



- Siembra en células Vero.
- 2 amplificaciones.
- Siembra en Lab-Teks.
- Fijación/tinción.
- Lectura.

Las diluciones de las cepas de *Mycoplasma* se llevaron a cabo en el producto por analizar.

Se utilizaron las siguientes cepas de *Mycoplasma*:

- *Mycoplasma orale*: BRP Y0000691 R3 del 3 de mayo de 2007.
- *Mycoplasma hyorhinis*: ATCC 29052 R3 del 24 de mayo de 2007.

3.3.1.5.2 Resultado

Los resultados para cada cepa de *Mycoplasma* se presentan en las siguientes tablas.

Tabla 33: Tinción de Hoechst: *Mycoplasma orale*

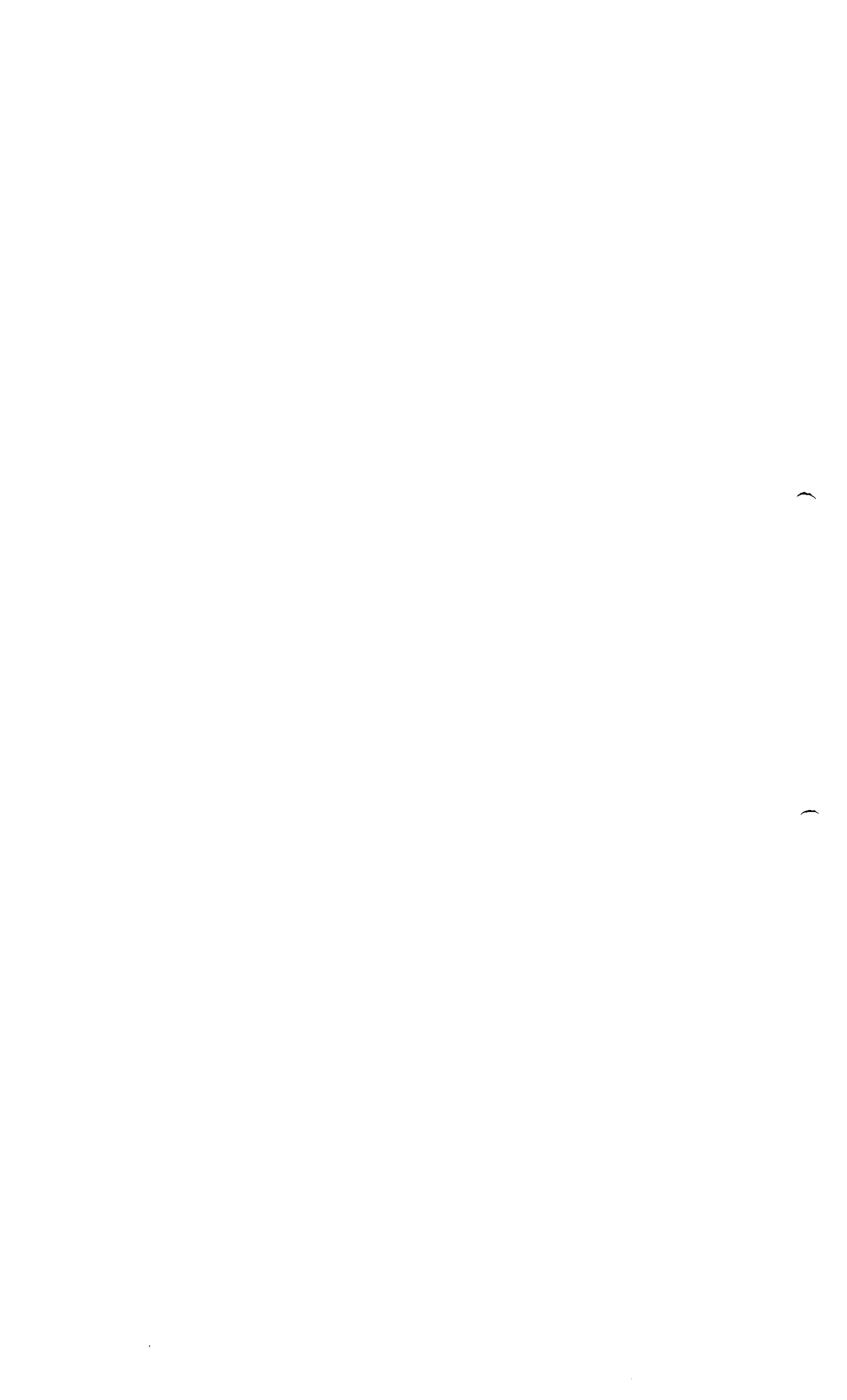
<i>Mycoplasma orale</i>	Producto	Control negativo	En ausencia del producto	En presencia del producto
FA273636	Negativo	Negativo	Positivo.	Positivo.
FA274136	Negativo.	Negativo	Positivo.	Positivo.
FA275633	Negativo.	Negativo	Positivo.	Positivo.

