

### 3.2.5.6 Cinética de inactivación

- Principio

La cinética de inactivación se obtiene determinando el título infeccioso de la suspensión viral monovalente antes de añadir formaldehído y después de 24, 48, 72 y 96 horas de inactivación.

El título infeccioso se determina inoculando diluciones sucesivas de suspensión viral en células Hep-2 y examinando el efecto citopático. Se expresa en DICC<sub>50</sub>/mL.

- Equipo

Equipo estándar para laboratorio de virología.

- Reactivos

Ver el capítulo 3.2.3.2 (concentración de poliovirus).

- Solución de antibióticos

Sulfato de penicilina

Dihidroestreptomicina.

Almacene a <-20 °C.

- Solución de PBS diluida en agua purificada ultrafiltrada estéril:

PBS sin calcio ni magnesio [10 x C].

Solución antibiótica.

Almacenamiento a +5 ± 3 °C.

- Solución de tripsina-Versene EDTA diluida en agua purificada ultrafiltrada estéril:

Tripsina-Versene EDTA Eurobio [10 x C].

PBS [10 x C] sin calcio ni magnesio.

Almacene a +5 ± 3 °C.

- Medio de dilución e inoculación (MEM)

Suero fetal de ternero.

MEM [1 x C] con rojo de fenol

+ antibióticos + bicarbonato de sodio (2,2 g/L) + COAlmacenamiento a +5 ± 3 °C.

- Procedimiento operativo

- Muestra a analizar.

Suspensiones monovalentes en los momentos T0 – 24 h – 48 h – 72 h y 96 h.

Todas las operaciones se deben llevar a cabo en condiciones estériles.

- Preparación de la dilución viral



Para muestras recolectadas en T0, 24 h y 48 h: producir diluciones en proporción de 10 (por ejemplo: 0,2 mL + 1,8 mL de medio de dilución).

Para muestras recogidas a las 48 h, 72 h y 96 h: produzca una dilución primaria a razón de 1/2 (por ejemplo 1 mL + 1 mL de medio de dilución) seguida de diluciones en proporción de 4 (0,5 mL + 1,5 mL de medio de dilución).

- Preparación y distribución de la suspensión celular.

Prepare una suspensión que contenga aproximadamente 80 000 células/mL diluidas en el medio de inoculación, de un matraz de células Hep-2 sembradas 2 a 4 días antes.

Distribuya 0,1 mL de suspensión celular por pocillo.

- Distribución de la dilución viral en la microplaca.

Distribuya 0,05 mL de medio de dilución en todos los pocillos de las 10 primeras columnas.

Distribuya 0,1 mL de medio en la 12.<sup>a</sup> columna: control celular.

Las diluciones inoculadas serán las siguientes:

D0	$10^{-7} - 10^{-8} - 10^{-9} - 10^{-10}$	} distribuya 0,05 mL/pocillo en 10 pocillos.
24 h	$10^{-3} - 10^{-4} - 10^{-5} - 10^{-6}$	
48 h	$10^{-1} - 10^{-2} - 10^{-3} - 10^{-4}$	
48 h	$10^{-0.3} - 10^{-0.9} - 10^{-1.5} - 10^{-2.1}$	} distribuya 0,05 mL/pocillo en 6 pocillos.
72 h	$10^{-0.3} - 10^{-0.9} - 10^{-1.5} - 10^{-2.1}$	
96 h	$10^{-0.3} - 10^{-0.9} - 10^{-1.5} - 10^{-2.1}$	

Colocar las placas en una cámara a  $+36 \pm 1$  °C,  $5 \pm 1$  % CO<sub>2</sub> durante 7 u 8 días.

- Lectura; cálculo; resultados

Lea los efectos citopáticos con un microscopio invertido tras 7 u 8 días de incubación.

Cálculo de los títulos según el método de Spearman y Kärber u otro método estadístico equivalente (por ejemplo el método de los cuadrados mínimos).

El resultado se expresa en DICC<sub>50</sub>/mL.

Calcular la pendiente cinética con los resultados de la DO a T0, 24 h y 48 h.

Los resultados a las 72 y 96 horas no se conservan para el cálculo estadístico porque estos títulos suelen ser más bajos al principio de la detección de la técnica.

- Criterios de validez

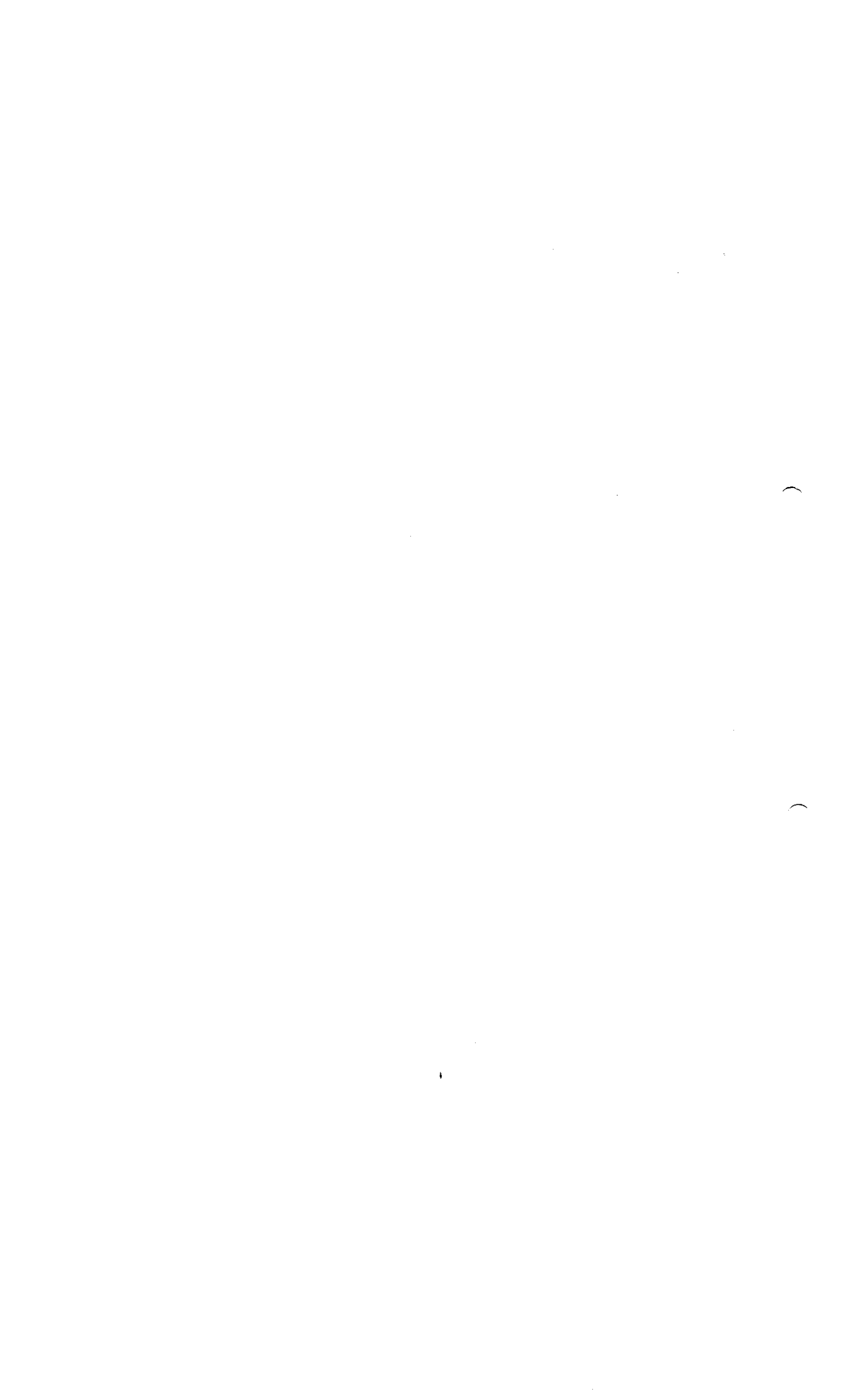
La prueba se considera válida si:

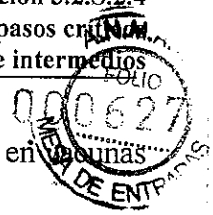
- El control celular no muestra alteración alguna de la capa celular.
- El perfil de cinética de inactivación es comparable al obtenido generalmente para cada tipo de virus.

Si uno de los tiempos cinéticos no es válido, repetir la cinética completa.

### 3.2.5.7 Prueba de inactivación efectiva

- Principio





El objetivo de la prueba es verificar la ausencia de virus infecciosos de la poliomielitis en vacunas monovalentes inactivadas.

La prueba consiste en la amplificación de virus en células primarias de riñón de Cercopithecus.

El día 21 se realiza un desafío inoculando en cultivos celulares una suspensión de poliovirus objetivo que contiene 50 a 300 DICC<sub>50</sub>/mL.

