



**UNSAM**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE  
SAN MARTÍN



Instituto  
Nacional  
de Tecnología  
Industrial

Tesis de Maestría en Calidad Industrial

**“Aseguramiento de la calidad de los resultados de los ensayos de liberación por control de calidad de la vacuna a virus vivo atenuado Candid # 1 contra la fiebre hemorrágica argentina (FHA).”**

Autora: Bioq. Julieta Chale

Directora de Tesis: Dra. Laura M. Riera

Marzo 2015

## ***Dedicatoria***

En especial a mis padres por acompañarme siempre en este maravilloso camino de la vida, por transmitirme sus valores, por haberme dado la posibilidad de estudiar y la hermosa libertad de poder elegir la carrera universitaria que yo quería.

Como siempre ellos nos dijeron tanto a mí, como a mis hermanos, *“aprovechen el estudio que es la herramienta que les queremos dejar para defenderse en la vida.”*

Realmente soy una agradecida.

A mis padres y a mis hermanos, Luciana, Joaquín y Agustina que gracias a su incondicional apoyo pude realizar el cambio de vida que tanto quería.

A Laura, mi directora de tesis, que me dio la posibilidad de hacer realidad mi regreso a Pergamino.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud y al Ministerio de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca del Plan de Mejoramiento Institucional para realizar la Maestría en Calidad Industrial en la Universidad Nacional de San Martín.

A los docentes de la UNSAM por el compromiso y por la formación académica brindada durante el desarrollo de la Maestría.

Al Lic. Fernando Kornblit por su aporte tan valioso, su cálida atención y su generosa ayuda para poder realizar el cálculo de incertidumbre.

A Pablo y a Lidia que siempre han estado presentes acompañando durante el transcurso de este camino en la UNSAM.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas “Dr. Julio I. Maiztegui.” que me abrió sus puertas para poder realizar la tesis.

A todo el personal del INEVH que de una forma u otra han colaborado con este proyecto.

Al equipo de Control y Aseguramiento de Calidad a Nahuel Martinez, a Gisele Lázzari, a Carina Paz, a Alejandro Bottale, a Alejandro Raggio, a Sebastián Fossa, a Florencia Cantore, a Carlos Diaz y a Lucas Taborda que gracias a su compromiso, experiencia y colaboración han realizado una enorme contribución para llevar a cabo el desarrollo del presente trabajo e implementar lo que hemos aprendido a su rutina laboral.

En especial a la Dra. Laura Riera, mi directora de tesis, por su apoyo permanente e incondicional durante estos 3 años, por su gran aporte profesional tan enriquecedor, por su generosidad al compartir su conocimiento, por su calidad humana, por confiar en mí, por las discusiones enriquecedoras que hemos tenido, por permitirme ser parte del equipo de Control y Aseguramiento de Calidad del INEVH.

## RESUMEN

Candid # 1 es una vacuna eficaz para prevenir la fiebre hemorrágica argentina (FHA). Se produce en las instalaciones habilitadas del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui". Con la introducción de la vacuna, la incidencia de la FHA ha disminuido significativamente. Por poseer un reservorio distinto al humano no es posible su erradicación por lo que resulta imprescindible sostener la vacunación en el área endémica.

En el presente trabajo, mediante la utilización de herramientas de calidad, se analizaron las variables que impactan sobre los resultados de los ensayos de liberación de la vacuna Candid # 1.

Se obtuvo la incertidumbre expandida (U) asociada a la expresión del resultado en los ensayos cuantitativos (Potencia,  $U=0.32$ ; Identidad,  $U=0.30$ ; Humedad residual,  $U=0.58$ ; Osmolalidad,  $U=12.6$ ; pH,  $U=0.18$ ). En los ensayos cualitativos se realizaron revalidaciones y verificaciones.

La incertidumbre se utilizará para establecer límites internos en los ensayos de liberación y para evaluar la consistencia de la producción. Asimismo, los datos generados permiten establecer un material de referencia para consideración de la autoridad regulatoria nacional. Finalmente el conocimiento exhaustivo de los parámetros de calidad que caracterizan a cada lote de vacuna aporta significativamente a garantizar su seguridad y eficacia.

## **ABSTRACT**

Candid # 1 is an effective vaccine to prevent argentine hemorrhagic fever (AHF). It is produced in approved facilities at the Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui". With the introduction of the vaccine, the incidence of AHF has decreased significantly. It is not possible to eradicate AHF because it has a reservoir outside the human being, for this reason is essential to hold vaccination in the endemic area.

In this work, analysis of the parameters that plays a key role in Candid # 1 batch release assays was performed using quality tools.

The expanded uncertainty (U) associated with the expression of the result in all the quantitative assays (Potency,  $U=0.32$ ; Identity,  $U=0.30$ ; Residual moisture,  $U=0.58$ ; Osmolality,  $U=12.6$ ; pH,  $U=0.18$ ) was obtained. Revalidations and verifications were also done in the qualitative assays.

Uncertainty will be used to set internal limits on release assays and to assess the consistency of production. Furthermore, the data generated in this study would allow having a potential reference material for consideration by the national regulatory authority. Finally, the in depth knowledge of the quality parameters properties of each batch of vaccine significantly contributes to ensuring the safety and efficacy of the product.

## **GLOSARIO**

### **A**

### **B**

### **C**

#### **Calibración**

operación que bajo condiciones especificadas establece, en una primera etapa, una relación entre los valores y sus incertidumbres de medida asociadas obtenidas a partir de los patrones de medida y las correspondientes indicaciones con sus incertidumbres asociadas y, en una segunda etapa, utiliza esta información para establecer una relación que permita obtener un resultado de medida a partir de una indicación

#### **Condición de precisión intermedia**

condición de medición, dentro de un conjunto de condiciones que incluye el mismo procedimiento de medición, el mismo lugar y mediciones repetidas del mismo objeto u objetos similares durante un periodo amplio de tiempo, pero que puede incluir otras condiciones que involucren variaciones

#### **Condición de repetibilidad**

condición de medición, dentro de un conjunto de condiciones que incluye el mismo procedimiento de medida, los mismos operadores, el mismo sistema de medida, las mismas condiciones de operación y el mismo lugar, así como mediciones repetidas del mismo objeto o de un objeto similar en un periodo corto de tiempo

#### **Condición de reproducibilidad**

condición de medición, dentro de un conjunto de condiciones que incluye diferentes lugares, operadores, sistemas de medida y mediciones repetidas de los mismos objetos u objetos similares

### **D**

### **E**

#### **Error aleatorio**

componente del error de medida que, en mediciones repetidas, varía de manera impredecible

**Error sistemático**

componente del error de medida que, en mediciones repetidas, permanece constante o varía de manera predecible

**Evaluación tipo A de la incertidumbre de medida**

Evaluación de una componente de la incertidumbre de medida mediante un análisis estadístico de los valores medidos obtenidos bajo condiciones de medida definidas

**Exactitud**

proximidad entre un valor medido y un valor verdadero de un mensurando

**F****Factor de cobertura**

número mayor que uno por el que se multiplica una incertidumbre típica combinada para obtener una incertidumbre expandida

**G****H****I****Incertidumbre**

parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mensurando, a partir de la información que se utiliza

**Incertidumbre expandida**

producto de una incertidumbre típica combinada y un factor mayor que uno

**Instrumento de medida**

dispositivo utilizado para realizar mediciones, solo o asociado a uno o varios dispositivos suplementarios

**J****K**

## L

## M

### **Material de referencia**

material suficientemente homogéneo y estable con respecto a propiedades especificadas, establecido como apto para su uso previsto en una medición o en un examen de propiedades cualitativas

### **Material de referencia certificado**

material de referencia acompañado por la documentación emitida por un organismo autorizado, que proporciona uno o varios valores de propiedades especificadas, con incertidumbres y trazabilidades asociadas, empleando procedimientos válidos

### **Medición**

proceso que consiste en obtener experimentalmente uno o varios valores que pueden atribuirse razonablemente a una magnitud

### **Mensurando**

magnitud que se desea medir

## N

## Ñ

## O

## P

### **Patrón nacional**

patrón reconocido por una autoridad nacional para servir, en un estado o economía, como base para la asignación de valores a otros patrones de magnitudes de la misma naturaleza

### **Patrón primario**

patrón establecido mediante un procedimiento de medida primario o creado como un objeto elegido por convenio

**Patrón secundario**

patrón establecido por medio de una calibración respecto a un patrón primario de una magnitud de la misma naturaleza

**Precisión**

proximidad entre las indicaciones o los valores medidos obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto, o de objetos similares, bajo condiciones especificadas

**Precisión intermedia**

precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de precisión intermedia

**Q****R****Repetibilidad**

precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de repetibilidad

**Reproducibilidad**

precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de reproducibilidad

**Resultado de una medición**

Conjunto de valores de una magnitud atribuidos a un mensurando, acompañados de cualquier otra información relevante disponible

**Robustez**

es la habilidad de proporcionar resultados de exactitud y precisión bajo una variedad de condiciones

**S****Sensibilidad**

cociente entre la variación de una indicación de un sistema de medida y la variación correspondiente del valor de la magnitud medida

**T****U**

## **V**

### **Validación**

verificación de que los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto

### **Valor medido**

valor de una magnitud que representa un resultado de medida

### **Verificación**

aportación de evidencia objetiva de que un elemento satisface los requisitos especificados

## **W**

## **X**

## **Y**

## **Z**

## LISTADO DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

<b>Ac</b>	Anticuerpo
<b>AE</b>	Antisuero Específico
<b>Ag</b>	Antígeno
<b>AMFE</b>	Análisis del Modo de Fallas y sus Efectos
<b>ANMAT</b>	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
<b>ANR</b>	Autoridades Nacionales de Regulación
<b>API</b>	Agua para rehidratación de la muestra para inyectables estéril
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ATB</b>	Antibiótico
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>ATS</b>	Medio de cultivo Tryptic Soy Agar
<b>B</b>	Bioterio de animales de Laboratorio
<b>BPF</b>	Buenas Prácticas de Fabricación
<b>CC</b>	CyAc – Sector <i>in vivo</i> / <i>in vitro</i>
<b>CERT</b>	Critical Path Method
<b>CFR 21</b>	Code of Federal Regulations Title 21
<b>CPE</b>	Efecto Citopático Focal
<b>CTS</b>	Caldo Digerido de Caseína – Soja
<b>CV</b>	Coeficiente de Variación
<b>CyAc</b>	Control y Aseguramiento de Calidad
<b>EU/ml</b>	Unidades de Endotoxina por mililitro
<b>FHA</b>	Fiebre Hemorrágica Argentina
<b>FNA</b>	Farmacopea Nacional Argentina
<b>G</b>	Interdepartamental – Generales
<b>IC</b>	Intervalo de Confianza
<b>INEVH</b>	Instituto Nacional de Estudios sobre Virosis Hemorrágicas o Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas “Dr. Julio I. Maiztegui”
<b>JUNV</b>	Virus Junin
<b>LE</b>	Límite de Endotoxina
<b>MC</b>	CyAc – Certificaciones
<b>MDV</b>	Máxima Dilución Válida
<b>MM</b>	División Mantenimiento
<b>MO</b>	CyAc – Operaciones

<b>mosmol/kg</b>	Miliosmoles por kilogramo
<b>PC</b>	Sector Cultivos Celulares Normales
<b>PERT</b>	Program Evaluation and Review Technique
<b>POS</b>	Procedimiento de Operación Standard
<b>PP</b>	Patrón primario
<b>PRNT</b>	Plaque Reduction Neutralization test (Ensayos de Neutralización por Reducción de Placas)
<b>PT</b>	Vacuna Candid # 1, Producto Terminado
<b>P+SD</b>	Promedio de los ensayos más un desvío estándar
<b>P-SD</b>	Promedio de los ensayos menos un desvío estándar
<b>P+2SD</b>	Promedio de los ensayos más dos desvíos estándar
<b>P-2SD</b>	Promedio de los ensayos menos dos desvíos estándar
<b>Q</b>	CyAc – Sector Química / Agua
<b>QFD</b>	Quality Function Deployment
<b>SD</b>	Desvío estándar
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino
<b>TC</b>	CyAc – Sector <i>in vitro</i>
<b>TIO</b>	Medio de cultivo Tioglicolato
<b>TM</b>	CyAc – Sector Microbiología
<b>U</b>	Incertidumbre Expandida
<b>UE</b>	Unidades de Endotoxina
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonias
<b>UFP/ml</b>	Unidades Formadoras de Placa por mililitro
<b>USP</b>	United States Pharmacopeia
<b>VJ</b>	Virus Junin
<b>VR</b>	Virus de Referencia
<b>VV</b>	CyAc – Sector <i>in vivo</i>
<b>WHO/OMS</b>	World Health Organization / Organización Mundial de la Salud

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>4</b>
<b>3. ALCANCES</b>	<b>6</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>7</b>
4.1 Objetivo general	7
4.2 Objetivos específicos	7
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>8</b>
5.1 Materiales	8
5.2 Ensayos	9
5.3 Herramientas de calidad	10
5.3.1 Herramienta de Calidad: Lluvia de Ideas	11
5.3.2 Herramienta de Calidad: Diagrama de Ishikawa	11
5.3.3 Herramienta de Calidad: 5W+2H	12
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>13</b>
6.1 Diagrama de Ishikawa	13
6.2 5W+2H	14
6.2.1 Categoría: Método/ Validación/Incertidumbre. Análisis retrospectivo. Diseño y ejecución de ensayos de validación.	15
6.2.1.1 Ausencia de contaminantes: Ensayo de Esterilidad	15
6.2.1.1.1 Fundamentos del método	15
6.2.1.1.2 Materiales y métodos	16
6.2.1.1.3 Diseño del ensayo de revalidación	16
6.2.1.1.4 Resultados	19
6.2.1.2 Ensayo de Potencia	24
6.2.1.2.1 Fundamentos del método	24
6.2.1.2.2 Materiales y métodos	24
6.2.1.2.3 Diseño del ensayo de validación	25
6.2.1.2.4 Resultados	25
6.2.1.2.4.1 Cálculo de Incertidumbre Expandida	29
6.2.1.3 Ensayo de Identidad	30
6.2.1.3.1 Fundamentos del método	30
6.2.1.3.2 Materiales y métodos	32
6.2.1.3.3 Diseño del ensayo de validación	34
6.2.1.3.4 Resultados	34

6.2.1.3.4.1 Cálculo de Incertidumbre Expandida	36
6.2.1.4 Toxicidad: Seguridad General	36
6.2.1.4.1 Fundamentos del método	36
6.2.1.4.2 Método	37
6.2.1.4.3 Resultados	37
6.2.1.5 Pureza: Ensayo de Endotoxinas	37
6.2.1.5.1 Fundamentos del método	37
6.2.1.5.2 Método	37
6.2.1.5.3 Resultados	38
6.2.1.6 Pureza: Humedad Residual	39
6.2.1.6.1 Fundamentos del método	39
6.2.1.6.2 Materiales y métodos	40
6.2.1.6.3 Diseño del ensayo de validación	40
6.2.1.6.4 Resultados	41
6.2.1.6.4.1 Cálculo de Incertidumbre Expandida	44
6.2.1.7 Pureza (monitor): Ensayo de Osmolalidad	44
6.2.1.7.1 Fundamentos del método	44
6.2.1.7.2 Materiales y métodos	46
6.2.1.7.3 Diseño del ensayo de validación	46
6.2.1.7.4 Resultados.	47
6.2.1.7.4.1 Cálculo de Incertidumbre Expandida	49
6.2.1.8 Pureza (monitor): Ensayo de pH	50
6.2.1.8.1 Fundamentos del método	50
6.2.1.8.2 Materiales y métodos	51
6.2.1.8.3 Diseño del ensayo de validación	51
6.2.1.8.4 Resultados	51
6.2.1.8.4.1 Cálculo de Incertidumbre Expandida	53
7. DISCUSIÓN	55
8. CONCLUSIONES	60
9. BIBLIOGRAFÍA	61
ANEXOS	66
BIOGRAFÍA JULIETA CHALE	100

## ÍNDICE DE TABLAS

1. Criterios de aceptabilidad de los ensayos realizados al PT.	9
2. Plan de acción 5W+2H correspondiente a la categoría considerada de riesgo alto.	14
3. Esterilidad de medio de cultivo. Condiciones de incubación.	16
4. Promoción de crecimiento. Condiciones de incubación.	17
5. Revalidación del método de transferencia directa. Condiciones de incubación.	18
6. Esterilidad de los medios de cultivo.	19
7. Ensayo de promoción del crecimiento.	20
8. Ensayo de revalidación del método de transferencia directa.	21
9. Revalidación: Resultados de la repetición con <i>B. subtilis</i> y medio de cultivo CTS.	22
10. Revalidación: Resultados de la repetición con mayor volumen de <i>B. subtilis</i> y medio de cultivo CTS.	23
11. Ensayo de potencia. Distribución normal. Parámetros estadísticos.	26
12. Prueba de identidad. Distribución normal. Parámetros estadísticos.	35
13. Determinación de humedad residual. Parámetros estadísticos.	41
14. Ensayo de Osmolalidad. Parámetros estadísticos.	47
15. Ensayo de pH. Parámetros estadísticos	52

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

1. Diagrama de Ishikawa realizado con el equipo de trabajo de Control y Aseguramiento de Calidad.	13
2. Determinación de precisión del ensayo de potencia.	27
3. Determinación de sensibilidad del ensayo de potencia.	27
4. Determinación de precisión intermedia del ensayo de potencia.	28
5. Determinación robustez del ensayo de potencia. Condición I.	28
6. Determinación robustez del ensayo de potencia. Condición II.	29
7. Determinación robustez del ensayo de potencia. Condición III.	29
8. Determinación de linealidad de la prueba de identidad.	35
9. Determinación de precisión intermedia de la prueba de identidad.	36
10. Determinación de precisión en el ensayo de humedad residual.	42
11. Determinación de exactitud en el ensayo de humedad residual.	42

<b>12. Determinación de precisión intermedia en el ensayo de humedad residual.</b>	<b>43</b>
<b>13. Determinación de precisión intermedia en el ensayo de humedad residual. Influencia de la temperatura ambiente.</b>	<b>43</b>
<b>14. Determinación de precisión intermedia en el ensayo de humedad residual. Influencia de la humedad relativa ambiente.</b>	<b>44</b>
<b>15. Determinación de precisión en el ensayo de osmolalidad. Patrón 100 mOsm/kg H<sub>2</sub>O.</b>	<b>47</b>
<b>16. Determinación de precisión en el ensayo de osmolalidad. Patrón 1500 mOsm/kg H<sub>2</sub>O.</b>	<b>48</b>
<b>17. Determinación de exactitud en el ensayo de osmolalidad. Patrón 100 mOsm/kg H<sub>2</sub>O.</b>	<b>48</b>
<b>18. Determinación de precisión en el ensayo de osmolalidad. Patrón 1500 mOsm/kg H<sub>2</sub>O.</b>	<b>49</b>
<b>19. Determinación de precisión intermedia en el ensayo de osmolalidad.</b>	<b>49</b>
<b>20. Precisión en el ensayo de pH.</b>	<b>52</b>
<b>21. Exactitud en el ensayo de pH.</b>	<b>53</b>
<b>22. Precisión intermedia en el ensayo de pH.</b>	<b>53</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>1. Área endémica y nuevos escenarios.</b>	<b>1</b>
<b>2. Esquema de producción de vacuna Candid # 1.</b>	<b>8</b>
<b>3. Ensayo de promoción de crecimiento: puntos de corte en medio líquido y sólido.</b>	<b>19</b>
<b>4. Ensayo de potencia: inoculación de células con la dilución viral; recuento de UFP.</b>	<b>26</b>
<b>5. Esquema de neutralización por reducción de placas.</b>	<b>31</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

La fiebre hemorrágica argentina (FHA) es una enfermedad endemoepidémica grave que emergió en la región pampeana, a principios de la década del 50, caracterizada clínicamente por fiebre, manifestaciones neurológicas, alteraciones renales y hepáticas, leucopenia y plaquetopenia [1]. El agente etiológico de la misma es el virus Junin (JUNV), un virus a ARN de la familia Arenaviridae, que se agrupa filogenéticamente con los virus Machupo, Chapare, Guanarito, y Sabiá, agentes causantes de fiebres hemorrágicas en Bolivia, Venezuela y Brasil [2-5].

La FHA tiene un tratamiento específico que consiste en la transfusión de plasma inmune dentro de los primeros ocho días de evolución desde el comienzo de los síntomas. Este tratamiento reduce la mortalidad de un 15-30% a menos del 1%, y es administrado en base a dosis estandarizadas de anticuerpos neutralizantes para el JUNV. [6].

El área endémica comprende a cuatro provincias argentinas: sur de Córdoba, sur de Santa Fe, norte de La Pampa y norte de Buenos Aires. En los últimos años se observa una extensión progresiva del área endémica de la FHA con cambios en los patrones eco epidemiológicos (Figura 1).

**Figura 1. Área endémica y nuevos escenarios.**



Fuente: Informe para la XXVII reunión anual del programa nacional de control de la fiebre hemorrágica argentina, 2013

El reservorio natural del JUNV es el roedor *Calomys musculinus*. La infección humana resulta del contacto directo o indirecto de un individuo susceptible con roedores infectados y/o sus excretas. Estudios experimentales han demostrado que la transmisión del virus Junin en los reservorios es generalmente horizontal produciéndose entre roedores en contacto muy directo entre ellos como encuentros agresivos por defensa de su territorio. La distribución de *C. musculinus* depende de

condiciones climáticas. [7- 10]. El control de los roedores reservorios no es practicable, por lo que, para la prevención de la FHA se han dirigido los esfuerzos a la obtención de una vacuna [11, 12].

Un proyecto de colaboración científica entre EE.UU. y la Argentina permitió el desarrollo de la vacuna de virus Junin vivo atenuado Candid # 1 [12].

La cepa Candid # 1 de Virus Junin derivada de la cepa parental XJ 44 mediante clonados por dilución final y single burst en células diploides certificadas FRhL-2 (ATCC-CCL 160). Completados extensos estudios preclínicos en cobayos y monos Rhesus, la mitad de la existencia de la Semilla Maestra [Junin XJ, Cobayo (2), Cerebro de Ratón (44), FRhL-2 (17)] y de la Semilla de Trabajo [Junin XJ, Cobayo (2), Cer, Ratón (44), FRhL-2 (18)] de la cepa vacunal Candid #1 fueron cedidas a la República Argentina y a la custodia del INEVH en diciembre de 1983.

La historia de la vacuna se resume: Candid 1 = XJ, Cob<sub>2</sub> Cer R<sub>44</sub> FRh L-2<sub>16</sub>, ...- FRhL - 2<sub>17</sub> (Semilla Maestra) ...- FRhL - 2<sub>18</sub> (Semilla Secundaria)...- FRhL - 2<sub>19</sub> (Vacuna).

Esta cepa, resultó ser inocua, inmunogénica y eficaz para prevenir la enfermedad por JUNV en estudios preclínicos, en los que también se demostró la ausencia de neurovirulencia, neurotropismo o manifestaciones hemorrágicas, y la estabilidad del comportamiento atenuado de la cepa vacunal [13, 14]. Se demostró también la protección en cobayos y monos contra el desafío con virus Machupo, el agente etiológico de la fiebre hemorrágica boliviana [15-17].

En forma simultánea, el Gobierno de la Nación Argentina, comienza en el entonces Instituto Nacional de Estudios sobre Virosis Hemorrágicas (INEVH) la construcción de una planta para la producción y control de vacunas para uso humano.

Los estudios clínicos de Candid # 1 en voluntarios sanos en fases I y II fueron realizados en EE.UU. y la Argentina con vacuna producida por *The Salk Institute*, Swiftwater, PA, EE.UU. [18,19]. Entre 1988 y 1990 se realizaron con los mismos lotes de vacuna, los ensayos de Fase III: estudio prospectivo, aleatorio, a doble ciego, utilizándose vacuna y placebo, el que permitió demostrar una eficacia de Candid # 1 del 95.5% (IC: 95% 82-99%) para proteger contra la FHA [20].

El Ministerio de Salud de la Nación, demostrada la eficacia de la vacuna para prevenir la FHA, delega en el INEVH el proyecto de producción nacional. Mientras se comenzó con las reformas en la planta con el fin de adecuarse a la norma de Buenas Prácticas de Fabricación, se realizó el proceso de transferencia de la tecnología de producción y control de Candid # 1 desde *The Salk Institute* al área de producción del INEVH. En el año 2001, estas instalaciones fueron habilitadas por la Administración Nacional de

Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) como planta para producir vacunas de virus vivo atenuado para uso en humanos [21].

En el año 2006 se culminó el ensayo clínico en 946 voluntarios humanos sanos, donde se comparó la vacuna Candid # 1 producida en Argentina con la elaborada en EE.UU., que había sido utilizada en estudios previos. Ambas vacunas mostraron una tasa equivalente de inmunogenicidad ligeramente superior al 95.5%. No se observaron eventos adversos graves relacionados con la vacuna. Estos resultados indicaron que la vacuna Candid # 1 elaborada en la Argentina es equivalente a la elaborada en los EE.UU, permitiendo extrapolar los estudios previos realizados. [22]. Este ensayo permitió el registro de la vacuna Candid # 1 como nueva especialidad medicinal ante ANMAT, (Registro N° 53205) [23].

Candid # 1 es considerada una vacuna huérfana ya que está destinada a una población limitada de nuestro país estimada en 5.000.000 de habitantes y su comercialización no recuperaría los costos de producción. [15, 24]

La vacuna, compuesta por virus vivo atenuado, de vía intramuscular de administración, tiene ciertas limitaciones por ser un producto estéril termolábil liofilizado, se debe conservar entre -15°C a -20°C. Una vez resuspendida en el vacunatorio, se debe conservar entre 2°C a 8°C y se debe utilizar en el término de 4 horas de su reconstitución.