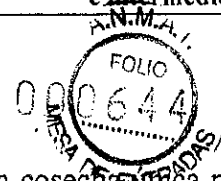
Tabla 34: Tinción de Hoechst: *Mycoplasma hyorhinis*

<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	Producto	Control negativo	En ausencia del producto	En presencia del producto
FA273636	Negativo.	Negativo	Positivo.	Positivo.
FA274136	Negativo.	Negativo	Positivo.	Positivo.
FA275633	Negativo.	Negativo	Positivo.	Positivo.

3.3.1.5.3 Conclusión

- Para *Mycoplasma hyorhinis* y *Mycoplasma orale*, se obtuvieron resultados positivos para la tinción de Hoechst en presencia y en ausencia del producto. Además, ninguna de las tinciones de controles negativos y productos de prueba demostró la presencia de *Mycoplasmas*.
- Las pruebas realizadas en ambas cepas de *Mycoplasma* (*M. hyorhinis*, *M. orale*) y en las tres cepas de vacuna antipoliomielítica inactivada (IPV) no mostraron ningún efecto de la matriz. Según los requisitos normativos, la validación por el método de epifluorescencia ha demostrado que no existe ningún efecto de la matriz para estas dos cepas de *Mycoplasma*.





3.3.2 Métodos de validación de la cosecha única

Se presenta a continuación la validación de los procedimientos analíticos de la cosecha única no descritos en la Ph. Eur. se presenta a continuación.

La validación de las pruebas de *Mycoplasma* por el método de cultivo se presenta en el capítulo 3.3.1.4.

3.3.2.1 Identificación de poliovirus (tipo 1, 2 o 3)

3.3.2.1.1 Panorama

El procedimiento de identificación consiste en la neutralización del efecto citopático (CPE) en células Hep-2 con antisueros dirigidos contra los 3 tipos de poliovirus.

Estos estudios consistieron en verificar la presencia de CPE para análisis no neutralizados, la presencia de CPE para análisis neutralizados con sueros heterólogos y la ausencia de CPE para ensayos neutralizados con sueros homólogos.

Como el procedimiento es un análisis de identificación, se validó la especificidad de los antisueros utilizados contra los 3 serotipos de poliovirus.

Se llevaron a cabo tres análisis independientes, en 3 días, con 2 operadores diferentes, en 3 cosechas virales únicas (una sola cosecha viral de cada serotipo).

Se prepararon cuatro mezclas de antisueros:

- Mezcla 1: antisuero tipo 2 + antisuero tipo 3.
- Mezcla 2: antisuero tipo 1 + antisuero tipo 3.
- Mezcla 3: antisuero tipo 1 + antisuero tipo 2.
- Mezcla 4: antisuero tipo 1 + antisuero tipo 2 + antisuero tipo 3.

3.3.2.1.2 Resultado

Los resultados de identificación obtenidos para los 3 lotes de cosecha viral se presentan en la tabla 35, la tabla 36 y en la tabla 37.



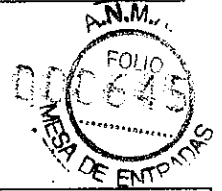


Tabla 35: Cosecha viral única tipo 1 (lote FA057411)

Dilución viral	Control viral no neutralizado			Virus + mezcla 1			Virus + mezcla 2			Virus + mezcla 3			Virus + mezcla 4		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
10 ⁻³	++*	++	++	++	++	++	00†	00	00	00	00	00	00	00	00
10 ⁻⁴	++	++	++	++	++	++	00	00	00	00	00	00	00	00	00
10 ⁻⁵	++	++	++	++	++	++	00	00	00	00	00	00	00	00	00
10 ⁻⁶	++	++	++	++	++	++	00	00	00	00	00	00	00	00	00
10 ⁻⁷	++	0+	++	0+	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00

* ++ = Ausencia de neutralización del virus por el antisuero: presencia de efecto citopático.

† 0 = Neutralización del virus por el antisuero: ausencia de efecto citopático.

El lote FA057411 es positivo para el poliovirus tipo 1.