La sensibilidad de los cultivos celulares al virus objetivo se comprueba por observaciones microscópicas para detectar el efecto citopático (CPE) característico entre los días 3 y 7 y por identificación del poliovirus en los líquidos sobrenadantes cosechados al final del desafío.

Si es necesario (por motivos prácticos), las operaciones programadas para los días 7, 14 y 21 de la prueba principal se pueden llevar a cabo varios días después. Hay que garantizar en todos los casos un intervalo mínimo de 7 días entre dos cosechas.

- Equipo

Equipo estándar utilizado en un laboratorio de cultivo celular y virología.

- Reactivos


- Cultivos confluentes de células renales primarias de mono (Vervet o Patas).
- Medio de cultivo: medio 199 con solución al 4 % de bicarbonato sódico al 5,6 % y con un 2 % de suero de ternero libre de inhibidores de los 3 tipos de virus de la poliomielitis (suero de ternero de donante o fetal).
- Suspensiones virales de referencia de la poliomielitis tipo 1, 2 y 3.

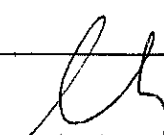
- Procedimiento operativo

Se toman dos muestras a los ¾ y al final del proceso de inactivación, correspondientes a los días 9 y 12.

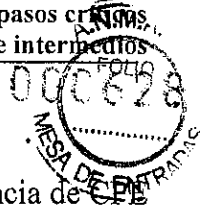
La prueba se lleva a cabo en 2 pasos sucesivos:

- En la primera etapa (prueba principal) se inoculan dos muestras en cultivos confluentes de células primarias de riñón de diferentes monos Cercopithecus y se observan durante 3 semanas. Durante este período, las células se mantienen realimentando los cultivos con medio fresco al menos 3 veces (los días 7, 14 y 21). Se realimenta medio fresco después de la cosecha, el mismo día. Se cosechan los líquidos sobrenadantes de forma aséptica y se inoculan. El día 21 se realiza un desafío inoculando en cultivos celulares una suspensión de poliovirus objetivo que contiene 50 a 300 DICC<sub>50</sub>/mL. La sensibilidad de los cultivos celulares al virus objetivo se comprueba por observaciones microscópicas para detectar el efecto citopático característico entre los días 3 y 7 y por identificación del poliovirus en los líquidos sobrenadantes cosechados al final del desafío.
- El segundo paso es otra fase de amplificación. Los líquidos sobrenadantes recogidos los días 7, 14 y 21 de la prueba principal se inoculan en un cultivo confluyente de células primarias de riñón de mono Cercopithecus diferente del utilizado en la prueba principal. El mantenimiento de subcultivos durante 14 días implica al menos una realimentación con medio fresco. Se analiza un mínimo del 2 % del líquido sobrenadante de cada matraz de cultivo de la prueba principal.

  
ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

  
CHRISTIAN DOMINGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.





- Lectura; cálculo; resultados

Utilizando un microscopio invertido, verificar las condiciones de las células y la ausencia de CPE durante la prueba principal y durante los subcultivos.

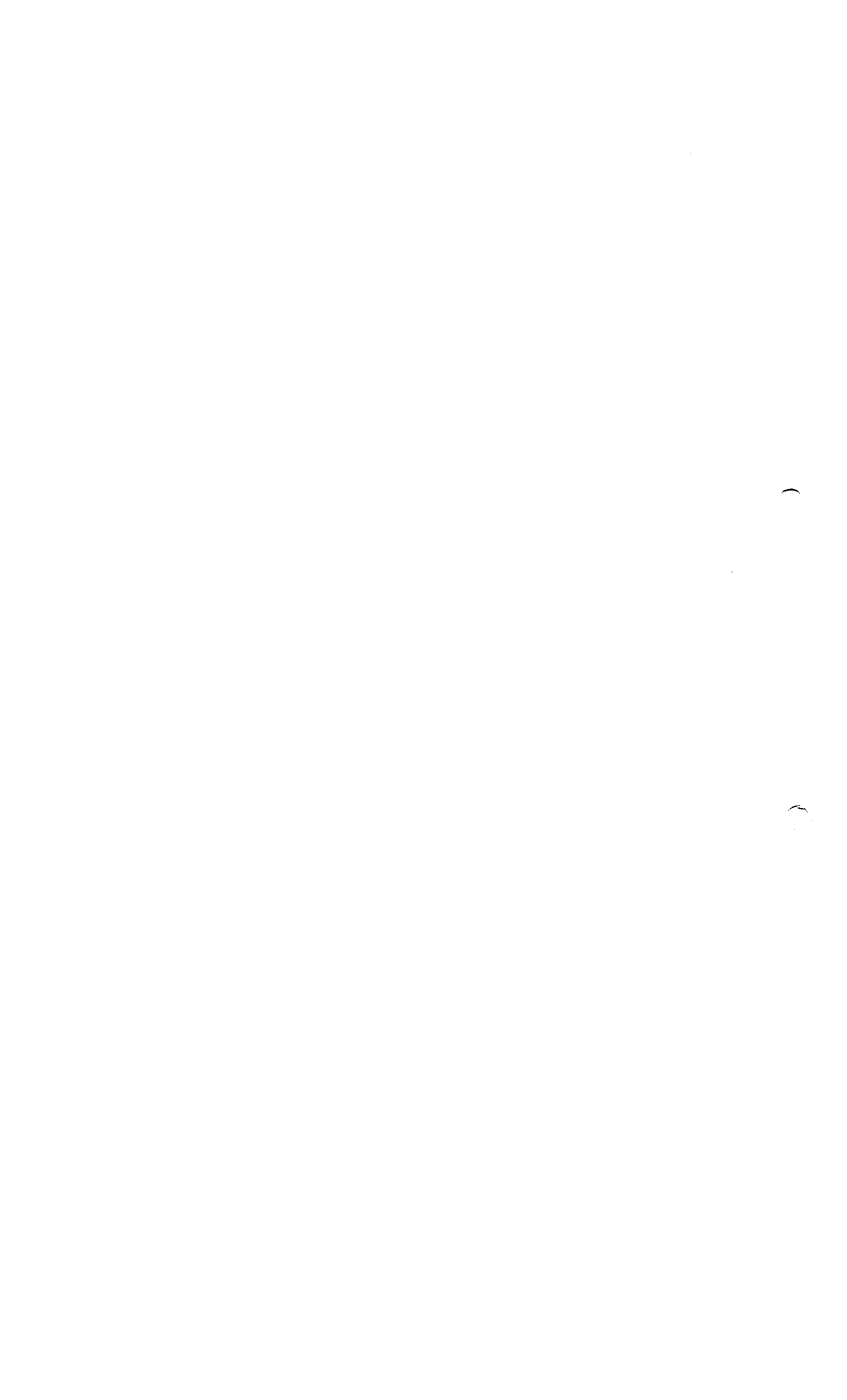
Los resultados se expresan como ausencia (0) o presencia (+) de CPE.

Una muestra de la vacuna monovalente inactivada supera la prueba si:

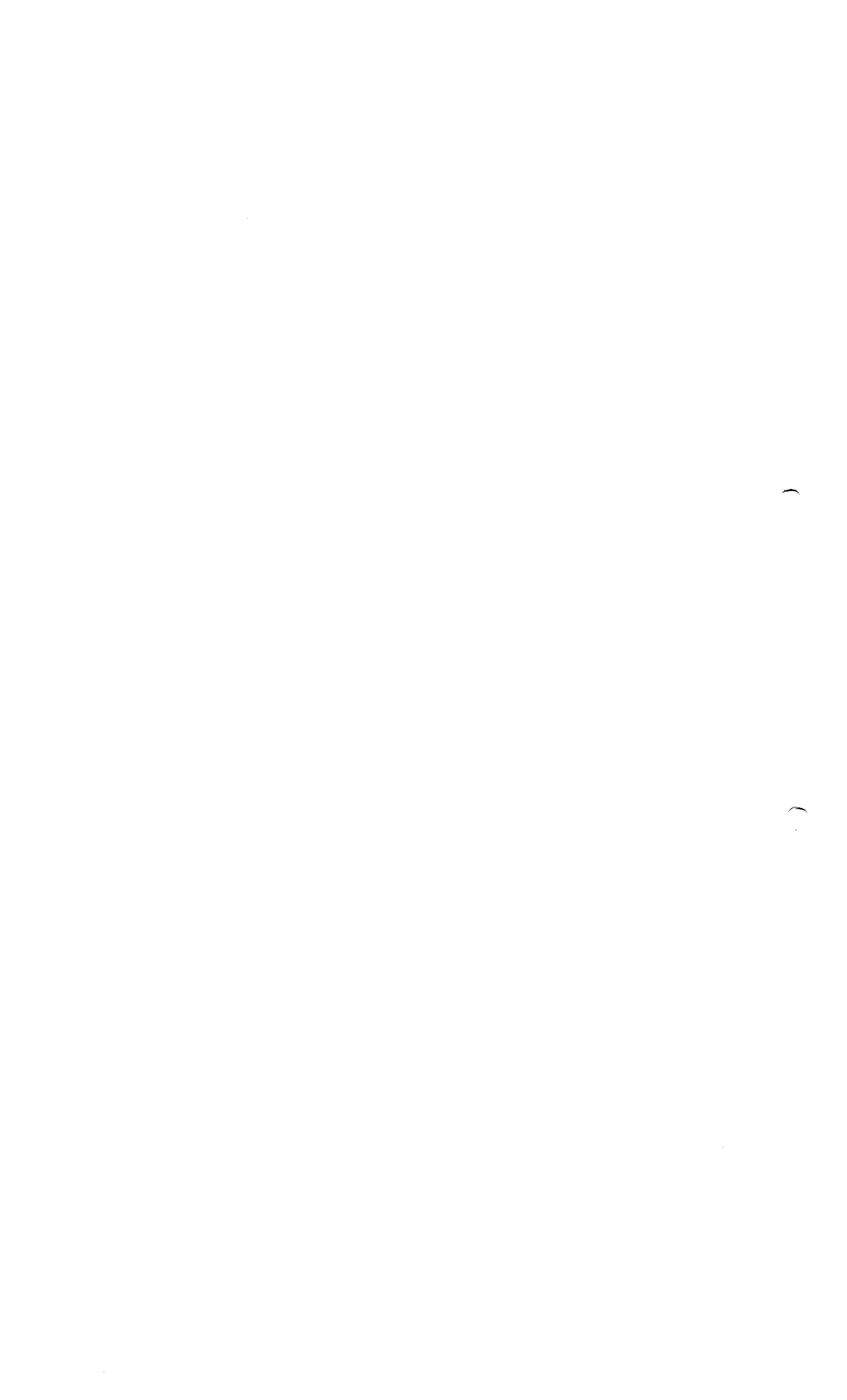
- Los resultados obtenidos son válidos.
- No se produjo CPE alguno durante toda la amplificación.
- Criterios de validez