Las condiciones que deben reunir las personas que deseen vacunarse se detallan a continuación:

- Residir o desarrollar actividades en las cuatro provincias del área endémica de FHA.
- Hombres y mujeres mayores de 15 años de edad.
- No haber recibido vacuna Candid # 1 anteriormente.
- En caso de mujeres, no deben estar embarazadas o amamantando.
- No presentar cuadros agudos o crónicos descompensados.
- No estar recibiendo corticoides sistémicos o presentar cuadros de inmunosupresión.
- No haber recibido otras vacunas y/o gammaglobulinas en el mes previo, ni recibirlas en el mes posterior a Candid # 1.

El 3 de enero de 2007, el Ministerio de salud, incorporó en el Programa Nacional de Inmunizaciones, la vacunación contra la FHA, con carácter gratuito y obligatorio, en poblaciones de riesgo [25]. Actualmente, la vacuna Candid # 1 se distribuye a vacunatorios instalados en las provincias afectadas.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Como se puede observar, por lo expuesto en la introducción, en los primeros años de la enfermedad los hombres afectados trabajaban en contacto directo con el campo, con la cosecha manual. Posteriormente, con la introducción de las prácticas de agricultura mecanizada, los tractoristas y en la actualidad los transportistas continúan siendo las poblaciones más expuestas. A partir de 1992, con la introducción de la vacuna, la incidencia de la FHA ha disminuido significativamente. Este descenso en el número de casos se ha sostenido en el tiempo, lo que refuerza la evidencia de su asociación con la vacunación [26]. Al ser una enfermedad no erradicable resulta imprescindible sostener la vacunación con Candid # 1 en el área endémica.

La responsabilidad de la calidad, seguridad y eficacia de las vacunas es del fabricante en primer lugar, en este caso el INEVH, y las Autoridades Nacionales de Regulación (ANR), ANMAT, deben establecer los procedimientos para asegurar que los productos y los fabricantes cumplen con los criterios establecidos.

Las vacunas son medicamentos de origen biológico con cierta variabilidad intrínseca, se caracterizan por procesos de fabricación complejos y por ser administradas masivamente a poblaciones de niños, adolescentes y adultos sanos. Su calidad es evaluada por ensayos del producto final, y se recomienda a las ANR establecer un sistema de reglamentación específico para este tipo de medicamento. Las ANR establecen los requisitos que deben cumplir los solicitantes del registro de una vacuna. Estos requisitos deben mostrar evidencias de que la vacuna ha pasado las fases de investigación, desarrollo, producción y control de calidad, así como también los estudios clínicos, que avalen la calidad, seguridad y eficacia requerida para su uso en humanos. [27]. Esta etapa ya ha sido llevada a cabo por el INEVH. La vacuna debe llegar a la población de una forma segura y efectiva, para lo que se debe garantizar la calidad y trazabilidad de los lotes de vacuna Candid # 1 que se producen en el INEVH y que los resultados sean consistentes con los resultados obtenidos de los lotes utilizados en los ensayos clínicos. Para ello, es imprescindible cumplir con los requisitos regulatorios, científicos y técnicos de ANMAT, Disposición 705/2005 en el marco de especialidades medicinales [28] como así también con los requisitos de Farmacopea Nacional Argentina [29] y de la Organización Mundial de la Salud (OMS) [30] para los ensayos que se realizan en el Laboratorio de Control de Calidad.

La garantía de la calidad de la vacuna es entonces la suma del cumplimiento sostenido con las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) [31] y de la instalación de la mejora continua en los procesos de producción y control.

Es responsabilidad del productor buscar estrategias para estudiar y conocer las limitaciones de los ensayos para la liberación de la vacuna Candid # 1 como PT,

principalmente en los métodos que no se encuentran compendiados en la bibliografía en los que se requieren un conocimiento exhaustivo del comportamiento y limitaciones de los mismos. Cabe destacar la importancia de mantener las metodologías actualizadas y validadas para la mejora continua. El diseño de las validaciones y/o verificaciones se realiza evaluando los factores críticos de mayor impacto que pueden afectar a las determinaciones con las distintas metodologías para la liberación de los lotes manufacturados de vacuna Candid # 1. Dicha evaluación debe realizarse sobre la base del conocimiento y experiencia adquirida en el INEVH desde la transferencia tecnológica. *La mejora en pequeños pasos conduce al éxito* (fuente: “Kaizen” de Kasaki Imai) [32].

### **3. ALCANCES**

Se realizó un análisis exhaustivo que permite garantizar la calidad de los resultados de los ensayos de liberación como producto terminado, de acuerdo a las metodologías utilizadas por el laboratorio de control de calidad. Algunos de los ensayos se utilizan también para la liberación de productos intermedios (producto a granel) y materias primas (sustrato celular) por lo que el conocimiento que el presente trabajo ha generado impactará también en la liberación de los mismos.

Las etapas previas a la liberación de la vacuna: aprobación de materias primas y material de empaque, producción del sustrato celular, producción de producto a granel, liberación de productos intermedios, formulación, llenado aséptico, liofilización y controles de procesos, no fueron abordados en el presente estudio.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Garantizar la calidad de los resultados de los ensayos de liberación por control de calidad, de la vacuna a virus vivo atenuado Candid # 1, contra la fiebre hemorrágica argentina, mediante el cumplimiento de los requisitos regulatorios a través de metodologías validadas o verificadas, para abastecer en forma segura la demanda de vacuna a la población.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Analizar los factores que contribuyen a la calidad de los resultados de los ensayos de liberación por control de calidad, de la vacuna a virus vivo atenuado Candid # 1, mediante la utilización de una herramienta de calidad, identificando las categorías donde se deben aplicar acciones de mejora.
- Diseñar acciones de mejora para las categorías seleccionadas, garantizando su implementación.
- Generar material de referencia para la Autoridad Regulatoria Nacional, para poder cumplir con ítem 1.2 Control de calidad de la Disposición 705/2005 de ANMAT.
- Contar con la información necesaria para proponer la incorporación de la vacuna Candid # 1, al apartado de sueros y vacunas de la Farmacopea Nacional Argentina.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

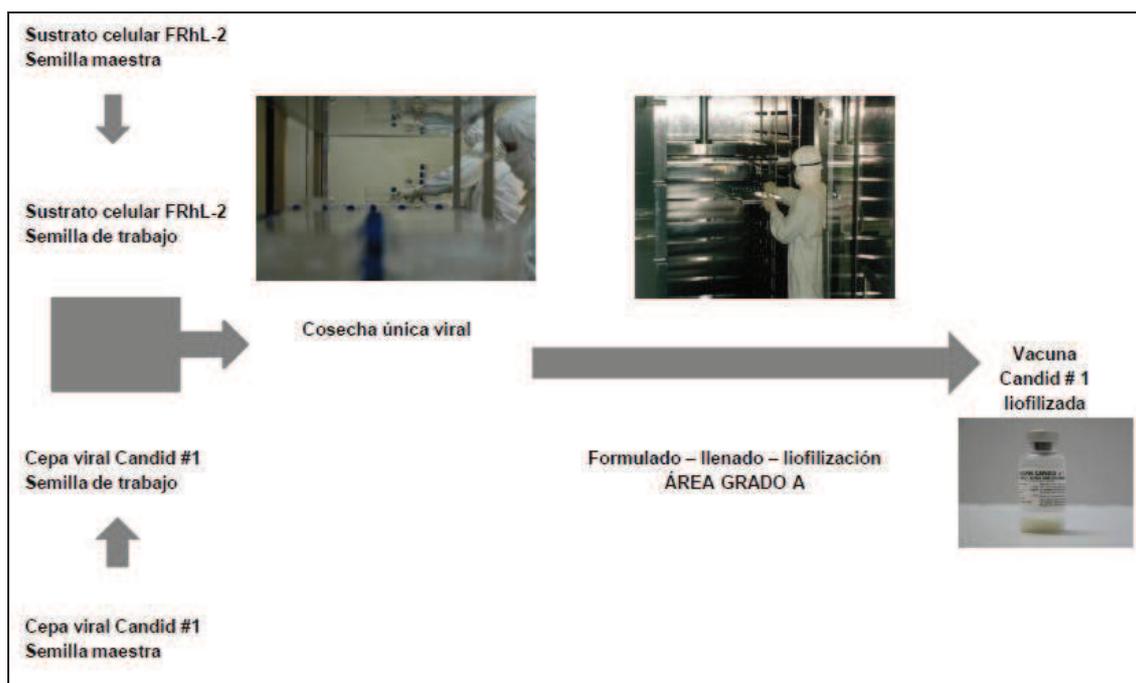
### 5.1 Materiales

#### Vacuna Candid # 1, Producto Terminado (PT). Especificaciones.

Vacuna Candid # 1, Cepa Candid # 1 de Virus Junin vivo atenuado, Polvo liofilizado para inyectables.

En el proceso de producción (Figura 2), se amplifica la línea celular y se inocula con el virus vacunal. Así se obtiene la cosecha única, la cual es sometida a un extenso proceso de control de calidad para su liberación. Las cosechas se mezclan, en función de la cantidad de vacuna a envasar, formando la mezcla de cosechas; luego se formula en un área grado A y se obtiene así la vacuna final a granel, la que será sometida al proceso de envase final en viales multidosis de 20 ml de capacidad para su posterior liofilización.

Figura 2. Esquema de producción de vacuna Candid # 1.



Composición: Cada dosis de 0,5 ml de vacuna reconstituida contiene:

Virus Junin vivo atenuado (cepa Candid # 1)  $10^4$  UFP.

Sulfato de neomicina base: 9,0 mcg/ml.

Excipientes (albúmina sérica humana, gelatina hidrolizada, sorbitol, ácido L- glutámico sal monosódica) csp: 0,5 ml.

## Virus de Referencia

Se prepara en las instalaciones del INEVH. Para ello se retiran de la cámara que se encuentra a una temperatura de  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$  10 viales de vacuna Candid # 1, se realiza la apertura de los viales y se resuspenden con 5,5 ml de agua estéril para inyectables (API). Los viales de vacuna resuspendidos se colocan en hielo granizado.

Se dejan reposar 15 minutos. Se realiza un pool del contenido de los 10 viales en recipiente apropiado. Se realiza el fraccionamiento en viales de 1,2 ml, colocando 0,8 ml en cada uno. Los viales se identifican mediante un rótulo como "Virus Junin de Referencia" detallando lote y fecha de preparación. Se conservan en congeladoras a un temperatura de  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 5.2 Ensayos

Se resumen en la tabla 1 los ensayos realizados al PT, las metodologías utilizadas y los criterios de aceptabilidad. Los criterios de aceptabilidad para los ensayos de Potencia e Identidad fueron establecidos por el desarrollador. Los criterios de aceptabilidad para el resto de los ensayos se establecen en la normativa vigente nacional e internacional (Farmacopea Argentina, USP, CFR). Todos los criterios de aceptabilidad se encuentran declarados en el registro de la vacuna presentado ante ANMAT.

**Tabla 1. Criterios de aceptabilidad de los ensayos realizados al PT.**

Ensayos	Criterios de aceptabilidad
Potencia. Ensayo biológico <i>in vitro</i> . Titulación en células mediante formación de Unidades Formadoras de Placa (UFP) bajo agarosa.	Entre $(1.10^4$ y $9.10^5)$ UFP/ml
Identidad. Ensayo biológico <i>in vitro</i> . Neutralización del virus vacunal con antisuero específico producido en conejos y titulación en células mediante formación de UFP bajo agarosa.	Neutraliza frente a antisuero específico
Esterilidad (CFR21 610.12(a)). Cultivo. Método directo.	Libre de crecimiento microbiano
LAL USPXXIV. Ensayo biológico de detección de endotoxinas bacterianas. Formación de coágulo con lisado de amebocito de cangrejo ( <i>Limulus polyphemus</i> ).	$\leq 700$ EU/ml
Seguridad General (CFR 21.610.11). Ensayo biológico <i>in vivo</i> de toxicidad inespecífica.	Libre de evidencia de contaminantes tóxicos extraños
Humedad Residual. Método Karl Fischer.	Menor al 3%
pH. Potenciometría.	Rango 6,5-7,5
Osmolalidad. Método: depresión en el punto de congelamiento.	Rango 260-330 mOsm/kg

Se evaluó cada metodología de control individualmente, para ello, se definió el tipo de estudio a realizar, diseño del mismo y parámetros a determinar, equipamiento, muestra a estudiar, necesidad de interlaboratorios y análisis estadístico de resultados. La evaluación se realizó mediante la aplicación de distintas herramientas de calidad: lluvia de ideas, diagrama de Ishikawa y 5W+2H, las que se describen a continuación. El estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas “Dr. Julio I. Maiztegui” en la ciudad de Pergamino.

### **5.3 Herramientas de calidad**

La utilización de herramientas de calidad conduce a un mejor diseño de las operaciones y apoya tanto las actividades de mejora como la resolución de problemas en todos los sectores de una organización. Para implementar exitosamente actividades de mejora es importante actuar de forma analítica y sistemática, partiendo previamente de una identificación o detección y análisis de los problemas.

Si bien existen múltiples herramientas de calidad, las más conocidas son:

Las 7 (siete) tradicionales herramientas de calidad

- Lluvia de ideas o brainstorming
- Diagrama de flujo
- Diagrama de Pareto
- Diagrama de Ishikawa o Diagrama de causa efecto
- Diagrama de correlación
- Histogramas
- Gráficos de control

Las 7 (siete) nuevas herramientas de calidad

- Diagrama de afinidad
- Diagrama de interrelación
- Diagrama de árbol
- Diagrama de matriz
- AMFE (Análisis del Modo de Fallas y sus Efectos)
- PERT/CERT (Program Evaluation and Review Technique/Critical Path Method)
- QFD (Quality Function Deployment)

Se analizaron las herramientas citadas y se seleccionó para el presente trabajo el Diagrama de Ishikawa. Para la construcción del mismo se utilizaron otras dos herramientas de calidad como son la lluvia de ideas para poder identificar las posibles causas que afectan a la problemática planteada y la herramienta 5W+2H para realizar

un plan de acción evaluando cada una de las distintas causas y planteando una solución a la problemática planteada.

### 5.3.1 Herramienta de Calidad: Lluvia de Ideas

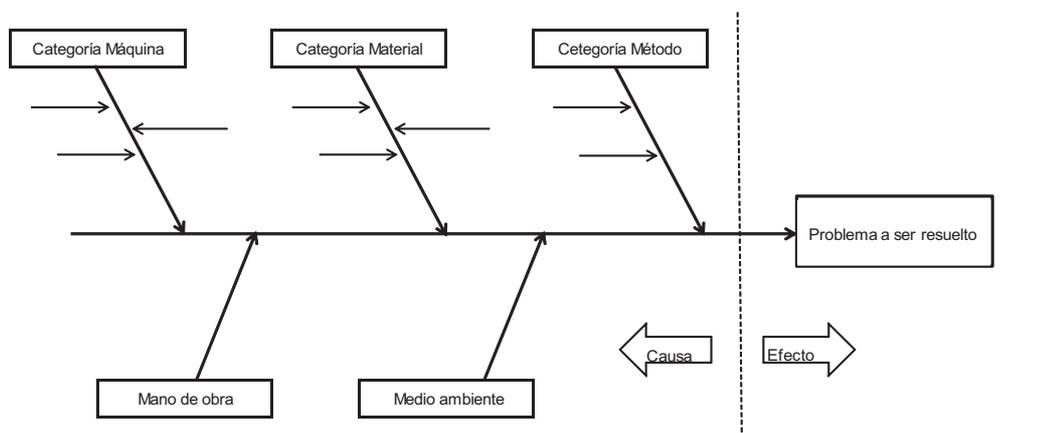
Se utilizó para obtener gran cantidad de ideas a partir de la experiencia y conocimiento del equipo de trabajo de Control y Aseguramiento de Calidad. Se llevaron a cabo tres encuentros mensuales de dos horas cada uno. Se determinaron las posibles causas que pudieran afectar a la problemática [32]: “¿Se garantiza la calidad de los resultados de los ensayos de liberación por control de calidad, de la vacuna a virus vivo atenuado, Candid # 1?”.

### 5.3.2 Herramienta de Calidad: Diagrama de Ishikawa

Con el mismo equipo de trabajo citado en 5.3.1, se construyó un diagrama de Ishikawa que permitió ilustrar con claridad cuáles eran las posibles causas que estaban afectando a la problemática planteada y las relaciones entre ellas. El diagrama exhibió la relación entre la característica de calidad, problema o “efecto”, y los factores o “causas” que pudieron ocasionarla [32-36].

El efecto se ubicó a la derecha del diagrama y las causas o subcausas en la izquierda, como se muestra a continuación:

#### Diagrama de Ishikawa



Durante la construcción del diagrama, fueron identificadas cinco categorías: Equipo-Máquina, Materia Prima-Materiales, Método-Validación-Incertidumbre, Personal y Ambiente.

Cada una de las categorías mencionadas fue analizada minuciosamente con expertos en la materia en distintos grupos de trabajo.

### 5.3.3 Herramienta de Calidad: 5W+2H

Se continuó trabajando con el mismo equipo de Control y Aseguramiento de Calidad y con la misma línea de análisis realizada en 5.3.1 y 5.3.2. Se categorizaron las causas en riesgo alto y riesgo bajo, teniendo en cuenta las exigencias de la normativa vigente. Las causas de riesgo alto se analizaron con el método 5W+2H [37, 38] preguntándose frente a cada causa “¿dónde?, ¿qué?, ¿por qué?, ¿quién?, ¿cómo?, ¿cuándo?, ¿cuánto?” y de esta forma se confeccionó el plan de acción con la siguiente matriz.

#### Plan de acción 5W+2H

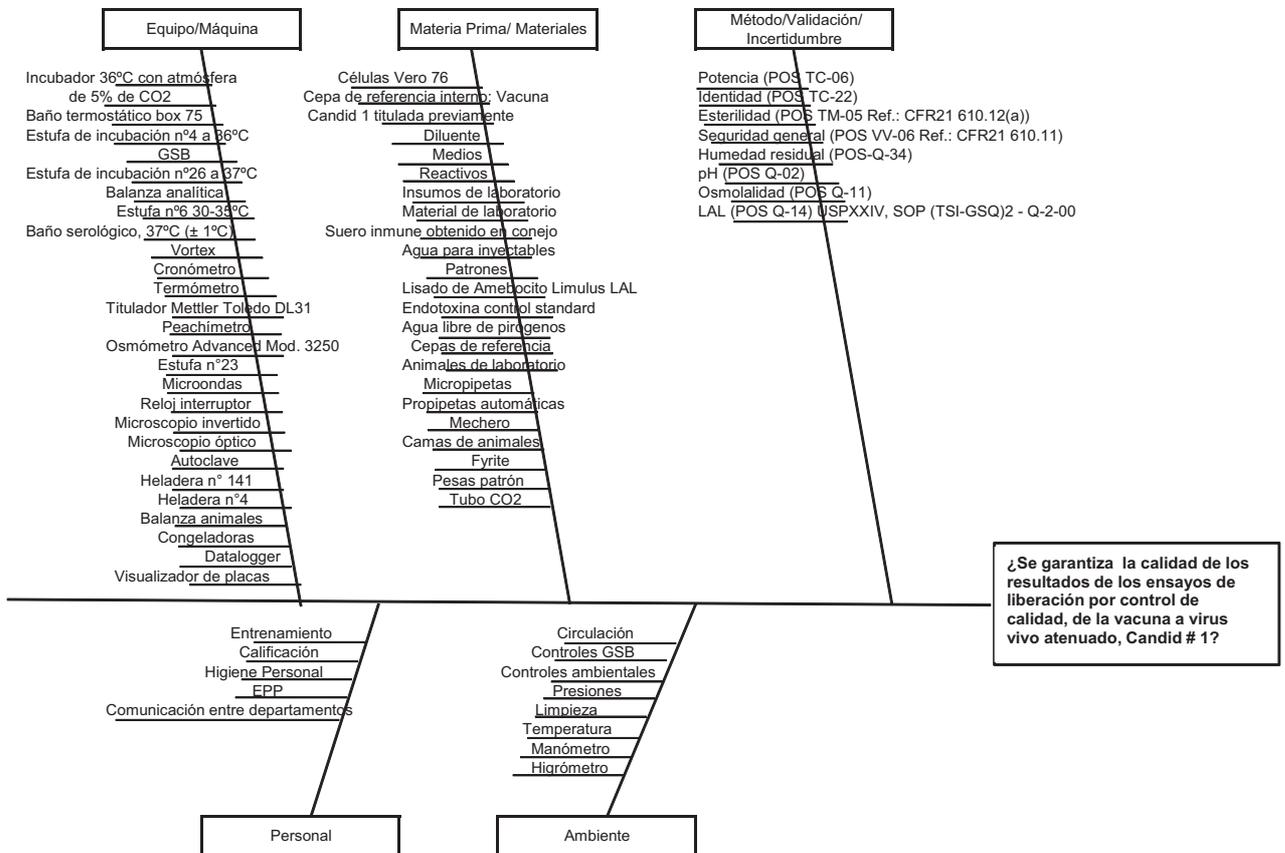
Item	¿Dónde?	¿Qué?	¿Por Qué?	¿Quién?	¿Cómo?	¿Cuándo?	¿Cuánto?

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Diagrama de Ishikawa

El diagrama de Ishikawa o diagrama de espina de pescado, que se describió en 5.3.2, surgió de la lluvia de ideas realizada según 5.3.1, el contenido se muestra a continuación en el Gráfico 1.

**Gráfico 1. Diagrama de Ishikawa realizado con el equipo de trabajo de Control y Aseguramiento de Calidad.**



## 6.2 5W+2H

Se continuó con el análisis utilizando la herramienta de calidad descrita en 5.3.3. Las categorías de riesgo bajo fueron: Equipo-Máquina, Materia Prima-Materiales, Personal y Ambiente. Se encontraron dentro de control cumpliendo con los estándares de calidad para la realización de los ensayos y la normativa vigente.

La categoría Método-Validación-Incertidumbre se consideró de riesgo alto debido a que fue necesario realizar la validación de las metodologías para determinar Potencia, Identidad y Humedad Residual; la revalidación de los ensayos Esterilidad y LAL; la verificación de los métodos para determinar pH y Osmolalidad, como así también, la revisión de la metodología de Seguridad General (Tabla 2).

**Tabla 2. Plan de acción 5W+2H correspondiente a la categoría considerada de riesgo alto.**

Item	¿Dónde?	¿Qué?	¿Por Qué?	¿Quién?	¿Cómo?	¿Cuándo?	¿Cuánto?
37	Método Validación Incertidumbre	Potencia (POS TC-06)	El método no está compendiado	LR/JCH	Realizar validación	08/2014	No Aplica
38	Método Validación Incertidumbre	Identidad (POS TC-22)	El método no está compendiado	LR/JCH	Realizar validación	08/2014	No Aplica
39	Método Validación Incertidumbre	Esterilidad (POS TM-05 Ref.: CFR21 610.12(a))	El método se encuentra validado. Comparar con normativa vigente	LR/JCH	Realizar análisis retrospectivo. Evaluación de necesidad de revalidación	08/2014	No Aplica
40	Método Validación Incertidumbre	Seguridad general (POS VV-06 Ref.: CFR21 610.11)	El método se encuentra compendiado	LR/JCH	Realizar verificación	08/2014	No Aplica
41	Método Validación Incertidumbre	Humedad residual (POS-Q-34)	El método no se encuentra validado	LR/JCH	Realizar validación	08/2014	No Aplica
42	Método Validación Incertidumbre	pH (POS Q-02)	El método se encuentra compendiado	LR/JCH	Realizar verificación	08/2014	No Aplica
43	Método Validación Incertidumbre	Osmolalidad (POS Q-11)	El método se encuentra compendiado	LR/JCH	Realizar verificación	08/2014	No Aplica

44	Método Validación Incertidumbre	LAL (POS Q-14) USPXXIV, SOP (TSI- GSQ)2 - Q- 2-00	El método se encuentra validado. Comparación con normativa vigente	LR/JCH	Realizar análisis retrospectivo. Evaluación de necesidad de revalidación	08/2014	No Aplica
----	---------------------------------------	---	--	--------	--	---------	-----------

El análisis realizado considerando las 5 (cinco) categorías se encuentra en el anexo I.

### **6.2.1 Categoría: Método/ Validación/Incertidumbre. Análisis retrospectivo. Diseño y ejecución de ensayos de validación.**

En el presente apartado se describen los métodos, sus fundamentos y los resultados obtenidos en el marco del trabajo de tesis.

La validación de los ensayos para la liberación de la vacuna Candid # 1, como PT, se realizó retrospectivamente en algunos casos. En otros, como se describe a continuación, fue necesario el diseño de ensayos para calcular los parámetros necesarios en la validación.

Se obtuvo la incertidumbre expandida asociada a la expresión del resultado en todos los ensayos cuantitativos como son el ensayo de potencia, ensayo de identidad, ensayo de humedad residual, ensayo de osmolalidad y ensayo de pH.

#### **6.2.1.1 Ausencia de contaminantes: Ensayo de Esterilidad**

##### **6.2.1.1.1 Fundamentos del método**

El ensayo de esterilidad se emplea para verificar la ausencia de contaminación por microorganismos en productos esterilizados o preparados asépticamente. Existen consideraciones ambientales que deben tenerse en cuenta durante el desarrollo del ensayo, el área de trabajo no debe estar expuesta a la luz ultravioleta directa ni sometida a otros agentes esterilizantes y deben realizarse monitoreos microbiológicos del área durante los mismos. [39-47].

El ensayo de esterilidad que se realiza a la vacuna Candid # 1 como producto terminado (PT), confirma que el producto cumple con los requisitos del ensayo aunque el mismo no es suficiente para suponer la esterilidad de la totalidad del lote ensayado, dadas las limitaciones inherentes a la estadística del muestreo. La condición de estéril se asegura a través de la validación del proceso de llenado aséptico.

El ensayo se realiza en gabinete de seguridad biológica ubicado en el laboratorio de control y aseguramiento de calidad, el cual es certificado anualmente para evidenciar

cumplimiento con los requisitos de un área grado A, de igual características a la empleada para el procesamiento aséptico durante el fraccionamiento de la vacuna.