Tabla 36: Cosecha viral única tipo 2 (lote FA054049)

Dilución viral	Control viral no neutralizado			Virus + mezcla 1			Virus + mezcla 2			Virus + mezcla 3			Virus + mezcla 4		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
10 ⁻³	+++	++	++	00†	+0	00	++	++	++	00	00	00	00	00	00
10 ⁻⁴	++	++	++	00	00	00	++	++	++	00	00	00	00	00	00
10 ⁻⁵	++	++	++	00	00	00	++	++	++	00	00	00	00	00	00
10 ⁻⁶	++	++	++	00	00	00	++	++	++	00	00	00	00	00	00
10 ⁻⁷	++	00	++	00	00	00	0+	++	00	00	00	00	00	00	00

El lote FA054049 es positivo para el poliovirus tipo 2.

Tabla 37: Cosecha viral única tipo 3 (lote FA054056)

Dilución viral	Control viral no neutralizado			Virus + mezcla 1			Virus + mezcla 2			Virus + mezcla 3			Virus + mezcla 4		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
10 ⁻³	+++	++	++	0+	+0†	00	0+	00	0+	++	++	++	0+	00	00
10 ⁻⁴	++	++	++	00	00	00	00	00	00	++	++	++	00	00	00
10 ⁻⁵	++	++	++	00	00	00	00	00	00	++	++	++	00	00	00
10 ⁻⁶	++	++	++	00	00	00	00	00	00	++	++	++	00	00	00
10 ⁻⁷	0+	00	0+	00	00	00	00	00	00	0+	00	0+	00	00	00

El lote FA054056 es positivo para el poliovirus tipo 3.

Todos los análisis son válidos. Las células de control inoculadas en cada placa son satisfactorias,





no se observó alteración celular alguna.

Las neutralizaciones se consideran válidas ya que existe una diferencia de al menos 2 diluciones entre el virus neutralizado y el virus de control para cada análisis.

Los 3 tipos virales han sido identificados de acuerdo con el diagrama presentado en la tabla 38.

Tabla 38: Identificación del serotipo de poliovirus

Presencia de efectos citopáticos con la mezcla	Neutralización con la mezcla	Conclusión
1	2, 3 and 4	Type 1
2	1, 3 and 4	Type 2
3	1, 2 and 4	Type 3

3.3.2.1.3 Conclusión

El procedimiento se considera válido para la identificación del poliovirus para el producto intermedio de la cosecha única.

3.3.2.2 Concentración de poliovirus (tipo 1, 2 o 3)

3.3.2.2.1 Panorama

El título infeccioso se determina por inoculación de diluciones sucesivas de la suspensión viral en células Hep-2 y examen del efecto citopático. Esta concentración corresponde al promedio aritmético de 3 titulaciones y se expresa en $\log_{10}(\text{DICC}_{50}/\text{mL})$.

Debido a que el método es un ensayo cuantitativo, las características estudiadas son la especificidad, la linealidad, la exactitud y la precisión. El método de identificación permite elucidar el tipo de poliovirus presente en la mezcla utilizando anticuerpos neutralizantes específicos de todos los tipos de poliovirus. Se llevó a cabo la determinación de la especificidad del método para la prueba de identificación de poliovirus presentada en el capítulo 3.2.3.1.

- **Linealidad y exactitud:** para cada tipo de poliovirus, el diseño experimental fue: 2 operadores realizaron 3 series separadas, en días diferentes. Cada corrida incluía un rango de 5 títulos infecciosos (3 vacunas diluidas, 1 vacuna pura y 1 vacuna con agregado).
- **Precisión:** se llevaron a cabo 3 series en condiciones de precisión intermedia: los análisis se llevaron a cabo de manera independiente utilizando el mismo método, en una muestra primaria homogénea, en el mismo laboratorio y los realizaron 2 operadores en días diferentes. En cada serie se realizaron 6 análisis en condiciones que garantizaban la repetibilidad: los análisis se llevaron a cabo de manera independiente, utilizando el mismo método, en una muestra primaria homogénea, en el mismo laboratorio, con el mismo equipo, con el mismo operador y el mismo día.

El método de validación para la precisión se llevó a cabo por separado para los monovalentes de tipo 1 y para los de tipo 2 y tipo 3, y por lo tanto, se presentan dos resultados diferentes.

Los resultados de la validación se resumen en la tabla siguiente.