Los resultados de la prueba son válidos si:

- El 80 % de la superficie celular de prueba se puede evaluar y menos del 20 % de las células se rechazan por motivos no específicos.
- El volumen de muestra correspondió a un mínimo de 1500 dosis humanas en cada una de las 2 muestras (día 9 y día 12). Las muestras se analizaron en cultivos celulares obtenidos de monos diferentes.
- Se produjo un CPE característico para el poliovirus de la vacuna monovalente analizada entre los días 3 y 7 tras del desafío con 50 a 300 DICC<sub>50</sub>/matraz de cultivo de 225cm<sup>2</sup>









**3.3.1.1.2 Resultados**

Los datos analizados se presentan en las siguientes tablas.

- Efecto citopático: límite positivo.

Los límites positivos para cada uno de los 6 experimentos y por tipo de virus se resumen en la tabla 13.

Los valores indicados son la última dilución positiva para la que se detectó efecto citopático.

**Tabla 13: Datos brutos para el efecto citopático**

Reovirus tipo 3	Adenovirus humano	Virus de la parainfluenza tipo 3	Virus del herpes simple tipo 1
10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-7</sup>
10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-7</sup>
10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-6</sup>
10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-6</sup>
10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-5</sup>
10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-5</sup>

- Hemadsorción con virus de la parainfluenza tipo 3: límite positivo.


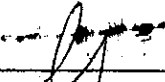
El límite positivo para la prueba de hemadsorción con el virus de la parainfluenza se resume en la tabla 14:

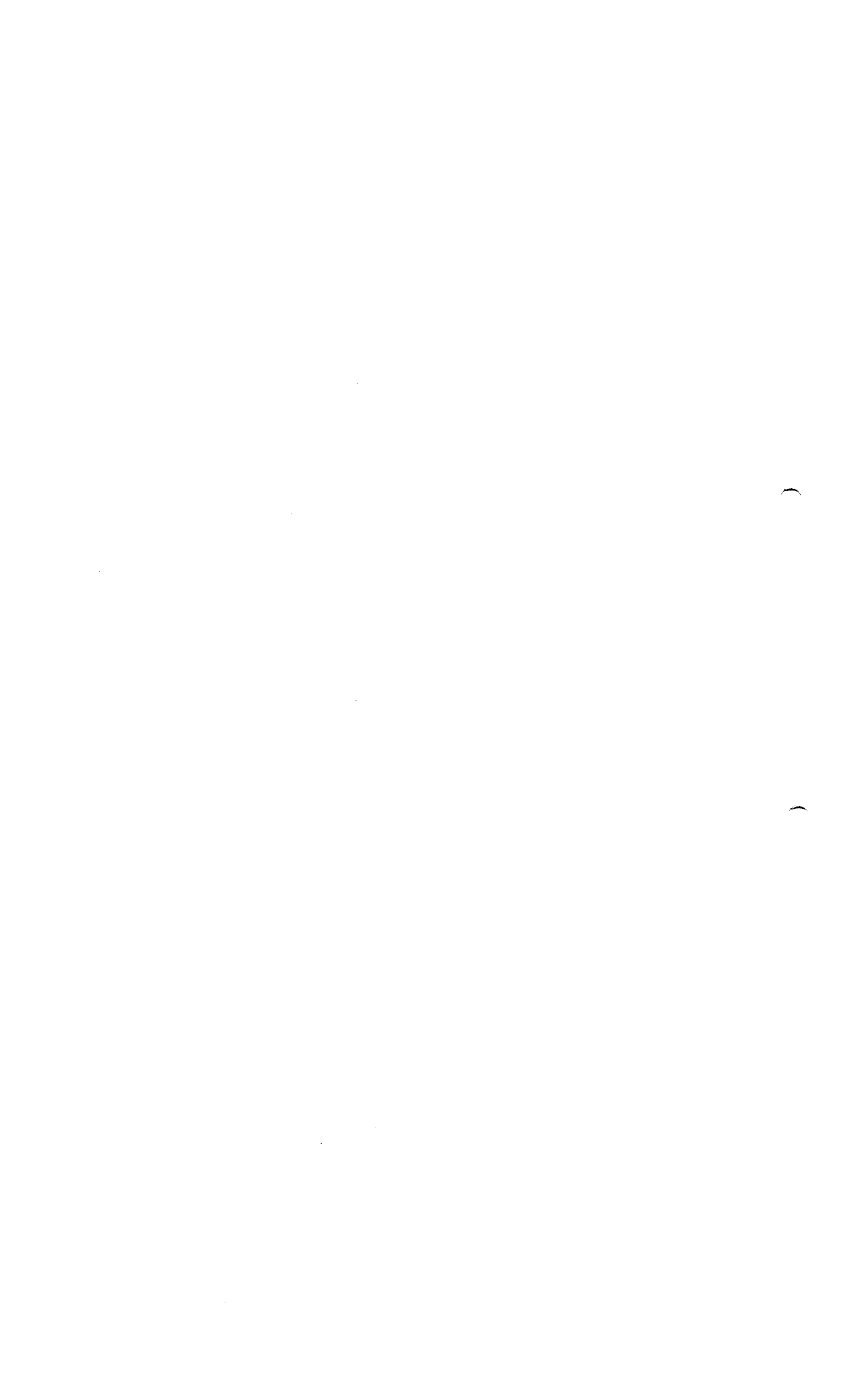
**Tabla 14: Datos brutos para la prueba de hemadsorción**

Virus de la parainfluenza tipo 3
10 <sup>-3</sup>
10 <sup>-3</sup>
10 <sup>-3</sup>
10 <sup>-3</sup>
10 <sup>-3</sup>
10 <sup>-3</sup>

**3.3.1.1.3 Especificidad**

Los efectos citopáticos observados en matraces infectados fueron característicos de la familia de los virus inoculados. Los controles celulares, introducidos en cada experimento y sometidos al mismo procedimiento, salvo la infección, no presentaron daños: no mostraron signos de infección, toxicidad, contaminación bacteriana o fúngica ni signos de envejecimiento o sufrimiento celular.

  
 ROXANA MONTEMILONE  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 SANOFI PASTEUR S.A.  
  
 CHRISTIAN DOMINGUEZ  
 APODERADO  
 SANOFI PASTEUR S.A.





- Efecto citopático

El objetivo del análisis estadístico es definir la mínima concentración de virus de la polio que se puede detectar en el cultivo celular de control de la vacuna antipoliomielítica inactivada (células Vero).

