que contiene:

- Peptona de caseína
- Fosfato disódico
- Glucosa
- Cloruro de sodio
- Peptona de soja
- Agua purificada

2.3 Agar con sangre ovina

2.3.1 Composición del agar:

- Agar base con sangre y triptosa
- Agua purificada

El agar se esteriliza con vapor a alta temperatura.

2.3.2 Agar con sangre ovina

El agar con sangre y triptosa se mezcla con agua purificada y esta preparación se esteriliza con vapor a alta temperatura. Luego, se le agrega 5 % de sangre ovina desfibrinada al agar previamente enfriado a +45 °C a +50 °C. El agar con sangre preparado de esta manera se vacía en tubos previamente esterilizados con vapor a alta temperatura.





3 Pruebas de control de calidad para los lotes de siembra

3.1 Especificaciones

Los controles de calidad realizados en el MSL, en el ISL1 y en el WSL son: identidad y pureza. El objetivo de estas pruebas es:

- Verificar que la cepa tenga las características de *C. diphtheriae*.
- Verificar que la cepa sea pura, es decir libre de contaminantes microbianos, después de sembrarla en los medios apropiados.

Las pruebas realizadas a los lotes de siembra de *C. diphtheriae*, así como sus criterios de aceptación, se presentan en la tabla 1.

Tabla 1: Pruebas y especificaciones de los lotes de siembra de *C. diphtheriae* (MSL, ISL y WSL)

Controles	Requeridos por	Métodos	Criterios de aceptación
Prueba de pureza	Ph. Eur. 0153, edición actual	Características de crecimiento en diversos medios	Cumple (ausencia de contaminantes)
Pruebas de identidad: - Examen morfológico - Características de crecimiento Características bioquímicas: - Catalasa - Identificación bioquímica	Ph. Eur. 0153, edición actual	Tinción de Gram Características de crecimiento en diversos medios Prueba de catalasa Identificación API	Bacilos gram positivos Colonias de uno a tres mm de diámetro, rugosas e irregulares. Positivo Características del perfil metabólico bioquímico de la especie <i>C. diphtheriae</i> .

3.2 Procedimientos analíticos

3.2.1 Prueba de pureza

3.2.1.1 Principio

La finalidad de esta prueba es controlar la ausencia de contaminantes microbianos en los lotes de siembra de *C. diphtheriae* mediante el cultivo en diversos medios de cultivo sólidos.





3.2.1.2 Método

Se reconstituye una ampolla liofilizada en caldo de trip casa de soja. Después de incubarla a entre +35 °C y +38 °C durante 48 a 72 horas, esta suspensión se inocula en:

- agar de trip casa de soja,
- agar de trip casa de soja con 5 % de sangre ovina,
- medio de Loeffler,
- agar Columbia con 5 % de sangre ovina.

Los medios se incuban a entre +35 °C y +38 °C durante por lo menos 5 días y se observan las placas todos los días.

3.2.1.3 Criterios de aceptación

Se observa una cepa pura (es decir, no se observan contaminantes microbianos) después de sembrarla en los medios apropiados y se observa crecimiento en todos los medios sembrados.

3.2.2 Pruebas de identidad

3.2.2.1 Examen morfológico

3.2.2.1.1 Principio

La finalidad de esta prueba es determinar la morfología bacteriana mediante una tinción de Gram.

3.2.2.1.2 Método

Se reconstituye una ampolla liofilizada en caldo de trip casa de soja. Se inocula una gota de esta suspensión en agar Columbia con 5 % de sangre ovina y se incuba a entre +35 °C y +38 °C durante 24 horas. Se usa una colonia para hacer un frotis en un portaobjetos. Después de tefirlo, se observa el portaobjetos con un microscopio.

3.2.2.1.3 Criterios de aceptación

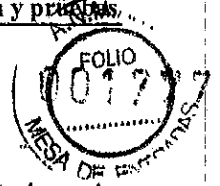
Se observan bacilos gram positivos (bacilos con extremos delgados, irregulares, por lo general puntiagudos o con forma de mazo, o ligeramente curvados, que permanecen en arreglos paralelos o en forma de letras del alfabeto).