Tabla 39: Resultados de la validación

Características	Criterios de aceptación	Resultados
Especificidad	/	El método es específico. Ver el capítulo 3.3.2.1 "Identificación de poliovirus".
Linealidad	$P_{\text{linealidad}} \leq 0,01$ $P_{\text{desviación de la linealidad}} > 0,05$	Después del ajuste de la linealidad en una escala doble logarítmica de $Y =$ título infeccioso medido ($\log_{10}(\text{DICC}_{50}/\text{mL})$) en función de $X =$ título infeccioso teórico previsto ($\log_{10}(\text{DICC}_{50}/\text{mL})$), se observa la siguiente relación: <ul style="list-style-type: none"> • Tipo 1: $P_{\text{linealidad}} < 0,0001$ $P_{\text{desviación de la linealidad}} = 0,66$ $Y = 0,860 + 0,904. X$ $R^2 = 0,9988$ Rango de linealidad: $[5,12 - 8,95] \log_{10}(\text{DICC}_{50}/\text{mL})$ • Tipo 2: $P_{\text{linealidad}} < 0,0001$ $P_{\text{desviación de la linealidad}} = 0,11$ $Y = -0,388 + 0,971. X$ $R^2 = 0,9953$ Rango de linealidad: $[4,65 - 10,94] \log_{10}(\text{DICC}_{50}/\text{mL})$ • Tipo 3: $P_{\text{linealidad}} < 0,0001$ $P_{\text{desviación de la linealidad}} < 0,05$ Pero la curvatura es despreciable. $Y = -0,078 + 1,033. X$ $R^2 = 0,9912$ Rango de linealidad: $[4,26 - 10,78] \log_{10}(\text{DICC}_{50}/\text{mL})$
Exactitud	La recuperación porcentual promedio calculada para los niveles de título infeccioso teórico previsto debe hallarse entre el 80 % y el 120 %.	La recuperación porcentual promedio y sus límite de confianza del 95 % son los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> • Tipo 1: del 102 % al 108 %. • Tipo 2: del 102 % al 107 %. • Tipo 3: del 101% al 105%.





Características	Criterios de aceptación	Resultados
Precisión	El intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia debe ser inferior a: $\pm 0,5 \log_{10}(\text{DICC}_{50}/\text{mL})$.	<p>• Tipo 1:</p> <p>- Media general: $\bar{m} = 8,69 \log_{10}(\text{DICC}_{50}/\text{mL})$.</p> <p>- Los coeficientes de variación de repetibilidad y precisión intermedia son ambos iguales al: 1,5%</p> <p>- Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 serie con 3 mediciones: $\pm 0,16 \log_{10}(\text{DICC}_{50}/\text{mL})$.</p> <p>• Tipo 2:</p> <p>- Media general: $\bar{m} = 8,84 \log_{10}(\text{DICC}_{50}/\text{mL})$.</p> <p>- Los coeficientes de variación de repetibilidad y precisión intermedia son respectivamente: 1,1 % y 1,3 %.</p> <p>- Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 serie con 3 mediciones: $\pm 0,19 \log_{10}(\text{DICC}_{50}/\text{mL})$.</p> <p>• Tipo 3:</p> <p>- Media general: $\bar{m} = 8,60 \log_{10}(\text{DICC}_{50}/\text{mL})$.</p> <p>- Los coeficientes de variación de repetibilidad y precisión intermedia son respectivamente: 0,90% y 0,92%.</p> <p>- Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 serie con 3 mediciones: $\pm 0,10 \log_{10}(\text{DICC}_{50}/\text{mL})$.</p>

3.3.2.2.2 Resultados

• Linealidad

El título infeccioso se expresa en $\log_{10}(\text{DICC}_{50}/\text{mL})$.

Los resultados del estudio se resumen en la tabla 40.

Los títulos infecciosos medios de la vacuna sin diluir son medias de las 3 series:

- Para el tipo 1 = $8,79 \log_{10}(\text{CCID}_{50}/\text{mL})$
- Para el tipo 2 = $8,73 \log_{10}(\text{CCID}_{50}/\text{mL})$
- Para el tipo 1 = $8,79 \log_{10}(\text{CCID}_{50}/\text{mL})$

Por lo tanto, el título infeccioso teórico previsto en la muestra de prueba se calcula del siguiente modo:

Para la vacuna diluida:

Título teórico previsto = concentración de la vacuna sin diluir + log (factor de dilución).