Consta de los siguientes pasos:

- Cálculo de la media y de la desviación estándar de la respuesta.
- Cálculo del intervalo de confianza del 95 % de la media

**Tabla 15: Resultados estadísticos del efecto citopático**

	Reovirus tipo 3	Adenovirus humano	Virus de la parainfluenza tipo 3	Virus del herpes simple tipo 1
Media de las respuestas	-6,50	-4,00	-3,00	-6,00
Desviación estándar de las respuestas	1,05	0,00	0,00	0,89
Intervalo de confianza del 95% de la media	[-7,60 ; -5,40]	No hay intervalo de confianza porque la desviación estándar es igual a 0.	No hay intervalo de confianza porque la desviación estándar es igual a 0.	[-6,94 ; -5,06]

- Hemadsorción

**Tabla 16: Resultados estadísticos de la hemadsorción con virus de la parainfluenza tipo 3**

	Virus de la parainfluenza tipo 3
Media de las respuestas	-3,00
Desviación estándar de las respuestas	0,00
Intervalo de confianza del 95% de la media	No hay intervalo de confianza porque la desviación estándar es igual a 0.

### 3.3.1.1.4 Conclusión

Se establecen límites del efecto citopático para:

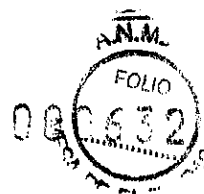
- El reovirus tipo 3.
- El adenovirus humano.
- El virus de la parainfluenza tipo 3.
- El virus del herpes simple tipo 1.

Se establecen límites para la prueba de hemadsorción con el virus de la parainfluenza tipo 3.

Como el procedimiento puede detectar de un modo específico las cantidades límite de virus, también es específico para detectar virus hemadsorbentes en cultivo celular de control de la vacuna antipoliomielítica inactivada (células Vero).



### 3.3.1.2 Identificación de células de simio



#### 3.3.1.2.1 Panorama

El enfoque isoelectrico (IEF) es un método utilizado para la identificación celular por comparación con células de referencia. Por lo tanto, se verificó la especificidad de la prueba.

El enfoque isoelectrico es una técnica en la cual las proteínas se separan en un gradiente de pH en función de su punto isoelectrico.

Se seleccionaron tres sistemas enzimáticos que permiten diferenciar las células utilizadas en el centro de producción para confirmar su identidad:

- Lactato deshidrogenasa (LDH).
- Glucosa fosfato isomerasa (GPI).
- Fosfogluconato deshidrogenasa (PGD).

#### 3.3.1.2.2 Condiciones operativas

La selección de células de referencia analizadas se amplió a:

Células Vero (de simio), MRC-5 (embrionarias humanas), Hep-2 (humanas), WI-38 (embrionarias humanas), CHO (de hámster), BHK-21 (de riñón de hámster), Hela (humanas), de pollo, de ratón, de rata.

El diseño experimental con los tres sistemas enzimáticos permite mostrar, por la posición o el número de bandas, que:

- La lactato deshidrogenasa (LDH) permite clasificar las células humanas y las de simio en la misma categoría y distinguirlas de otras células animales.
- La glucosa fosfato isomerasa (GPI) permite distinguir las células humanas de las células de simio.
- La fosfogluconato deshidrogenasa (PGD) permite distinguir las células WI-38 de las células MRC-5.

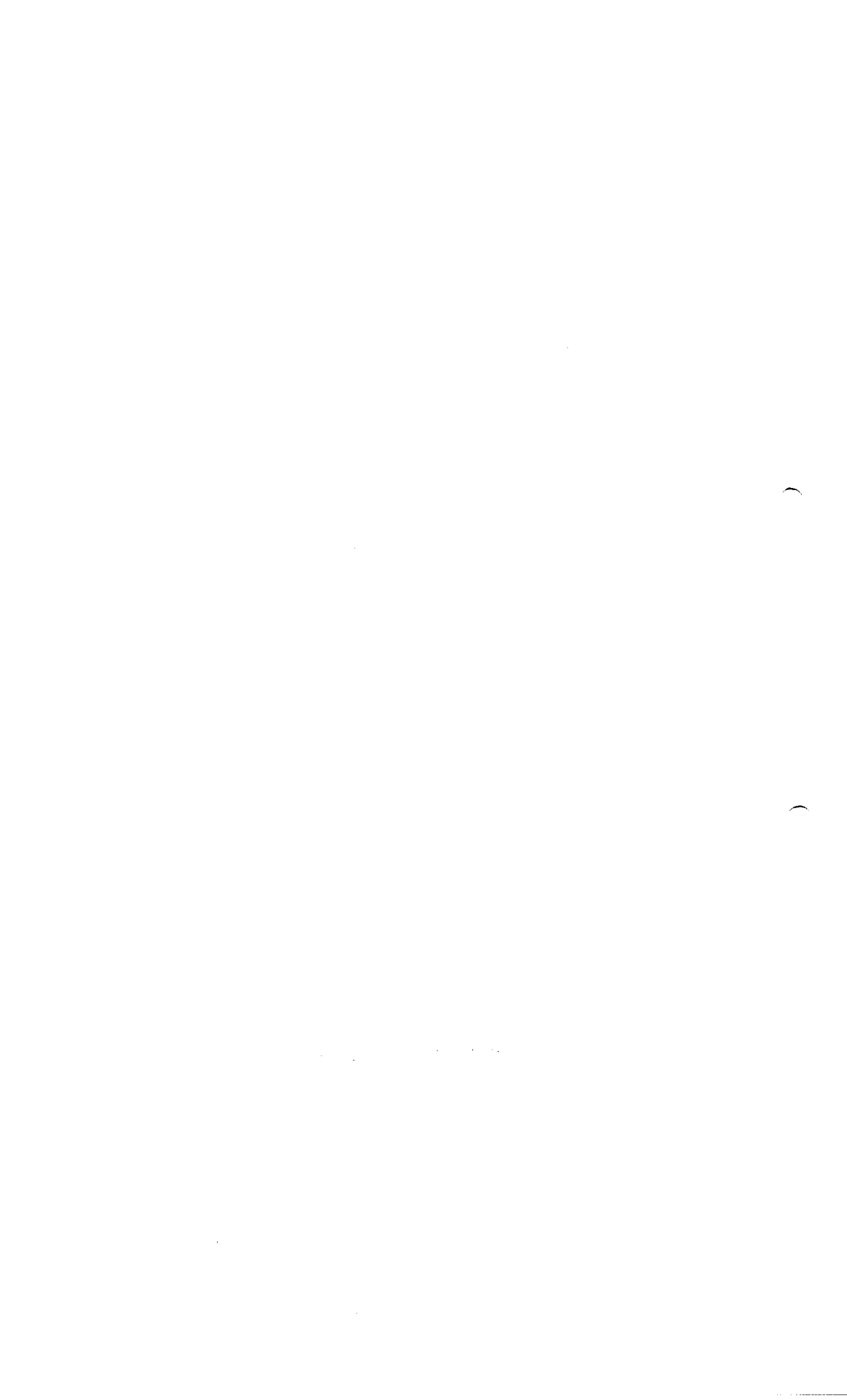
#### 3.3.1.2.3 Resultados

Las fotografías de los geles mostraron que:

- La LDH diferencia las células Hep-2 de las demás células por la posición y el número de sus bandas.
- La GPI diferencia las células humanas de las células de simio por la posición de sus bandas.
- La PGD diferencia las células MRC-5 de las demás células por el número de sus bandas.

#### 3.3.1.2.4 Conclusión

La identificación de células de control es específica por enfoque isoelectrico de isoenzimas (LDH,



GPI y PGD).



### 3.3.1.3 Prueba de detección de agentes extraños con células

#### 3.3.1.3.1 Panorama

La prueba descrita en la Ph. Eur. 2.6.16 "Pruebas de agentes extraños en vacunas virales para uso en seres humanos" consiste en verificar la ausencia de contaminantes virales en el sobrenadante de los cultivos celulares de control por subcultivo en células Vero, células diploides humanas MRC-5 y cultivos primarios en monocapa de células renales de mono cercopiteco. El análisis para detectar posibles contaminantes virales induciendo un efecto citopático se lleva a cabo por microscopía óptica.