Antes de efectuar el ensayo de esterilidad de la vacuna Candid # 1, se debe demostrar la ausencia de actividad bacteriostática y fungistática del PT, como así también, se debe demostrar que la presencia de neomicina en la vacuna no tiene influencia en la inhibición de crecimiento microbiano. Lo anteriormente expuesto se realizó a través del procedimiento que se describe en el punto 6.2.1.1.2. Este procedimiento se debe efectuar cada vez que se cambia alguna condición del ensayo o cuando exista un cambio significativo en la composición del producto.

Mediante el análisis retrospectivo de la documentación surge que la validación del ensayo de esterilidad fue realizada en el año 2003 con las exigencias normativas que se encontraban vigentes en ese momento. En la actualidad los requisitos han cambiado por lo que con el fin de ajustarse a los mismos, se diseñó una revalidación del ensayo. Se incorporaron microorganismos a la revalidación y se aumentó la cantidad de lotes de validación de PT. El diseño del ensayo de revalidación se corresponde con los requerimientos que se encuentran en la Farmacopea Nacional Argentina [40].

#### **6.2.1.1.2 Materiales y métodos**

##### Lotes de validación

Lote I: vacuna Candid # 1, Lote 24 A.

Lote II: vacuna Candid # 1, Lote 25 A.

Lote III: vacuna Candid # 1, Lote 26 A.

##### Cepas de referencia

Cepas provenientes del Banco de Cepas del INEVH adquiridas en ATCC.

##### Medios de cultivo

Medio Tioglicolato: TIO Lote M # 1051.

Caldo Digerido de Caseína - Soja: CTS Lotes M # 1051, M # 1053, M # 1062, M # 1080.

Tryptic Soy Agar: ATS Lotes M # 1051, M # 1053, M # 1062, M # 1080.

#### **6.2.1.1.3 Diseño del ensayo de revalidación**

Se verificó la esterilidad de cada lote de medio de cultivo. Tabla 3.

**Tabla 3. Esterilidad de medio de cultivo. Condiciones de incubación.**

<b>Medio</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Condición</b>	<b>Tiempo</b>
Medio Tioglicolato	30-35°C	Aeróbica	5 días
Caldo Digerido de Caseína-Soja	20-25°C	Aeróbica	5 días

Se realizó el ensayo de promoción de crecimiento de cada lote de medio de cultivo para determinar la capacidad de promover el crecimiento microbiano [41-43]. Tabla 4.

**Tabla 4. Promoción de crecimiento. Condiciones de incubación.**

Medio	Microorganismo	Temperatura	Condición	Tiempo
Medio Tioglicolato	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	30-35°C	Aeróbica	3 días
Medio Tioglicolato	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	30-35°C	Aeróbica	3 días
Medio Tioglicolato	<i>Clostridium sporogenes</i> (ATCC 11437)	30-35°C	Aeróbica	3 días
Caldo Digerido de Caseína-Soja	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	20-25°C	Aeróbica	5 días
Caldo Digerido de Caseína-Soja	<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	20-25°C	Aeróbica	5 días
Caldo Digerido de Caseína-Soja	<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 34467)	20-25°C	Aeróbica	5 días

Se ejecutó el ensayo de revalidación del método de transferencia directa. El mismo, se llevó a cabo con 3 lotes diferentes de la vacuna Candid # 1, como PT. Para cada uno de los lotes se inocularon 2 tubos de cada medio de cultivo (15 ml) con no más de 100 UFC de los microorganismos especificados y con un volumen de vacuna Candid # 1 de 1ml. El volumen de medio de cultivo utilizado en los tubos control positivo fue de 16 ml. Se incluyó dentro de la revalidación una cepa aislada y caracterizada del ambiente de fabricación (Tabla 5).

**Tabla 5. Revalidación del método de transferencia directa. Condiciones de incubación.**

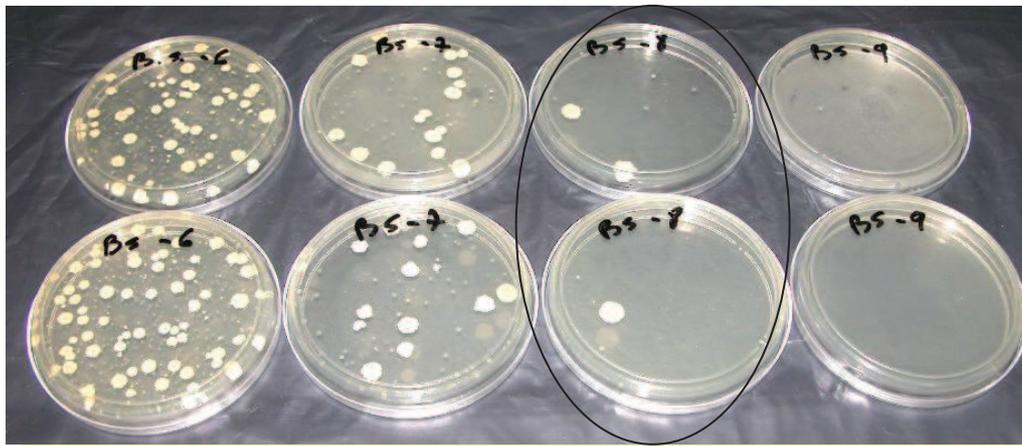
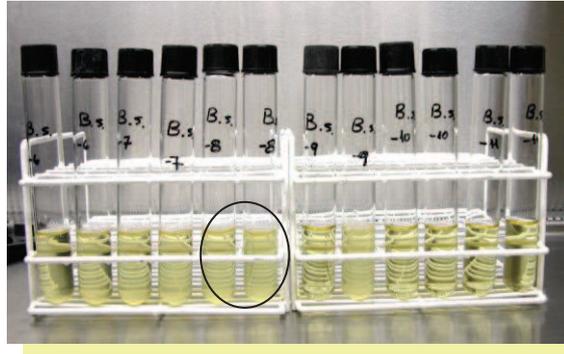
Medio	Microorganismo	Vacuna Candid # 1	Temperatura	Condición	Tiempo
Medio Tioglicolato	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	-	30-35°C	Aeróbica	5 días
		Lote I			
		Lote II			
		Lote III			
Medio Tioglicolato	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	-	30-35°C	Aeróbica	5 días
		Lote I			
		Lote II			
		Lote III			
Medio Tioglicolato	<i>Clostridium sporogenes</i> (ATCC 11437)	-	30-35°C	Aeróbica	5 días
		Lote I			
		Lote II			
		Lote III			
Caldo Digerido de Caseína-Soja	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	-	20-25°C	Aeróbica	5 días
		Lote I			
		Lote II			
		Lote III			
Caldo Digerido de Caseína-Soja	<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	-	20-25°C	Aeróbica	5 días
		Lote I			
		Lote II			
		Lote III			
Caldo Digerido de Caseína-Soja	<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 34467)	-	20-25°C	Aeróbica	5 días
		Lote I			
		Lote II			
		Lote III			
Caldo Digerido de Caseína-Soja	<i>*Kocuria rosea</i>	-	20-25°C	Aeróbica	5 días
		Lote I			
		Lote II			
		Lote III			

\*Cepa aislada del ambiente de producción.

#### 6.2.1.1.4 Resultados

Se muestran a continuación los resultados obtenidos. Ensayo de promoción de crecimiento (Figura 3)

**Figura 3. Ensayo de promoción de crecimiento: puntos de corte en medio líquido y sólido.**



**Tabla 6. Esterilidad de los medios de cultivo.**

Medio	Lectura Crecimiento (por duplicado)
TIO	-/-
CTS	-/-

Referencias: Crecimiento positivo: (+); Ausencia de crecimiento: (-).

**Tabla 7. Ensayo de promoción del crecimiento.**

<b>Medio</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Lectura Crecimiento (por duplicado)</b>
TIO	<i>B. subtilis</i> (Recuento en placa 25/27 UFC)	+/+
TIO	<i>P. aeruginosa</i> (Recuento en placa 2/1 UFC)	+/+
TIO	<i>C. sporogenes</i> (Recuento en placa 12/13 UFC)	+/+
CTS	<i>B. subtilis</i> (Recuento en placa 25/27 UFC)	+/+
CTS	<i>C. albicans</i> (Recuento en placa 38/42 UFC)	+/+
CTS	<i>A. niger</i> (Recuento en placa 18/18 UFC)	+/+
CTS	<i>K. rosea</i> (Recuento en placa 25/27 UFC)	+/+

**Tabla 8. Ensayo de revalidación del método de transferencia directa.**

Medio	Microorganismo	Vacuna Candid # 1	Lectura Crecimiento (por duplicado)
TIO	<i>B. subtilis</i> (Recuento en placa 25/27 UFC)	-	+/+
		Lote I	+/+
		Lote II	+/+
		Lote III	+/+
TIO	<i>P. aeruginosa</i> (Recuento en placa 2/1 UFC)	-	+/+
		Lote I	+/+
		Lote II	+/+
		Lote III	+/+
TIO	<i>C. sporogenes</i> (Recuento en placa 12/13 UFC)	-	+/+
		Lote I	+/+
		Lote II	+/+
		Lote III	+/+
CTS	<i>B. subtilis</i> (Recuento en placa 25/27 UFC)	-	+/+
		Lote I	-/-
		Lote II	-/-
		Lote III	-/-
CTS	<i>C. albicans</i> (Recuento en placa 38/42 UFC)	-	+/+
		Lote I	+/+
		Lote II	+/+
		Lote III	+/+
CTS	<i>A. niger</i> (Recuento en placa 2/1 UFC)	-	+/+
		Lote I	+/+
		Lote II	+/+
		Lote III	+/+
CTS	<i>K. rosea</i> (Recuento en placa 83/72 UFC)	-	+/+
		Lote I	+/+
		Lote II	+/+
		Lote III	+/+

Del ensayo de revalidación se observa que la recuperación del *B. subtilis* no es reproducible en los distintos lotes de vacuna probados en el medio de cultivo CTS por el método de transferencia directa y además los resultados obtenidos muestran que el

crecimiento de *B. subtilis* en la mezcla de vacuna y medio de cultivo CTS no es visualmente comparable a los tubos control positivo, por lo tanto, se decidió repetir una parte de la revalidación. Tabla 9.

**Tabla 9. Revalidación: Resultados de la repetición con *B. subtilis* y medio de cultivo CTS.**

Medio	Microorganismo	Vacuna Candid # 1	Lectura Crecimiento (por duplicado)
1° Repetición CTS	<i>B. subtilis</i> (Recuento en placa 103/93 UFC)	-	+/+
		Lote I	-/-
		Lote II	+/+
		Lote III	-/-
2° Repetición CTS	<i>B. subtilis</i> (Recuento en placa 50/43 UFC)	-	+/+
		Lote I	-/-
		Lote II	-/-
		Lote III	+/+
3° Repetición CTS	<i>B. subtilis</i> (Recuento en placa 10/11 UFC)	-	+/+
		Lote I	+/-
		Lote II	+/-

Dado que la falta de reproducibilidad con el *B. subtilis* persistió en las repeticiones realizadas, confirmándose de este modo que en las condiciones del ensayo no puede garantizarse que el producto no produce efecto inhibitor del crecimiento del microorganismo especificado, se adecuaron las condiciones según lo permitido por la Farmacopea Argentina. En este caso, se permite realizar una dilución mayor del producto, diluyendo así el antibiótico (ATB) presente en la muestra.

Por lo expuesto anteriormente, se decidió realizar la revalidación del método de transferencia directa aumentando el volumen de medio de cultivo y aumentando el volumen de muestra el cual no debe superar el 10% del volumen de medio de cultivo.

Se realizó la prueba en las siguientes condiciones:

Volumen de medio de cultivo CTS: 60 ml

Volumen de vacuna Candid # 1: 2.75 ml (Lote I)

Se probaron distintas diluciones de *B. subtilis*. Tabla 10.

**Tabla 10. Revalidación: Resultados de la repetición con mayor volumen de *B. subtilis* y medio de cultivo CTS.**

Medio	Microorganismo	Vacuna Candid # 1	Lectura Crecimiento (por duplicado)
CTS	<i>B. subtilis</i> (Recuento en placa 34/26 UFC)	-	+/+
		Lote I	Ⓢ+/-

Según los resultados obtenidos y las repeticiones realizadas, se confirma que la recuperación del microorganismo *B. subtilis* no es reproducible en los distintos ensayos, tanto en las condiciones iniciales como aumentando el volumen de medio de cultivo y vacuna Candid # 1. Se reproduce el resultado obtenido en experiencias anteriores: en algunos casos se recupera el microorganismo en cuestión y en otros no. La metodología no es reproducible sólo para la recuperación del *B. subtilis* en el medio de cultivo CTS en las distintas condiciones probadas. La recuperación del resto de los microorganismos ensayados que forman parte de la revalidación fue, en todos los casos, visualmente comparable con el control positivo.

Por lo tanto, se decidió implementar el método de filtración por membrana con el fin de eliminar la actividad bacteriostática que se observó para el microorganismo *B. subtilis* (Bioball, cepas comerciales cuantificadas NCTC 10400/ATCC 6633 MultiShot 550 – Mixed Kit) en el medio de cultivo CTS.

El diseño del ensayo responde a los lineamientos que se encuentran descritos en la FNA [40], para ello se utilizó un equipo de filtración al que se le colocó una membrana de 0.45 µm, se filtraron 20 viales de vacuna Candid # 1 (Lote I), se lavó la membrana con 3 porciones de 100 ml de solución de lavado (Solución A), incorporando en el lavado final un inóculo correspondiente a 70 UFC de *B. subtilis* (180 µl de MultiShot 550) luego se colocó la membrana en una botella conteniendo 100 ml de medio de cultivo CTS.

Para el control positivo, se repitió el procedimiento con microorganismo y medio, sin vacuna Candid # 1.

Luego de la incubación realizada en condiciones de aerobiosis, a una temperatura de (20-25) °C durante 5 días, se obtuvo crecimiento del microorganismo *B. subtilis* en el medio de cultivo CTS, visualmente comparable al control positivo.

## **6.2.1.2 Ensayo de Potencia**

### **6.2.1.2.1 Fundamentos del método**

Las pruebas de potencia están destinadas a evaluar el contenido del antígeno en el producto y se pueden efectuar por métodos *in vivo* e *in vitro*. Los métodos *in vivo* son los más utilizados para vacunas de virus inactivados. Los métodos *in vitro*, como los cultivos de tejidos, son los más utilizados para evaluar la potencia de vacunas a virus vivos atenuados [51-64].

El ensayo de potencia se realiza para estimar el título de virus de la vacuna Candid # 1. Consiste en generar la infección viral de monocapas de células susceptibles que puede inducir cambios celulares conocidos como efecto citopatogénico. Estos cambios morfológicos inducidos por virus incluyen: estructura celular alterada, formación de células gigantes, vacuolización o lisis. Se adiciona una cubierta de agarosa para restringir los cambios del efecto citopatogénico a áreas discretas de la monocapa limitando la diseminación viral de célula a célula. Estas áreas focales de infección se visualizan macroscópicamente o microscópicamente como áreas discretas o placas. Se agrega como colorante, rojo neutro, para contrastar el área afectada con las células adyacentes sin afectar [62]. Invertir cada placa y contar utilizando un marcador indeleble el número de UFP por *well*. Examinar los *wells* de control de células. No deberían observarse placas y la monocapa debería estar intacta. El recuento de UFP obtenido es analizado para seleccionar la dilución a usar para el cálculo de título. Debido al tamaño habitual de las placas que produce Candid # 1 en este sistema, se recomienda la selección de la dilución donde se cuenten entre 10 y 30 placas. El recuento de UFP de los 4 *wells* de la dilución seleccionada se suma, y se divide por 4 para dar el recuento de UFP promedio por *well*.

El título es calculado por la siguiente fórmula

Título: recuento de UFP promedio en el volumen de inóculo (0.2 ml) x 5 (para convertirlo en 1 ml) x inversa de la dilución logarítmica de la muestra.

Ejemplo: promedio de 20 UFP por *well* en la dilución 1/200 de la muestra

Título: 20 placas por *well* x 5 x 200 = 2.10<sup>4</sup> UFP/ml.

El ensayo de potencia se considerará válido evaluando el título del VR y comparándolo con la carta de control. Se utilizan como guía las reglas de Westgard sobre cartas de control de Shewart.

### **6.2.1.2.2 Materiales y métodos**

Células Vero C76 (70-90%) confluentes, sembradas 48 horas antes en bandejas de 6 *wells*, entre pasajes 34 a 42.

Diluyente: Eagle's Minimal Essential Medium con sales de Earle (EMEM) + suplementado con aminoácidos no esenciales (NEAA) + L-glutamina (3 mM total) + 2% Suero Fetal Bovino + 1% Penicilina + Streptomina (P+S).

Medio para 1º overlay: 60% de medio para placas, 40 % de Agarosa y 1% de P+S.

Medio para 2º overlay: 50% API + 50 % de Agarosa + 2,3 % de Rojo neutro.

25 viales VR, lote 5.

4 viales PT, lote 19 A.

Se realizó la validación del ensayo de potencia mediante el diseño de diferentes pruebas se determinó la precisión, sensibilidad, precisión intermedia y robustez de la metodología.

#### **6.2.1.2.3 Diseño del ensayo de validación**

Se detallan a continuación los parámetros estudiados:

##### ***Precisión***

Se realizaron 10 determinaciones con la misma muestra de PT. Como control se realizaron 2 determinaciones con el VR.

##### ***Sensibilidad***

Se realizó el ensayo de potencia con una serie de diluciones del VR. Las diluciones analizadas fueron: 1/10, 1/25, 1/50, 1/100 y 1/200.

##### ***Precisión intermedia***

Se realizaron 20 determinaciones con distintas muestras del mismo lote de VR a distintos horarios y con distintos analistas.

##### ***Robustez***

Se evaluó el ensayo de potencia en tres condiciones diferentes:

**Condición I:** Se realizó la hidratación de tres viales de PT con distintos volúmenes de API: 5 ml, 5.5 ml y 6 ml. Como control se realizó la determinación del VR.

**Condición II:** Se realizó la determinación con el VR, se incubaron las muestras a 36°C con distintas concentraciones de CO<sub>2</sub>: 2.5 %, 5 % y 7.5 %.

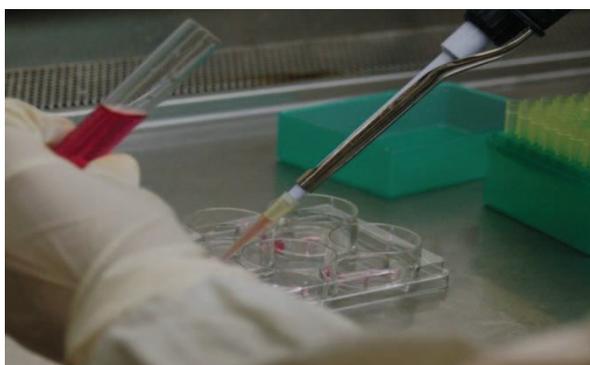
**Condición III:** Se realizó la determinación con el VR, se incubaron las muestras a una concentración del 5 % de CO<sub>2</sub> a distintas temperaturas: 34°C, 36°C y 38°C.

Se realizó una evaluación estadística de la incertidumbre, basada en datos experimentales (Tipo A). Se calculó la incertidumbre expandida a partir del desvío estándar obtenido en el ensayo de precisión intermedia, asociada al resultado de la medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente asignados al mensurando.

#### **6.2.1.2.4 Resultados**

En la Figura 4 se observa el ensayo de potencia y las UFP durante la lectura.

**Figura 4. Ensayo de potencia: inoculación de células con la dilución viral; recuento de UFP.**



Los resultados obtenidos en UFP se transformaron logarítmicamente de modo de normalizar la variable y calcular los parámetros. Tabla 11.

**Tabla 11. Ensayo de potencia. Distribución normal. Parámetros estadísticos.**

Prueba	Precisión	Precisión intermedia	Robustez (Hidratación)	Robustez (CO2)	Robustez (Temperatura)
Promedio	4.5	4.3	4.2	4.4	4.3
SD	0.058	0.16	0.16	0.23	0.11
Promedio+SD	4.5	4.4	4.4	4.6	4.4
Promedio+2SD	4.6	4.6	4.5	4.9	4.5
Promedio-SD	4.4	4.1	4.1	4.2	4.2
Promedio-2SD	4.4	4.0	3.9	3.9	4.1
CV	1.3	3.7	3.8	5.3	2.6
Varianza	0.0033	0.025	0.025	0.054	0.013

Los resultados crudos de la validación se encuentran en el Anexo II.

La prueba de sensibilidad permitió demostrar un comportamiento lineal ( $R^2=0.9496$ ) de la metodología. Gráfico 3.

Se graficaron los resultados obtenidos de cada parámetro estudiado como se presentan a continuación.

Gráfico 2. Determinación de precisión del ensayo de potencia.

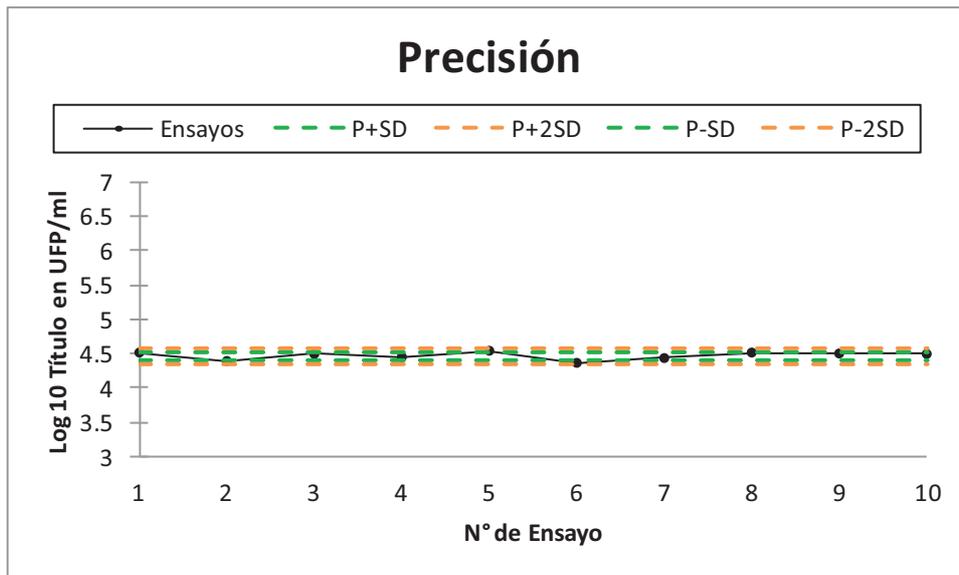


Gráfico 3. Determinación de sensibilidad del ensayo de potencia.

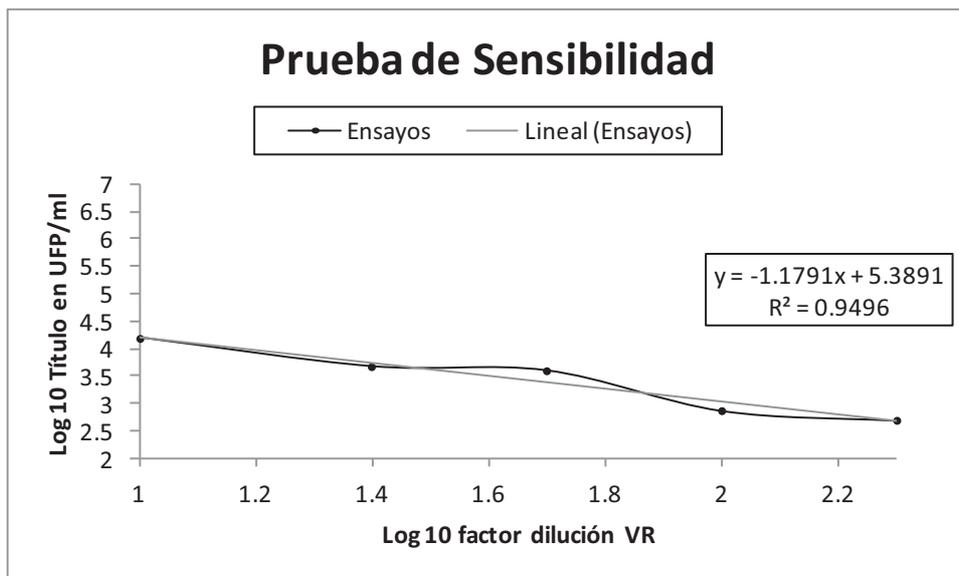


Gráfico 4. Determinación de precisión intermedia del ensayo de potencia.

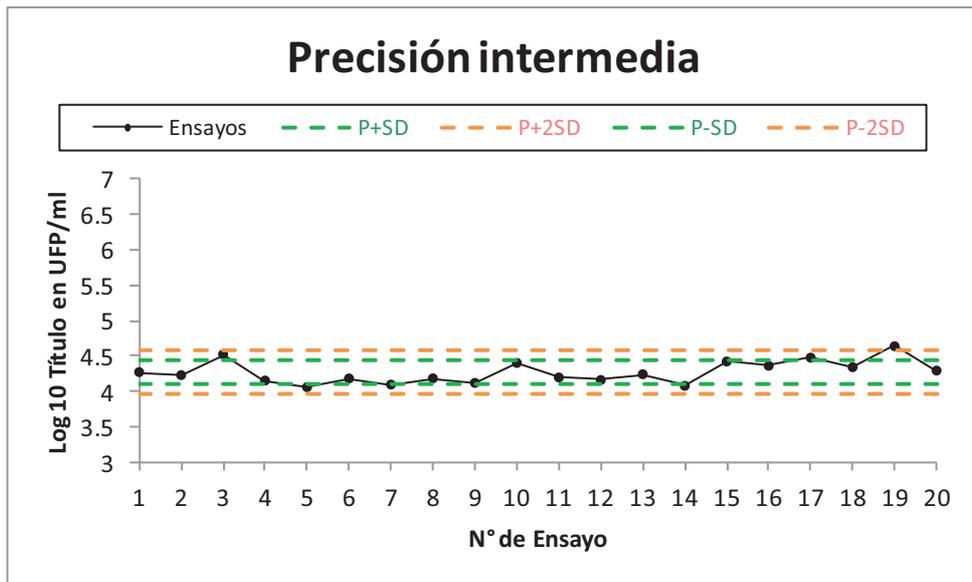


Gráfico 5. Determinación robustez del ensayo de potencia. Condición I.