- Para la vacuna con agregado:





$$\text{Título teórico previsto} = \log \left(\frac{(V_{C2} \times 10^{\text{Concentración de C2}}) + (V_{RI} \times 10^{\text{concentración de la vacuna sin agregado}})}{V_{C2} + V_{RI}} \right)$$

Donde:

- V_{C2} = volumen del concentrado 2 = 0,250 mL.
- V_{RI} = volumen del RI = 0,475 mL

y

- Tipo 1: concentración de C2 = 11,40 $\log_{10}(\text{DICC}_{50}/\text{mL})$: lote FA266559.
- Tipo 2: concentración de C2 = 11,73 $\log_{10}(\text{DICC}_{50}/\text{mL})$: lote FA267778.
- Tipo 3: concentración de C2 = 11,23 $\log_{10}(\text{DICC}_{50}/\text{mL})$: lote FA270932.

Se obtienen los siguientes resultados:

Tabla 40: Linealidad: títulos infecciosos medidos frente a títulos infecciosos teóricos previstos ($\log_{10}(\text{DICC}_{50}/\text{mL})$)

Tipo	Nivel de dilución	Factor de dilución	Adición	Concentración teórica prevista $\log_{10}(\text{DICC}_{50}/\text{mL})$	Concentración medida $\log_{10}(\text{DICC}_{50}/\text{mL})$		
					Serie 1		
Tipo 1	RI 1 S	/	0,250 mL de C2 + 4,750 mL de RI 1	10,12	10,21	10,67	10,33
	RI 1	/	/	8,79	8,74	8,85	8,77
	RI D1a	1:20	/	7,49	7,63	7,71	7,60
	RI D1b	1:400	/	6,18	6,44	6,47	6,46
	RI D1c	1:8000	/	4,88	5,34	5,21	5,24
Tipo 2	RI 2 S	/	0,250 mL de C2 + 4,750 mL de RI 2	10,44	10,74	10,68	10,48
	RI 2	/	/	8,73	8,81	8,79	8,60
	RI D2a	1:20	/	7,43	7,51	7,69	7,47
	RI D2b	1:400	/	6,13	6,26	6,48	6,24
	RI D2c	1:8000	/	4,83	5,05	5,23	5,17
Tipo 3	RI 3 S	/	0,250 mL de C2 + 4,750 mL de RI 3	9,95	10,61	10,41	10,27
	RI 3	/	/	8,66	8,64	8,69	8,65
	RI D3a	1:20	/	7,36	7,36	7,46	7,37
	RI D3b	1:400	/	6,06	6,17	6,24	6,08
	RI D3c	1:8000	/	4,76	5,02	5,00	4,88





Como la concentración media del título infeccioso en la vacuna sin diluir (nivel RI) es la media de 3 concentraciones medidas, este nivel no se incluye en los cálculos de exactitud.

Por lo tanto, la exactitud se estudia en 4 niveles de título infeccioso.

La linealidad en el rango seleccionado se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos presentados en la tabla 40:

- La homogeneidad de las varianzas vinculadas se verifica mediante la prueba de Cochran.
- La dependencia entre los títulos infecciosos teóricos previstos y los títulos infecciosos medidos, así como la linealidad de esta relación, se analizan mediante una regresión lineal no ponderada utilizando el método de los cuadrados mínimos. Se debe mostrar una pendiente significativa y una desviación no significativa de la linealidad.

Linealidad para el tipo 1

La prueba de Cochran demuestra que las varianzas de todos los niveles de titulación teóricos no son homogéneas.

La dependencia lineal entre el título infeccioso teórico previsto y el título infeccioso medido no se puede determinar.

El análisis se lleva a cabo en el rango de los 4 títulos infecciosos teóricos [4,99 – 8,89] $\log_{10}(\text{DICC}_{50}/\text{mL})$.

La prueba de Cochran demuestra que las varianzas de los 4 niveles de titulación teóricos son homogéneas.

Existe una dependencia lineal entre el título infeccioso teórico previsto y el título infeccioso medido.

La ecuación de la recta de regresión presentada en la figura 1 es la siguiente:

$$Y = (0,860 \pm 0,155) + (0,904 \pm 0,022) \cdot X$$

Donde:

X: título infeccioso teórico ($\log(\text{DICC}_{50}/\text{ml})$).