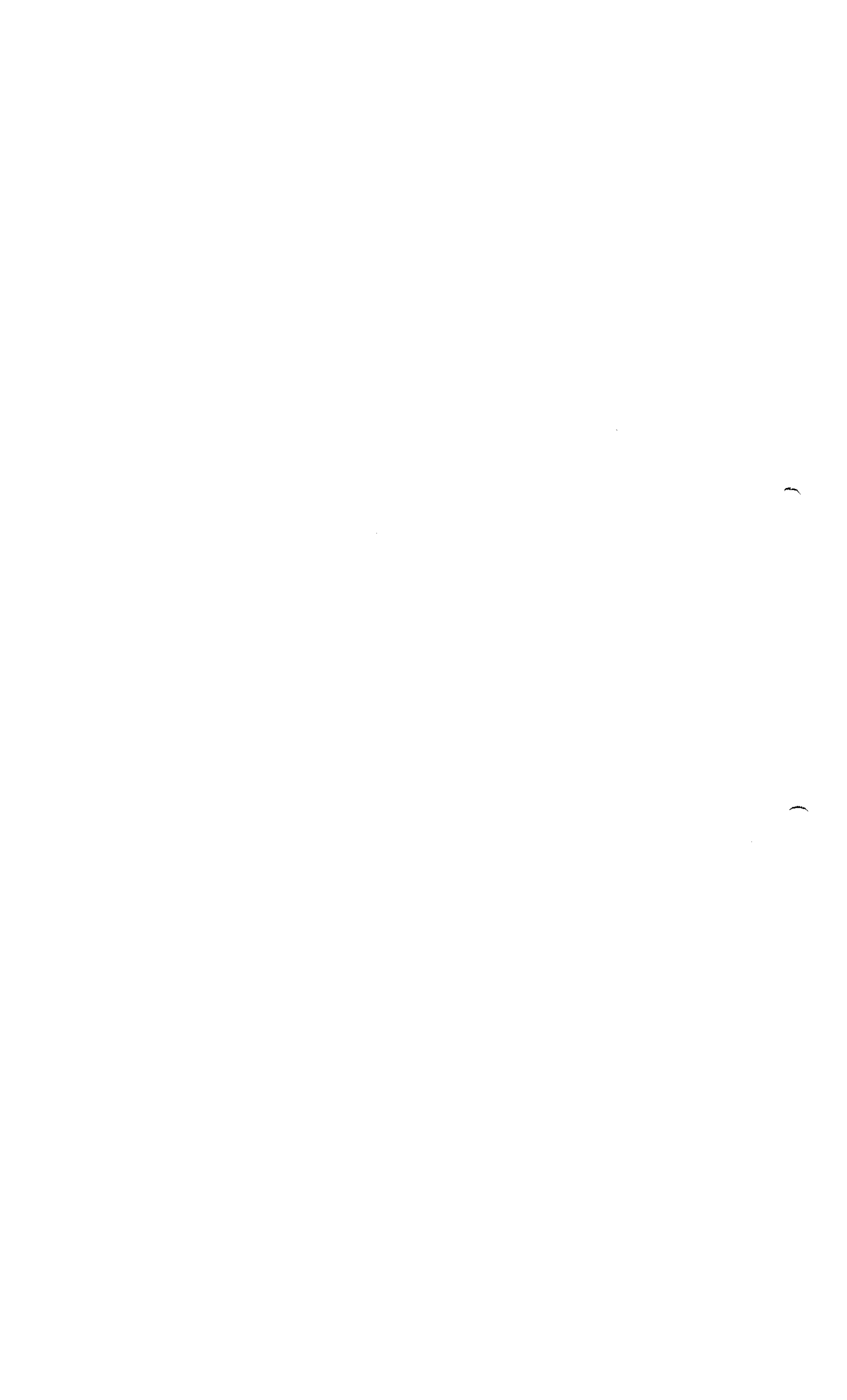
Como el procedimiento es una prueba de límites (prueba de pureza viral), las características estudiadas fueron la especificidad y el límite de detección. No se llevó a cabo ninguna prueba concreta para evaluar la especificidad. Los experimentos realizados para calcular el límite de detección se utilizan para demostrar la especificidad.

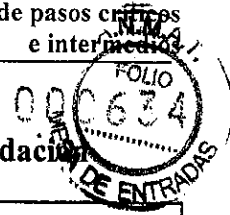
El diseño experimental fue el siguiente:

- Para cada sistema celular se analizaron 4 virus diferentes: reovirus tipo 3, adenovirus humano, parainfluenza tipo 3 y herpes simple tipo 1.
- Se llevaron a cabo 6 experimentos independientes por sistema celular y por virus, con operadores diferentes y en días diferentes.

Todos los cálculos se realizaron con logaritmos, dado que los datos siguen una distribución logarítmica normal.

Se presenta un resumen de la validación en la tabla 17.





**Tabla 17: Prueba de detección de agentes extraños con células: resumen de validación**

Características	Criterios de aceptabilidad	Resultados
Especificidad	Respuesta específica.	Efecto citopático observado en matraces infectados característico de la familia de los virus inoculados.  Ausencia de efecto citopático en los controles celulares.
Límite de detección	Última respuesta positiva detectada.	- Células Vero:  Reovirus tipo 3: DL = 10 <sup>-6,7</sup> Adenovirus humano: DL = 10 <sup>-4,5</sup> Parainfluenza tipo 3: DL = 10 <sup>-4,5</sup> Herpes simple tipo 1: DL = 10 <sup>-6,8</sup>  - Células diploides humanas MRC-5:  Reovirus tipo 3: DL = 10 <sup>-8,0</sup> Adenovirus humano: DL = 10 <sup>-3,7</sup> Parainfluenza tipo 3: DL = 10 <sup>-3,8</sup> Herpes simple tipo 1: DL = 10 <sup>-6,5</sup>  - Células primarias de riñón de mono:  Reovirus tipo 3: DL = 10 <sup>-6,8</sup> Adenovirus humano: DL = 10 <sup>-5,8</sup> Parainfluenza tipo 3: DL = 10 <sup>-4,2</sup> Herpes simple tipo 1: DL = 10 <sup>-5,8</sup>

El límite positivo para cada uno de los 6 experimentos por sistema celular y por tipo de virus se resume en las tablas siguientes. El valor indicado es la última dilución positiva para la que se detecta efecto citopático.

ROXANA MONTEMILONE  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ  
 APODERADO  
 SANOFI PASTEUR S.A.





3.3.1.3.2 Resultados

Los datos brutos de validación se presentan en la tabla 18 a la tabla 20:

Tabla 18: Datos brutos para la línea celular continua Vero

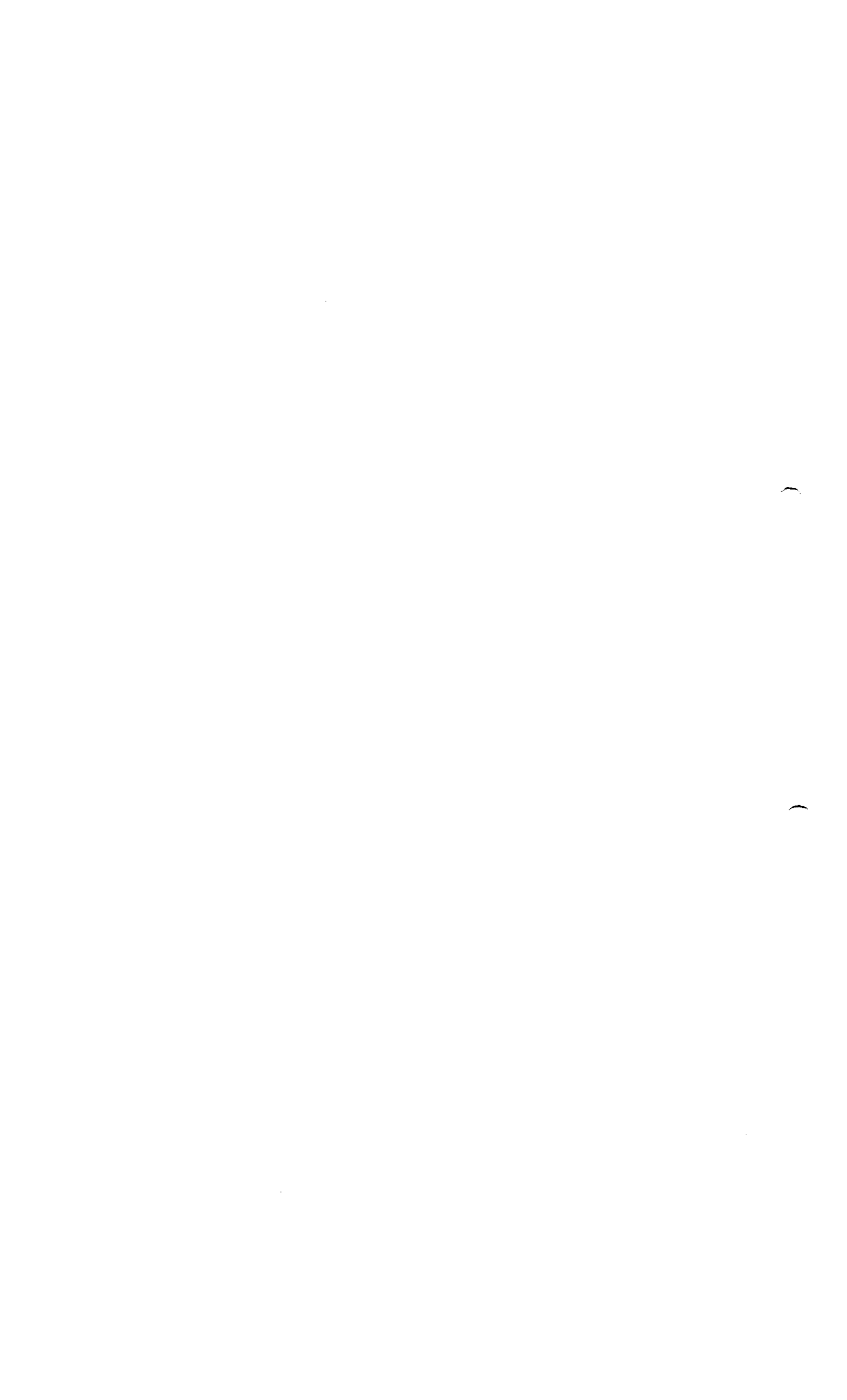
Reovirus tipo 3	Adenovirus humano	Parainfluenza tipo 3	Herpes simple tipo 1
10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-8</sup>
10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-7</sup>
10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-7</sup>
10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-7</sup>
10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-6</sup>
10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-6</sup>