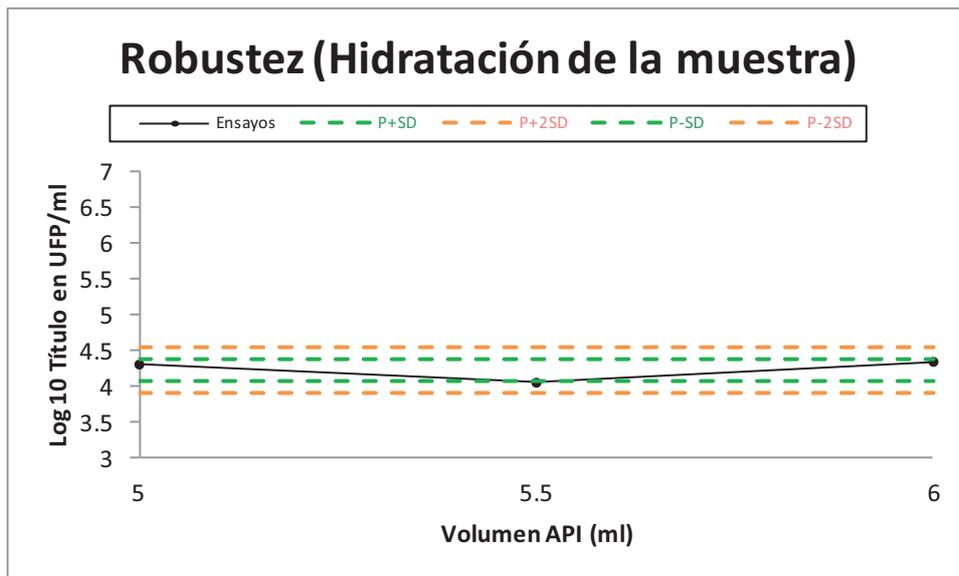


Gráfico 6. Determinación robustez del ensayo de potencia. Condición II.

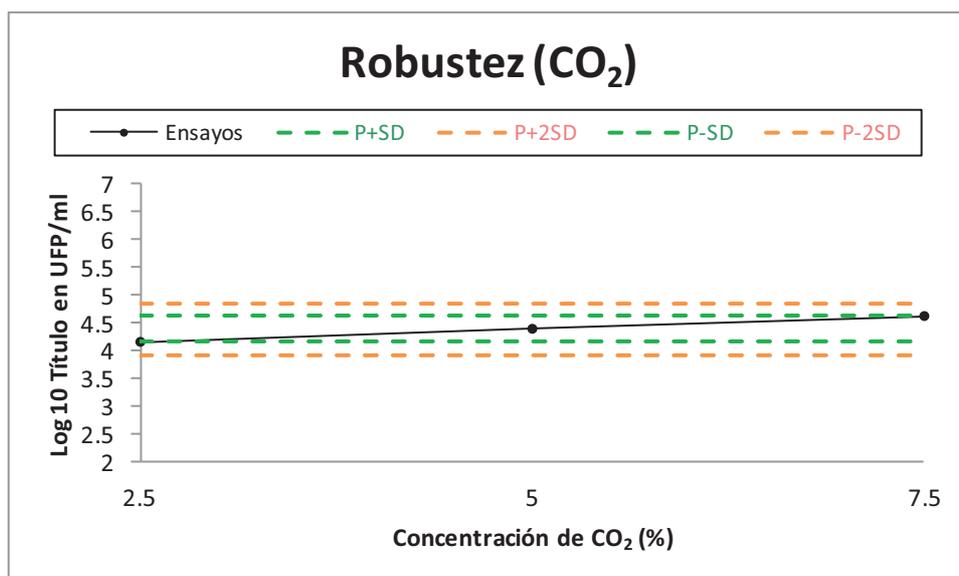
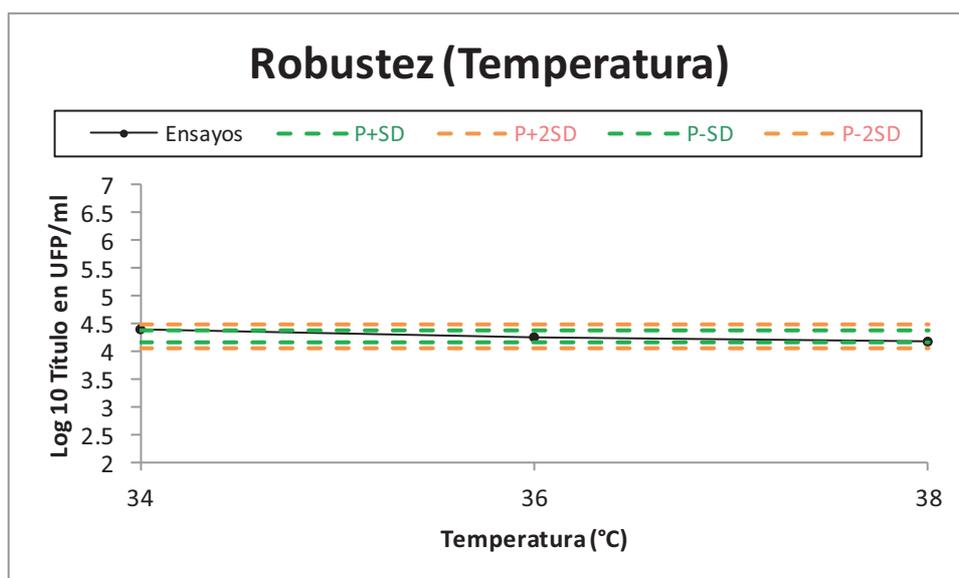


Gráfico 7. Determinación robustez del ensayo de potencia. Condición III.



#### 6.2.1.2.4.1 Cálculo de Incertidumbre Expandida

Incertidumbre Expandida ( $U = k u(y)$ ) =  $2 \times 0.16$

$U = 0.32$

Expresión del resultado obtenido de una determinación:

$$Y = (y \pm U) \text{ UFP/ml}$$

Para informar el resultado transformar Y en antilogaritmo siendo,

U: incertidumbre expandida

u: desvío estándar de las 20 determinaciones

k: factor de cobertura

y: resultado obtenido de cada determinación

Y: expresión final del resultado

### **6.2.1.3 Ensayo de Identidad**

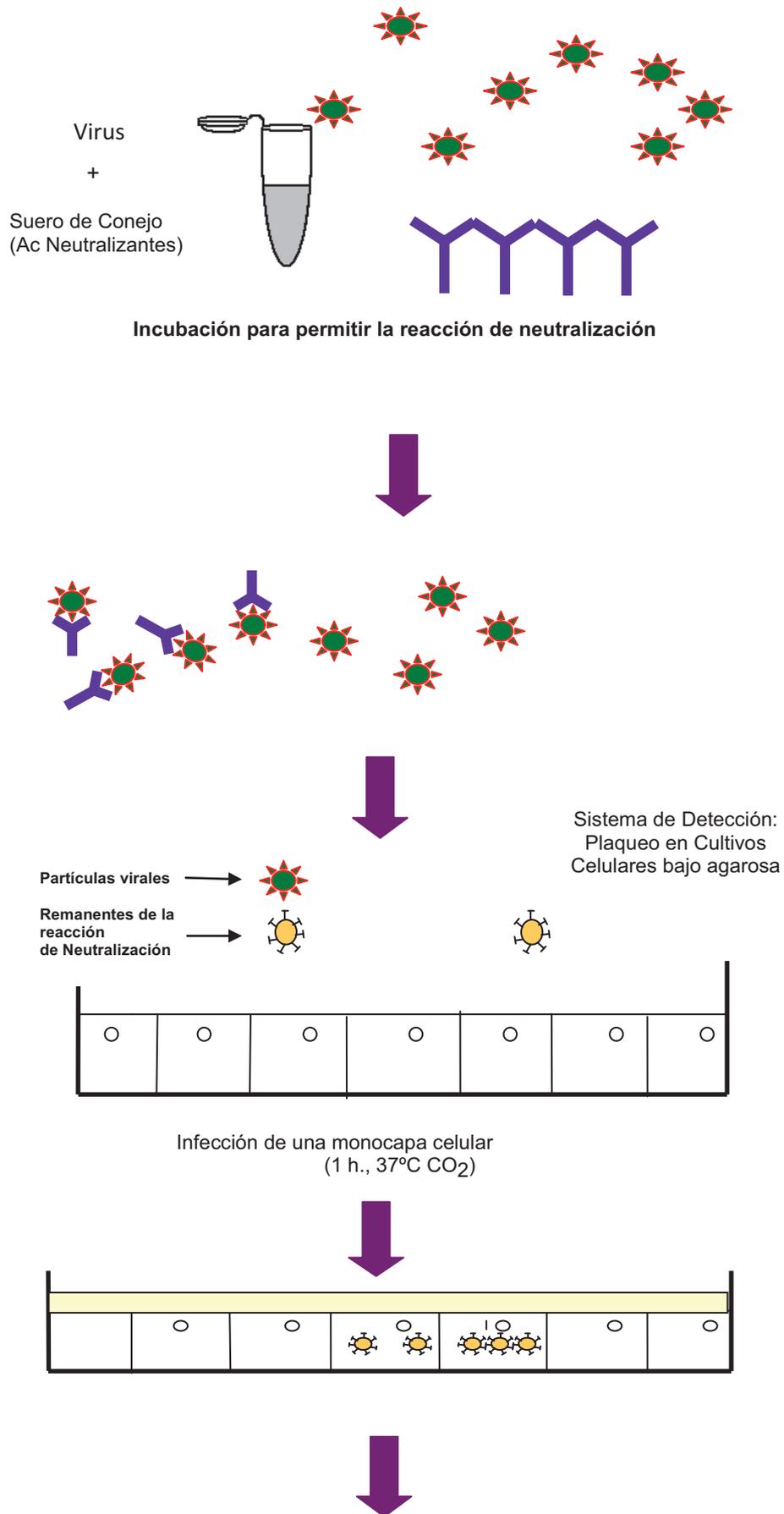
#### **6.2.1.3.1 Fundamentos del método**

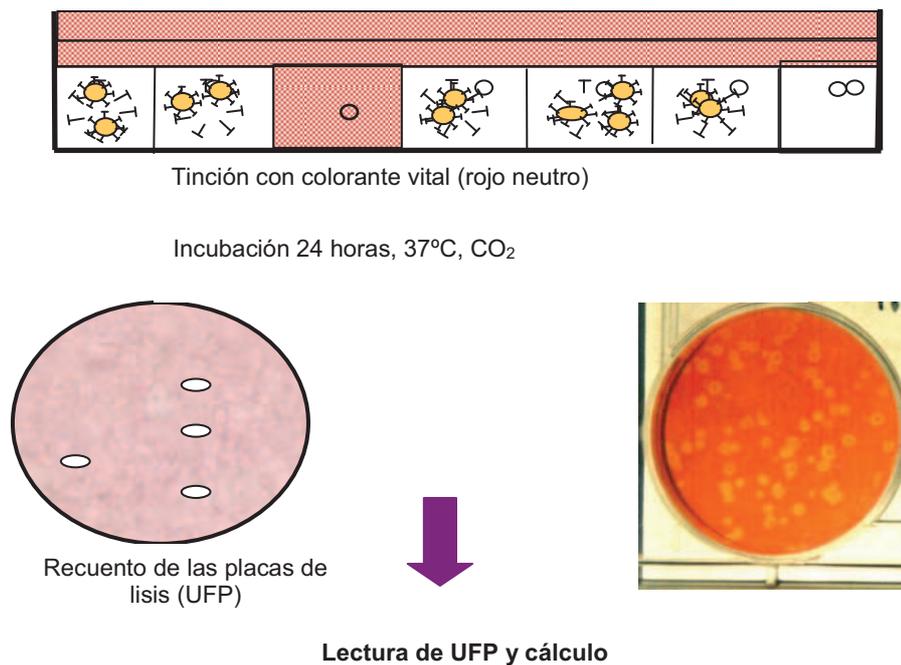
Los ensayos que miden la capacidad de los anticuerpos de inhibir la actividad biológica de los virus, deben utilizar la menor cantidad de virus que sea fácilmente detectable para maximizar el alcance al cual pequeñas cantidades de anticuerpos pueden producir inhibición detectable. Ejemplo: ensayos de neutralización por reducción de placas (PRNT). El mecanismo por el cual anticuerpos específicos transforman las partículas virales en no infecciosas involucra uniones de moléculas de inmunoglobulinas a, o cerca de, estructuras de la superficie del virión involucradas en la unión del virus a la membrana de la célula huésped. Debido a la simetría de las partículas virales, cada una de ellas contiene más de un sitio de unión, de todas maneras se requiere un número limitado de moléculas de inmunoglobulinas para que se produzca la neutralización [65,66]. Se ha encontrado en términos generales que la determinación de anticuerpos neutralizantes es un ensayo moderadamente sensible. Uno de los métodos que mide anticuerpos neutralizantes es la técnica de reducción de placas. Este método utiliza la capacidad de los virus de diseminarse desde la célula infectada a células vecinas produciendo placas, consistentes en un efecto citopático focal (CPE), la diseminación a células distantes a través del fluido extracelular es inhibido por la presencia de una capa semisólida (overlay). Se calcula la reducción de un 80 % de UFP que generalmente se desarrollan.

La PRNT es el “estándar de oro” en el diagnóstico serológico de infecciones por arnavirus [66], detecta anticuerpos dirigidos primariamente a epítopes glicoproteicos de superficie [67].

El conocimiento de la reacción de neutralización del VJ por anticuerpos específicos determina su utilización como base del ensayo de identidad de la vacuna Candid # 1. La prueba de identidad es entonces, una reacción antígeno – anticuerpo (Ag-Ac) que tiene el propósito de corroborar que el contenido de la vacuna se corresponda con lo declarado en la etiqueta del envase. Consiste en enfrentar la vacuna con antisuero específico (AE) producido en conejos, observando la neutralización por reducción del número de placas. Se calcula el título del AE. Se debe observar que la vacuna ha sido neutralizada.

Figura 5. Esquema de neutralización por reducción de placas.





#### 6.2.1.3.2 Materiales y métodos

Células Vero C76 (monocapa epitelial de riñón de mono verde africano, (*Cercopithecus aethiopsis*) (70-90%) confluentes, sembradas 48 horas antes en bandejas de 6 wells, entre pasajes 34 a 42.

La línea celular fue crecida en EMEM, suplementado con NEAA, 5% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor (56° C durante 30 minutos), 293 µg/ml, L-glut 2 mM, 100 UI Penicilina /ml y 100 µg/ml de estreptomycin.

Las líneas celulares utilizadas son certificadas en su identidad y en no poseer contaminantes extraños (bacterias, hongos, mycoplasma y virus) [68].

Diluyente de vacuna: EMEM suplementado con NEAA + 1% L-glutamina (3 mM total) + 2% Suero Fetal Bovino + 1% Penicilina + Streptomycin (P+S).

Medio para placas.

Agarosa 1%.

Rojo neutro al 2,3%.

API.

Antisuero específico obtenido en conejo: lote pool 01-02; lote pool 02-02; lote 3c; lote 4.

Virus de Referencia (VR): lote (5-92); lote # 4; lote # 5; lote # 6.

Para realizar la validación de la prueba de identidad se utilizaron algunos de los criterios que se encuentran en la FNA para la validación del método inmunoquímico [69,70]. Los mismos se detallan a continuación.

El método inmunoquímico cuantitativo solo es válido si:

- El Ag o Ac no discrimina entre preparación muestra y estándar
- El método no se ve afectado por otros componentes de la preparación muestra o de sus excipientes, que pueden variar de una muestra a otra. Estos componentes pueden incluir concentraciones elevadas de otras proteínas, sales, conservantes o actividad proteolítica contaminante.
- Hay ausencia de errores sistemáticos, ligados a la secuencia en la que se ha efectuado la determinación.

Para verificar estos criterios, el método de validación debe respetar lo siguiente:

- La valoración se realiza, al menos, por triplicado.
- La valoración incluye, como mínimo, 3 diluciones diferentes de la preparación estándar y 3 diluciones diferentes de la preparación muestra que supuestamente presentan una actividad similar a la preparación estándar.
- El diseño es aleatorizado.
- Si la preparación muestra es un suero o si está formulada con otros componentes, el estándar se prepara de la misma manera.

A continuación se muestra con un ejemplo como realizar el cálculo del título:

Con el fin de calcular el número de UFP que corresponderá a un dado porcentaje de reducción de las mismas como evidencia de neutralización se realizan series de diluciones del virus en estudio y del virus Junin de referencia, se elige la dilución donde se cuente aproximadamente 30 UFP y se calcula el número de UFP que corresponda al porcentaje de neutralización requerido.

Se requiere el 80% de la neutralización de las placas, se multiplica el promedio de placas obtenido en el virus por 0,2.

Ej.: el número de placas promedio = 80 entonces  $80 \times 0,2 = 16$

El título del antisuero será la dilución más alta que causa una reducción del 80% en el número de placas y es llamado título de neutralización por reducción de placas<sub>80</sub> (PRNT<sub>80</sub>).

En el ejemplo anterior será la más alta dilución del suero que dé un contaje menor a 16 placas.

Cálculo del título: (se eligen las diluciones del suero en función de los datos históricos.)

Ejemplo:

Dilución del Suero	Promedio de UFP
1:10	<u>0</u>
1:100	<u>12</u> PC <sub>1</sub>
1:1000	<u>60</u> PC <sub>2</sub>

Log título neutralizante del suero = log dilución del suero +  $\frac{PRN_{80} - PC_1}{PC_2 - PC_1} \times \log \text{factor}$   
de dilución

$$= \log 100 + \frac{16 - 12}{60 - 12} \times \log 10 =$$

$$= \log 100 + \frac{4}{48} \times \log 10 =$$

$$= 2 + (0,835 \times 1) = 2,0833$$

$$\text{Título neutralizante del suero} = \text{antilog } 2,083 = 121$$

Para los ensayos de precisión intermedia y linealidad se utilizaron lotes aprobados de VR y AE. La validación se realizó en forma retrospectiva.

#### 6.2.1.3.3 Diseño del ensayo de validación

Se detallan a continuación los parámetros estudiados:

##### **Linealidad**

Se estableció a partir de 12 determinaciones realizadas en distintas diluciones 1:500, 1:1000, 1:2000 de distintos lotes de suero (AE).

##### **Precisión intermedia**

Se realizaron 22 determinaciones con distintas muestras de lotes de VR, distintos lotes de AE, a distintos horarios y distintos analistas.

Se realizó una evaluación estadística de la incertidumbre, basada en datos experimentales (Tipo A). Se calculó la incertidumbre expandida a partir del desvío estándar obtenido en el ensayo de precisión intermedia.

#### 6.2.1.3.4 Resultados

Se muestran a continuación los parámetros calculados para los distintos ensayos a partir de resultados históricos. Tabla 12.

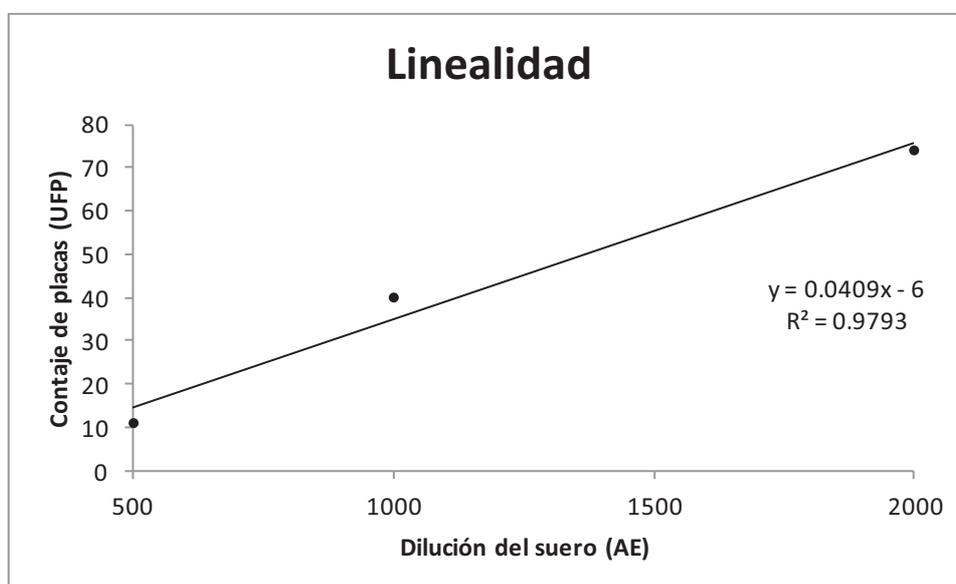
**Tabla 12. Prueba de identidad. Distribución normal. Parámetros estadísticos.**

Prueba	Precisión intermedia
Promedio	3.0
SD	0.15
Promedio+SD	3.1
Promedio+2SD	3.3
Promedio-SD	2.8
Promedio-2SD	2.7
CV	5.0
Varianza	0.022

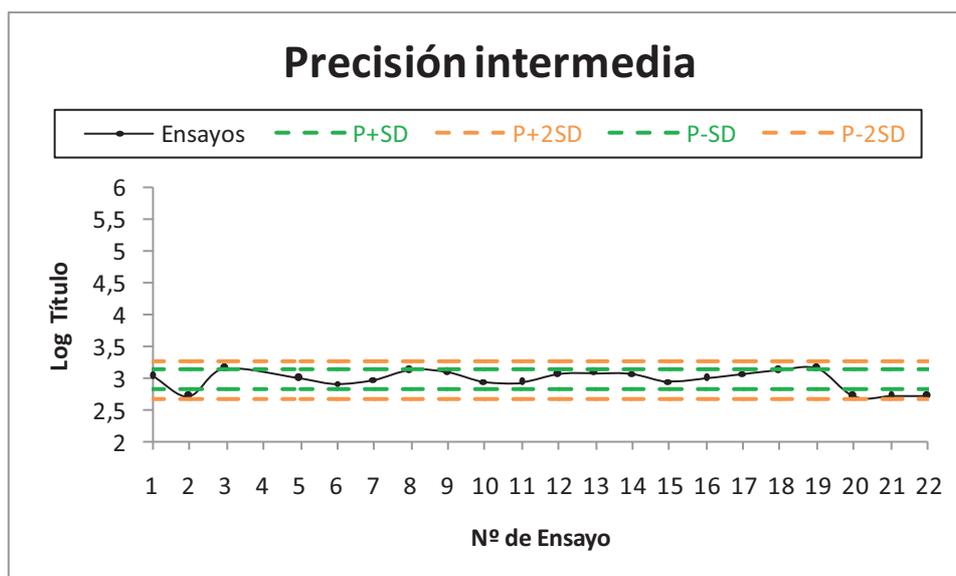
Los resultados crudos de la validación se encuentran en el Anexo III.

Se graficaron los resultados obtenidos de cada parámetro como se presenta a continuación.

**Gráfico 8. Determinación de linealidad de la prueba de identidad.**



**Gráfico 9. Determinación de precisión intermedia de la prueba de identidad.**



#### 6.2.1.3.4.1 Cálculo de Incertidumbre Expandida

Incertidumbre Expandida ( $U = k u(y)$ ) =  $2 \times 0.15$

$U = 0.30$

Expresión del resultado obtenido de una determinación:

$$Y = (y \pm U) \text{ Título}$$

Para informar el resultado transformar Y en antilogaritmo siendo,

U: incertidumbre expandida

u: desvío estándar de las 22 determinaciones

k: factor de cobertura

y: resultado obtenido de cada determinación

Y: expresión final del resultado

#### 6.2.1.4 Toxicidad: Seguridad General

##### 6.2.1.4.1 Fundamentos del método

El ensayo de Seguridad General o también llamado ensayo de Toxicidad Anormal se emplea para demostrar la presencia de contaminantes tóxicos extraños en productos biológicos para ser administrados en humanos. La prueba consiste en la inyección parenteral del máximo volumen de producto tolerado en dos ratones y en dos cobayos. Luego de la inoculación, todos los animales testeados son observados por cualquier reacción significativa, imprevista, no específica que pudiera indicar una diferencia en la calidad del producto [71].

#### **6.2.1.4.2 Método**

Para la liberación de cada lote de vacuna Candid # 1, se seleccionan no menos de 2 cobayos que pesen entre  $(400 \pm 40)$  g y no menos de 2 ratones que pesen entre  $(22 \pm 2)$  g, que no hayan sido empleados en ningún ensayo previo.

La vacuna Candid # 1 se reconstituye con 5.5 ml de API y se inyecta por vía intraperitoneal 0.5 ml de la vacuna por cada ratón y 5 ml de la vacuna en cada cobayo. Cada animal debe ser pesado antes de la primera inyección y al finalizar el ensayo, registrando los pesos individualmente. La duración del ensayo es de 7 días para cada especie. La observación de los animales debe realizarse diariamente. Los animales no deben presentar respuestas inesperadas al producto y el peso de los mismos al finalizar el período de ensayo no debe ser menor al que tenían al comienzo del mismo [72].

#### **6.2.1.4.3 Resultados**

Se realizó el análisis retrospectivo de la totalidad de los lotes de vacuna Candid # 1 elaborada en el INEVH desde el año 2003. Debido a las características observacionales del método y constatando que se ha cumplido los requisitos vigentes tanto de CFR 21 [71] como FNA [72], no resultó necesario realizar ni ensayos ni análisis complementarios.