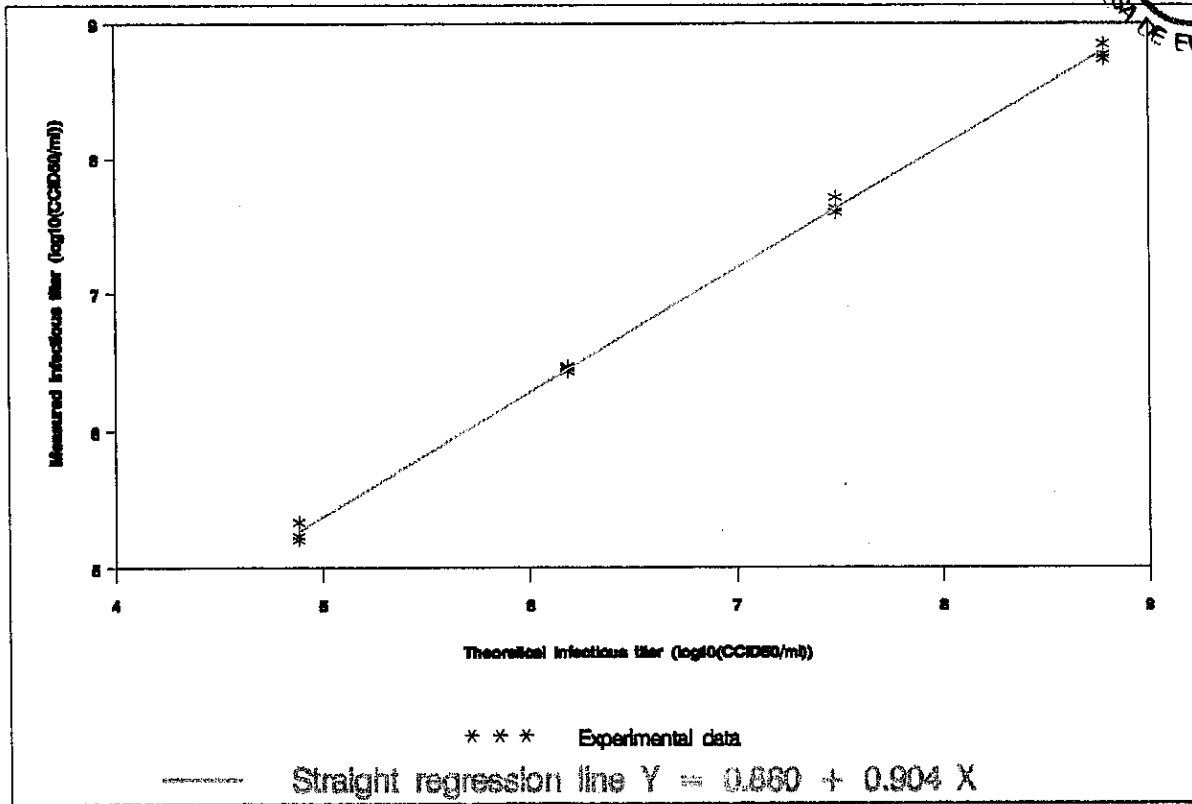
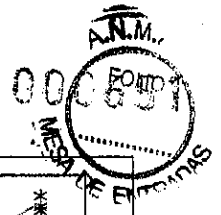
Y: título infeccioso medido ($\log(\text{DICC}_{50}/\text{ml})$).

Coefficiente de correlación lineal: $R^2 = 0,9988$.

Rango de linealidad: [5,12 – 8,95] UD/mL.



Figura 1: Tipo 1: gráfico de linealidad



Linealidad para el tipo 2

La prueba de Cochran muestra que las varianzas de todos los niveles de titulación teóricos son homogéneas.

Existe una dependencia lineal entre el título infeccioso teórico previsto y el título infeccioso medido.

La ecuación de la recta de regresión presentada en la figura 2 es la siguiente:

$$Y = (-0,388 \pm 0,312) + (0,971 \pm 0,040) \cdot X$$

Donde:

X: título infeccioso teórico (log(DICC₅₀/mL)).

Y: título infeccioso medido (log(DICC₅₀/mL)).

Coefficiente de correlación lineal: $R^2 = 0,9953$.

