



- Segundo cultivo:

El primer cultivo se suspende en caldo de tripcasa de soja y se cultiva en Bordet Gengou con sangre ovina desfibrinada de 42 a 48 horas a + 37 °C ± 1 °C.

- Tercer cultivo:

El segundo cultivo se inocular en Bordet Gengou con sangre ovina desfibrinada durante 24 ± 2 horas a + 37 °C ± 1 °C. Luego, este cultivo se suspende en una solución de leche descremada estéril.

Liofilización

La suspensión bacteriana se transfiere a ampollas (0,2 mL por ampolla) bajo un flujo de aire laminar vertical y luego se liofiliza.

Al final de la etapa de liofilización, las ampollas se sellan al vacío y se mantienen a + 5 °C ± 3 °C.

A algunas ampollas se les realizan pruebas de control de calidad tal como se describirá más adelante (vea el párrafo 3.2).



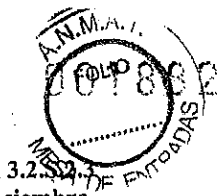
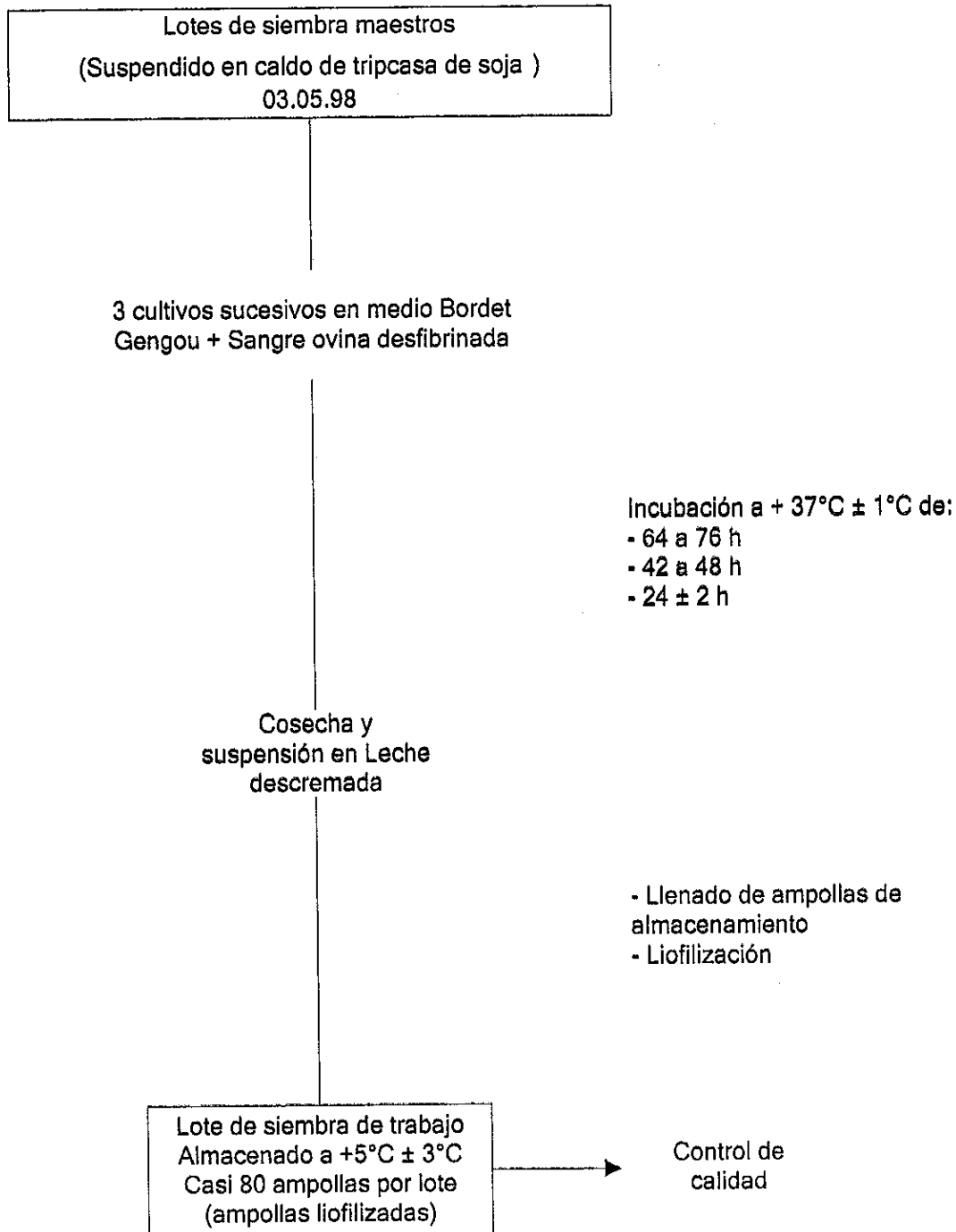
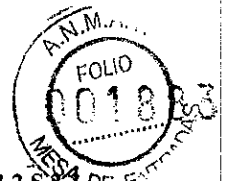


Figura 4: Preparación del lote de siembra de trabajo (WSL)







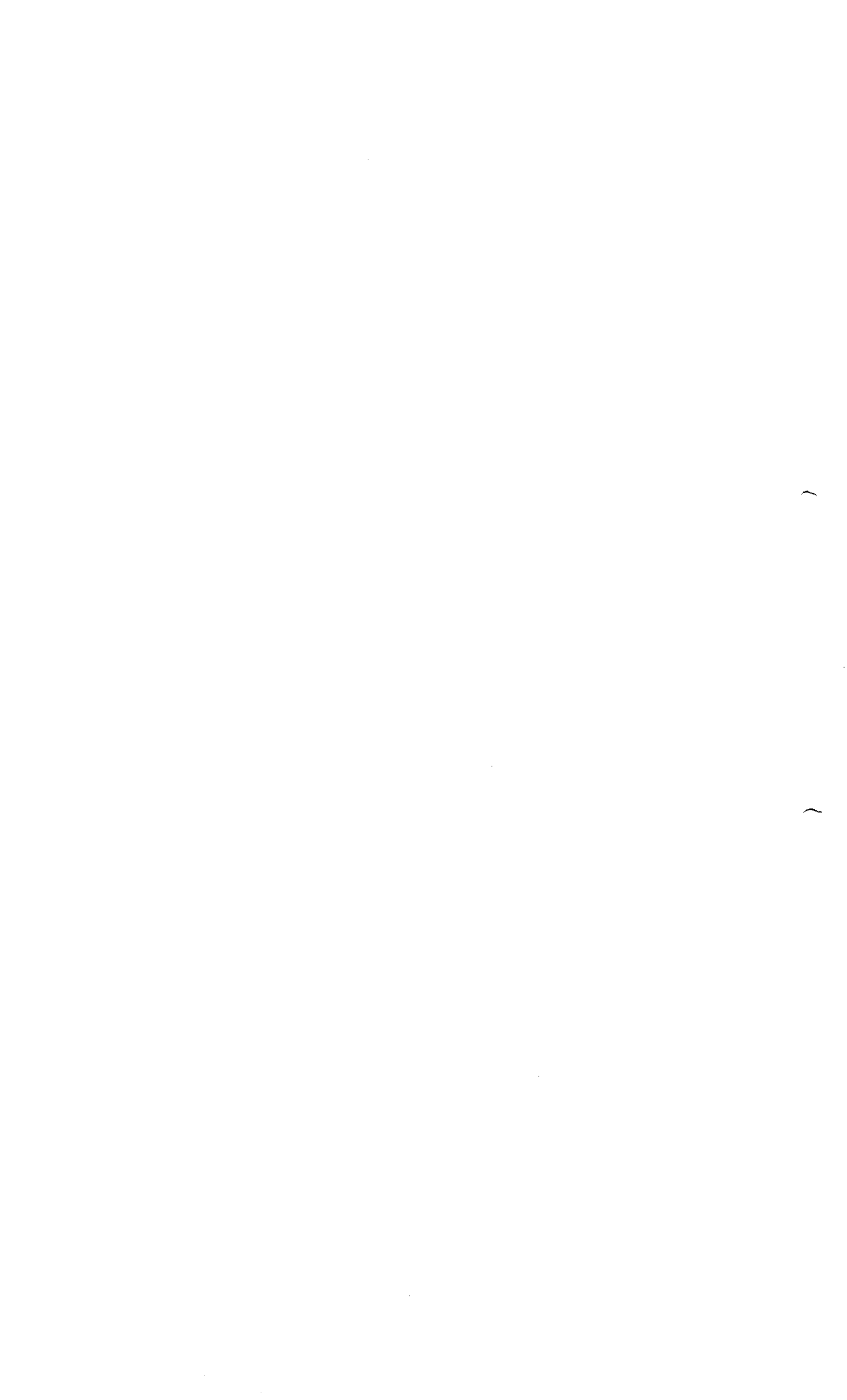
2 Medios de cultivo y soluciones utilizadas para la elaboración de los lotes de siembra

2.1 Caldo de tripcasa de soja

La composición del caldo de tripcasa de soja se describe en 3.2.S.2.2 Cultivo celular y cosecha.

2.2 Medio de Bordet Gengou

La composición del medio de Bordet Gengou se describe en 3.2.S.2.2 Cultivo celular y cosecha.





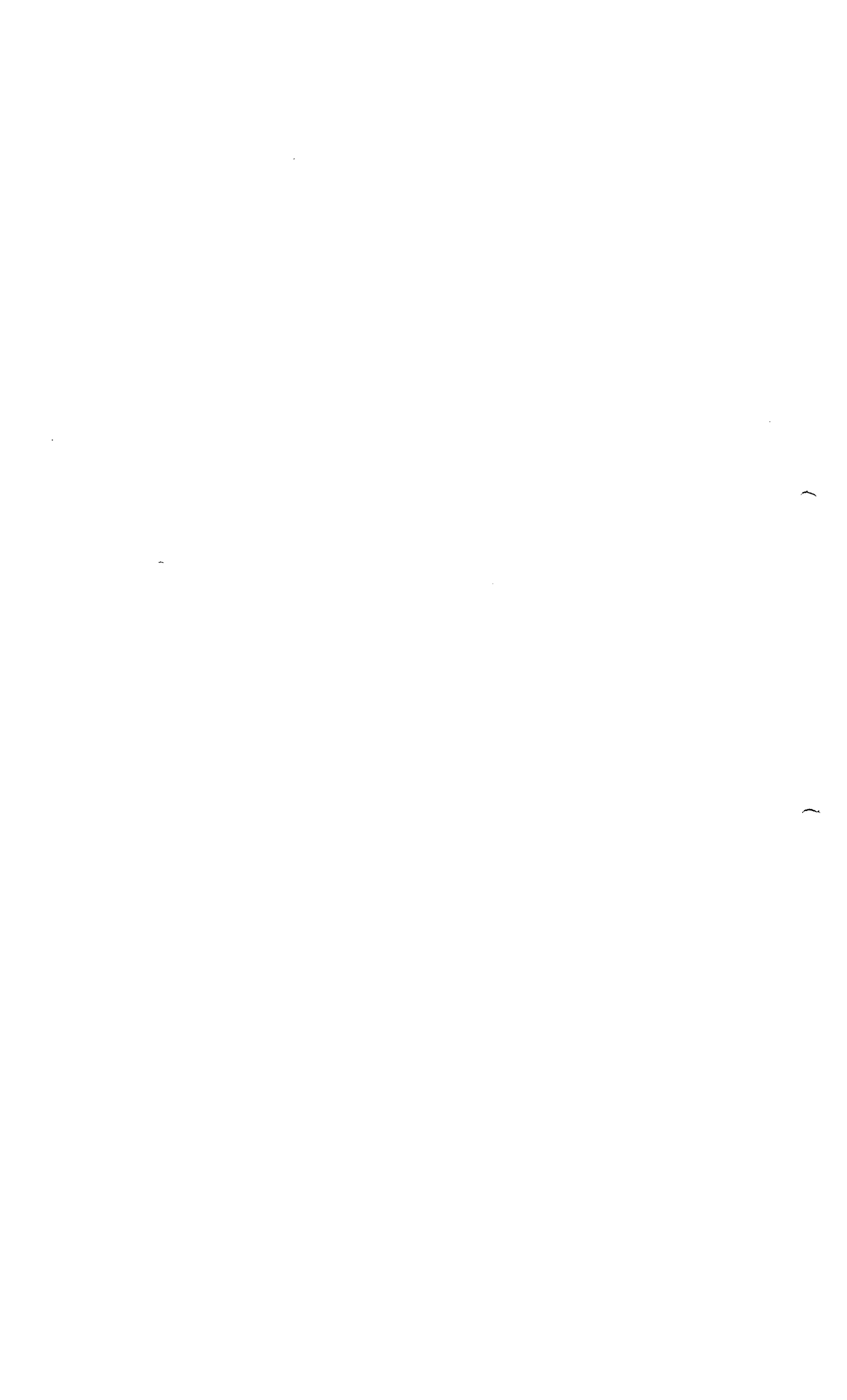
3 Pruebas de control de calidad para los lotes de siembra

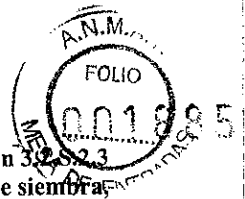
3.1 Especificaciones

Las pruebas de liberación, realizadas en el MSL y el WSL de *Bordetella pertussis* para controlar la identidad y la pureza de la cepa, se detallan en la Tabla 1. Varias de las características fenotípicas y genotípicas de la cepa se analizan a partir del pre-MSL, de manera tal que se establece la estabilidad genética de la cepa.

Tabla 1: Especificaciones para *Bordetella pertussis* (pre-MSL, MSL y WSL)

Controles	Requeridos por	Métodos	Criterios de aceptación
Prueba de pureza	Ph. Eur. 1053, edición actual	Características de crecimiento en varios medios	Cumple (ausencia de contaminantes)
Prueba de identidad: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Características de crecimiento ➤ Examen morfológico ➤ Características bioquímicas: <ul style="list-style-type: none"> ✓ Ureasa ✓ Oxidasa ➤ Características antigénicas 	Ph. Eur. 1053, edición actual	Tinción de Gram Características de crecimiento en varios medios Prueba de ureasa Prueba de oxidasa	Cumple (se observan pequeñas colonias convexas y blandas con un aspecto opaco y brillante, y un color gris metálico) Cocobacilo gram-negativo Negativo Positivo Aglutinación en portaobjeto con antisuero específico Antisuero de <i>B. pertussis</i> de fase 1 Positivo Control negativo Aglutinógeno 1 Positivo Aglutinógeno 2 negativo Aglutinógeno 3 Positivo





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 en los lotes de siembra de *Bordetella pertussis* mediante el cultivo en diversos medios de cultivo.

3.2.1.2 Método

Se reconstituye una ampolla liofilizada del MSL o de WSL en medio de Verwey. Luego, se inocula una alícuota en agar Bordet Gengou más sangre ovina durante al menos 5 días. Otra alícuota se amplifica en medio de Verwey durante 72 h. La última suspensión se transmite a través de:

- Agar de tripcasa de soja,
- Agar de tripcasa de soja + sangre ovina,
- Agar de Bordet Gengou + sangre ovina.

Los cultivos se incuban a $+ 36,5 \text{ °C} \pm 1,5 \text{ °C}$ durante 5 días. Se observan regularmente los cultivos para determinar las características de crecimiento.

3.2.1.3 Criterios de aceptación

Cepa pura (es decir, sin contaminación) después de la siembra en el medio correspondiente (agar de Bordet Gengou + sangre ovina).

No se observa crecimiento alguno en ninguno de los otros medios.





3.2.2 Prueba de identidad

3.2.2.1 Características de crecimiento

3.2.2.1.1 Principio

La finalidad de esta prueba es estudiar las características de crecimiento de la *Bordetella pertussis* en el medio correspondiente.

3.2.2.1.2 Método

Se reconstituye una ampolla liofilizada del MSL o del WSL en medio de Verwey y luego una gota de esta suspensión se inocula en agar de Bordet Gengou más sangre ovina durante al menos 48 h.

3.2.2.1.3 Criterios de aceptación

Se observan colonias pequeñas de aproximadamente 0,5 mm de diámetro, redondas, suaves y convexas como gotas de mercurio con un área hemolizada alrededor.

3.2.2.2 Morfología y tinción de Gram

3.2.2.2.1 Principio

La finalidad de esta prueba es determinar la morfología bacteriana mediante la tinción de Gram. Las bacterias Gram positivas retienen el cristal violeta después de ser lavadas con etanol al 95 %, mientras que las bacterias Gram negativas pierden el colorante púrpura.

3.2.2.2.2 Método

Después de fijar el frotis bacteriano en un portaobjetos, se tifican las células con cristal violeta y se enjuagan con agua. Posteriormente, se recubre el portaobjetos con una solución de yodo de Gram y se enjuaga nuevamente con agua. Luego se destiñen las células con una solución de ácido acético y etanol, se enjuagan con agua y se realiza una tinción de contraste con safranina. Finalmente, se enjuagan las bacterias con agua y se secan. Se examinan las muestras con un microscopio.

3.2.2.2.3 Criterios de aceptación

Presencia de pequeños cocobacilos gram negativos.



3.2.2.3 Características bioquímicas

3.2.2.3.1 Principio

La finalidad de esta prueba es identificar los lotes de siembra de *Bordetella pertussis* por sus actividades enzimáticas de ureasa y oxidasa.

3.2.2.3.2 Método

- Ureasa: esta prueba se lleva a cabo en una suspensión de crecimiento de colonias en agar de Bordet Gengou. Se agrega 0,25 mL de esta suspensión a un reactivo de ureasa y se mantiene a $36,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 18 a 24 horas.
- Oxidasa: la prueba se lleva a cabo colocando una colonia única de *Bordetella pertussis* en un reactivo de oxidasa.

3.2.2.3.3 Criterios de aceptación

- Ureasa: la *Bordetella pertussis* no presenta actividad enzimática (suspensión incolora).
- Oxidasa: la *Bordetella pertussis* presenta actividad enzimática (color azul).

3.2.2.4 Características antigénicas

3.2.2.4.1 Principio

La actividad antigénica de la *Bordetella pertussis* se evalúa mediante aglutinación en portaobjetos con antisueros específicos en relación con los sueros antipertúsicos de fase 1 (control positivo) y solución salina fisiológica (control negativo).

3.2.2.4.2 Método

Se toma una muestra de cultivo bacteriano de 40 a 48 horas de edad y una gota de este se mezcla con una gota de cada antisuero diferente. Los controles negativos son antisueros incubados en ausencia de bacterias.

Se registra la presencia o ausencia de aglutinación.

3.2.2.4.3 Criterios de aceptación

La *Bordetella pertussis* se aglutina con el antisuero pertúsico de fase 1 y con el aglutinógeno 1 y 3, pero no con el aglutinógeno 2.

4 Datos de control de calidad de los lotes de siembra de *Bordetella pertussis*

Los resultados de liberación obtenidos para el MSL 03.05.98A y para los WSL FA220626, FA299664 y FA299007 se proporcionan en la Tabla 2. Todos los lotes cumplen con las especificaciones.

Tabla 2: Datos de control de calidad para la *Bordetella pertussis*

Controles	Criterios de aceptación	Resultados (fecha de elaboración)			
		MSL 03.05.98.B -	WSL FA220626 30 sept 2005	WSL FA299664 25 se enero de 2008	WSL FA299007 18 Ene 2008
Prueba de pureza	Ausencia de contaminantes	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Pruebas de identidad					
➤ Examen morfológico	Cocobacilos gram negativos	Bacilos gram-positivos	Bacilos gram-positivos	Bacilos gram-positivos	Bacilos gram-positivos
➤ Características de crecimiento	Se observan colonias suaves, convexas y pequeñas con aspecto brillante, opaco y un tono grisáceo metálico	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
➤ Características bioquímicas					
✓ Ureasa	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
✓ Oxidasa	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
➤ Características antigénicas					
✓ Antisuero de pertussis de fase 1	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
✓ Aglutinógenos	Aglutinógeno 1 : Positivo Aglutinógeno 2 : negativo Aglutinógeno 3 : Positivo	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple





2.3.S.4

Control del Principio Activo - FHA PTxd


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

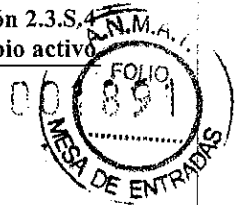

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.



Sección 2.3.S.4 Control del principio activo

Índice

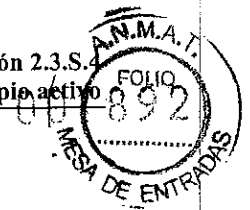
Lista de tablas	2
1 Especificaciones	3
2 Procedimientos analíticos	4
2.1 Contenido de aluminio	4
2.2 Identificación del PTxd y la FHA	4
2.3 Actividad dermonecrótica residual en FHA	4
3 Validación de los procedimientos analíticos	4
3.1 Contenido de aluminio	5
3.2 Identificación del PTxd y de la FHA	5
3.3 Actividad dermonecrótica residual de la FHA	5
4 Análisis de lotes	5
4.1 Lotes de uniformidad utilizados en la elaboración del producto medicinal formulado optimizado	5
4.2 Lotes de producción actuales	7
5 Justificación de las especificaciones	8
5.1 Contenido de aluminio	8
5.2 Medición de pH	9
5.3 Identificación de los antígenos purificados adsorbidos	9
5.4 Prueba de actividad dermonecrótica residual	9
5.5 Prueba de esterilidad	9



Lista de tablas

Tabla 1: Especificaciones para el toxoide pertúsico purificado adsorbido3
Tabla 2: Especificaciones para la hemaglutinina filamentosa purificada adsorbida3
Tabla 3: Descripciones de los lotes para la FHA purificada adsorbida (Lotes de uso clínico)5
Tabla 4: Descripciones de los lotes para el PTxd purificado adsorbido (Lotes de uso clínico)6
Tabla 5: Análisis de lote para la FHA purificada adsorbida (Lotes de uso clínico)6
Tabla 6: Análisis de lote para el PTxd purificado adsorbido (Lotes de uso clínico)6
Tabla 7: Descripciones de los lotes para la FHA purificada adsorbida (Lotes de producción)7
Tabla 8: Descripciones de los lotes para el PTxd purificado adsorbido (Lotes de producción)7
Tabla 9: Datos de análisis de lote para la FHA purificada adsorbida (Lotes de producción)8
Tabla 10: Datos de análisis de lote para el PTxd purificado adsorbido (Lotes de producción)8





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

1 Especificaciones

Las especificaciones del principio activo para el toxoide pertúsico purificado adsorbido (PTxd) y la hemaglutinina filamentosa purificada adsorbida (FHA) se enumeran en la tabla 1 y la tabla 2.

Tabla 1: Especificaciones para el toxoide pertúsico purificado adsorbido

Pruebas	Requisitos	Métodos	Criterios de aceptación
Contenido de aluminio	/	Según la Ph. Eur. 2.5.13, edición actual Ensayo de complejometría	De 0,6 a 1,4 mg Al/mg de proteínas
Medición de pH	/	Ph. Eur. 2.2.3, edición actual Método potenciométrico	De 6,2 a 8,2
Identificación del toxoide pertúsico	Ph. Eur. 1356, edición actual TRS 878	Ph. Eur. 2.7.1, edición actual Método inmunoquímico Método de difusión doble en gel de Ouchterlony	Positivo
Prueba de esterilidad	Ph. Eur. 1356, edición actual TRS 878	Ph. Eur. 2.6.1, edición actual Filtración por membrana	No se observa crecimiento microbiano

Tabla 2: Especificaciones para la hemaglutinina filamentosa purificada adsorbida

Pruebas	Requisitos	Métodos	Criterios de aceptación
Contenido de aluminio	/	Según la Ph. Eur. 2.5.13, edición actual Ensayo de complejometría	De 0,6 a 1,4 mg Al/mg de proteínas
Medición de pH	/	Ph. Eur. 2.2.3, edición actual Método potenciométrico	De 6,2 a 8,2
Identificación de la FHA	Ph. Eur. 1356, edición actual TRS 878	Ph. Eur. 2.7.1, edición actual Método inmunoquímico Método de difusión doble en gel de Ouchterlony	Positivo
Actividad dermonecrótica residual	Ph. Eur. 1356, edición actual TRS 878	Ph. Eur. 1356, edición actual Inyección intradérmica en ratones lactantes	No se observó reacción necrótica (++++) o reacción hemorrágica marcada (+++) en ninguno de los ratones lactantes después de las 72 h de la inyección
Prueba de esterilidad	Ph. Eur. 1356, edición actual TRS 878	Ph. Eur. 2.6.1, edición actual Filtración por membrana	No se observa crecimiento microbiano