#### **6.2.1.5 Pureza: Ensayo de Endotoxinas**

##### **6.2.1.5.1 Fundamentos del método**

El ensayo de endotoxinas bacterianas se aplica a la determinación o cuantificación de endotoxinas provenientes de las bacterias Gram negativas, empleando como reactivo, lisados de amebocitos circulantes del cangrejo herradura *Limulus polyphemus* (ensayo LAL). Cuando se enfrenta el reactivo a soluciones que contienen endotoxinas produce gelificación. La reacción requiere la presencia de cationes bivalentes. La velocidad de reacción depende de la concentración de endotoxina, del pH y de la temperatura. El lisado contiene un sistema enzimático que actúa en cascada y que se activa progresivamente en presencia de endotoxinas. Como resultado final, la proteína coagulable (coagulógeno) se transforma en un gel (coagulina), siendo la base del método de gel en tubo. [73,74].

##### **6.2.1.5.2 Método**

Con el ensayo LAL se semicuantificó la concentración de endotoxinas bacterianas que pudieran estar presentes en la vacuna Candid # 1 por comparación directa de la reacción obtenida de la vacuna como PT, con la obtenida con diluciones paralelas de endotoxina de referencia de concentración conocida de endotoxina expresada como Unidades de Endotoxina (UE). [75,76].

El límite de endotoxina (LE) para la vacuna Candid # 1 se calcula de la siguiente manera

LE= K/M = 5 EU/kg (para administración parenteral)/0.5 ml (dosis) = 10 EU/kg.ml x 70 kg (masa corporal promedio adultos) = 700 EU/ml

Siendo,

K: la dosis máxima de endotoxinas admitida (UE) por kg de peso corporal en humano.

M: la dosis máxima (en mg o UI) recomendada para ser administrada por kg de peso corporal en humanos.

Según la Farmacopea Argentina 7<sup>ma</sup> edición [77] el cálculo de MDV, cuando en la monografía, el límite de endotoxina especificado es en EU/ml, se debe dividir el límite de endotoxina por  $\lambda$  (sensibilidad del lisado en EU/ml, declarado en el rótulo).

$$\text{MDV} = \frac{700 \text{ EU/ml}}{0.03 \text{ EU/ml}} = 23333$$

Contenido de

$$\text{endotoxina} = \frac{\text{Sensibilidad (0.03 EU/ml)}}{\text{antilog}(\frac{\text{Sumatoria del } \log_{10} \text{ 1er dilución negativa expresada como fracción}}{\text{n}^\circ \text{ de repeticiones}})} =$$

Se procesó una serie de diluciones (por duplicado) y se realizarán los cálculos. Ej.: si da positivo en las 2 diluciones de 1/1250 y negativo en las 2 diluciones 1/2500, los cálculos serán los siguientes.

$$\text{Contenido de endotoxina} = \frac{\text{Sensibilidad (0.03 EU/ml)}}{\text{antilog}(\frac{\log_{10} 1/2500 + \log_{10} 1/2500}{2})} = 75 \text{ EU/ml}$$

Contenido de endotoxina sería <75 EU/ml que estaría dentro de los límites aceptables.

Se establecen las diluciones a procesar en virtud de los datos históricos.

### 6.2.1.5.3 Resultados

Se realizó la validación del Ensayo LAL en el año 2001.

Antes de llevar a cabo el método gel en tubo, ensayo límite y semicuantitativo, se verificó:

- Que todos los materiales y reactivos a usar no contengan endotoxinas bacterianas
- La sensibilidad del lisado,  $\lambda$

- La ausencia de factores interferentes en las muestras a analizar. Los resultados son válidos siempre que se haya demostrado previamente que las muestras a analizar no inhiban ni intensifiquen la reacción.

Como así también se determinó:

- Ensayo para la confirmación de la sensibilidad del lisado
- Máxima dilución válida (MDV)
- Ensayo de inhibición o intensificación
- Ensayo límite
- Ensayo semicuantitativo

Se realizó el análisis retrospectivo de la validación realizada en el año 2001. La misma se encuentra en cumplimiento con los requisitos vigentes tanto de FNA [76] como de USP [75].

### **6.2.1.6 Pureza: Humedad Residual**

#### **6.2.1.6.1 Fundamentos del método**

La liofilización se utiliza satisfactoriamente para la preservación y almacenamiento de varias vacunas, cultivos microbianos y otros productos biológicos lábiles garantizando su integridad, potencia y otras propiedades.

La humedad residual es el parámetro usado para describir el bajo nivel de agua superficial, usualmente entre 1 % y 5 %, remanente en vacunas liofilizadas u otros biológicos luego de que el solvente acuoso ha sido removido durante el proceso de liofilización (sublimación al vacío).

El término “humedad residual” de la muestra puede representar agua en diferentes estados debido a interacciones físicas y químicas con el material y además debido a la configuración geométrica del espacio que puede ocupar.

La recomendación de la FNA es emplear el método de titulación volumétrica directa por Karl Fischer. La determinación de agua por dicho método se basa en la reacción cuantitativa entre el agua y un reactivo constituido por dióxido de azufre e iodo en presencia de metanol y una base orgánica como la piridina, según la siguiente ecuación:



La determinación del contenido de humedad residual se realiza mediante una valoración coulombimétrica según Karl Fischer con indicación volumétrica. [78-82].

Para realizar las determinaciones de humedad residual, según el método Karl Fischer, se utiliza el equipo Mettler Toledo DL31, que es un instrumento de análisis controlado por microprocesadores.

#### **6.2.1.6.2 Materiales y métodos**

Equipo: Titulador Mettler Toledo DL31

Fecha de última calibración: 21/04/2014

##### Titulante

CombiTitrant 5 Keto Merck. Cat.: 188006

Lote: HX132346

Vencimiento: 30/11/2014

Solvente: Disolvente Merck. Cat.: 188015

Lote: HX386214

Vencimiento: 30/04/2016

##### Patrón primario (PP)

Sodium tatrato dihydrate Water standard for volumetric Karl Fischer Titration (volumetric standard) apura Merck. Cat.: 106664

Spec. values pérdida por secado: 15,61 - 15,71 %

batch value: 15,70 % (valor del certificado)

Lote: A0674964418

Vencimiento: 30/04/2016

##### Lotes de validación

PT lotes: 19 A; 20 A; 21 A; 22 A; 23 A; 24 A; 25 A; 26 A.

Se realizó la validación del ensayo de determinación de humedad residual mediante el diseño de diferentes pruebas. Se determinó la precisión, exactitud y precisión intermedia de la metodología.

#### **6.2.1.6.3 Diseño del ensayo de validación**

Se detallan a continuación los parámetros estudiados:

##### ***Precisión***

Se realizaron 12 determinaciones con el mismo PP, el mismo analista en el mismo día.

##### ***Exactitud***

Se realizaron 9 determinaciones con el mismo PP, el mismo analista en el mismo día.

##### ***Precisión intermedia***

Se determinó de forma retrospectiva teniendo en cuenta los resultados obtenidos en 8 determinaciones con distintos lotes de PT a distintos momentos y con distintos analistas.

##### ***Precisión intermedia. Influencia de la temperatura y la humedad relativa del ambiente***

Se evaluaron los resultados obtenidos en 21 determinaciones con el mismo PP a distintos momentos con distintos analistas. Se evaluó la influencia de la temperatura y la humedad relativa del ambiente.

Se realizó una evaluación estadística de la incertidumbre, basada en datos experimentales (Tipo A). Se calculó la incertidumbre expandida a partir del desvío estándar obtenido en el ensayo de precisión intermedia.

#### 6.2.1.6.4 Resultados

Se muestran a continuación los parámetros obtenidos. Tabla 13.

**Tabla 13. Determinación de humedad residual. Parámetros estadísticos.**

<b>Prueba</b>	<b>Precisión</b>	<b>Exactitud</b>	<b>Precisión intermedia</b>	<b>Precisión Intermedia PP Temperatura (22.1-23.1)°C Humedad relativa (35.6-58.9)%</b>
Promedio	16	16	2.3	16
SD	0.34	0.38	0.29	0.52
Promedio+SD	16	16	2.6	16
Promedio+2D	16	17	2.9	17
Promedio-SD	15	15	2.0	15
Promedio-2SD	15	15	1.8	15
CV	2.2	2.4	12	3.2
Varianza	0.12	0.15	0.085	0.27

Los resultados crudos de la validación se encuentran en el Anexo IV.

Para la prueba de exactitud mediante la aplicación de t-Student, se realizó la comparación entre el resultado obtenido promedio y el valor asignado al PP por el proveedor. No se obtuvieron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).

Gráfico 10. Determinación de precisión en el ensayo de humedad residual.

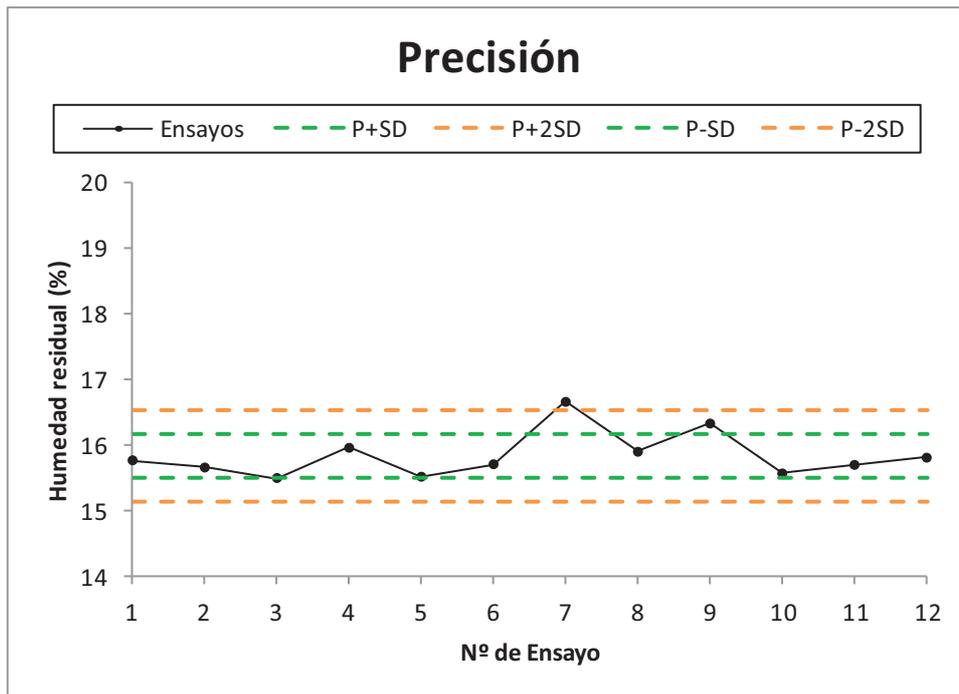
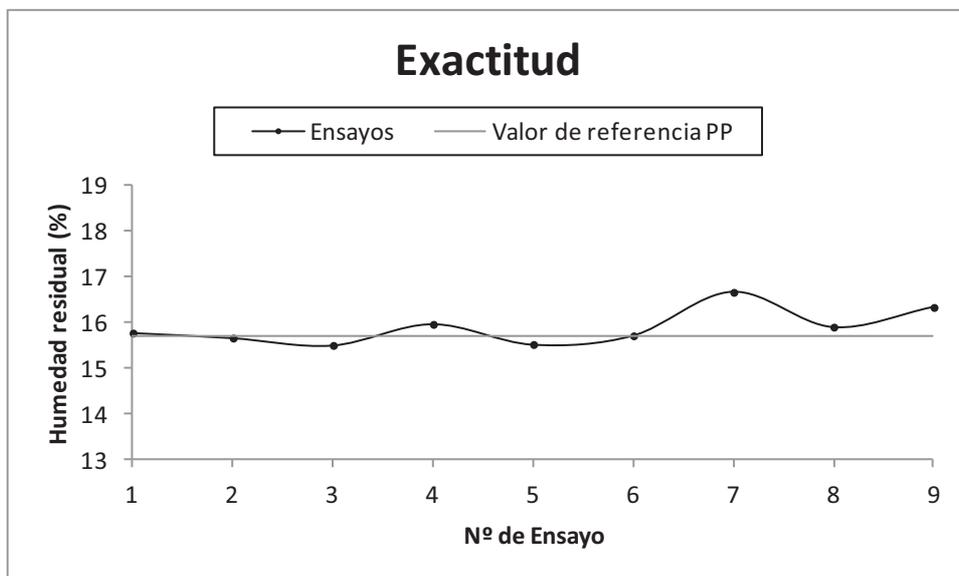
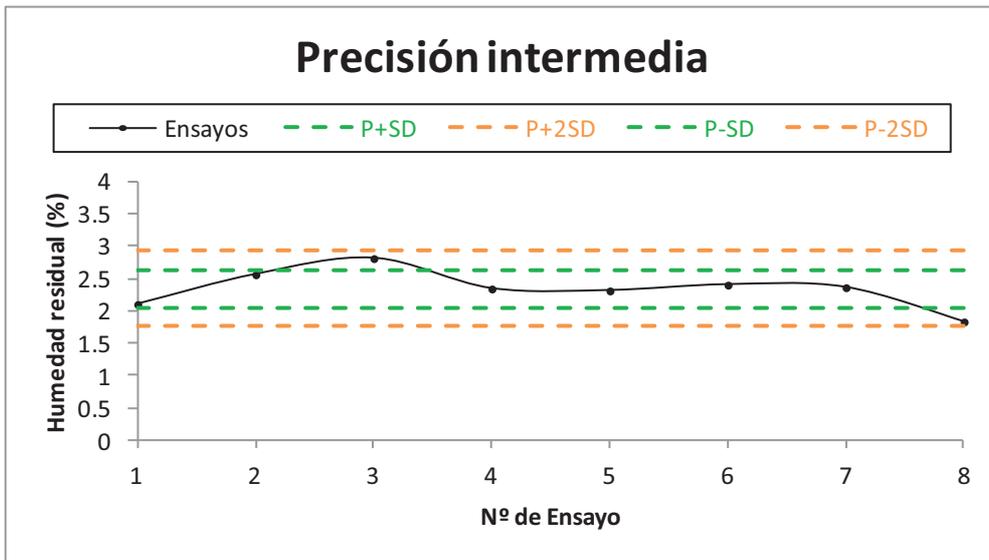


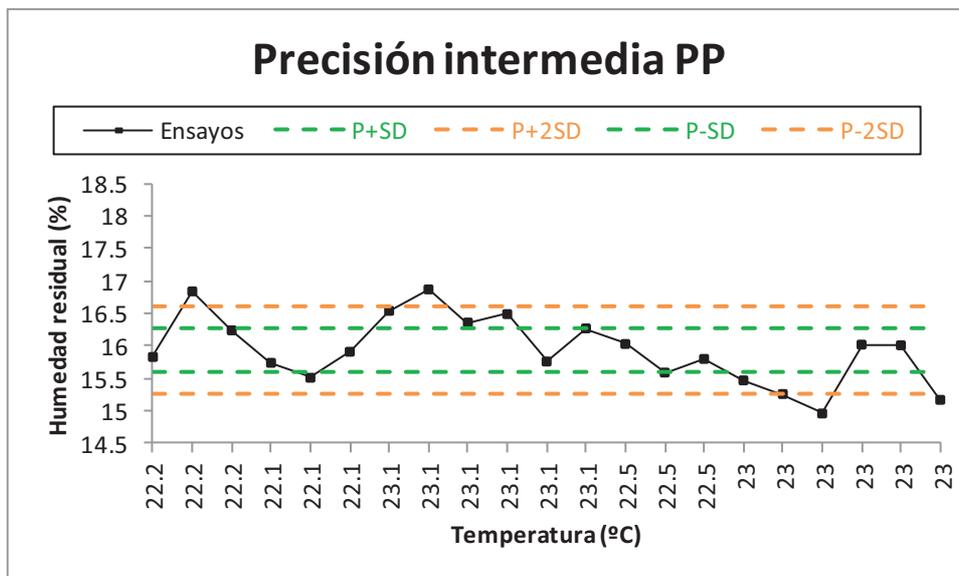
Gráfico 11. Determinación de exactitud en el ensayo de humedad residual.



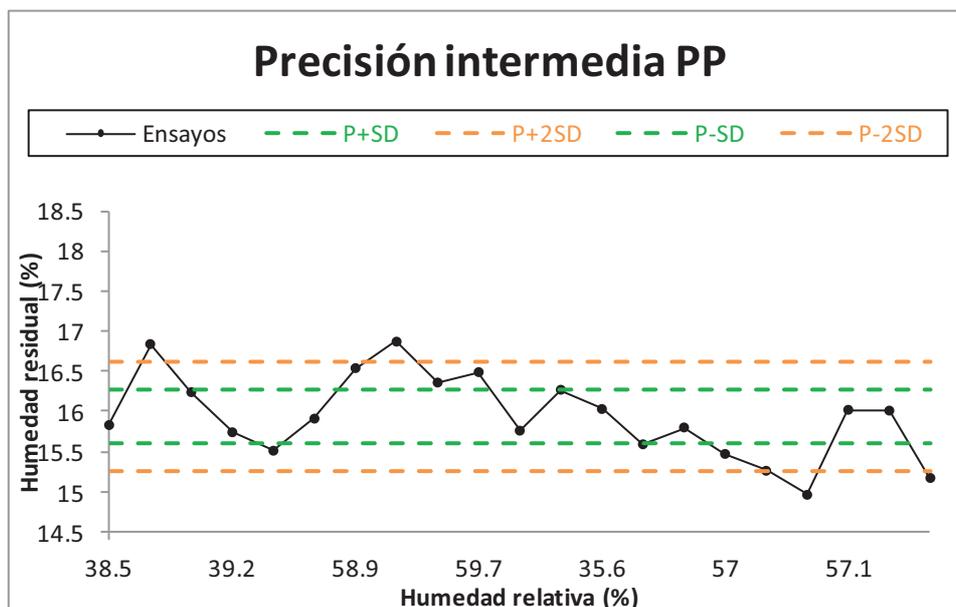
**Gráfico 12. Determinación de precisión intermedia en el ensayo de humedad residual.**



**Gráfico 13. Determinación de precisión intermedia en el ensayo de humedad residual. Influencia de la temperatura ambiente.**



**Gráfico 14. Determinación de precisión intermedia en el ensayo de humedad residual. Influencia de la humedad relativa ambiente.**



#### 6.2.1.6.4.1 Cálculo de Incertidumbre Expandida

Incertidumbre Expandida ( $U = k u(y)$ ) =  $2 \times 0.29 = 0.58$

$U = 0.58$

Expresión del resultado obtenido de una determinación:

$Y = (y \pm U) \%$

siendo,

U: incertidumbre expandida

u: desvío estándar de las 8 determinaciones

k: factor de cobertura

y: resultado obtenido de cada determinación

Y: expresión final del resultado

#### 6.2.1.7 Pureza (monitor): Ensayo de Osmolalidad

##### 6.2.1.7.1 Fundamentos del método

La concentración osmolar se expresa en osmoles de soluto por litro de solución, pero generalmente se emplea un submúltiplo miliosmoles (mosmol) de soluto por litro de solución. Idealmente, el peso de un osmol es el peso de la molécula grammo de una sustancia dividido por el número de iones o especies químicas osmóticamente activas (n) formados con la disolución.

La concentración osmolal se expresa en osmol por kilogramo de solvente, pero el submúltiplo empleado generalmente es miliosmoles por kilogramo (mosmol/kg).

A medida que aumenta la concentración de soluto aumenta la interacción entre las partículas disueltas y disminuye la osmolalidad real con respecto al valor ideal. La desviación de las condiciones ideales es generalmente pequeña en soluciones dentro del intervalo fisiológico. En soluciones de alta concentración, la osmolalidad real puede tener valores considerablemente inferiores a los ideales.

Cada osmol de soluto agregado a 1 kg de agua disminuye el punto de congelación en 1.858 °C y la presión de vapor baja aproximadamente 0.3 mm Hg a 25 °C. Estos cambios físicos son cuantificables lo que permite estimaciones exactas de las concentraciones osmolales. La relación entre la miliosmolalidad y el descenso crioscópico se expresa en la siguiente fórmula:

$$\text{Osmolalidad (mosmol/kg)} = (\Delta T / 1.858) \cdot 1.000 \text{ mosmol/kg}$$

Cuando se emplean osmómetros que miden el descenso crioscópico, un volumen medido de solución se coloca en un tubo de vidrio sumergido en un baño de temperatura controlada. Se coloca en la solución un termistor y un sistema de vibración y la temperatura del baño se reduce hasta lograr que la solución se sobre enfríe. El sistema de vibración se activa para inducir la cristalización del agua en la solución muestra y el calor de fusión liberado aumenta la temperatura de la mezcla hasta su punto de congelación. A través de un puente de Wheatstone, el punto de congelación registrado se convierte en una medida de la osmolalidad.

Al disolver un soluto en un disolvente puro, se producen los siguientes cambios de propiedades de la solución:

- se reduce el punto de congelación,
- se eleva el punto de ebullición
- aumenta la presión osmótica
- disminuye la presión de vapor

Estas propiedades se denominan “coligativas” o de concentración de la solución. Dentro de ciertos límites, estas propiedades cambian en forma directamente proporcional a la concentración de soluto.

El punto de congelación es la propiedad coligativa que permite determinar fácilmente y con gran precisión la concentración de una solución.

La osmolalidad es una unidad común para medir la concentración, y se puede utilizar como elemento relacionante entre todas las propiedades coligativas y con otras unidades de medición de concentración [83-85].

Con el instrumento Osmómetro Advanced Mod. 3250 se determinó la osmolalidad de la vacuna Candid # 1. Se cuantifica la concentración osmótica del PT, definida como el número de osmoles de soluto por kg de solvente.

### **6.2.1.7.2 Materiales y métodos**

Instrumento Osmómetro Advanced Mod. 3250

Fecha última calibración: 29/09/2014

#### Patrones de calibración

100 mOsm/kg. Advanced Instruments, INC.

Intervalo esperado: (98-102) mOsm/kg

Lote: 3424C261

Fecha de vencimiento: 01/2017

1500 mOsm/kg. Advanced Instruments, INC.

Intervalo esperado (1492,5-1507,5) mOsm/kg

Lote: 0404300

Fecha de vencimiento: 04/2015

#### Solución de referencia

Fiske Accuref 290

Intervalo esperado: (288-292) mOsm/kg

Lote: 2782C390

Fecha de vencimiento: 03/2015

Se realizó la validación del ensayo de determinación de osmolalidad mediante el diseño de diferentes pruebas. Se determinó la precisión, exactitud y precisión intermedia de la metodología.

### **6.2.1.7.3 Diseño del ensayo de validación**

Se detallan a continuación los parámetros estudiados:

#### ***Precisión***

Se realizaron 10 determinaciones con el mismo patrón 100 mOsm/kg, el mismo analista en el mismo día y 10 determinaciones con el mismo patrón 1500 mOsm/kg, el mismo analista en el mismo día.

#### ***Exactitud***

Se realizaron 10 determinaciones con el mismo patrón 100 mOsm/kg, el mismo analista en el mismo día y 10 determinaciones con el mismo patrón 1500 mOsm/kg, el mismo analista en el mismo día.

#### ***Precisión intermedia***

Se determinó de forma retrospectiva teniendo en cuenta los resultados obtenidos en 18 determinaciones con distintos lotes de PT a distintos momentos y con distintos analistas.

Se realizó una evaluación estadística de la incertidumbre, basada en datos experimentales (Tipo A). Se calculó la incertidumbre expandida a partir del desvío estándar obtenido en el ensayo de precisión intermedia.

#### 6.2.1.7.4 Resultados

Se muestran a continuación los parámetros obtenidos. Tabla 14.

**Tabla 14. Ensayo de Osmolalidad. Parámetros estadísticos.**

Prueba	Precisión 100 mOsm/kg	Precisión 1500 mOsm/kg	Exactitud 100 mOsm/kg	Exactitud 1500 mOsm/kg	Precisión intermedia
Promedio	100	1483	100	1483	280
SD	1.25	14.61	1.25	14.61	6.28
Promedio+SD	102	1497	102	1497	286
Promedio+2D	103	1512	103	1512	292
Promedio-SD	99.0	1468	99.0	1468	274
Promedio-2SD	97.8	1453	97.8	1453	268
CV	1.25	0.9853	1.25	0.9853	2.24
Varianza	1.57	213.4	1.57	213.4	39.4

Los resultados crudos de la validación se encuentran en el Anexo V.

Para la prueba de exactitud mediante la aplicación de t-Student, se realizó la comparación entre el resultado obtenido promedio y el valor asignado al calibrador por el proveedor. No se obtuvieron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) para el calibrador de 100 mOsm/kg. En caso contrario, se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para el calibrador de 1500 mOsm/kg.

Se graficaron los resultados obtenidos de cada parámetro como se presenta a continuación.

**Gráfico 15. Determinación de precisión en el ensayo de osmolalidad. Patrón 100 mOsm/kg H<sub>2</sub>O.**

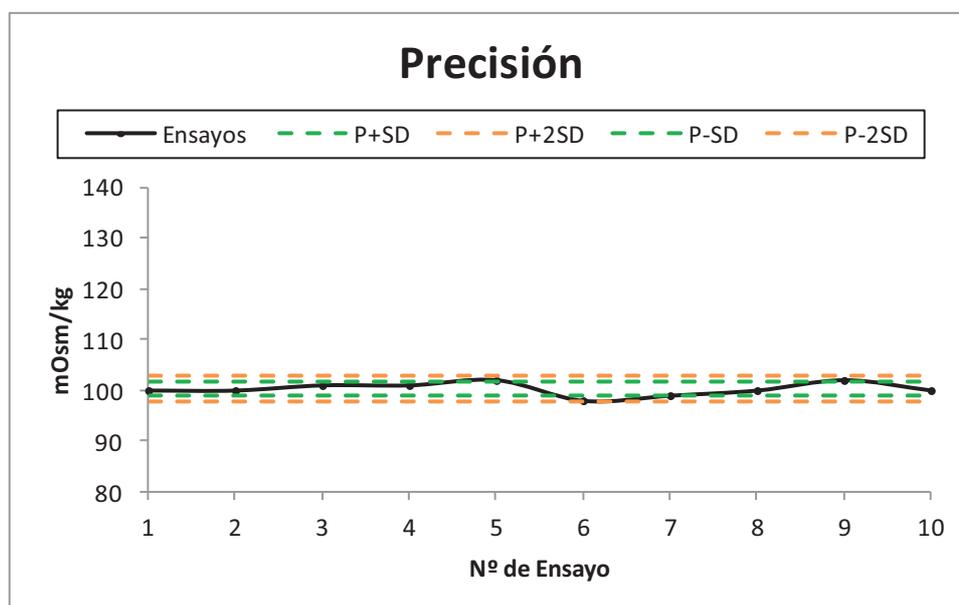


Gráfico 16. Determinación de precisión en el ensayo de osmolalidad. Patrón 1500 mOsm/kg H<sub>2</sub>O.

