

ANEXO

VACUNA BCG LIOFILIZADA

Vaccinum BCG cryodesiccatum

DEFINICIÓN

La Vacuna BCG Liofilizada es una preparación de bacterias vivas liofilizadas, de virulencia atenuada que provienen de un cultivo del bacilo de Calmette y Guérin (*Mycobacterium bovis* BCG), de inocuidad y eficacia reconocidas, la cual ha demostrado su capacidad para proteger al hombre contra la infección tuberculosa.

PRODUCCIÓN

Consideraciones generales

La vacuna se debe preparar a partir de un sistema de lote semilla. Se prepara a partir de cultivos derivados de la semilla maestra con el menor número de subcultivos posibles y en ningún caso debe superar a ocho subcultivos. En el curso de estos subcultivos, la preparación solo puede ser liofilizada una vez. Se debe demostrar que el método de producción produce la vacuna BCG en forma consistente y que la misma induce una adecuada sensibilidad para la tuberculina en el hombre, es segura y tiene una potencia protectora aceptable en animales.

La vacuna BCG liofilizada debe ser producida por un equipo de personas saludables que no trabajen con otros agentes infecciosos, en particular no deben trabajar con cepas virulentas de *Mycobacterium tuberculosis* ni estar expuestas a un riesgo conocido de infección tuberculosa. El personal deberá ser controlado periódicamente para tuberculosis. La vacuna BCG liofilizada es sensible a la luz solar; tanto los cultivos como las vacunas se deben proteger de la luz solar directa y de la luz ultravioleta en todas las etapas de producción, control y almacenamiento.

La cepa utilizada para establecer el lote semilla maestro se debe seleccionar y mantener de manera que estén preservadas sus características, su capacidad de sensibilizar al hombre a la tuberculina, y ausencia relativa de patogenicidad para el hombre y para los animales de laboratorio.

Se debe preparar un lote de vacuna, a partir del primer lote semilla de trabajo que se reserva para ser utilizado como vacuna de comparación. Cuando se establece un nuevo lote semilla de trabajo, se debe realizar un ensayo de reactividad dérmica en cobayos, sobre un lote de vacuna obtenido del nuevo lote semilla de trabajo; la vacuna debe demostrar que no es significativamente diferente en actividad a la vacuna de comparación

El lote semilla de trabajo debe cumplir con los ensayos de identificación, esterilidad excepto por la presencia de micobacterias y Micobacterias virulentas, se examina según se indica en el ensayo descrito para el lote final utilizando diez cobayos.

Cultivo

Las bacterias se deben cultivar en un medio apropiado, durante no más de 21 días, por cultivo en superficie o en profundidad. Antes del llenado, se evalúa la viabilidad de la vacuna determinada mediante el recuento de unidades formadoras de colonias y la esterilidad

Vacuna final a granel se puede agregar un estabilizador. Si el estabilizador interfiere con la determinación de la concentración bacteriana en el granel, la determinación de esta concentración debe ser realizada antes de la adición del mismo.

Debe cumplir el ensayo de esterilidad excepto por la presencia de micobacterias.

Se deberá determinar el número de unidades viables por mL y la concentración bacteriana.

VACUNA FINAL

Cuando los envases llenos y cerrados, se conserven a una temperatura igual o menor de -20 °C, la fecha de caducidad no debe ser mayor de 4 años a partir de la fecha de cosecha.

Solamente se puede utilizar un lote final que satisfaga el recuento de unidades viables y cada uno de los requisitos especificados en *Ensayos*.

Si el ensayo de micobacterias virulentas, se ha realizado en la vacuna final a granel y resulta satisfactorio, se puede omitir su realización en el lote final.

El ensayo de *Reactividad dérmica excesiva* se puede omitir en el lote final si se ha realizado sobre el lote semilla de trabajo y sobre cinco lotes finales consecutivos derivados de dicho lote semilla con resultado satisfactorio.

Si en lugar del recuento de viables se utiliza la bioluminiscencia o cualquier otro método bioquímico, el método usado debe estar validado contra el método de recuento de viables para cada etapa del proceso en la que se utilice.