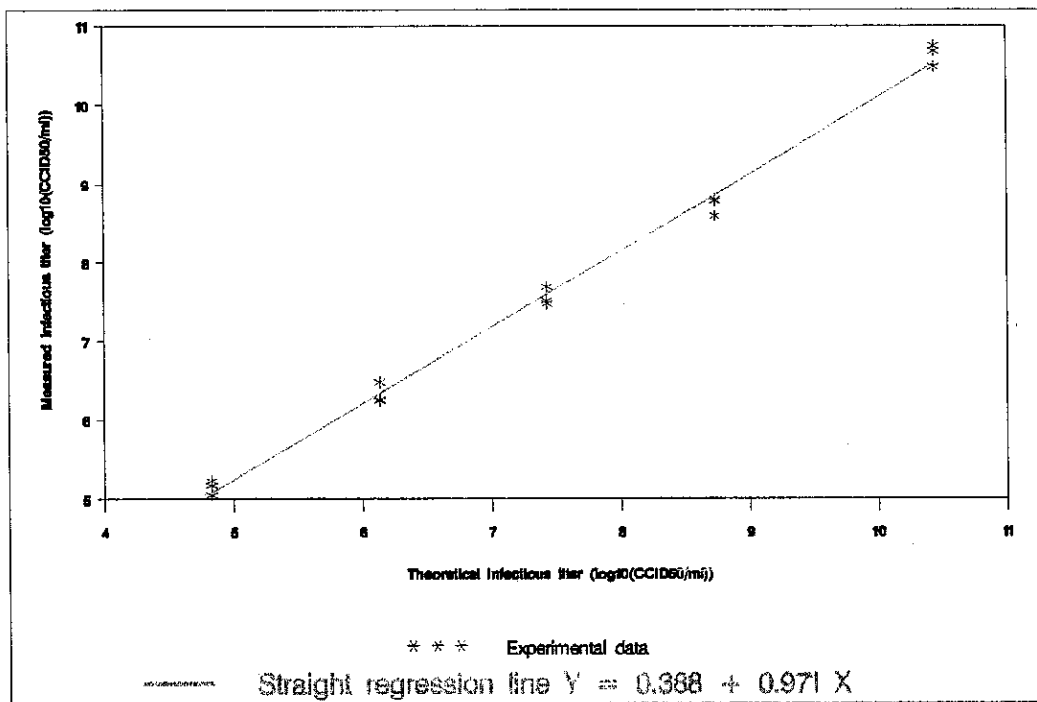
Rango de linealidad: [4,65 – 10,94] UD/mL.

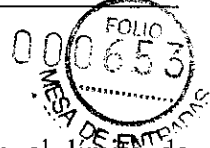
ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.



Figura 2: Tipo 2: gráfico de linealidad





Linealidad para el tipo 3

En todos los niveles de titulación teóricos, la prueba de Cochran se halla en el límite de significancia. Con la prueba de Dixon se detecta un valor atípico, pero no fue confirmado por el laboratorio. Se acepta la ligera diferencia de varianza.

Existe una dependencia lineal entre el título infeccioso teórico previsto y el título infeccioso medido.

La ecuación de la recta de regresión presentada en la figura 3 es la siguiente:

$$Y = (-0,078 \pm 0,441) + (1,033 \pm 0,058) \cdot X$$

Donde:

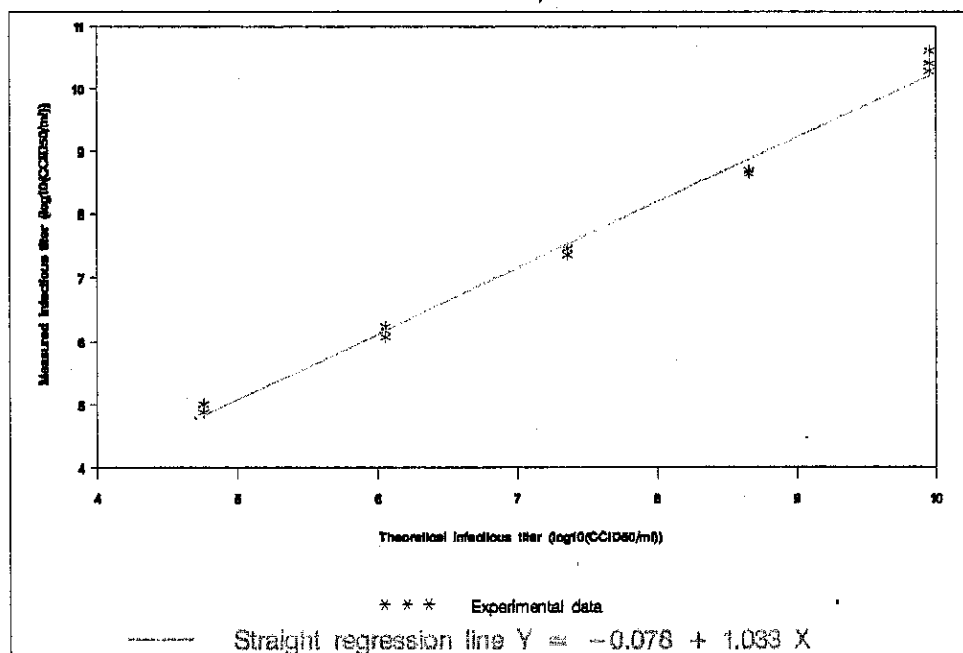
X: título infeccioso teórico (log(DICC₅₀/mL)).