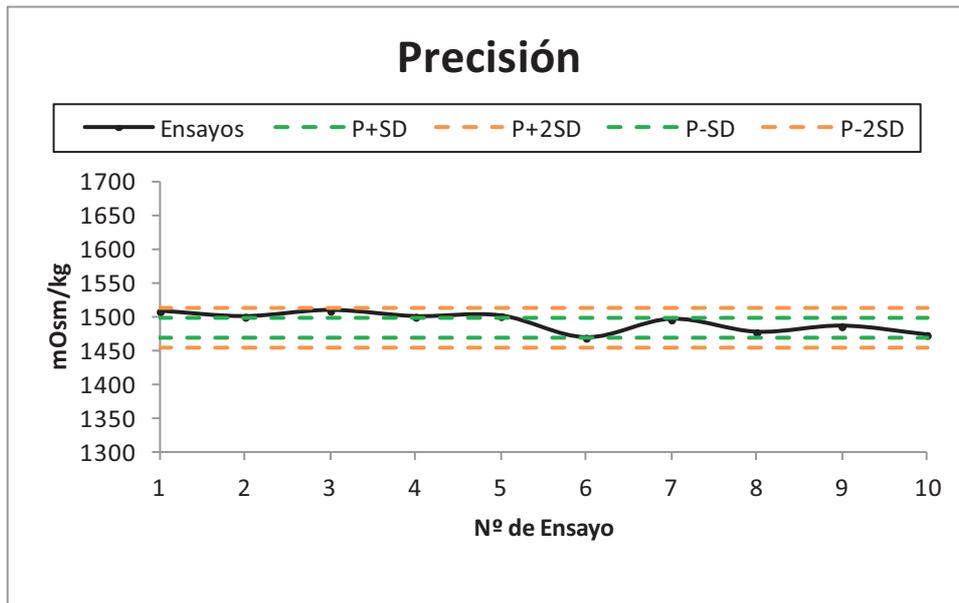
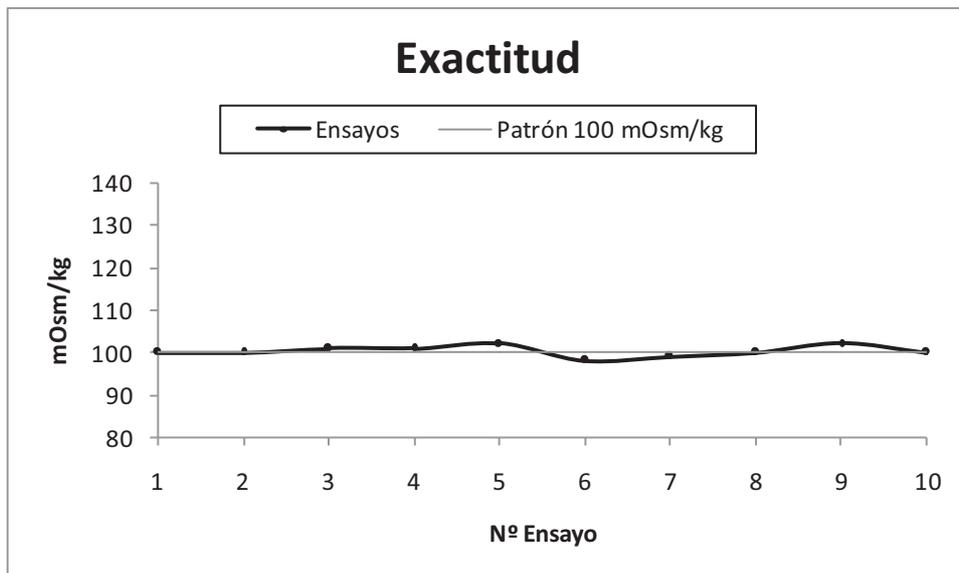
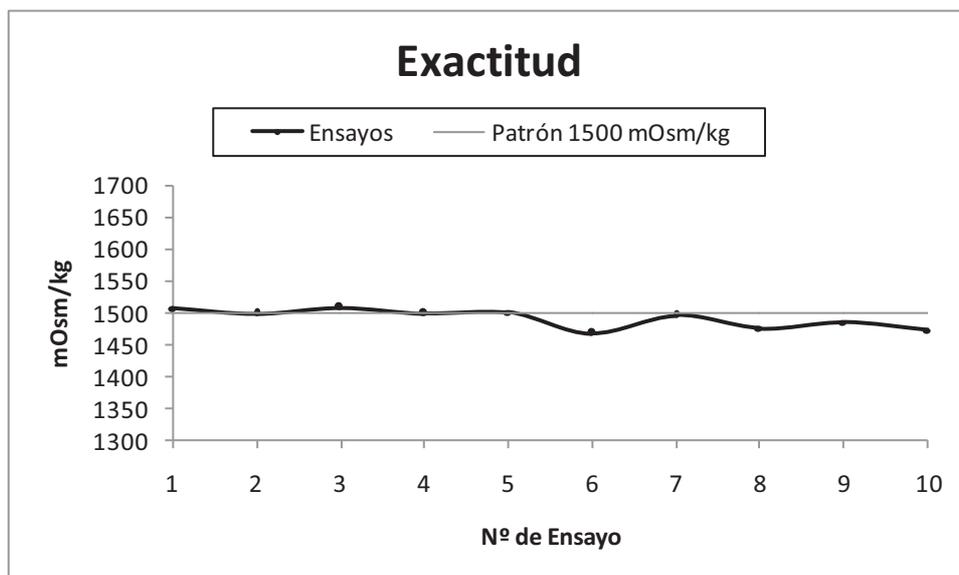


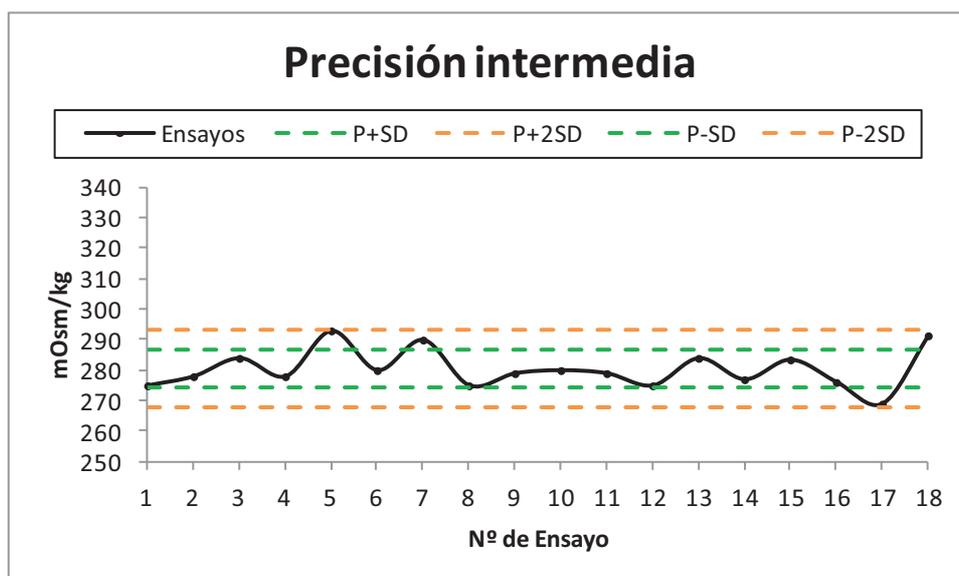
Gráfico 17. Determinación de exactitud en el ensayo de osmolalidad. Patrón 100 mOsm/kg H<sub>2</sub>O.



**Gráfico 18. Determinación de precisión en el ensayo de osmolalidad. Patrón 1500 mOsm/kg H<sub>2</sub>O.**



**Gráfico 19. Determinación de precisión intermedia en el ensayo de osmolalidad.**



#### 6.2.1.7.4.1 Cálculo de Incertidumbre Expandida

Incertidumbre Expandida ( $U = k u(y)$ ) =  $2 \times 6.28 = 12.56$

$U = 12.6$

Expresión del resultado obtenido de una determinación:

$$Y = (y \pm U) \text{ mOsm/kg}$$

siendo,

U: incertidumbre expandida

u: desvío estándar de las 18 determinaciones

k: factor de cobertura

y: resultado obtenido de cada determinación

Y: expresión final del resultado

### 6.2.1.8 Pureza (monitor): Ensayo de pH

#### 6.2.1.8.1 Fundamentos del método

El pH es un índice numérico que se emplea para expresar el grado de acidez o alcalinidad de una solución. La determinación del pH se realiza empleando un medidor del pH, calibrado y capaz de reproducir valores de pH con variaciones menores a 0.02 unidades de pH, empleando un electrodo indicador sensible a la actividad del ión hidrógeno, como el electrodo de vidrio, y un electrodo de referencia apropiado, como por ej., colomel o plata-cloruro de plata. La determinación del pH se realiza mediante la medición de la diferencia del potencial entre el par de electrodos. Las mediciones se hacen  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ , a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente.

La escala de pH se define por:

$$pH_x = pH_r + \frac{(E_x - E_r)}{k}$$

siendo,  $pH_x$  es el pH de la solución muestra,  $pH_r$  es el pH de la solución de calibración,  $E_x$  y  $E_r$  son los potenciales medios cuando la celda contiene la solución muestra y la solución de calibración, respectivamente. El valor  $k$  es el cambio en el potencial por cada unidad de pH y es teóricamente  $[0.05916 + 0.000198(t-25^\circ\text{C})]$  voltios a la temperatura  $t$ .

Los valores de pH medidos de esta manera no corresponden exactamente a los obtenidos mediante la definición clásica  $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$ . Cuanto mayor es la similitud entre la composición de la solución muestra y la composición de la solución de calibración, el pH operativo se acerca más al pH teórico. Cabe destacar que cuando se calibra medidor del pH empleando una solución calibración (solución reguladora acuosa) y luego se lo emplea para medir el pH de una solución no acuosa o una suspensión, se modifican la constante de ionización del ácido o la base, la constante dieléctrica del medio, el potencial de contacto de los líquidos de la pila (que puede ocasionar errores de aproximadamente 1 unidad de pH), así como la respuesta a los iones hidrógeno del electrodo empleado. Por estas razones, los valores obtenidos con estas soluciones de carácter parcialmente acuoso, pueden considerarse solamente como valores aparentes de pH.

Para calibrar el medidor del pH seleccionar dos soluciones de calibración cuya diferencia de pH no exceda 4 unidades, de manera tal que el pH a determinar esté comprendido entre ambos valores [86, 87].

Se realizó la medición del pH de la vacuna Candid # 1 con el peachímetro Orion 920-A. De esta manera se determina la actividad del ión hidrógeno por medida potenciométrica entre el electrodo de referencia y el indicador.

#### **6.2.1.8.2 Materiales y métodos**

Instrumento Medidor de pH Orion Modelo 920 A

Fecha de última calibración: 11/11/2014

##### Soluciones de Calibración

Buffer pH 4 (HANNA instruments)

Lote: 2210

Vencimiento: 02/2015

Buffer pH 7 (HANNA instruments)

Lote: 4939

Vencimiento: 09/2017

Se realizó la validación del ensayo de determinación de pH mediante el diseño de diferentes pruebas. Se determinó la precisión, exactitud y precisión intermedia de la metodología.

#### **6.2.1.8.3 Diseño del ensayo de validación**

Se detallan a continuación los parámetros estudiados.

##### ***Precisión***

Se realizaron 10 determinaciones con el mismo buffer pH 7, el mismo analista en el mismo día.

##### ***Exactitud***

Se realizaron 10 determinaciones con el mismo buffer pH 7, el mismo analista en el mismo día.

##### ***Precisión intermedia***

Se determinó de forma retrospectiva teniendo en cuenta los resultados obtenidos en 18 determinaciones con distintos lotes de PT a distintos momentos y con distintos analistas.

Se realizó una evaluación estadística de la incertidumbre, basada en datos experimentales (Tipo A). Se calculó la incertidumbre expandida a partir del desvío estándar obtenido en el ensayo de precisión intermedia.

#### **6.2.1.8.4 Resultados**

Se muestran a continuación los parámetros obtenidos. Tabla 15

**Tabla 15. Ensayo de pH. Parámetros estadísticos**

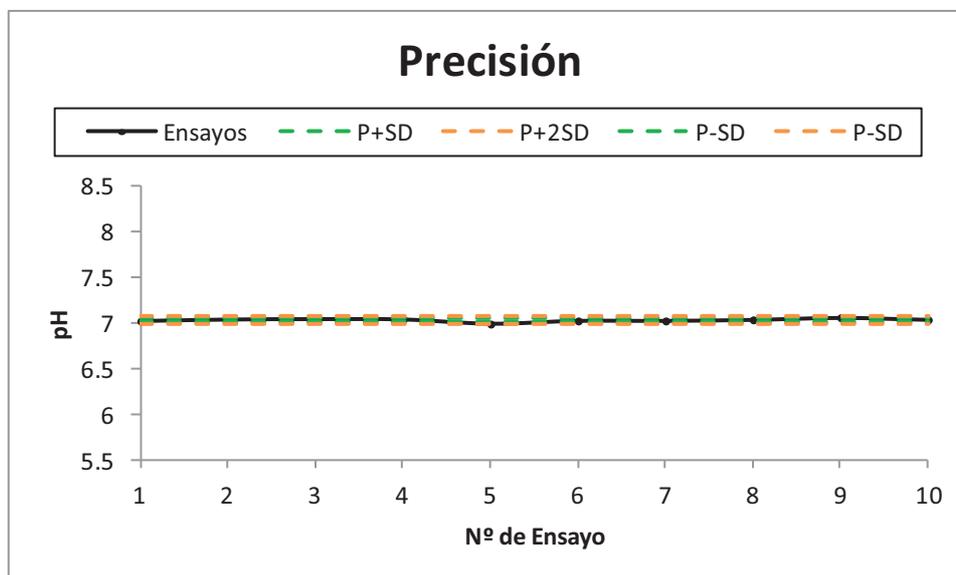
Prueba	Precisión	Exactitud	Precisión intermedia
Promedio	7.0	7.0	6.9
SD	0.018	0.018	0.088
Promedio+SD	7.0	7.0	7.0
Promedio+2SD	7.1	7.1	7.1
Promedio-SD	7.0	7.0	6.8
Promedio-2SD	7.0	7.0	6.7
CV	0.26	0.26	1.3
Varianza	0.00034	0.00034	0.0077

Los resultados crudos de la validación se encuentran en el Anexo VI.

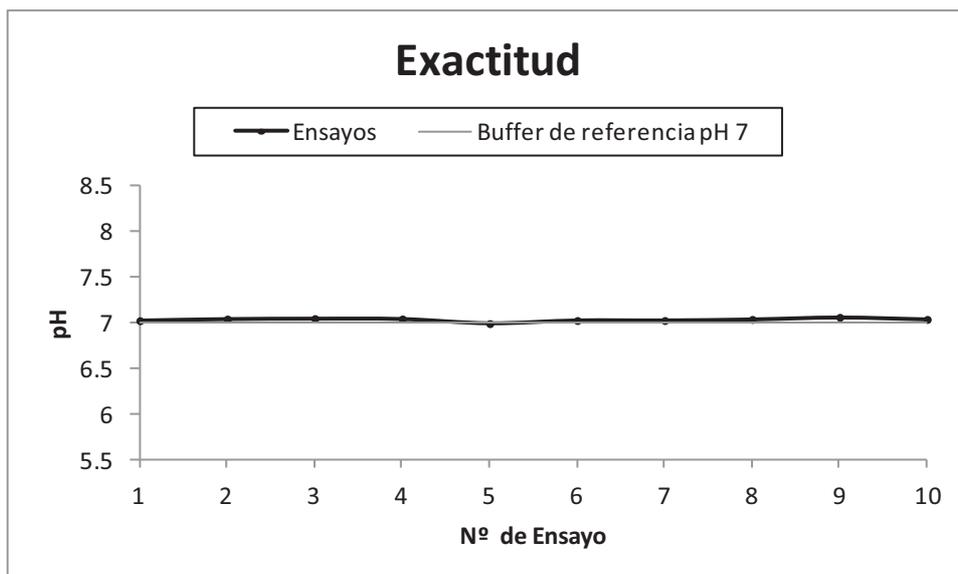
Para la prueba de exactitud mediante la aplicación de t-Student, se realizó la comparación entre el resultado obtenido promedio y el valor asignado al buffer de referencia de pH 7. No se obtuvieron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).

Se graficaron los resultados obtenidos de cada parámetro como se presenta a continuación.

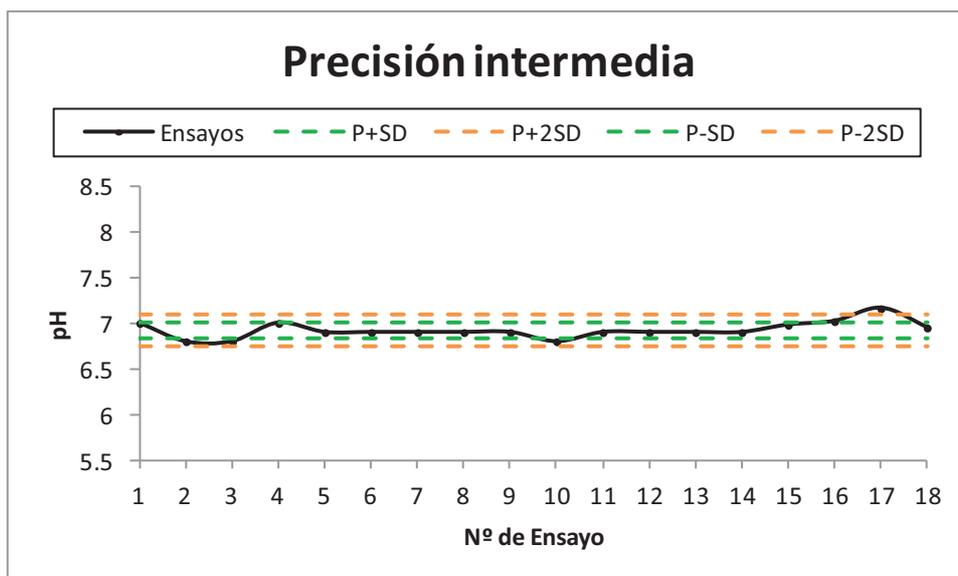
**Gráfico 20. Precisión en el ensayo de pH.**



**Gráfico 21. Exactitud en el ensayo de pH.**



**Gráfico 22. Precisión intermedia en el ensayo de pH.**



#### 6.2.1.8.4.1 Cálculo de Incertidumbre Expandida

Incertidumbre Expandida ( $U = k u(y)$ ) =  $2 \times 0.088 = 0.176$

$U = 0.18$

Expresión del resultado obtenido de una determinación:

$$Y = (y \pm U) \text{ pH}$$

siendo,

U: incertidumbre expandida

u: desvío estándar de las 18 determinaciones

k: factor de cobertura

y: resultado obtenido de cada determinación

Y: expresión final del resultado

## 7. DISCUSIÓN

La utilización de herramientas de calidad permitió analizar la problemática planteada y conocer exhaustivamente las distintas metodologías que se utilizan para la liberación de la vacuna Candid # 1, como así también evaluar oportunidades de mejora para ser incorporadas a la rutina de trabajo. Se analizaron los factores que contribuyen a la calidad de los resultados de los ensayos mediante la utilización de herramientas de calidad, principalmente, el diagrama de Ishikawa. El estudio evidenció la necesidad de aplicar e implementar mejoras en la categoría “Método”. Las 4 categorías restantes analizadas en el diagrama de Ishikawa se encontraron bajo control. En la categoría “Equipo/ Máquina” se observó que el equipamiento que se utiliza para realizar los ensayos está calibrado cumpliendo con el programa de calibración perteneciente al sistema de gestión de calidad del INEVH. Con respecto a la categoría “Materia Prima/ Materiales”, la compra de los insumos se realiza a proveedores reconocidos en el mercado, se controlan los mismos y en el caso de que acompañe al insumo el certificado de análisis, éste se revisa y se almacena en el laboratorio. El material de vidrio se acondiciona en el INEVH por personal calificado siguiendo el procedimiento que se encuentra documentado. Con respecto a la categoría “Personal”, el mismo se encuentra capacitado y calificado para la tarea que realiza. Por último en relación a la categoría “Ambiente”, se realiza la limpieza, el monitoreo de temperatura, presión, humedad y controles ambientales como se detalla en los procedimientos.

Luego del análisis de la categoría “Método” se lograron implementar las mejoras que se discuten a continuación.

El ensayo de esterilidad se realiza por el método de inoculación directa, producto de la transferencia tecnológica proveniente de *The Salk Institute, GSD, USA*. La normativa fue cambiando siendo los requisitos actuales para la validación del ensayo más exigentes.

Al diseño de la revalidación fue necesario incorporar distintos microorganismos de prueba como así también aumentar la cantidad de lotes de vacuna. De los 6 microorganismos que se utilizaron sólo la recuperación de uno de ellos (*B. subtilis*) y en uno de los medios de cultivo probados (CTS) no resultó reproducible con los lotes de vacuna ensayados. Se realizaron cambios en el

método sugeridos por la bibliografía. Con el aumento de la dilución de la muestra no se obtuvieron los resultados esperados. Se debió probar con un cambio de método a filtración por membrana. De esta manera se logró la recuperación del *B. subtilis* en CTS. Los microorganismos que se utilizan en la validación del ensayo de esterilidad son cepas de referencia que abarcan un espectro amplio de posibles contaminantes, por lo tanto es indispensable demostrar la recuperación de las mismas para garantizar que la vacuna no produce un efecto inhibitorio. Del presente estudio surge la necesidad de realizar un cambio de la metodología de análisis de transferencia directa a filtración por membrana. Para el método en cuestión se obtuvo una mejora significativa, detectándose la necesidad de realizar un cambio metodológico que brinda mayor seguridad en la liberación del producto.

Con respecto al ensayo de potencia, parámetro asociado a la eficacia de la vacuna, se demostró que la metodología es robusta para las distintas condiciones de ensayo probadas (cambios controlados de la temperatura de incubación, concentración de CO<sub>2</sub> y volumen de hidratación de la muestra) en los que se obtienen valores promedios que se encuentran +/- 1SD del ensayo de precisión intermedia. Cabe destacar que a pesar de ser un ensayo biológico con la variabilidad intrínseca característica de los mismos, posee un comportamiento homogéneo demostrado en el ensayo de precisión (CV=1.3 %). El parámetro exactitud no pudo establecerse debido a que se carece de un material de referencia certificado y no se cuenta con laboratorios para la ejecución de ensayos de aptitud. El ensayo demostró ser sensible detectándose virus hasta la mayor dilución probada del VR (1/200) presentando además un comportamiento lineal ( $R^2= 0.9496$ ). Se realizó la evaluación tipo A de la incertidumbre mediante el análisis estadístico de los valores obtenidos experimentalmente a partir de los resultados del ensayo de precisión intermedia, por ser el de mayor aporte de variabilidad en la determinación. Se calculó la incertidumbre expandida (U) asociada a la expresión del resultado utilizando VR. Al realizar los ensayos de liberación de lote, la potencia se determina por triplicado y se informa el valor promedio. El desvío estándar de las determinaciones se comparará con la U calculada. Por otra parte, siendo el límite inferior de la especificación  $1 \cdot 10^4$  UFP/ml (4 unidades logarítmicas), sabiendo que U para el ensayo de potencia es 0.32, la potencia obtenida deberá ser mayor a  $2.1 \cdot 10^4$  UFP/ml ( $4 + 0,32= 4,32$ ;

$\text{antilog}_{10} 4.32 = 2.09 \cdot 10^4$ ) y menor a  $4.3 \cdot 10^5$  UFP/ml ( $5.95 - 0,32 = 5,63$ ;  $\text{antilog}_{10} 5.63 = 4.3 \cdot 10^5$  UFP/ml).

Con respecto al ensayo de Identidad, es importante destacar que el mismo involucra además de la utilización del virus de referencia, el uso de un suero hiperinmune obtenido en conejos luego de sucesivas inoculaciones con distintas cepas de VJ. El antisuero obtenido se utiliza para neutralizar la vacuna *in vitro* y demostrar su identidad. Ambos materiales biológicos aportan una variabilidad al método que resulta necesario conocer y controlar. El grado de heterogeneidad es evidenciado por el coeficiente de variación (CV=5.0 %) obtenido en la prueba de precisión intermedia. El ensayo demostró un comportamiento lineal para distintas diluciones del AE ( $R^2 = 0.9793$ ). Luego de la validación de la metodología, se calculó U asociada a la expresión del resultado del título de antisuero específico (AE) y de esta forma se logró estandarizar el título mínimo del AE según los resultados históricos. El título promedio obtenido fue de 3 unidades logarítmicas (1000) por lo que incorporando la U calculada (0.30 unidades logarítmicas) se establece un rango ( $3 \pm 0.30$ ) para el título de AE de 500 a 2000. Es de gran importancia el establecimiento de la especificación para el AE. Los antisueros estudiados que son utilizados además para ensayos de seguridad en animales y cultivos celulares, han demostrado poseer el título de anticuerpos suficiente para neutralizar el virus vacunal y no interferir en los ensayos de seguridad en sustratos biológicos susceptibles al VJ como son los ratones lactantes y las células Vero.

Tanto para el ensayo de seguridad general como para el ensayo de endotoxinas, se realizó un análisis retrospectivo de las validaciones. Ambas se encuentran en cumplimiento con la normativa vigente.