Tabla 19: Datos brutos para células diploides humanas MRC-5

Reovirus tipo 3	Adenovirus humano	Parainfluenza tipo 3	Herpes simple tipo 1
10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-6</sup>
10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-7</sup>
10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-6</sup>
10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-7</sup>
10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-7</sup>

Tabla 20: Datos brutos para células primarias de riñón de mono

Reovirus tipo 3	Adenovirus humano	Parainfluenza tipo 3	Herpes simple tipo 1
10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-3</sup>
10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-6</sup>
10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>
10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-7</sup>
10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-6</sup>
10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-6</sup>





### 3.3.1.3.3 Especificidad

Los efectos citopáticos observados en matraces infectados fueron característicos de la familia de los virus inoculados. Los controles celulares, introducidos en cada experimento y sometidos al mismo procedimiento, salvo la infección, no presentaron daños: no mostraron signos de infección, toxicidad, contaminación bacteriana o fúngica ni signos de envejecimiento o sufrimiento celular.

- Efecto citopático

El objetivo del análisis estadístico es definir la mínima concentración de virus de la poliomielitis que se puede detectar en el líquido sobrenadante de los cultivos celulares de control de la vacuna antipoliomielítica inactivada (células Vero).

Para cada tipo de células, consta de los siguientes pasos:

- Cálculo de la media y de la desviación estándar de la respuesta
- Cálculo del intervalo de confianza del 95 % de la media.

Se sintetizan en la tabla 21 a la tabla 23:

**Tabla 21: Resultados estadísticos para la línea celular continua Vero**

	Reovirus tipo 3	Adenovirus humano	Parainfluenza tipo 3	Herpes simple tipo 1
Media de las respuestas	-6,67	-4,50	-4,50	-6,83
Desviación estándar de las respuestas	0,52	1,05	0,55	0,75
Intervalo de confianza del 95% de la media	[-7,21 ; -6,12]	[-5,60 ; -3,40]	[-5,07 ; -3,93]	[-7,62 ; -6,04]

**Tabla 22: Resultados estadísticos para células diploides humanas MRC-5**

	Reovirus tipo 3	Adenovirus humano	Parainfluenza tipo 3	Herpes simple tipo 1
Media de las respuestas	-8,00	-3,67	-3,83	-6,50
Desviación estándar de las respuestas	0,00	0,82	0,98	0,55
Intervalo de confianza del 95% de la media	Ausencia de intervalo de confianza porque la desviación estándar es igual a 0	[-4,52 ; -2,81]	[-4,87 ; -2,80]	[-7,07 ; -5,93]





**Tabla 23: Resultados estadísticos para células primarias de riñón de mono**

	Reovirus tipo 3	Adenovirus humano	Parainfluenza tipo 3	Herpes simple tipo 1
Media de las respuestas	-6,83	-5,83	-4,17	-5,83
Desviación estándar de las respuestas	0,75	0,75	0,75	0,75
Intervalo de confianza del 95% de la media	[-7,62 ; -6,04]	[-6,62 ; -5,04]	[-4,96 ; -3,38]	[-6,62 ; -5,04]

**3.3.1.3.4 Conclusión**

Se establecen límites de detección para células Vero, para células diploides humanas MRC-5 y para células primarias de riñón de mono.

Como el procedimiento puede detectar de un modo específico las cantidades límite de virus, también es específico para detectar agentes extraños en el líquido sobrenadante de los cultivos celulares de control de la vacuna antipoliomielítica inactivada (células Vero).

**3.3.1.4 Prueba de detección de *Mycoplasma* por el método de cultivo**

**3.3.1.4.1 Panorama**

Utilizando cepas de *Mycoplasma* calibradas en el laboratorio, se llevaron a cabo pruebas de adición para evaluar la posible interferencia del producto en el sobrenadante de las células de control (lote FA126373) y de la cosecha única (lote FA129729).

Como no se utiliza ninguna sustancia de origen aviar para la producción de la vacuna antipoliomielítica inactivada, la prueba para detectar la ausencia de inhibidores se llevó a cabo utilizando 3 cepas de *Mycoplasma* por producto intermedio como se describe en la tabla siguiente.

**Tabla 24: Cepas de *Mycoplasma* utilizadas durante la validación**

Especie de <i>Mycoplasma</i>	Uso	Método
<i>Acheloplasma laidlawii</i> ATCC 23206	Vacunas para uso humano (se utiliza un antibiótico durante la producción).	Detección de <i>Mycoplasmas</i> cultivables no aviares.
<i>Mycoplasma orale</i> ATCC 23714	Vacunas para uso humano (arginina hidrolizante).	
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> ATCC 15531	Vacunas para uso humano (utilizando D-glucosa).	





La validación incluyó los siguientes pasos:

- Verificación de las cualidades de promoción del crecimiento de los medios utilizados.
- Cuantificación de UFC en una muestra de 200 µL de cada cepa.
- Verificación de la ausencia de *Mycoplasmas* en el producto a validar.
- Adición al producto que se va a validar.
- Análisis de los resultados

### 3.3.1.4.2 Verificación de las cualidades de promoción del crecimiento de los medios utilizados

Se verificaron las cualidades de promoción del crecimiento de todos los medios.

Tabla 25: Medios utilizados (líquidos y sólidos) para la validación

	Medios líquidos		Medios sólidos	
	Hayflick	BOB	Hayflick	BOB
	F2305 G	F2306 G	F3236 E	F3237 D
	F2305 I	F2306 I	F3236 F	/
Resultado	Aprobado.	Aprobado	Aprobado	Aprobado

Los medios aprobaron las pruebas de fertilidad con las 3 cepas.

### 3.3.1.4.3 Cuantificación de UFC en cada cepa

Se cuantificaron las UFC en la muestra calibrada de cada cepa de *Mycoplasma*.

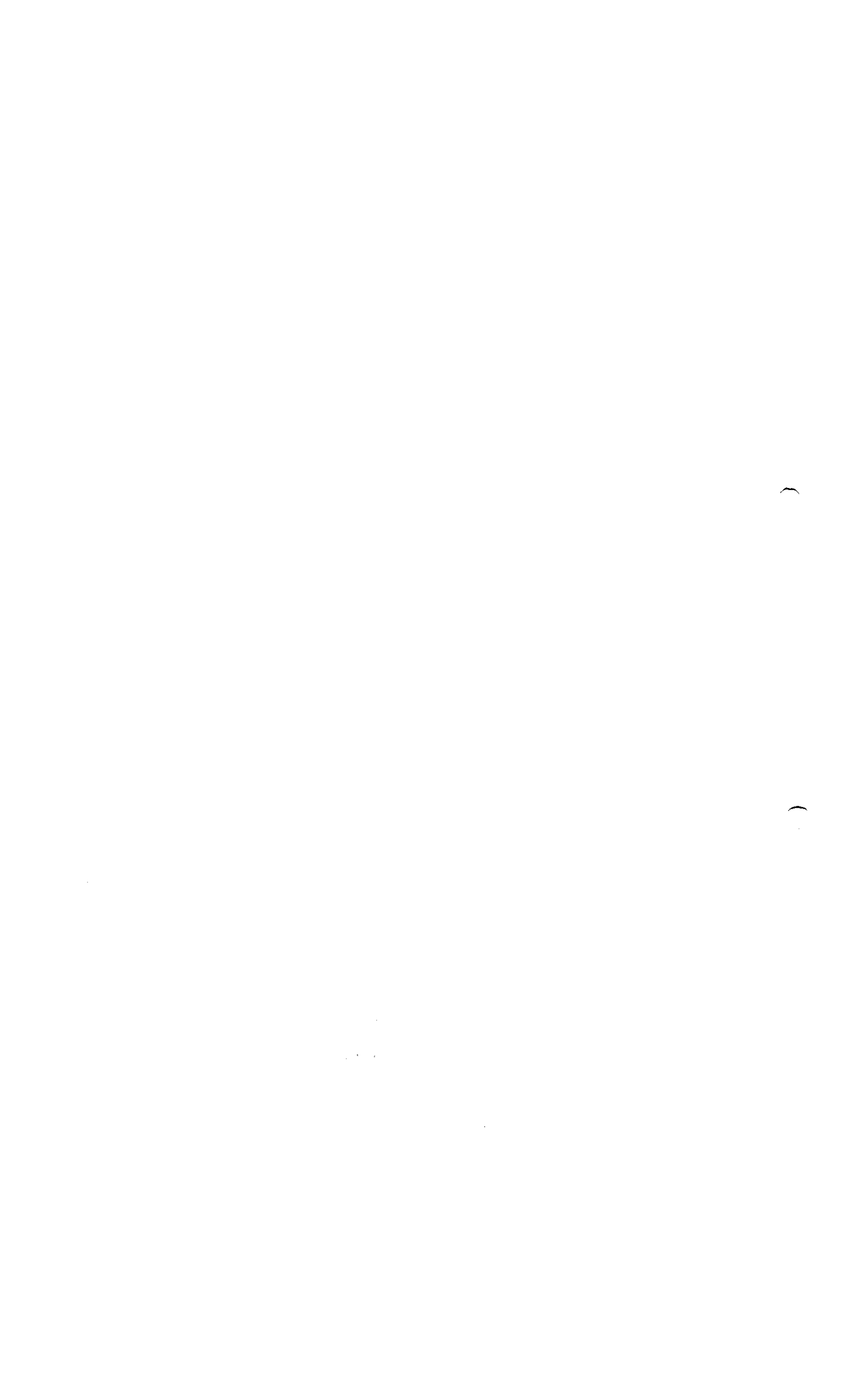
Tabla 26: Cuantificación de UFC en cada cepa