Y: título infeccioso medido (log(DICC₅₀/mL)).

Coefficiente de correlación lineal: R² = 0,9912.

Rango de linealidad: [4,26 – 10,78] UD/mL.

Figura 3: Tipo 3: gráfico de linealidad



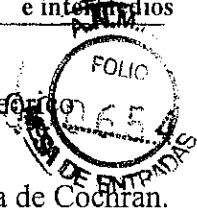
- Exactitud

El título infeccioso se expresa como log₁₀(DICC₅₀/mL) y es la media de 3 títulos individuales.

Los resultados del estudio se resumen en la tabla 40.

La exactitud se analiza sobre datos de la tabla 40 mediante los siguientes pasos:





- Se calcula el porcentaje de recuperación para cada nivel de título infeccioso teórico previsto y para cada grupo.
- Se verifica la homogeneidad de las varianzas entre niveles mediante la prueba de Cochran.
- Cuando se adquiere la homogeneidad, se demuestra mediante un análisis de varianzas que las diferencias entre los niveles de título infeccioso teórico previsto no son significativas.
- Cuando se comprueba la igualdad de las medias entre niveles, se calcula la recuperación porcentual promedio con los límites de confianza del 95 %.

Exactitud para el tipo 1

La prueba de Cochran demuestra que las varianzas de los niveles de concentración previstos son homogéneas.

En la tabla 41 se presenta la recuperación porcentual promedio para cada nivel de concentración teórica.

Tabla 41: Exactitud: Recuperación porcentual promedio

Nivel de concentración teórica en $\log_{10}(\text{DICC}_{50}/\text{mL})$	Media (%)
4,88	108
6,18	104
7,49	102

Debido a que la recuperación porcentual promedio se encuentra entre el 80 % y el 120 %, el método es exacto para el tipo 1.

Exactitud para el tipo 2

La prueba de Cochran muestra que las varianzas de los niveles de concentración previstos son homogéneas.

En la tabla 42 se presenta la recuperación porcentual promedio para cada nivel de concentración teórica:

Tabla 42: Exactitud: Recuperación porcentual promedio

Nivel de concentración teórica en $\log_{10}(\text{DICC}_{50}/\text{mL})$	Media (%)
4,83	107
6,13	103
7,43	102
10,44	102

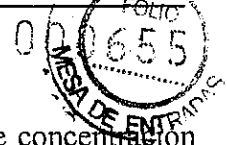
Debido a que la recuperación porcentual promedio se encuentra entre el 80 % y el 120 %, el método es exacto para el tipo 2.

Exactitud para el tipo 3

La prueba de Cochran muestra que las varianzas de los niveles de concentración previstos son

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.



homogéneas.

En la tabla 43 se presenta la recuperación porcentual promedio para cada nivel de concentración teórica :

Tabla 43: Exactitud: recuperación porcentual promedio

Nivel de concentración teórica en log ₁₀ (DICC ₅₀ /mL)	Media
4,76	104
6,06	102
7,36	101
9,95	105

Debido a que la recuperación porcentual promedio se encuentra entre el 80% y el 120%, el método es exacto para el tipo 3.

- Precisión

El título infeccioso se expresa en log₁₀(DICC₅₀/mL).

En la tabla 44 se presentan las concentraciones del virus de la poliomielitis expresadas en log₁₀ DICC₅₀/mL.

Tabla 44: Concentración del virus de la poliomielitis (log₁₀ DICC 50/mL).

	Serie 1	Serie 2	Serie 3
Tipo 1	8,86	8,86	8,73
	8,86	8,79	8,66
	8,58	8,66	8,65
	8,73	8,42	8,66
	8,58	8,79	8,51
	8,58	8,73	8,79
Tipo 2	8,95	8,89	8,81
	9,04	8,67	8,81
	9,09	8,77	8,85
	8,78	8,85	8,87
	8,86	8,90	8,71
	8,88	8,66	8,79
Tipo 3	8,56	8,71	8,54
	8,61	8,66	8,57
	8,50	8,48	8,58
	8,68	8,58	8,55
	8,75	8,65	8,61
	8,74	8,54	8,56