Durante la realización de la validación de la metodología del ensayo de humedad residual, se presentó la dificultad de que en el mercado no hay disponibilidad de un patrón con un contenido de agua similar al de la vacuna en una matriz semejante. El patrón sólido (PP) que se utiliza posee un contenido de agua del 15 %, siendo la especificación de la vacuna menor al 3 %. En el ensayo de precisión realizado con el PP se observó un CV=3.2 % en el rango de (22.1 – 23.1) °C de temperatura y (35.6 – 58.9) % de humedad relativa ambiente. Con la aplicación de t-student se determinó la exactitud de la

metodología realizando la comparación entre el resultado promedio obtenido y el valor asignado al patrón ( $p > 0.05$ ). Se determinó la U de la metodología a partir de los resultados obtenidos del ensayo de precisión intermedia con PT, por ser el mayor aporte de variabilidad en la determinación. El ensayo incorpora la variabilidad provista por la utilización de distintos viales provenientes de distintas corridas de liofilización ( $CV = 12\%$ ). Esta variabilidad está incorporada al cálculo de la incertidumbre. La especificación de la vacuna Candid # 1 en su contenido de humedad residual es menor a 3% por lo que al considerar la U calculada, será deseable obtener valores menores a 2.4 %  $[(3 - U) \% = (3 - 0.58) \% = 2.42\%]$ .

Con respecto a la validación del ensayo de Osmolalidad se calculó el coeficiente de variación ( $CV=1.25\%$ ) a partir de la prueba de precisión. Se determinó la exactitud de la metodología comparando el resultado promedio obtenido con el calibrador de 100 mOsm/kg y el valor asignado mediante t-student ( $p > 0.05$ ). Se calculó la U asociada al resultado de la medición a partir del ensayo de precisión intermedia por ser el que aporta mayor variabilidad a la determinación. La vacuna Candid # 1 debe poseer una osmolalidad entre (260 y 330) mOsm/kg por lo que al considerar la U calculada (12.6), será deseable obtener valores mayores a  $[(260+U) \text{ mOsm/kg} = (260 + 12.6) \text{ mOsm/kg} = 273 \text{ mOsm/kg}]$  y menores a  $[(330 - U) \text{ mOsm/kg} = (330 - 12.6) \text{ mOsm/kg} = 317 \text{ mOsm/kg}]$ .

En el ensayo de validación de pH se calculó el coeficiente de variación ( $CV=0.26\%$ ) de la prueba de precisión, siendo este ensayo el de mayor homogeneidad en comparación al resto de las metodologías. Se determinó la exactitud, con la aplicación de t-student comparando el resultado promedio obtenido y el valor asignado a la solución de calibración de pH 7 ( $p > 0.05$ ). Se calculó la U asociada a la expresión del resultado siendo de 0.18. La vacuna Candid # 1 debe poseer un pH entre 6.5 y 7.5 por lo que al considerar la U calculada (0.18), será deseable obtener valores mayores a  $(6.5+U) = (6.5 + 0.18)=6.7$  y menores a  $(7.5 - U) = (7.5 - 0.18)=7.3$ .

Por último, el conocimiento de la incertidumbre expandida para las distintas metodologías permitió establecer los límites internos que se resumen a continuación:

<b>Ensayo</b>	<b>Especificación</b>	<b>U</b>	<b>Límites internos</b>
Potencia	(1.10 <sup>4</sup> - 9.10 <sup>5</sup> ) UFP/ml	0.32	(2.1 10 <sup>4</sup> - 4.3.10 <sup>5</sup> ) UFP / ml
Identidad	No Especificado	0.30	(500 – 2000) título de AE
Humedad Residual	< 3 %	0.58	< 2.4 %
Osmolalidad	(260 - 330) mOsm/kg	12.6	(273 – 317) mOsm/kg
pH	(6.5 - 7.5)	0.18	(6.7 – 7.3)

## 8. CONCLUSIONES

Si bien el cálculo de incertidumbre realizado en el presente trabajo no es requisito obligatorio, su conocimiento permite establecer límites internos en los ensayos de liberación de la vacuna y evaluar estadísticamente la consistencia de los lotes de producción.

La completa caracterización del comportamiento del Virus de Referencia obtenida en el estudio desarrollado lo presenta como un potencial material de referencia para ser puesto a consideración de la Autoridad Regulatoria Nacional. Asimismo el conocimiento exhaustivo de las metodologías de control de calidad y la capacidad de poder realizar la transferencia de las mismas a la Autoridad Regulatoria Nacional posibilita la incorporación de la vacuna Candid # 1 al apartado de sueros y vacunas de la Farmacopea Nacional Argentina.

Para concluir, se han incorporado mejoras vinculadas a los ensayos de liberación por control de calidad de la vacuna a virus vivo atenuado Candid # 1 contra la fiebre hemorrágica argentina a través de estudios de validación y/o verificación, según requisitos regulatorios, científicos y técnicos de ANMAT, Disposición 705/2005 en el marco de especialidades medicinales [28], como así también con los requisitos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Code of Federal Regulations (CFR21). El conocimiento exhaustivo de los parámetros que caracterizan a la vacuna aporta significativamente a la garantía de su calidad y de ese modo al abastecimiento seguro a la población.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] R. A Arribalzaga, "Una nueva enfermedad epidémica a gérmen desconocido: Hipertermia nefrotóxica, leucopénica y enantémica." *Día Médico.*, vol. 27, pp. 1204, 1955.
- [2] A. Parodi, D. Greenway, H. Rugiero, E. Rivero, M. Frigerio, N. Mettler, M. Boxaca, L. Guerrero y N. Nota, "Sobre la etiología del brote epidémico en Junin." *Dia Med.*, vol. 30, pp. 2300, 1958.
- [3] I. Pirotsky, J. Zuccarini, E. Molinelli, A. Di Pietro, P. Martini, B. Ferreyra, L. Gutman Frugone y T. Vazquez, "Virosis Hemorrágica del noroeste bonaerense. Endemoepidémica, febril, enantemática y leucopénica". La primera inoculación experimental al hombre, 1959.
- [4] M. D Bowen, C. J Peters, S. T Nichols, "The Phylogeny of new world (Tacaribe complex) arenaviruses." *Virology.*, vol. 219, pp. 285-290, 1996.
- [5] S. Delgado, B. R Erickson, R. Agudo, P. J Blair, E. Vallejo, C. G Albariño, J. Vargas, J. A Comer, P.E Rollin, T. G Ksiazek, J. G Olson, S.T Nichol, "Chapare virus, a newly discovered arenavirus isolated from a fatal hemorrhagic fever case in Bolivia." *PLoS Pathog* 4(4): e1000047. doi:10.1371/journal.ppat.1000047, 2008.
- [6] D. Enria, S. Garcia Franco, A. Ambrosio, et al, "Current status of the treatment of Argentine hemorrhagic fever with immune plasma." *Med Microbiol Immunol.*, vol. 175, pp. 169-172, 1986.
- [7] J. I Maiztegui, M.S Sabattini, "Extensión progresiva del área endémica de fiebre hemorrágica argentina." *Medicina (Buenos Aires).*, vol. 37, pp. 162-166, 1977.
- [8] M. S Sabattini, M. S Contigiani, "Ecological and biological factors influencing the maintenance of arenaviruses in nature, with special reference to the agent of Argentine hemorrhagic fever." en F.D. Pinheiro (ed). *International Symposium on Tropical Arbovirus and Hemorrhagic Fever.* 1982, pp. 251-62.
- [9] J. N Mills, B. A Ellis, K. T McKee, et al, "A longitudinal study of Junin virus activity in the rodent reservoir of Argentine hemorrhagic fever." *Am J Trop Med Hyg.*, vol. 47, pp. 749-763, 1992.
- [10] D. A Enria, A. M Briggiler, M.R Feuillade, "An overview of the epidemiological, ecological and preventive hallmarks of Argentine Hemorrhagic Fever (Junin virus)." *Bull Inst Pasteur.*, vol. 96, pp. 103-114, 1998.
- [11] L. B Guerrero, "Vacunas experimentales contra la fiebre hemorrágica argentina." *Medicina (Buenos Aires).*, vol. 37, pp. 252-259, 1977.
- [12] J. G Barrera Oro, K. T. Jr Mc Kee, "Hacia una vacuna contra la fiebre hemorrágica argentina." *Bol Of Sanit Panam.*, vol. 112, pp. 296-305, 1992.

- [13] K. T. Jr McKee, J. G Barrera Oro, A. Kuehne, et al, "Candid # 1 Argentine Hemorrhagic Fever vaccine protects against lethal Junin virus challenge in Rhesus macaques." *Intervirology.*, vol. 34, pp. 154-163, 1992.
- [14] J. G Barrera Oro, K. T. Jr McKee, A. Kuehne, et al, "Preclinical trials of a live, attenuated Junin virus vaccine in Rhesus macaques." en *Institut Pasteur Symposium on Vaccines and Vaccinations. 1985*, p.28.
- [15] J. G Barrera Oro, H. W Lupton, P. B Jahrling , et al, "Cross protection against Machupo virus with Candid # 1 live attenuated Junin virus vaccine." en *Second International Conference on Comparative Virology, 1988*, pp. E1.
- [16] P. B Jahrling, R. W Trotter, J. G Barrera Oro, et al, "Crossprotection against Machupo virus with Candid # 1 Junin virus vaccine: III, post-challenge clinical findings." en *Second International Conference on the Impact of Viral Diseases on the Development of Latin American Countries and the Caribbean Region, 1988*, pp. E3.
- [17] H. W Lupton, P. B Jahrling, J.G Barrera Oro, et al, "Crossprotection against Machupo virus with Candid # 1 liveattenuated Junin virus vaccine: II, post-challenge virological and immunological findings." en *Second International Conference on the Impact of Viral Diseases on the Development of Latin American Countries and the Caribbean Region, 1988*, pp. E2.
- [18] C. MacDonald, K. McKee, C. Peters , et al, "Initial clinical assessment of humans inoculated with a live-attenuated Junin virus vaccine."en *Programs and abstracts of the VII International Congress of Virology, 1987*, pp. R3-27.
- [19] J. I Maiztegui, K. T Jr McKee, "Inoculation of human volunteers with a vaccine against Argentine hemorrhagic fever." en *Program and abstracts of the VI International Conference on Comparative and Applied Virology, 1989*, pp. S4.
- [20] J. I Maiztegui, K. T Jr McKee, J. G Barrera Oro, et al, "Protective efficacy of a live attenuated vaccine against Argentine Hemorrhagic Fever." *J Infect Dis.*, vol. 177, pp. 277-283, 1998.
- [21] A. M Ambrosio, M. C Saavedra, L. M Riera, R. M Fassio, "La producción nacional de vacuna a virus Junin vivo atenuado (Candid # 1) anti-fiebre hemorrágica argentina." *Acta Bioquím Clín Latinoam.*,vol. 40, pp. 5-17, 2006.
- [22] D. Enria, A. M Ambrosio, A. M Briggiler, M. R Feuillade, E. Crivelli, y Grupo de Estudio de la vacuna contra la fiebre hemorrágica argentina: A. Azar, G. Bonavitta, A. Bottale, C. Digilio, R. Fassio, L. Ranzuglia, L. Riera, M. C Saavedra, Z. Sanchez, A. Senn, "Vacuna contra la fiebre hemorrágica argentina Candid # 1 en la Argentina." *Medicina (Buenos Aires).*, vol. 70, pp. 215-222, 2010.
- [23] *Disposición ANMAT 4882/06. Autorización de Registro de la vacuna Candid # 1 al Registro de Especialidades Medicinales, 2006.*

- [24] *Informe para la XXVII reunión anual del programa nacional de control de la fiebre hemorrágica argentina*, 2013.
- [25] *Resolución ANMAT 498/08. Normas Nacionales de Vacunación*, 2008.
- [26] D. Enria, "Situación actual de la fiebre hemorrágica argentina (FHA)." en *Temas de Zoonosis V. Asociación Argentina de Zoonosis (Eds.). 2011*, pp. 99-106.
- [27] Organización Panamericana de la Salud, *Requisitos armonizados para el registro de vacunas en la Región de las Américas y Guía para la preparación de una solicitud de registro sanitario Red PARF Documento Técnico No. 1 ISBN 978 92 75 33083 8*, 2010.
- [28] *Disposición ANMAT 705/2005. Requisitos para la inscripción de vacunas. Presentación de la documentación técnica. Establecimientos elaboradores. Información Preclínica-Clínica. Formularios*, 2005.
- [29] *Farmacopea Argentina 7ª Edición*, 2013.
- [30] World Health Organization, *Manual of laboratory methods*. WHO/V&B/97.04, 1997.
- [31] *Disposición ANMAT 2819/04. Lineamientos generales de Buenas Prácticas de Fabricación para Elaboradores, Importadores/Exportadores de medicamentos*, 2004.
- [32] *Gestión de la Calidad Enfocada en los Procesos II*. Deutsche Gesellschaft für Qualität (DGQ), 2007.
- [33] A. Ossorio, *Planeamiento estratégico*. 5ta. Edición INAP, Buenos Aires (1ª edición 1998), 2003.
- [34] L. Camacho, R. Cámara, H. Casacante. *El enfoque de marco lógico, 10 casos prácticos*. Acciones de Desarrollo y Cooperación A.D.C CIDEAL – Fundación CIDEAL, 1999.
- [35] M. Testa, *Pensamiento estratégico y lógica de la programación*. El caso de salud, OPS, Washington, 1989.
- [36] C. Matus, *Estrategia y plan. Los supuestos básicos de la concepción interna de la planificación*. Siglo XXI Editores, 1981.
- [37] K. Bose Tapan, *Total Quality of Management*. Editorial Pearson, 2011.
- [38] M. Meireles. *Ferramentas Administrativas Para Identificar Observar y Analisar Problemas*. Editora Arte & Ciencia, 2001.
- [39] Scott Sutton, *The sterility Test*. Microbiology Network, Inc. Rochester, NY, USA, 2011.
- [40] *Farmacopea Argentina 7ª Edición, Capítulo 370, Ensayo de Esterilidad*, 2013.
- [41] *USP 35 <61> Microbiological Examination of Non Sterile Products: Microbial Enumeration Tests*, 2012.
- [42] *USP 35 <62> Microbiological Examination of Non Sterile Products: Test for specified microorganisms*, 2012.

- [43] *Farmacopea Argentina 7ª Edición, Capítulo 90, Control Higiénico de Productos no Obligatoriamente Estériles*, 2013.
- [44] *USP 36 <1> Inyectables*, 2013.
- [45] *USP 36 <71> Pruebas de esterilidad*, 2013.
- [46] *USP 36 <151> Prueba de pirógenos*, 2013.
- [47] *USP 36 <660> Envases vidrios*, 2013.
- [48] *USP 36 <788> Partículas en inyectables*, 2013.
- [49] *USP 36 <1211> Esterilización y garantía de esterilidad de artículos farmacopeicos*, 2013.
- [50] *CFR Title 21- Foods and Drugs (21 CFR), Part 610- General biological products standards (21 CFR 610), 610.12 Sterility*, 2013.
- [51] *GUM Guide to the expression of uncertainty in measurement*, JCGM 100:2008.
- [52] *USP 35 <111> Design and Analysis of Biological Assays*, 2012.
- [53] *USP 35 <1010> Analytical Data-Interpretation and Treatment*, 2012.
- [54] *USP 35 <1225> Validation of Compendial Procedures*, 2012.
- [55] *USP 35 <1226> Verification of Compendial Procedures*, 2012.
- [56] *USP 35 <1032> Design and Development of Biological Assays*, 2012.
- [57] *USP 35 <1033> Biological Assay Validation*, 2012.
- [58] *USP 35 <1034> Analysis of Biological Assays*, 2012.
- [59] *ICH, Q6B, Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products*, 1999.
- [60] *ICH, Q2, Validation of Analytical Procedures: Test and Methodology*, 1994.
- [61] *CFR Title 21- Food and Drugs (21 CFR), Part 610-General Biological Products Standards (21 CFR 610). 610.10 – Potency*, 2013.
- [62] "Growth of Junin virus, the etiological agent of argentinian hemorrhagic fever, in cell cultures." *Archiv für die gesamte Virusforschung.*, vol.21, pp. 243-252, 1967.
- [63] *VIM Vocabulario internacional de metrología – Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados*, JCGM 200:2008.
- [64] *NIST, Guide to the SI, Appendix B, Conversion Factors, B.7.1 Rounding numbers*, 2009 [Online]. Disponible: <http://physics.nist.gov/Pubs/SP811/appenB.html>
- [65] Fazekas de St Groth S. "The neutralization of viruses." *In Adv. Virus Res.*, pp.1-125, 1962.
- [66] A. E. Wittek, G. V. Quinnan, Jr., *Immunology of viral infections*, Chapter 4: 116-155. In *Textbook of Human Virology*, Second Edition, Ed Robert Belsher, 1990.
- [67] P. Webb, K. Johnson, R. Mackensie (1969), "The measurement of specific antibodies in Bolivian hemorrhagic fever by neutralization of virus plaques.", *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 130: 1013.

- [68] E. B. Damonte, S. E. Mersuch, N. A. Candurra, C. E. Coto (1986), "Cross reactivity between Junin and Tacaribe viruses as determined by neutralization test and immunoprecipitation.", *Med. Microbiol. Immunol*, 175:85-8.
- [69] *ATCC Quality Control Methods for Cell Lines*, Second edition, 1992.
- [70] *Farmacopea Argentina 7ª Edición, Capítulo 635, Métodos Inmunoquímicos*, 2013.
- [71] *CFR, Title 21- Foods and Drugs (21 CFR), Part 610- General biological products standards (21 CFR 610), 610.11 General safety*, 2013.
- [72] *Farmacopea Argentina 7ª Edición, Capítulo 360, Ensayo de Toxicidad Anormal*, 2013.
- [73] E. Earley, P. H. Peralta, K. M. Johnson, *Proc Soc Exp Biol Med*. 1967 Jul;125(3):741-7. A plaque neutralization method for arboviruses.
- [74] P.A. Webb, K. M. Johnson, R. B. Mackenzie, "The measurement of specific antibodies in Bolivian hemorrhagic fever by neutralization of virus plaques." *.Proc Soc Exp Biol Med*. 1969 Mar;130(3):1013-9.
- [75] *USP 37 <85> Prueba de endotoxinas bacterianas*, 2014.
- [76] *Farmacopea Argentina 8ª Edición, Capítulo 330, Ensayos de endotoxinas bacterianas*. 2014.
- [77] *Farmacopea Argentina 7ª Edición, Capítulo 330, Ensayos de endotoxinas bacterianas*, 2013.
- [78] *Farmacopea Argentina 7ª Edición, Capítulo 120, Determinación de agua*, 2013.
- [79] *USP 37 <921> Water determination*, 2014.
- [80] *FDA Guideline for the determination of residual moisture in dried biological products*, 1990.
- [81] Mettler Toledo DL31/DL38, Fundamentos de la valoración volumétrica según Karl Fischer con 10 aplicaciones seleccionadas. Tituladores. Folleto aplicativo 26.
- [82] Mettler Toledo. Manual de instrucciones Tituladores KF DL31/DL38.
- [83] *Farmacopea Argentina 7ª Edición, Capítulo 640, Osmolaridad y Osmolalidad*, 2013.
- [84] *USP 37 <785> Osmolaridad y Osmolalidad*, 2014.
- [85] Osmómetro Advanced. Modelo 3250. Guía del usuario.
- [86] *Farmacopea Argentina 7ª Edición, Capítulo 250, Determinación del pH*, 2013.
- [87] *USP 37 <791> pH*, 2014.

# ANEXOS

## **Anexo I**

### **Diagrama de Ishikawa**

ITEM	CATEGORIA	CAUSA	RIESGO BAJO	RIESGO ALTO
1	Equipo/Máquina	Estufas de incubación con CO <sub>2</sub> : calibración semestral, control de T y CO <sub>2</sub>	Se realiza calibración y control de T y CO <sub>2</sub>	
2	Equipo/Máquina	Baños termostático y serológico: termómetro calibrado anualmente	Se realiza calibración del termómetro digital. No se realiza calibración del termómetro de Hg	
3	Equipo/Máquina	Estufas de incubación: calibración semestral y control de T	Se realiza calibración y control de T	
4	Equipo/Máquina	GSB: certificados anualmente	Se realiza	
5	Equipo/Máquina	Balanza analítica y para animales: calibración anual, verificación y registros	Se realiza calibración y verificación. Actualizar MO para implementar registro de verificación	
6	Equipo/Máquina	Vortex: en funcionamiento y suministro de energía	No crítico	
7	Equipo/Máquina	Cronómetro: en funcionamiento y suministro de batería	Batería, verificación MO-23	
8	Equipo/Máquina	Termómetro de Hg y digital OAKTON serie N° 100-295/SI-3358/NRTD400/ID-TD0006: calibración semestral	Se realiza calibración del termómetro digital. No se realiza calibración del termómetro de Hg	
9	Equipo/Máquina	Titulador Mettler Toledo DL31: calibración y verificación	Se realiza verificación con patrón antes de uso	
10	Equipo/Máquina	Peachímetro Orion 920A: calibración semestral, verificación antes de uso y registros	Se realiza verificación antes de uso. Implementar registros de MO-61	
11	Equipo/Máquina	Osmómetro Advanced Mod. 3250: calibración anual y verificación	Se realiza verificación con patrón antes de uso	
12	Equipo/Máquina	Microondas: en funcionamiento y suministro de energía	No es crítico	
13	Equipo/Máquina	Reloj interruptor: ciclo de 12 hs	¿Cómo controlarlo? Corriente?	
14	Equipo/Máquina	Microscopio invertido: en funcionamiento, suministro de energía y MO	Realizar MO	
15	Equipo/Máquina	Microscopio óptico: en funcionamiento, suministro de energía y MO	Realizar MO	
16	Equipo/Máquina	Autoclave Mazden AVD-0960-000: calificación, calibración y verificación (bowie dick, indicador biológico e integrador químico)	Se realiza certificación. Ciclo de medios validado en 2010	
17	Equipo/Máquina	Heladeras: calibración y control de T	Se realiza y registra control de temperatura según CC-03	
18	Equipo/Máquina	Congeladoras: calibración y control de T	Se encuentran controladas diariamente. Registros MO-73	

19	Equipo/Máquina	Datalogger: calibración y verificación	Se realiza verificación semestral, no están incluidos en MC-29, ni en MC-05, por lo tanto no se encuentran los registros. No se realiza calibración. Definir frecuencia	
20	Equipo/Máquina	Visualizador de placas: en funcionamiento, suministro de energía y MO	Realizar MO	

ITEM	CATEGORIA	CAUSA	RIESGO BAJO	RIESGO ALTO
21	Materia Prima/ Materiales	Células Vero 76 certificadas: 80 % de crecimiento, cultivo celular joven	Visualización en microscopio. Confluencia	
22	Materia Prima/ Materiales	Cepa de referencia interna: Vacuna Candid #1, titulada previamente	TC-24 "Preparación de Virus Junin de referencia"	
23	Materia Prima/ Materiales	Medios y reactivos provistos por Producción: liberados con vencimiento definido	Producción provee EMEM, L-glutamina, Suero Fetal Bovino (certificado del proveedor se guarda fotocopia en Ccal) , P+S, Medio para placas, Agarosa, Rojo neutro, API	
24	Materia Prima/ Materiales	Medios y reactivos provistos por control de calidad: liberados con vencimiento definido y comerciales con certificado	CCal para ensayo de esterilidad se realiza promoción de crecimiento previo al análisis. Se utilizan reactivos comerciales, certificado se almacena firmado. TM-32	
25	Materia Prima/ Materiales	Materiales de laboratorio: descartable y no descartable	Se realiza el pedido de los materiales por especificación, según HE (hoja de especificación) y la disponibilidad de los mismos es de acuerdo al uso previsto	
26	Materia Prima/ Materiales	Suero inmune obtenido en conejo: definir requisito ( <b>título de Ac</b> )	VV-10-00 y TC-12	
27	Materia Prima/ Materiales	Patrones: certificado	Se utilizan patrones comerciales, certificado se almacena firmado	
28	Materia Prima/ Materiales	Pesas patrón: calibración bianual	Calibración bianual, incorporar al cronograma	
29	Materia Prima/ Materiales	Cepas de referencia: control anual	Implementar TM-19	
30	Materia Prima/ Materiales	Animales de laboratorio: ratones: condición SPF certificada; cobayos: calidad controlada; conejos: certificado agrotécnica	Evidencia ratones SPF, cobayos controlados. TM-24 "Monitoreo micrionológico de animales de laboratorio" (para serología hace referencia al TC-16 y al TM-26)/VV-15 "Cuidado de animales"/TC-16 "	

31	Materia Prima/ Materiales	Micropipetas: calibración anual	Se realiza anualmente MC-24/MM-19.No está incorporado al cronograma de calibración y difícil cumplimiento de MC-24	
32	Materia Prima/ Materiales	Propipetas automáticas: mantenimiento según uso	Se realiza cambio de filtros, según necesidad	
33	Materia Prima/ Materiales	Mechero: en funcionamiento y suministro de gas	No es crítico	
34	Materia Prima/ Materiales	Camas de animales: viruta estéril, alimento liberado, agua acidulada y VitC calidad medicinal	Se encuentra controlado, según: B-25-01 "ALIMENTO BALANCEADO Y SUPLEMENTO VEGETAL COMO FUENTE DE VITAMINA C PARA COBAYOS"/ B-05-02 "PROCEDIMIENTO PARA EL ACIDIFICADO DEL AGUA DE BEBIDA Y CONTROL DE pH"/ B-06-02 "PROCEDIMIENTO PARA EL AUTOCLAVADO DE MAMADERAS CON AGUA ACIDULADA" VV-15 "CUIDADO DE ANIMALES". TM-28 "CONTROL MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTO PARA ANIMALES DE LABORATORIO"	
35	Materia Prima/ Materiales	Fyrite: mantenimiento	Tener en cuenta del manual el punto 6.0 Fyrite Maintenance. No hace referencia en el manual a calibración o utilización de patrones. Se podría hacer carta de uso	
36	Materia Prima/ Materiales	Tubo de CO2: disponibilidad del insumo durante la incubación/ porcentaje de pureza	Contemplado en registro de T de la estufa	