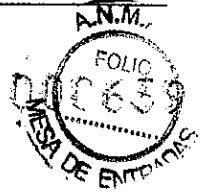
Cepa	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma orale</i>	<i>Acheloplasma laidlawii</i>
Número máximo de UFC en una muestra de 200 µL tras la dilución de la cepa	62 CFU	64 CFU	45 CFU

El número de UFC cumplió las recomendaciones de las autoridades competentes (<100 UFC).

### 3.3.1.4.4 Evaluación de una posible interferencia inducida por el producto

Para cada producto intermedio y cada cepa de *Mycoplasma* se llevaron a cabo tres pruebas independientes con 2 operadores en días diferentes.





Cada formulario muestra resultados relacionados con:

- Los controles negativos.
- El control positivo.
- El producto solo (verificación de la ausencia de contaminación inicial).
- Las 3 pruebas de adición.

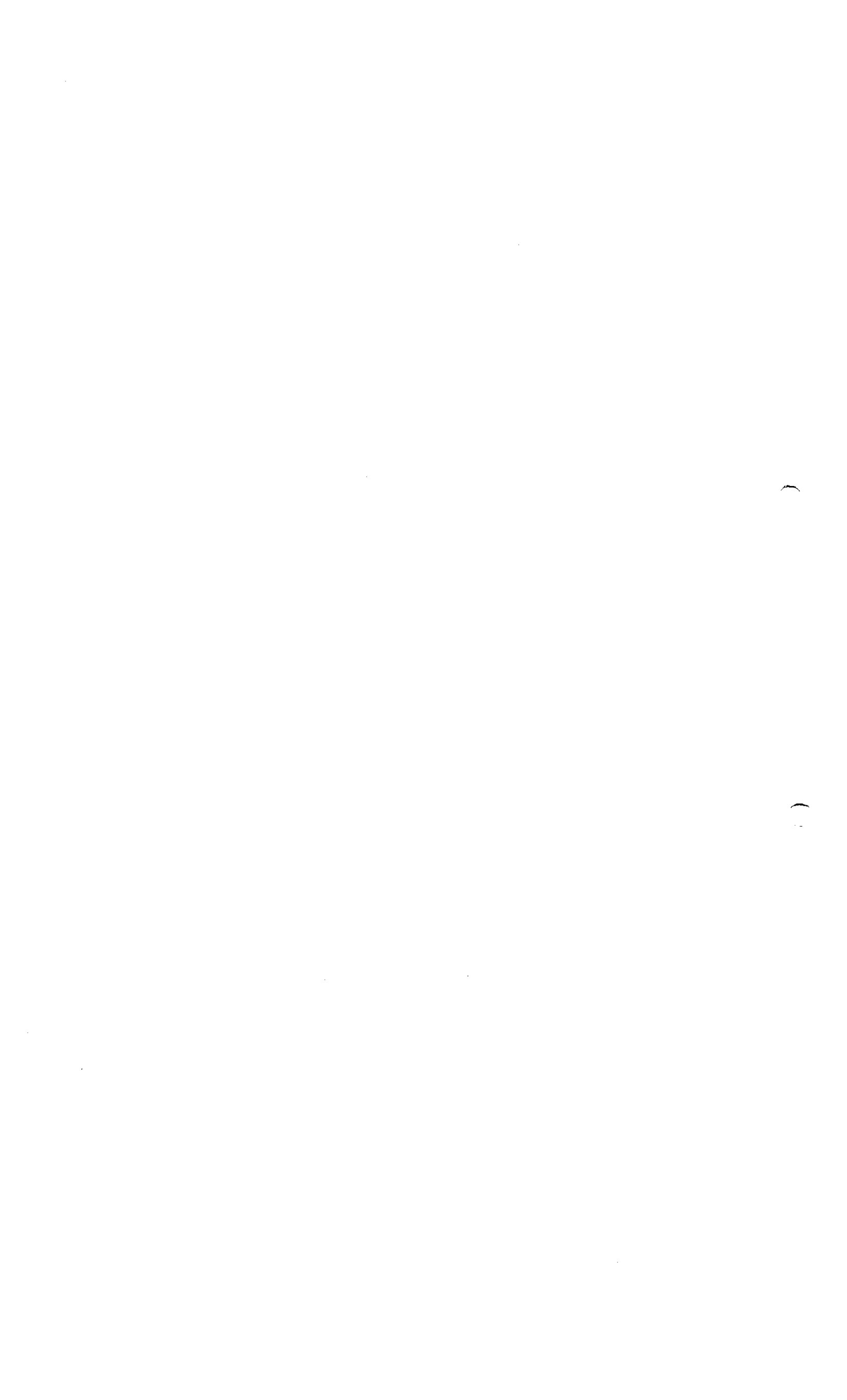
### 3.3.1.4.5 Adición de *Mycoplasma pneumoniae*

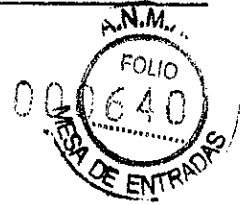
- Sobrenadante de las células de control.

Tabla 27: Resultados obtenidos en el sobrenadante de las células de control

Adición de <i>Mycoplasma pneumoniae</i>		1ª prueba	2ª prueba	3ª prueba
Control negativo		Negativo	Negativo	Negativo
Producto		No se observa contaminación con <i>Mycoplasma</i> .		
Producto con agregado	Inoculación*	Contaminación con <i>Mycoplasma</i> comparable con el control positivo.	Contaminación con <i>Mycoplasma</i> comparable con el control positivo.	Contaminación con <i>Mycoplasma</i> comparable con el control positivo.
	Después del subcultivo*	Contaminación con <i>Mycoplasma</i> comparable con el control positivo.	Contaminación con <i>Mycoplasma</i> comparable con el control positivo.	Contaminación con <i>Mycoplasma</i> comparable con el control positivo.
Resultado		Prueba válida.	Prueba válida.	Prueba válida.

\* Las placas de agar fueron examinadas después de 14 y 21 días de incubación sin afectar al resultado final. No se detectaron factores que interfiriesen con el crecimiento de *Mycoplasma pneumoniae* en el producto.





- Cosecha única

**Tabla 28: Resultados obtenidos en la cosecha única**

de <i>Mycoplasma pneumoniae</i>		1ª prueba	2ª prueba	3ª prueba
Control negativo		Negativo	Negativo	Negativo
Producto		No se observa contaminación con <i>Mycoplasma</i> .		
Producto con agregados	Inoculación*	Contaminación con <i>Mycoplasma</i> comparable con el control positivo.	Contaminación con <i>Mycoplasma</i> comparable con el control positivo.	Producto con agregado
	Después del subcultivo*	Contaminación con <i>Mycoplasma</i> comparable con el control positivo.	Contaminación con <i>Mycoplasma</i> comparable con el control positivo.	
Resultado		Prueba válida.	Prueba válida.	Prueba válida.

\* Las placas de agar fueron examinadas después de 14 y 21 días de incubación sin afectar el resultado final. No se detectaron factores que interfirieran con el crecimiento de *Mycoplasma pneumoniae* en el producto.

### 3.3.1.4.6 Adición de *Mycoplasma orale*

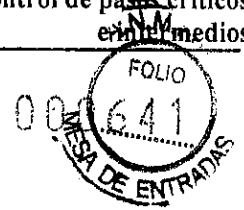
- Sobrenadante de las células de control.