PRODUCTO FINAL

IDENTIFICACIÓN

Realizar la identificación de la vacuna BCG liofilizada mediante observación microscópica, por tinción de los bacilos, mediante microscopía de frotis de Ziehl-Nielsen, para demostrar su propiedad de resistencia al ácido y por el aspecto característico de las colonias en cultivos en medio sólido Lowenstein-Jensen, las colonias son rugosas, no pigmentadas.

Alternativamente se pueden utilizar técnicas validadas de biología molecular.

ENSAYOS FISICO-QUIMICOS

pH (**Métodos generales**) Determinar luego de la reconstitución de la vacuna con el diluyente apropiado. Los límites deben de estar de acuerdo con el registro histórico del producto.

Determinación de agua (**Métodos generales**) Titulación volumétrica directa. No más de 3,0 % p/p.

ENSAYOS BIOLÓGICOS Y MICROBIOLÓGICOS

Micobacterias virulentas

Inyectar una cantidad de vacuna equivalente a no menos de 50 dosis humanas por vía subcutánea o intramuscular, a seis cobayos de 250 a 400 g de peso que no hayan recibido ningún tratamiento que pudiera interferir con el ensayo. Observar los animales durante no menos de 42 días. Después de este tiempo, sacrificar los animales e investigar por autopsia signos de infección tuberculosa, ignorando cualquier reacción leve que pueda aparecer en el punto de la inoculación. Los animales que mueren durante el período de observación también deben ser examinados para signos de tuberculosis. La vacuna cumple con el ensayo si ninguno de los cobayos presenta signos de tuberculosis y si no muere más de un animal durante el período de observación. Si dos animales mueren durante este período y la autopsia no revela ningún signo de tuberculosis, repetir el ensayo en seis cobayos nuevos. La vacuna cumple con el ensayo si no muere más de un animal del segundo grupo durante los 42 días siguientes a la inyección y la autopsia no revela signos de tuberculosis.

Reactividad dérmica excesiva

Utilizar seis cobayos sanos blancos, de no menos de 250 g de peso cada uno y que no hayan recibido ningún tratamiento que pueda interferir en el ensayo. Inyectar, por vía intradérmica, 0,1 mL de la vacuna reconstituida y de sucesivas diluciones seriadas (1 en 10) de la vacuna en ensayo e idénticas dosis de la vacuna de referencia interna. Observar las lesiones formadas en los puntos de inyección durante cuatro semanas. La vacuna cumple con el ensayo si la reacción que produce no es marcadamente diferente de la obtenida con la vacuna de referencia interna.

Esterilidad (Métodos generales).

Debe cumplir con el ensayo, excepto por la presencia de micobacterias.

VALORACIÓN

Determinar el número de unidades viables en la vacuna reconstituida, por recuento de colonias en medio sólido.

Para determinar el número de unidades formadoras de colonias (ufc): Reconstituir cinco viales de vacuna con el diluyente recomendado, reconstituir suavemente para evitar la formación de espuma.

Transferir el contenido a un tubo de ensayo, homogeneizar y realizar diluciones de modo de obtener un recuento de 40 -100 ufc. Inocular en el medio Lowenstein-Jensen, utilizando cinco tubos para cada una de las diluciones más concentradas y 10 tubos para las más diluidas. Sellar los tubos e incubarlos en posición vertical a una temperatura de 37°C, durante 4 semanas. Determinar en paralelo el número de unidades viables contenido en la vacuna de referencia.

El criterio de aceptación debe estar de acuerdo con el registro histórico del producto, el límite máximo no debe ser superior a cuatro veces al límite inferior.

Si se utiliza bioluminiscencia el mismo debe estar validado contra el método de recuento de viables.

TERMOESTABILIDAD

Mantener muestras de vacuna liofilizada a 37 °C durante cuatro semanas. Determinar el número de unidades viables en la vacuna sometida a calor y en la no tratada por calor, según se indica en *Valoración*. El número de unidades viables contenido en la vacuna después del calentamiento no debe ser menor de 20 % del contenido en la vacuna no calentada.

ACONDICIONAMIENTO Y ALMACENAMIENTO

De acuerdo con la normativa vigente por la Autoridad Regulatoria Nacional.

ROTULADO

De acuerdo a la normativa vigente por la Autoridad Regulatoria Nacional.