ITEM	CATEGORIA	CAUSA	RIESGO BAJO	RIESGO ALTO
37	Método/Validación/ Incertidumbre	Potencia (POS TC-06)		Realizar Validación
38	Método/Validación/ Incertidumbre	Identidad (POS TC-22)		Realizar análisis retrospectivo. Evaluación de necesidad de validación
39	Método/Validación/ Incertidumbre	Esterilidad (POS TM-05 Ref.: CFR21 610.12(a))		Realizar Verificación
40	Método/Validación/ Incertidumbre	Seguridad general (POS VV-06 Ref.: CFR21 610.11)		Realizar Validación
41	Método/Validación/ Incertidumbre	Humedad residual (POS-Q-34)		Realizar Verificación
42	Método/Validación/ Incertidumbre	pH (POS Q-02)		Realizar Verificación
43	Método/Validación/ Incertidumbre	Osmolalidad (POS Q-11)		Realizar revalidación con normativa vigente
44	Método/Validación/ Incertidumbre	LAL (POS Q-14) USPXXIV, SOP (TSI-GSQ)2 - Q-2-00		Realizar análisis retrospectivo. Evaluación de necesidad de validación

ITEM	CATEGORIA	CAUSA	RIESGO BAJO	RIESGO ALTO
45	Personal	Entrenamiento y calificación: Personal calificado según G-10	Entrenamiento del personal según G-10	
46	Personal	Higiene Personal: Cumplimiento CC-01	Según CC-01	
47	Personal	EPP: Normas de Bioseguridad	Según CC-01. Incorporar los anteojos de seguridad donde corresponda	
48	Personal	Comunicación entre departamentos, coordinación de ensayos, interrelación con otros departamentos	PC-10 "PROCEDIMIENTO PARA LA SOLICITUD Y ENTREGA DE MATERIALES A Y DESDE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES Y MEDIOS Y REACTIVOS" Formulario N°0127/0138/0240 CC-15 "PROCEDIMIENTO DE SOLICITUD DE INSUMOS Y ESPACIO DE TRABAJO AL LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD (CCAL)" Formulario N°0288	

ITEM	CATEGORIA	CAUSA	RIESGO BAJO	RIESGO ALTO
49	Ambiente	Circulación: cumplimiento plano CC-01	Según CC-01	
50	Ambiente	Controles GSB: certificación anual	Se realiza MC-29/MC-01	
51	Ambiente	Controles ambientales: áreas limpias certificación anual	MC-17	
52	Ambiente	Presiones: 81/84 Rango: 7-9 mmH2O; 80 Rango: 5-7 mmH2O; 72/77 Rango: 3.5-5.5 mmH2O; 71/79 Rango: 2-4 mmH2O y $\Delta P \geq 1.2$ mmH2O	Control diario se registra en Formulario N°578. Acciones son correctivas	
53	Ambiente	Limpieza: diaria, general (mensual) y profunda (cuando el ensayo lo requiera para un mayor decontaminación). Limpieza de heladeras (semestral), incubadores secos y húmedos (según necesidad de decontaminación) y congeladoras (anual)	Se realiza la limpieza diaria y general del laboratorio CC-02 y limpieza y control de incubadores y refrigeradores CC-03	
54	Ambiente	Temperatura: 18-22°C	Según CC-03 el control de temperatura ambiente se registra en Formulario N° 0128. Implementar el control que se debe realizar in vivo. En CC-03 se encuentra contemplado registrar el diferencial de presión; no está contemplado registrar la T ambiente in vivo, pero me comentan que se toma la T cuando se están realizando los ensayos	
55	Ambiente	Manómetro: calibración anual	Se realiza según MC-12 calibración anual. Fueron calibrados en Octubre de 2013, Vto calibración: octubre 2014	
56	Ambiente	Higrómetro: HR: 30-60%	Se realiza de la misma forma que el item 54 para autoclave (79) y pasillo (71)	

## **Anexo II**

Resultados crudos del ensayo de validación de Potencia

**Precisión**

Referencia: Test N° 5915

<b>Ensayo N°</b>	<b>Título</b>	<b>Título</b>	<b>log10</b>
1	3.25 x 10 <sup>4</sup>	32500	4.511883361
2	2.45 x 10 <sup>4</sup>	24500	4.389166084
3	3.10 x 10 <sup>4</sup>	31000	4.491361694
4	2.80 x 10 <sup>4</sup>	28000	4.447158031
5	3.45 x 10 <sup>4</sup>	34500	4.537819095
6	2.30 x 10 <sup>4</sup>	23000	4.361727836
7	2.70 x 10 <sup>4</sup>	27000	4.431363764
8	3.25 x 10 <sup>4</sup>	32500	4.511883361
9	3.15 x 10 <sup>4</sup>	31500	4.498310554
10	3.10 x 10 <sup>4</sup>	31000	4.491361694
Promedio	2.95 x 10 <sup>4</sup>	Promedio	4.467203547
		SD	0.057749737
		Promedio + 1SD	4.524953284
		Promedio + 2SD	4.582703021
		Promedio - 1SD	4.40945381
		Promedio - 2SD	4.351704073
		CV	1.292749174
		Varianza	0.003335032

## Sensibilidad

Referencia: Test N° 6289

Ensayo N°	Factor de Dilución (FD)	Log10 FD	Título	Título	log10
1	10	1	$1.55 \times 10^4$	15500	4.1903317
2	25	1.397940009	$4.75 \times 10^3$	4750	3.67669361
3	50	1.698970004	$4.0 \times 10^3$	4000	3.60205999
4	100	2	$7.5 \times 10^2$	750	2.87506126
5	200	2.301029996	$5.0 \times 10^2$	500	2.69897

$R^2=0.9496$

### Precisión intermedia

Referencia: Test N° 5184. 5333, 5358, 5372, 5374, 5898, 5901, 5915, 5932, 5950, 5951, 5972, 5993, 6035, 6061, 6102, 6114, 6127, 6142, 6150.

N° Ensayo	Fecha	Analista	Título	Título	log10
1	15/03/2012	AM – CA	1.875 x 10 <sup>4</sup>	18750	4.273001272
2	13/06/2012	AM – GL	1.70 x 10 <sup>4</sup>	17000	4.230448921
3	28/06/2012	AM – GL	3.35 x 10 <sup>4</sup>	33500	4.525044807
4	05/07/2012	AM – GL	1.425 x 10 <sup>4</sup>	14250	4.153814864
5	06/07/2012	AM – GL	1.15 x 10 <sup>4</sup>	11500	4.06069784
6	25/07/2012	AM – GL	1.525 x 10 <sup>4</sup>	15250	4.183269844
7	27/07/2012	AM – GL	1.25 x 10 <sup>4</sup>	12500	4.096910013
8	03/08/2012	AM – GL	1.53 x 10 <sup>4</sup>	15300	4.184691431
9	16/08/2012	AM – GL	1.32 x 10 <sup>4</sup>	13200	4.120573931
10	23/08/2012	NM – GL	2.525 x 10 <sup>4</sup>	25250	4.402261382
11	24/08/2012	NM – GL	1.575 x 10 <sup>4</sup>	15750	4.197280558
12	30/08/2012	NM – GL	1.45 x 10 <sup>4</sup>	14500	4.161368002
13	13/09/2012	AM – GL	1.75 x 10 <sup>4</sup>	17500	4.243038049
14	11/10/2012	NM – GL	1.2 x 10 <sup>4</sup>	12000	4.079181246
15	26/10/2012	NM – GL	2.65 x 10 <sup>4</sup>	26500	4.423245874
16	16/11/2012	NM – GL	2.3 x 10 <sup>4</sup>	23000	4.361727836
17	22/11/2012	NM – GL	3.0 x 10 <sup>4</sup>	30000	4.477121255
18	30/11/2012	NM – GL	2.2 x 10 <sup>4</sup>	22000	4.342422681
19	07/12/2012	NM – GL	4.35 x 10 <sup>4</sup>	43500	4.638489257
20	13/12/2012	NM – GL	1.97 x 10 <sup>4</sup>	19700	4.294466226
Promedio					4.272452765
SD					0.158785108
Promedio + 1SD					4.431237872
Promedio + 2SD					4.59002298
Promedio - 1SD					4.113667657
Promedio - 2SD					3.954882549
CV					3.71648598
Varianza					0.025212711

**Robustez – Hidratación de la muestra**

Referencia: Test N° 5932

<b>N° Ensayo</b>	<b>API (ml)</b>	<b>Título</b>	<b>Título</b>	<b>log10</b>
1	5	1.975 x 10 <sup>4</sup>	19750	4.2955671
2	5.5	1.10 x 10 <sup>4</sup>	11000	4.04139269
3	6	2.125 x 10 <sup>4</sup>	21520	4.33284227
			Promedio	4.22326735
			SD	0.15860692
			Promedio + 1SD	4.38187427
			Promedio + 2SD	4.54048119
			Promedio - 1SD	4.06466043
			Promedio - 2SD	3.90605351
			CV	3.75555007
			Varianza	0.02515615

**Robustez - CO<sub>2</sub>**

Referencia: Test N° 5942

<b>N° Ensayo</b>	<b>(%Co2)</b>	<b>Título</b>	<b>Título</b>	<b>log10</b>
1	2.5	1.43 x 10 <sup>4</sup>	14300	4.15533604
2	5	2.46 x 10 <sup>4</sup>	24600	4.39093511
3	7.5	4.18 x 10 <sup>4</sup>	41800	4.62117628
			Promedio	4.38914914
			SD	0.23292526
			Promedio + 1SD	4.6220744
			Promedio + 2SD	4.85499966
			Promedio - 1SD	4.15622388
			Promedio - 2SD	3.92329863
			CV	5.30684308
			Varianza	0.05425418

**Robustez - Temperatura**

Referencia: Test N° 6288

<b>N° Ensayo</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Título</b>	<b>Título</b>	<b>log10</b>
1	34	2.5 x 10 <sup>4</sup>	25000	4.39794001
2	36	1.8 x 10 <sup>4</sup>	18000	4.25527251
3	38	1.5 x 10 <sup>4</sup>	15000	4.17609126
			Promedio	4.27643459
			SD	0.11242817
			Promedio + 1SD	4.38886276
			Promedio + 2SD	4.50129092
			Promedio - 1SD	4.16400643
			Promedio - 2SD	4.05157826
			CV	2.62901636
			Varianza	0.01264009

## **Anexo III**

Resultados crudos del ensayo de validación de Identidad

**Linealidad**

Referencia: Test N° 6289

N° Ensayo	N° Test	Lotes	Lote Antisuero	PC (1:500)	PC1 (1:1000)	PC2 (1:2000)
1	7044	VR # 6	3c	7.25	33.5	82.5
2	7044	VR # 6	4	37	76.75	119.25
3	7108	VR # 6	3c	4	36	44.75
4	7108	VR # 6	4	14	34	54.25
5	7114	VR # 6	3c	7.25	68.75	98.25
6	7114	VR # 6	4	28	61.25	105
7	6613	VR # 5	3 C	5.5	25	52.5
8	6574	VR # 5	3 C	1.5	9	24.75
9	5880	VR # 5	3 C	9.25	34.5	62.25
10	4930	VR # 5	3 C	5.5	35.25	65.75
11	4085	VR # 5	3 C	11	44	103.75
12	3716	VR # 5	3 C	6	26	70.75
Promedio				11	40	74
SD				10.5676706	19.4758980	28.4486096

### Precisión intermedia

Nº Ensayo	Nº Test	Lotes	Lote Antisuero	Título(1:1000)	LOG 10 (título)
1	7044	VR # 6	3c	1071	3.029789471
2	7044	VR # 6	4	524	2.719331287
3	7108	VR # 6	3c	1414	3.150449409
5	7114	VR # 6	3c	957	2.980911938
6	7114	VR # 6	4	809	2.907948522
7	6613	VR # 5	3 C	933	2.969881644
8	6574	VR # 5	3 C	1318	3.11991541
9	5880	VR # 5	3 C	1188	3.074816441
10	4930	VR # 5	3 C	870.9	2.939968291
11	4085	VR # 5	3 C	831.76	2.919998031
12	3716	VR # 5	3 C	1156	3.062957834
13	2839	VR # 4	pool01-02	1191	3.075911761
14	2530	VR # 4	pool02-02	1172	3.068927612
15	2465	VR # 3 (5-92)	pool02-02	877	2.942999593
16	1730	VR # 5	pool01-02	966	2.984977126
17	1364	VR (5-92)	pool01-02	1166	3.06669855
18	611	VR (5-92)	pool01-02	1336	3.125806458
19	7184	VR # 6	3c	1412	3.149834697
20	7184	VR # 6	4	501	2.699837726
21	7161	VR # 6	4	501	2.699837726
22	7172	VR # 6	4	524	2.719331287
Promedio					2.971910991
SD					0.14918159
Promedio + 1SD					3.121092581
Promedio + 2 SD					3.27027417
Promedio -1SD					2.822729402
Promedio - 2SD					2.673547812
CV					5.019719297
Varianza					0.022255147

## **Anexo IV**

Resultados crudos del ensayo de validación de Humedad Residual

**Precisión**

Fecha: 16/10/2014

<b>Nº Ensayo</b>	<b>Humedad residual (%)</b>	<b>Analista</b>
1	15.76	CD
2	15.65	CD
3	15.49	CD
4	15.95	CD
5	15.51	CD
6	15.7	CD
7	16.65	CD
8	15.89	CD
9	16.32	CD
10	15.56	CD
11	15.69	CD
12	15.8	CD
Promedio	15.83083333	
SD	0.343258671	
Promedio+SD	16.174092	
Promedio+2D	16.51735068	
Promedio-SD	15.48757466	
Promedio-2SD	15.14	
CV	2.17	
Varianza	0.117826515	

**Exactitud**

Fecha: 16/10/2014

Nº Ensayo	Humedad residual (%)	Analista
1	15.76	CD
2	15.65	CD
3	15.49	CD
4	15.95	CD
5	15.51	CD
6	15.7	CD
7	16.65	CD
8	15.89	CD
9	16.32	CD
Promedio	15.88	
SD	0.384089833	
Promedio+SD	16.26408983	
Promedio+2D	16.64817967	
Promedio-SD	15.49591017	
Promedio-2SD	15.11	
CV	2.42	
Varianza	0.147525	

**Aplicación t-Student. Software EPIDAT Programa para análisis epidemiológico de datos tabulados. Versión 3.1.**

[ 1] Inferencia sobre una media

|

```

                Media:          15,880
Desviación estándar:      0,384
  Tamaño de muestra:         9
  Valor a contrastar:      15,700
  Nivel de confianza:      95,0%

```

```

                Media          IC (95,0%)
-----
                15,880      15,585      16,175

```

```

Prueba para una media
  Estadístico t          gl      Valor p
-----
                1,4063          8      0,1973

```

### Precisión Intermedia

Fecha	Lote	Humedad residual (%)
06/12/2013	26A	2.1
25/10/2013	25A	2.56
20/09/2013	24A	2.81
07/12/2012	23A	2.34
02/11/2012	22A	2.31
28/09/2012	21A	2.4
16/08/2012	20A	2.36
24/05/2012	19A	1.83
	Promedio	2.3
	SD	0.29
	Promedio+SD	2.629534039
	Promedio+2D	2.920318077
	Promedio-SD	2.047965961
	Promedio-2SD	1.757181923
	CV	12.433
	Varianza	0.084555357

### Precisión Intermedia con PP – Influencia de la temperatura

Fecha	Nº Ensayo	Temperatura	Humedad residual (%)
26/08/2014	1	22.2	15.83
26/08/2014	2	22.2	16.84
26/08/2014	3	22.2	16.24
28/08/2014	1	22.1	15.74
28/08/2014	2	22.1	15.51
28/08/2014	3	22.1	15.91
04/09/2014	1	23.1	16.54
04/09/2014	2	23.1	16.87
04/09/2014	3	23.1	16.36
04/09/2014	6	23.1	16.49
04/09/2014	7	23.1	15.76
04/09/2014	8	23.1	16.27
10/09/2014	6	22.5	16.03
10/09/2014	7	22.5	15.59
10/09/2014	8	22.5	15.8
29/09/2014	1	23	15.47
29/09/2014	2	23	15.26
29/09/2014	3	23	14.96
29/09/2014	6	23	16.02
29/09/2014	7	23	16.01
29/09/2014	8	23	15.17
	Promedio		15.93666667
	SD		0.518693872
	Promedio+SD		16.45536054
	Promedio+2D		16.97405441
	Promedio-SD		15.41797279
	Promedio-2SD		14.90
	CV		3.25
	Varianza		0.269043333

**Precisión Intermedia con PP – Influencia de la humedad relativa**

<b>Fecha</b>	<b>Nº Ensayo</b>	<b>Humedad relativa ambiente %</b>	<b>Humedad residual (%)</b>
26/08/2014	1	38.5	15.83
26/08/2014	2	38.5	16.84
26/08/2014	3	38.5	16.24
28/08/2014	1	39.2	15.74
28/08/2014	2	39.2	15.51
28/08/2014	3	39.2	15.91
04/09/2014	1	58.9	16.54
04/09/2014	2	58.9	16.87
04/09/2014	3	58.9	16.36
04/09/2014	6	59.7	16.49
04/09/2014	7	59.7	15.76
04/09/2014	8	59.7	16.27
10/09/2014	6	35.6	16.03
10/09/2014	7	35.6	15.59
10/09/2014	8	35.6	15.8
29/09/2014	1	57	15.47
29/09/2014	2	57	15.26
29/09/2014	3	57	14.96
29/09/2014	6	57.1	16.02
29/09/2014	7	57.1	16.01
29/09/2014	8	57.1	15.17
	Promedio		15.93666667
	SD		0.518693872
	Promedio+SD		16.45536054
	Promedio+2D		16.97405441
	Promedio-SD		15.41797279
	Promedio-2SD		14.90
	CV		3.25
	Varianza		0.269043333

## **Anexo V**

Resultados crudos del ensayo de validación de  
Osmolalidad

## Precisión

Nº Ensayo	Fecha	Patrón 100 mOsm/kg	Patrón 1500 mOsm/kg	Analista
1	22/10/2014	100	1507	NM
2	22/10/2014	100	1499	NM
3	22/10/2014	101	1508	NM
4	22/10/2014	101	1499	NM
5	22/10/2014	102	1500	NM
6	22/10/2014	98	1468	NM
7	22/10/2014	99	1495	NM
8	22/10/2014	100	1476	NM
9	22/10/2014	102	1485	NM
10	22/10/2014	100	1472	NM
	Promedio	100.3	1482.667	
	SD	1.252	14.6093577	
	Promedio+SD	101.551666	1497.27602	
	Promedio+2D	102.803331	1511.88538	
	Promedio-SD	99.0483344	1468.05731	
	Promedio-2SD	97.796669	1453.45	
	CV	1.24792179	0.98534337	
	Varianza	1.56666667	213.433333	

## Exactitud

Nº Ensayo	Fecha	Patrón 100 mOsm/kg	Patrón 1500 mOsm/kg	Analista
1	22/10/2014	100	1507	NM
2	22/10/2014	100	1499	NM
3	22/10/2014	101	1508	NM
4	22/10/2014	101	1499	NM
5	22/10/2014	102	1500	NM
6	22/10/2014	98	1468	NM
7	22/10/2014	99	1495	NM
8	22/10/2014	100	1476	NM
9	22/10/2014	102	1485	NM
10	22/10/2014	100	1472	NM
	Promedio	100.3	1482.66667	
	SD	1.25166556	14.6093577	
	Promedio+SD	101.551666	1505.50936	
	Promedio+2D	102.803331	1520.11872	
	Promedio-SD	99.0483344	1476.29064	
	Promedio-2SD	97.7966689	1461.68128	
	CV	1.24792179	0.979902	
	Varianza	1.56666667	213.433333	

**Aplicación t-Student. Software EPIDAT Programa para análisis epidemiológico de datos tabulados. Versión 3.1.**

[ 1] Inferencia sobre una media

```

Media:          100,300
Desviación estándar:  1,252
Tamaño de muestra:    10
Valor a contrastar:  100,000
Nivel de confianza:  95,0%
    
```

```

Media          IC (95,0%)
-----
100,300       99,404      101,196

Prueba para una media
Estadístico t          gl      Valor p
-----
0,7577                9      0,4680
    
```

[ 1] Inferencia sobre una media

Media: 1482,000  
 Desviación estándar: 14,610  
 Tamaño de muestra: 10  
 Valor a contrastar: 1500,000  
 Nivel de confianza: 95,0%

Media	IC (95,0%)	
----- 1482,000	----- 1471,549	----- 1492,451

Prueba para una media	gl	Valor p
----- Estadístico t ----- -3,8960	----- 9	----- 0,0036

### Precisión intermedia

Fecha	N° Ensayo	Lote	Osmolalidad (mOsm/kg)
06/12/2013	1	26A	275
25/10/2013	2	25A	278
20/09/2013	3	24A	284
07/12/2012	4	23A	278
02/11/2012	5	22A	293
28/09/2012	6	21A	280
16/08/2012	7	20A	290
24/05/2012	8	19A	275
28/10/2011	9	18A	279
23/09/2011	10	17A	280
08/07/2011	11	16A	279
27/05/2011	12	15A	275
28/09/2010	13	13A	284
13/08/2010	14	12A	277
08/10/2004	15	10A	284
08/07/2004	16	9A	276
04/09/2003	17	8A	269
22/07/2003	18	7A	291
		Promedio	280
		SD	6.28
		Promedio+SD	286
		Promedio+2D	292
		Promedio-SD	274
		Promedio-2SD	268
		CV	2.24
		Varianza	39.4

## **Anexo VI**

Resultados crudos del ensayo de verificación de la  
determinación de pH

## Precisión

Fecha	N° ensayo	Buffer pH:7
26/11/2014	1	7.02
26/11/2014	2	7.038
26/11/2014	3	7.043
26/11/2014	4	7.039
26/11/2014	5	6.988
26/11/2014	6	7.022
26/11/2014	7	7.022
26/11/2014	8	7.034
26/11/2014	9	7.057
26/11/2014	10	7.034
	Promedio	7.0297
	SD	0.01845746
	Promedio+SD	7.0482
	Promedio+2SD	7.06661492
	Promedio-SD	7.0112
	Promedio-2SD	6.99278508
	CV	0.26256396
	Varianza	0.00034068

## Exactitud

Fecha	N° ensayo	Buffer pH:7
26/11/2014	1	7.02
26/11/2014	2	7.038
26/11/2014	3	7.043
26/11/2014	4	7.039
26/11/2014	5	6.988
26/11/2014	6	7.022
26/11/2014	7	7.022
26/11/2014	8	7.034
26/11/2014	9	7.057
26/11/2014	10	7.034
	Promedio	7.0297
	SD	0.01845746
	Promedio+SD	7.0482
	Promedio+2SD	7.06661492
	Promedio-SD	7.0112
	Promedio-2SD	6.99278508
	CV	0.26256396
	Varianza	0.00034068

## Aplicación t-Student. Software EPIDAT Programa para análisis epidemiológico de datos tabulados. Versión 3.1.

### [ 2 ] Inferencia sobre una media

```

Media: 7,000
Desviación estándar: 0,018
Tamaño de muestra: 10
Valor a contrastar: 7,000
Nivel de confianza: 95,0%

```

```

Media          IC (95,0%)
-----
7,000          6,987      7,013

```

```

Prueba para una media
Estadístico t          gl      Valor p
-----
0,0000                 9      1,0000

```

### Precisión intermedia

Fecha	N° Ensayo	Lote	pH
06/12/2013	1	26A	7
25/10/2013	2	25A	6.8
20/09/2013	3	24A	6.8
07/12/2012	4	23A	7
02/11/2012	5	22A	6.9
28/09/2012	6	21A	6.9
16/08/2012	7	20A	6.9
24/05/2012	8	19A	6.9
28/10/2011	9	18A	6.9
23/09/2011	10	17A	6.8
08/07/2011	11	16A	6.9
27/05/2011	12	15A	6.9
28/09/2010	13	13A	6.9
13/08/2010	14	12A	6.9
08/10/2004	15	10A	6.98
08/07/2004	16	9A	7.02
04/09/2003	17	8A	7.16
22/07/2003	18	7A	6.95
		Promedio	7
		SD	0
		Promedio+SD	7.0107
		Promedio+2SD	7.098719687
		Promedio-SD	6.8348
		Promedio-2SD	6.746835868
		CV	1.270746478
		Varianza	0.007738889

## **BIOGRAFÍA JULIETA CHALE**

Nací y me críe en Pergamino, provincia de Buenos Aires, hasta que comencé mis estudios universitarios. Soy Bioquímica, egresada de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires en el año 2007.

En el año 2005 ingresé a trabajar como pasante en la industria privada, Johnson & Johnson de Argentina, en la Gerencia de Control y Aseguramiento de Calidad. Durante ese período fui aprendiendo distintas tareas y actividades que se llevan a cabo en laboratorios de control de calidad, como así también a trabajar en equipo.

Durante el transcurso de siete años fui pasando por distintos puestos y culminé mi formación en dicha industria como Jefe de control de Calidad con 12 personas a cargo.

En el año 2012 decido volver a radicarme en Pergamino y me presento a concurso por una Beca Científico Tecnológica, dentro del marco del Plan de Mejoramiento Institucional (PMI) otorgada por el MINCyT, siendo beneficiada con dicha beca. Desde ese momento, y hasta la actualidad, desempeño tareas en el área de Control y Aseguramiento de Calidad del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui" dependiente de la Administración Nacional de laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán", para el proyecto general "Gestión de la Calidad".

En el mismo año comencé la Maestría en Calidad Industrial en la Universidad Nacional de San Martín (UNSAM).

En el año 2014 obtuve el título intermedio correspondiente a la maestría: "Especialista en Calidad Industrial" emitido por la UNSAM.