3.2.2.2 Características de crecimiento

3.2.2.2.1 Principio

La finalidad de esta prueba es controlar las características de crecimiento mediante el cultivo en un medio de cultivo específico.





3.2.2.2 Método

Se reconstituye una ampolla liofilizada del lote de siembra en caldo de trip casa de soja. Se inocula una gota de esta suspensión en agar Columbia con 5 % de sangre ovina y se incuba a entre +35 °C y +38 °C durante 48 a 72 horas.

3.2.2.3 Criterios de aceptación

Se observan colonias de uno a tres milímetros de diámetro, rugosas e irregulares, después de 24 a 48 horas de incubación.

3.2.2.3 Características bioquímicas

3.2.2.3.1 Principio

La finalidad de esta prueba es identificar el lote de siembra de *C. diphtheriae* mediante la prueba de catalasa y la identificación según el sistema API®.

3.2.2.3.2 Método

- Catalasa: esta prueba se lleva a cabo utilizando las colonias que crecen en el agar Columbia que se usa para determinar las características de crecimiento. Se coloca una gota de reactivo de catalasa de color en el cultivo en la región de las colonias bien separadas.
- Identificación bioquímica: se inocula una bandeja de API® Coryne utilizando una suspensión del lote de siembra producido a partir de un cultivo de 24 horas en agar Columbia con sangre. La bandeja API® Coryne consta de 20 microtubos que contienen los sustratos deshidratados. Las reacciones producidas se detectan mediante los cambios de color espontáneos o revelados mediante la adición de reactivos.

3.2.2.3.3 Criterios de aceptación

- La catalasa es positiva.
- El perfil metabólico bioquímico es característico de la especie *C. diphtheriae*.

3.3 Datos de control de calidad de los lotes de siembra

Los resultados de liberación obtenidos para el MSL, el ISL1, el ISL2 y el WSL se presentan en la tabla 2. Todos los resultados cumplen con las especificaciones.





Tabla 2: Datos de control de calidad para *Corynebacterium diphtheriae*

Controles	Criterios de aceptación	Resultados				
		MSL 04.11.82	ISL1 22.06.93	ISL2 FA210919	WSL FA214903	WSL FA241705
Prueba de pureza	Ausencia de contaminación	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Pruebas de identidad						
- Examen morfológico	Bacilos gram positivos	Bacilos gram positivos	Bacilos gram positivos	Bacilos gram positivos	Bacilos gram positivos	Bacilos gram positivos
- Características de crecimiento	Colonias de uno a tres mm de diámetro, rugosas e irregulares.	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
- Características bioquímicas						
.Catalasa	Positivo	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
.Identificación bioquímica	Características del perfil metabólico bioquímico de la especie <i>C. diphtheriae</i>	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple



2.3.S.4

Control del Principio Activo - Diftérico


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





Sección 2.3.S.4, Control del principio activo

Índice

Lista de tablas	2
1 Especificaciones	3
2 Procedimientos analíticos	4
2.1 Contenido de formaldehído libre	4
3 Validación de los procedimientos analíticos	4
3.1 Contenido de formaldehído libre	4
4 Análisis de lote	4
5 Justificación de las especificaciones	5
5.1 Título de floculación	5
5.2 Contenido de nitrógeno proteico	5
5.3 Pureza antigénica	5
5.4 Contenido de formaldehído libre	6
5.5 Esterilidad	6
5.6 Ausencia de toxina (toxicidad específica)	6
5.7 Irreversibilidad del toxoide	6



Lista de tablas

Tabla 1: Especificaciones para el toxoide diftérico purificado3
Tabla 2: Descripción de los lotes clínicos de toxoide diftérico purificado5
Tabla 3: Datos de análisis de lote de toxoide diftérico purificado5

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