**Tabla 29: Resultados obtenidos en el sobrenadante de las células de control**

Adición de <i>Mycoplasma orale</i>		1ª prueba	2ª prueba	3ª prueba
Control negativo		Negativa.	Negativo	Negativo
Producto		No se observa contaminación con <i>Mycoplasma</i> .		
Producto con agregado	Inoculación*	Contaminación con <i>Mycoplasma</i> comparable con el control positivo.	Contaminación con <i>Mycoplasma</i> comparable con el control positivo.	Producto con agregado
	Después del subcultivo*	Contaminación con <i>Mycoplasma</i> comparable con el control positivo.	Contaminación con <i>Mycoplasma</i> comparable con el control positivo.	
Resultado		Prueba válida.	Prueba válida.	Prueba válida.

\* Las placas de agar fueron examinadas después de 14 y 21 días de incubación sin afectar el resultado final. No se detectaron factores que interfirieran con el crecimiento de *Mycoplasma orale* en el producto.





- Cosecha única

**Tabla 30: Resultados obtenidos en la cosecha única**

Adición de <i>Mycoplasma orale</i>		1ª prueba	2ª prueba	3ª prueba
Control negativo		Negativa.	Negativo	Negativo
Producto solo		No se observa contaminación con <i>Mycoplasma</i> .		
Producto con adición	Inoculación*	Contaminación con <i>Mycoplasma</i> comparable con el control positivo.	Contaminación con <i>Mycoplasma</i> comparable con el control positivo.	Producto con agregado
	Después del subcultivo*	Contaminación con <i>Mycoplasma</i> comparable con el control positivo.	Contaminación con <i>Mycoplasma</i> comparable con el control positivo.	
Resultado		Prueba válida.	Prueba válida.	Prueba válida.

\* Las placas de agar fueron examinadas después de 14 y 21 días de incubación sin afectar el resultado final.

No se detectaron factores que interfiriesen con el crecimiento de *Mycoplasma orale* en el producto.

#### 3.3.1.4.7 Adición de *Acheloplasma laidlawii*

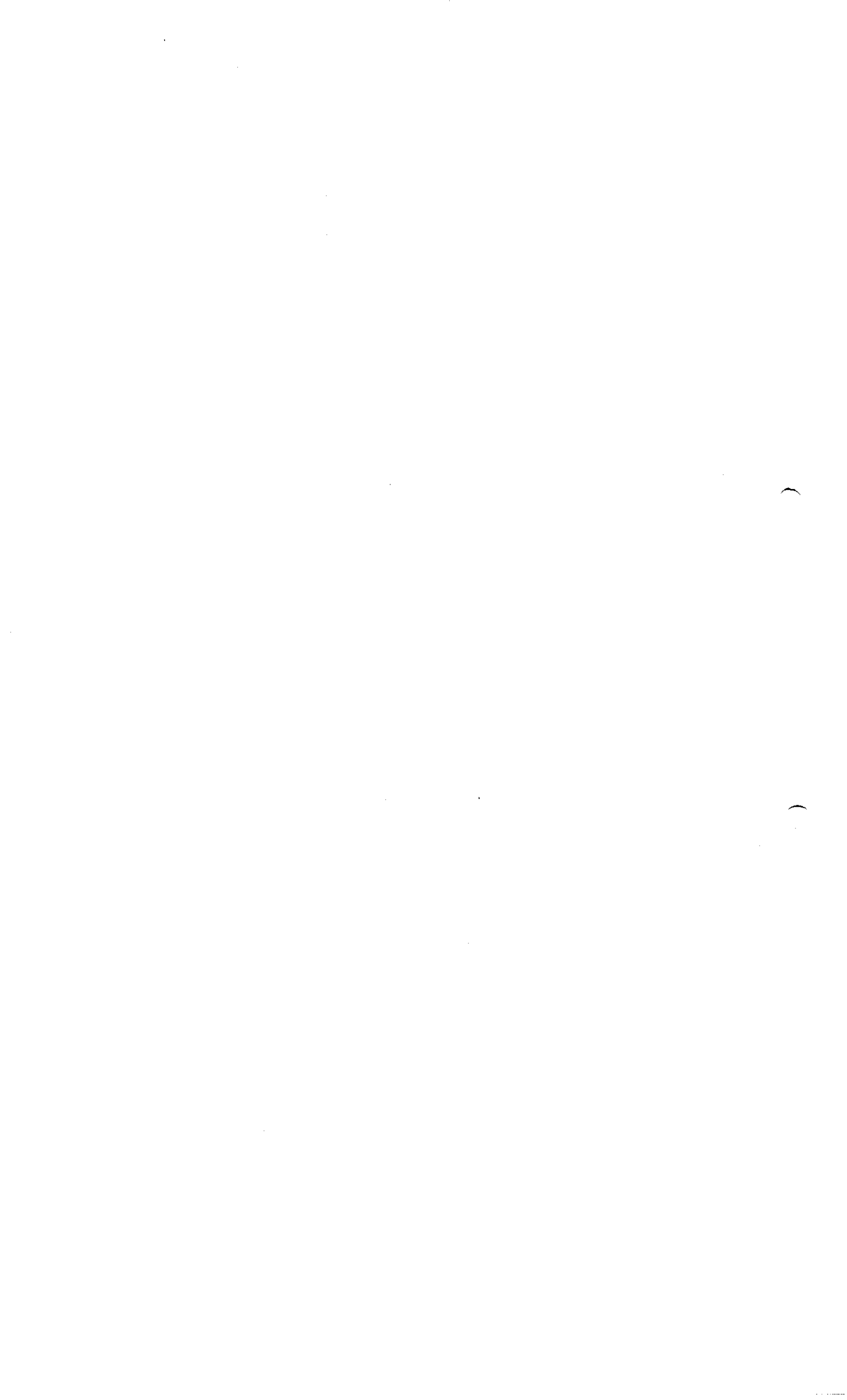
- Sobrenadante de las células de control.

**Tabla 31: Resultados obtenidos en el sobrenadante de las células de control**

Adición de <i>Acheloplasma laidlawii</i>		1ª prueba	2ª prueba	3ª prueba
Control negativo		Negativo	Negativo	Negativo
Producto		Ausencia de contaminación con <i>Mycoplasma</i> .		
Producto con agregado	Inoculación*	Contaminación con <i>Mycoplasma</i> comparable con el control positivo.	Contaminación con <i>Mycoplasma</i> comparable con el control positivo.	Contaminación con <i>Mycoplasma</i> comparable con el control positivo.
	Después del subcultivo*	Contaminación con <i>Mycoplasma</i> comparable con el control positivo.	Contaminación con <i>Mycoplasma</i> comparable con el control positivo.	Contaminación con <i>Mycoplasma</i> comparable con el control positivo.
Resultado		Prueba válida.	Prueba válida.	Prueba válida.

\* Las placas de agar fueron examinadas después de 14 y 21 días de incubación sin afectar el resultado final.

No se detectaron factores que interfiriesen con el crecimiento de *Mycoplasma laidlawii* en el producto.





- Cosecha única

**Tabla 32: Resultados obtenidos en la cosecha única**

Adición de <i>Acheloplasma laidlawii</i>		1ª prueba	2ª prueba	3ª prueba
Control negativo		Negativo	Negativo	Negativo
Producto		No se observa contaminación con <i>Mycoplasma</i> .		
Producto con agregado	Inoculación*	Contaminación con <i>Mycoplasma</i> comparable con el control positivo.	Contaminación con <i>Mycoplasma</i> comparable con el control positivo.	Contaminación con <i>Mycoplasma</i> comparable con el control positivo.
	Después del subcultivo*	Contaminación con <i>Mycoplasma</i> comparable con el control positivo.	Contaminación con <i>Mycoplasma</i> comparable con el control positivo.	Contaminación con <i>Mycoplasma</i> comparable con el control positivo.
Resultado		Prueba válida.	Prueba válida.	Prueba válida.

\* Las placas de agar fueron examinadas después de 14 y 21 días de incubación sin afectar el resultado final.

No se detectaron factores que interfirieran con el crecimiento de *Mycoplasma laidlawii* en el producto.

#### 3.3.1.4.8 Análisis de los resultados

No se observó inhibición alguna del crecimiento de cepas de *Mycoplasma* en el sobrenadante de las células de control ni en la cosecha única

#### 3.3.1.4.9 Conclusión

La vacuna antipoliomielítica inactivada en dos etapas de elaboración (sobrenadante de las células de control y cosecha individual) no mostró ningún factor que interfiriera con la detección de *Mycoplasmas* por el método de cultivo microbiológico.

#### 3.3.1.5 Prueba de detección de *Mycoplasma* mediante epifluorescencia en cultivo celular

##### 3.3.1.5.1 Panorama

Utilizando cepas de *Mycoplasma* calibradas en el laboratorio, se llevaron a cabo pruebas de adición para demostrar la validez de los resultados obtenidos y para evaluar una posible interferencia del producto en el sobrenadante de las células de control. Se analizaron tres lotes (FA273636, FA275 633 y FA274136). Las pruebas se llevaron a cabo en presencia y en ausencia del producto por validar.

Las pruebas se realizaron en las condiciones especificadas en el método de detección de *Mycoplasmas* por microscopía de epifluorescencia:

