



Sanofi Pasteur
Vacuna antigripal tetravalente (virión fraccionado, inactivado)

Sección 2.3.5.4
Control del principio activo

Tabla 7: Resultados de la prueba de liberación de QIV, lotes de principio activo de la cepa A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1) elaborados con el lote de WSL FA356399

Prueba	Referencia del método	Criterio de aceptación	Número de lote				
			FA491832	FA491837	FA516286	FA521583	FA528519
Contenido de antígeno hemaglutinina (HA)	Ph. Eur., 2.7.1, edición actual*	Para formulación†	279 µg/mL (273-287)	296 µg/mL (287-305)	232 µg/mL (215-251)	231 µg/mL (218-246)	235 µg/mL (213-259)
Identificación de la HA	Ph. Eur., 0158, edición actual	Positiva	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Identificación de la neuraminidasa (NA)‡	Método interno basado en la Ph. Eur., 2.6.21, edición actual	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	NR§	NP
Actividad enzimática de la NA‡	Método interno	Presencia de actividad de la neuraminidasa	Presencia de actividad de la neuraminidasa	Presencia de actividad de la neuraminidasa	Presencia de actividad de la neuraminidasa	NP	NP
Esterilidad bacteriana y fúngica	Ph. Eur., 2.6.1, edición actual	Sin multiplicación microbiana	Sin multiplicación microbiana	Sin multiplicación microbiana	Sin multiplicación microbiana	Sin multiplicación microbiana	Sin multiplicación microbiana
Virus infecciosos residuales	Ph. Eur., 0158, edición actual	Ausencia de virus infecciosos residuales	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Contenido de octoxinol 9	Método interno	≤800 µg/mL	612 µg/mL	573 µg/mL	566 µg/mL	568 µg/mL	616 µg/mL

* La prueba de contenido de antígeno HA se realiza mediante el método clásico de SRID para las cepas A y B.

† Vea la sección 3.2.S.4.5 Justificación de las especificaciones

‡ Realizada con los tres primeros lotes de principio activo elaborados a partir de un nuevo WSL.

§ NR: No realizada

RA_0928143

Información confidencial/proprietaria
Página 16 de 20

ROXANA MONTEALONE
DIRECTORA TÉCNICA
ASISTENTE
SANOFI PASTEUR S.A.



Sanofi Pasteur
Vacuna antigripal tetravalente (virión fraccionado, inactivado)

Sección 2.3.S.4
Control del principio activo

Tabla 8: Resultados de la prueba de liberación de QIV, lotes de principio activo de la cepa A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2) elaborados con el lote de WSL FA492096

Prueba	Referencia del método	Criterio de aceptación	Lote				
			FA493954	FA495333	FA513975	FA513976	FA523944
Contenido de antígeno HA	Ph. Eur. 2.7.1, edición actual*	Para formulación†	209 µg/mL (204-214)	214 µg/mL (210-218)	213 µg/mL (202-225)	213 µg/mL (206-220)	206 µg/mL (190-225)
Identificación de HA	Ph. Eur., 0158, edición actual	Positiva	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Identificación de la NA‡	Método interno basado en la Ph. Eur., 2.6.21, edición actual	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	NR§
Actividad enzimática de la NA‡	Método interno	Presencia de actividad de la neuraminidasa	Presencia de actividad de la neuraminidasa	Presencia de actividad de la neuraminidasa	Presencia de actividad de la neuraminidasa	Presencia de actividad de la neuraminidasa	NP
Esterilidad bacteriana y fúngica	Ph. Eur., 2.6.1, edición actual	Sin multiplicación microbiana	Sin multiplicación microbiana	Sin multiplicación microbiana	Sin multiplicación microbiana	Sin multiplicación microbiana	Sin multiplicación microbiana
Virus infecciosos residuales	Ph. Eur., 0158, edición actual	Ausencia de virus infecciosos residuales	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Contenido de octoxinol 9	Método interno	≤800 µg/mL	624 µg/mL	633 µg/mL	624 µg/mL	621 µg/mL	625 µg/mL

* La prueba de contenido de antígeno HA se realiza mediante el método clásico de SRID para las cepas A y B.

† Vea la sección 3.2.S.4.5 Justificación de las especificaciones

‡ Realizada con los tres primeros lotes de principio activo elaborados a partir de un nuevo WSL.

§ NR: No realizada

RA_0928143

Información confidencial/propietaria
Página 17 de 20

ROXANA GONZALEZ
DIRECTORA TECNICA
SANOFI PASTEUR S. A.



Sanofi Pasteur
Vacuna antigripal tetravalente (virión fraccionado, inactivado)

Sección 2.3.S.4
Control del principio activo

Tabla 9: Resultados de la prueba de liberación de QIV, lotes de principio activo de la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) elaborado con el lote de WSL FA413887

Prueba	Referencia del método	Criterio de aceptación	Lote				
			FA495974	FA495977	FA518526	FA518527	FA518528
Contenido de antígeno HA	Ph. Eur. 2.7.1, edición actual*	Para formulación†	212 µg/mL (207-218)	216 µg/mL (212-221)	234 µg/mL (220-250)	221 µg/mL (209-233)	188 µg/mL (178-198)
Identificación de HA	Ph. Eur., 0158, edición actual	Positiva	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Identificación de la NA‡	Método interno basado en la Ph. Eur., 2.6.21, edición actual	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	NR§	NP
Actividad enzimática de la NA‡	Método interno	Presencia de actividad de la neuraminidasa	Presencia de actividad de la neuraminidasa	Presencia de actividad de la neuraminidasa	Presencia de actividad de la neuraminidasa	NP	NP
Esterilidad bacteriana y fúngica	Ph. Eur., 2.6.1, edición actual	Sin multiplicación microbiana	Sin multiplicación microbiana	Sin multiplicación microbiana	Sin multiplicación microbiana	Sin multiplicación microbiana	Sin multiplicación microbiana
Virus infecciosos residuales	Ph. Eur., 0158, edición actual	Ausencia de virus infecciosos residuales	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Contenido de octoxinol 9	Método interno	≤800 µg/mL	615 µg/mL	536 µg/mL	571 µg/mL	619 µg/mL	638 µg/mL

- * La prueba de contenido de antígeno HA se realiza mediante el método clásico de SRID para las cepas A y B.
- † Vea la sección 3.2.S.4.5 Justificación de las especificaciones
- ‡ Realizada con los tres primeros lotes de principio activo elaborados a partir de un nuevo WSL.
- § NR: No realizada

RA_0928143

Información confidencial/propietaria
Página 18 de 20

FRANCISCA DE VILLALBA
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.



Sanofi Pasteur
Vacuna antigripal tetravalente (virión fraccionado, inactivado)

Sección 2.3.S.4
Control del principio activo

Tabla 10: Resultados de la prueba de liberación de QIV, lotes de principio activo de la cepa B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata) elaborado con el lote de WSL FA490508

Prueba	Referencia del método	Criterio de aceptación	Lote				
			FA492930	FA492931	FA525566	FA525567	FA525570
Contenido de antígeno HA	Ph. Eur. 2.7.1, edición actual*	Para formulación†	167 µg/mL (163-171)	169 µg/mL (163-175)	188 µg/mL (175-202)	186 µg/mL (174-199)	186 µg/mL (166-209)
Identificación de HA	Ph. Eur., 0158, edición actual	Positiva	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Identificación de la NA‡	Método interno basado en la Ph. Eur., 2.6.21, edición actual	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	NR§
Actividad enzimática de la NA†	Método interno	Presencia de actividad de la neuraminidasa	Presencia de actividad de la neuraminidasa	Presencia de actividad de la neuraminidasa	Presencia de actividad de la neuraminidasa	Presencia de actividad de la neuraminidasa	NP
Esterilidad bacteriana y fúngica	Ph. Eur., 2.6.1, edición actual	Sin multiplicación microbiana	Sin multiplicación microbiana	Sin multiplicación microbiana	Sin multiplicación microbiana	Sin multiplicación microbiana	Sin multiplicación microbiana
Virus infecciosos residuales	Ph. Eur., 0158, edición actual	Ausencia de virus infecciosos residuales	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Contenido de octoxinol 9	Método interno	≤800 µg/mL	564 µg/mL	575 µg/mL	619 µg/mL	613 µg/mL	608 µg/mL

* La prueba de contenido de antígeno HA se realiza mediante el método clásico de SRID para las cepas A y B.

† Vea la sección 3.2.S.4.5 Justificación de las especificaciones

‡ Realizada con los tres primeros lotes de principio activo elaborados a partir de un nuevo WSL.

§ NR: No realizada


RA_0928143

Información confidencial/propietaria
Página 19 de 20

ROYANA VON FRIEDLONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOPI PASTEUR S.A.



Todas las pruebas de lotes de principio activo de las cepas A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1), A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2), B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) y B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata) cumplen las especificaciones.


ROXANA MONREAL
DIRECTORA TÉCNICA
SANOVI PASTEUR S.A.



Sección 2.3.S.5 Estándares o materiales de referencia

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

Los estándares o materiales de referencia utilizados para las pruebas realizadas en la etapa de principio activo (DS) se presentan en la Tabla 1

Tabla 1: Estándares o materiales de referencia

Prueba	Estándares o materiales de referencia
Identificación de la hemaglutinina (HA)	<p>En la prueba cualitativa, implementada para la identificación del antígeno HA en el principio activo, se utilizan antígenos de referencia.</p> <p>Los antígenos de referencia, que provienen de cepas prototipo de referencia o del antígeno de referencia utilizado para el método de inmunodifusión radial simple (SRID), son suministrados por los Centros Colaboradores de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Los antígenos de referencia se cualifican frente a su antisuero correspondiente, según los procedimientos internos vigentes.</p> <p>Los reactivos de antígenos se almacenan a una temperatura ≤ -60 °C (antígenos de referencia que provienen de cepas prototipo de referencia) o al menos a una temperatura ≤ -20 °C (antígeno de referencia utilizado para el método de SRID)</p>
Contenido de antígeno HA	<p>Para la determinación del contenido de antígeno HA por inmunodifusión radial simple (SRID) se utilizan antígenos de referencia y sus antisueros.</p> <p>Los antígenos de referencia son suministrados por los Centros Colaboradores de la OMS, con sus títulos y condiciones de uso.</p> <p>Los reactivos de antígenos se almacenan a una temperatura ≤ -20 °C.</p> <p>Los reactivos (antígeno de referencia/antisuero) se cualifican en los casos siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none">• Cambio de reactivo debido a un cambio de cepa;• Cambio del lote de siembra de trabajo (WSL), en caso de que las condiciones de uso de los reactivos no puedan aplicarse más al principio activo obtenido a partir de este nuevo WSL.• Cambio de lote de reactivo. <p>El parámetro que se evalúa para la cualificación de los reactivos es la precisión intermedia.</p>
Contenido de octoxinol 9	<p>El estándar de referencia utilizado para el análisis de octoxinol 9 lo suministra un proveedor externo.</p> <p>El estándar de referencia se almacena a temperatura ambiente.</p> <p>Cuando se utiliza un nuevo lote de estándar de referencia de octoxinol 9, la referencia se cualifica de conformidad con los procedimientos internos vigentes.</p>

Vea la sección 3.2.S.5 Estándares o materiales de referencia para obtener información detallada sobre los estándares de referencia, incluyendo ejemplos de certificados de análisis, y una discusión de la preparación de los futuros estándares de referencia.



Sección 3.2.S.3.2 Impurezas

Índice

Lista de tablas	2
Lista de figuras	3
1 Introducción	4
2 Impurezas analizadas en el principio activo	4
2.1 Descripción y resultados de los lotes	4
2.2 Discusión.....	6
2.2.1 Impureza relacionada con el producto (ovoalbúmina)	6
2.2.2 Impurezas relacionadas con el proceso	6
2.2.2.1 Octoxinol 9.....	6
2.2.2.2 Formaldehído	7
3 Otras impurezas	7
3.1 Sulfato de neomicina.....	7
3.2 Hidrocortisona.....	8



Lista de tablas

Tabla 1: Descripción de las impurezas.....4

Tabla 2: Contenido de impurezas de la cepa A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1), lotes de DS obtenidos del lote de WSL n.º FA3563995

Tabla 3: Contenido de impurezas en la cepa A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2), lotes de DS obtenidos del lote de WSL n.º FA4920965

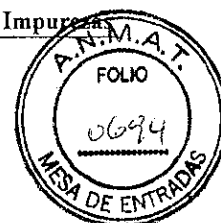
Tabla 4: Contenido de impurezas de la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria), lotes de DS obtenidos del lote de WSL n.º FA4138875

Tabla 5: Contenido de impurezas de la cepa B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata), lotes de DS obtenidos del lote de WSL n.º FA4905085



Lista de figuras

Figura 1: Octoxinol 9.....	6
Figura 2: Formaldehído	7
Figura 3: Sulfato de neomicina.....	8
Figura 4: Hidrocortisona.....	8



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

1 Introducción

Se realizan análisis de rutina de tres impurezas en la vacuna antigripal tetravalente (QIV), a saber:

- Ovoalbúmina (impureza relacionada con el producto) en la etapa de producto final a granel (PFAG).
- Octoxinol 9 (impureza relacionada con el proceso) en las etapas de principio activo (DS) y de PFAG.
- Formaldehído (impureza relacionada con el proceso) en las etapas de DS y de PFAG.

Además, el tampón del inóculo utilizado en la etapa 3 del proceso de elaboración (vea la sección 3.2.S.2.2 Multiplicación y cosecha viral) contiene sulfato de neomicina y opcionalmente hidrocortisona, los cuales se eliminan durante las etapas de producción posteriores. Las validaciones de la eliminación correspondientes se presentan en la sección 3.2.S.2.5 Validación y/o evaluación del proceso.

En la Tabla 1 se presenta una descripción de las impurezas analizadas en cada lote de DS y PFAG.

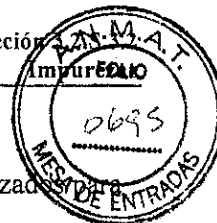
Tabla 1: Descripción de las impurezas

Impureza	Tipo de impureza	Fuente	Método analítico	Etapas de control	Límite
Ovoalbúmina	Glucopéptido (impureza relacionada con el producto).	Líquido alantoideo; cosecha viral.	ELISA	PFAG	≤100 ng/mL
Octoxinol 9	Detergente no iónico (impureza relacionada con el proceso).	Agente fraccionador; fraccionamiento del virus.	HPLC de fase inversa	DS	≤800 µg/mL
				PFAG	≤445 µg/mL
Formaldehído residual	Aldehído (impureza relacionada con el proceso).	Agente inactivante.	Método colorimétrico de Nash	DS	≤85 µg/mL
				PFAG	≤60 µg/mL

Para la etapa de DS, los niveles de impurezas se presentan a continuación. Para la etapa de PFAG, los niveles de impurezas se presentan en la sección 3.2.P.5.5. Caracterización de impurezas.

2 Impurezas analizadas en el principio activo

2.1 Descripción y resultados de los lotes



La Tabla 2, la Tabla 3, la Tabla 4 y la Tabla 5 presentan los niveles de impurezas analizadas en los lotes de DS de QIV.

Los lotes presentados son los primeros tres lotes consecutivos elaborados a partir del lote de siembra de trabajo (WSL) y los lotes que ingresan en la formulación de los lotes de producto final a granel utilizado para los estudios de validación de 400 L, los estudios no clínicos y el estudio clínico (GQM11).

Tabla 2: Contenido de impurezas de la cepa A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1), lotes de DS obtenidos del lote de WSL n.º FA356399

Impureza	Criterios de aceptación	Lote FA491832	Lote FA491837	Lote FA516286	Lote FA521583	Lote FA528519
Octoxinol 9 (µg/mL)	≤800 µg/mL	612	573	566	668	616
Formaldehído residual (µg/mL)	≤85 µg/mL	78	77	78	81	75

Tabla 3: Contenido de impurezas en la cepa A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2), lotes de DS obtenidos del lote de WSL n.º FA492096

Impureza	Criterios de aceptación	Lote FA493954	Lote FA495333	Lote FA513976	Lote FA523944
Octoxinol 9 (µg/mL)	≤800 µg/ml/mL	624	633	621	625
Formaldehído residual (µg/mL)	≤85 µg/mL	68	69	79	76

Tabla 4: Contenido de impurezas de la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria), lotes de DS obtenidos del lote de WSL n.º FA413887

Impureza	Criterios de aceptación	Lote FA495974	Lote FA495977	Lote FA518526	Lote FA518527	Lote FA518528
Octoxinol 9 (µg/mL)	≤800 µg/ml/mL	615	536	571	619	638
Formaldehído residual (µg/mL)	≤85 µg/mL	34	34	39	40	40

Tabla 5: Contenido de impurezas de la cepa B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata), lotes de DS obtenidos del lote de WSL n.º FA490508

Impureza	Criterios de aceptación	Lote FA492930	Lote FA525566	Lote FA525567	Lote FA525570
Octoxinol 9 (µg/mL)	≤800 µg/ml/mL	564	619	615	608
Formaldehído residual (µg/mL)	≤85 µg/mL	36	39	41	40



2.2 Discusión

2.2.1 Impureza relacionada con el producto (ovoalbúmina)

La cepa viral se multiplica en huevos de gallina embrionados. La ovoalbúmina (una glucoproteína con un peso molecular de unos 45 kDa) es una proteína abundante en el líquido alantoideo de los huevos.

La eliminación de la ovoalbúmina hasta cantidades muy bajas se evalúa mediante la validación del proceso, tal como se describe en la sección 3.2.S.2.5 Validación y/o evaluación del proceso. Además, el contenido de ovoalbúmina se analiza en el PFAG tal como se describe en la sección 3.2.P.5.2 Procedimientos analíticos con un límite de aceptación que se justifica en la sección 3.2.P.5.6 Justificación de las especificaciones. Los resultados del contenido de ovoalbúmina en el PFAG se presentan en la sección 3.2.P.5.5. Caracterización de impurezas.

2.2.2 Impurezas relacionadas con el proceso

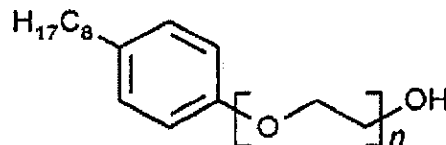
Durante el procesamiento de la cosecha cruda de líquido alantoideo para obtener el DS, se añaden dos agentes de procesamiento:

- Octoxinol 9, un agente tensoactivo utilizado para fragmentar la envoltura viral (fraccionamiento, etapa 16).
- Formaldehído, un aldehído usado para la inactivación viral (etapa 19).

2.2.2.1 Octoxinol 9

El octoxinol 9 (vea la Figura 1) está formado principalmente por éteres monoocilfenílicos de polietilenglicoles y corresponde a la fórmula general: $C_8H_{17}C_6H_4(OCH_2CH_2)_nOH$ (en la que el valor promedio de n es aproximadamente 9). Se añade después de la purificación de la cosecha de líquido alantoideo concentrado y clarificado, y la mayor parte se elimina en una etapa de diafiltración posterior.

Figura 1: Octoxinol 9



La concentración residual de octoxinol 9 se analiza como prueba de liberación de lotes en el DS y como una prueba de control durante el proceso (IPC) en el PFAG por HPLC de fase inversa, tal como se describe en la sección 3.2.S.4.2 Procedimientos analíticos (para el DS) y en la sección 3.2.P.3.3 Descripción del proceso de elaboración y controles del proceso (para el PFAG).



El control de los productos químicos utilizados para la fragmentación del virus es un requisito de la farmacopea (monografía n.º 0158 de la Ph. Eur., edición actual).

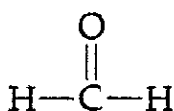
Como se muestra en la Tabla 2, en la Tabla 3, en la Tabla 4 y en la Tabla 5, el contenido de octoxinol 9 del DS se controla de manera continua por debajo del límite de aceptación. El límite de aceptación se justifica en la sección 3.2.S.4.5 Justificación de las especificaciones.

Para el PFAG, los resultados de concentración del octoxinol 9 residual se presentan en la sección 3.2.P.5.5. Caracterización de las impurezas y el límite de aceptación se justifica en la sección 3.2.P.2.3 Desarrollo del proceso de elaboración.

2.2.2.2 Formaldehído

Se añade formaldehído (vea la Figura 2), un agente inactivante, a la suspensión viral después del paso de fraccionamiento.

Figura 2: Formaldehído



La concentración residual de formaldehído se analiza como un IPC en el DS y como prueba de liberación de lotes en el PFAG por espectrofotometría ($\lambda = 410$ nm, aproximadamente) luego de la transformación química en un compuesto de color amarillo (vea la sección 3.2.P.5.2 Procedimientos analíticos para obtener una descripción del método analítico).

Como se muestra en la Tabla 2, en la Tabla 3, en la Tabla 4 y en la Tabla 5, el contenido de formaldehído del DS se controla de manera continua por debajo del límite de aceptación. El límite de aceptación se justifica en la sección 3.2.S.2.6 Desarrollo del proceso de elaboración.

Para el PFAG, los resultados del contenido de formaldehído se presentan en la sección 3.2.P.5.5. Caracterización de impurezas y el límite de aceptación que se justifica en la sección 3.2.P.5.6 Justificación de las especificaciones.

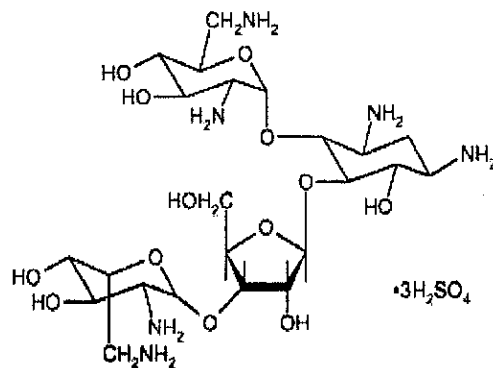
3 Otras impurezas

3.1 Sulfato de neomicina

El sulfato de neomicina (vea la Figura 3) es un antibiótico aminoglucósido de amplio espectro utilizado en la preparación de la solución tampón con inóculo. La eliminación del sulfato de neomicina se analizó mediante un método microbiológico durante las distintas etapas del proceso de elaboración. Los resultados presentados en la sección 3.2.S.2.5 Validación y/o evaluación del proceso demuestran que este compuesto se elimina durante el proceso de elaboración.



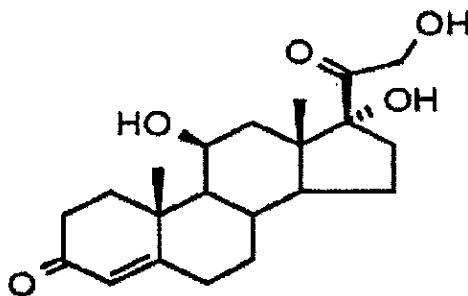
Figura 3: Sulfato de neomicina



3.2 Hidrocortisona

La hidrocortisona (vea la Figura 4) es un corticoide natural sintetizado a partir de esteroides (aceites destilados que se encuentran en las plantas) y se usa en la preparación de la solución tampón con inóculo. La eliminación de la hidrocortisona se analizó mediante el método LC-MS/MS durante las distintas etapas del proceso de elaboración. Los resultados que se presentan en la sección 3.2.S.2.5 Validación y/o evaluación del proceso demuestran que este compuesto se elimina durante el proceso de elaboración.

Figura 4: Hidrocortisona





Sección 3.2.S.4.1 Especificaciones

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

Las especificaciones de liberación del principio activo (DS) de la vacuna antigripal tetravalente se presentan en la Tabla 1.

Esta tabla incluye para cada prueba:

- el nombre de la prueba;
- el método asociado utilizado;
- referencias oficiales (farmacopea u otras) a los procedimientos analíticos, si corresponde;
- el criterio de aceptación correspondiente aplicado para la liberación del producto.

Tabla 1: Especificaciones para el DS

Prueba	Método	Referencia regulatoria	Criterio de aceptación
Contenido de antígeno hemaglutinina (HA)	Inmunodifusión radial simple (SRID) (método clásico para las cepas A y B)	Ph. Eur. 2.7.1, edición actual.	Para formulación*
Identificación del antígeno HA	Inhibición de la hemaglutinación	Ph. Eur. 0158, edición actual	Positiva
Identificación del antígeno neuraminidasa (NA)†	Trascripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	Método interno basado en la Ph. Eur. 2.6.21, edición actual.	Positiva
Actividad enzimática de la NA †	Método enzimático	Método interno	Presencia de actividad de la neuraminidasa
Esterilidad bacteriana y fúngica	Filtración por membrana	Ph. Eur. 2.6.1, edición actual.	Ausencia de crecimiento microbiano
Virus infecciosos residuales	Inoculación de huevos	Ph. Eur. 0158, edición actual	Ausencia de virus infecciosos residuales
Contenido de octoxinol 9	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase inversa	Método interno	≤800 µg/mL

* Vea la sección 3.2.S.4.5 Justificación de las especificaciones

† Realizada en los tres primeros lotes de DS elaborados a partir de cualquier nuevo lote de siembra de trabajo.

Las especificaciones que se utilizarán para controlar el DS en los estudios de estabilidad iniciales y en curso se presentan en la sección 3.2.S.7.2 Protocolo de estabilidad posterior a la aprobación y compromiso de estabilidad.



Sección 3.2.S.4.2 Procedimientos analíticos

Índice

Lista de tablas	3
1 Introducción.....	4
2 Métodos analíticos descritos en la Farmacopea Europea.....	4
3 Métodos analíticos no descritos o no detallados en la Farmacopea Europea	4
3.1 Contenido de antígeno hemaglutinina	4
3.1.1 Referencias	4
3.1.2 Principio.....	4
3.1.3 Equipo.....	5
3.1.4 Reactivos	5
3.1.5 Procedimiento operativo.....	5
3.1.6 Lectura, cálculo, resultados	6
3.1.7 Criterios de validez.....	6
3.2 Identificación del antígeno HA	7
3.2.1 Referencias	7
3.2.2 Principio.....	7
3.2.3 Equipo.....	7
3.2.4 Reactivos	7
3.2.5 Procedimiento operativo.....	8
3.2.6 Criterios de validez.....	9
3.2.7 Criterios de aceptación	9
3.3 Identificación del antígeno neuraminidasa	9
3.3.1 Referencia.....	9
3.3.2 Principio.....	9
3.3.3 Equipo.....	10
3.3.4 Reactivos	10
3.3.5 Procedimiento operativo.....	10
3.3.5.1 Extracción del ARN viral.....	10
3.3.5.2 Amplificación del gen de la neuraminidasa	10
3.3.5.3 Detección de los productos amplificados.....	11
3.3.6 Criterios de validez.....	11
3.4 Prueba de actividad enzimática de la neuraminidasa.....	11



3.4.1	Principio.....	11
3.4.2	Equipo.....	11
3.4.3	Reactivos	11
3.4.4	Procedimiento operativo.....	12
3.4.5	Lectura, cálculo, resultados	12
3.4.5.1	Presencia de actividad de la neuraminidasa	13
3.4.5.2	Cálculo del título.....	13
3.4.6	Criterios de validez.....	13
3.5	Contenido de octoxinol 9.....	13
3.5.1	Principio.....	13
3.5.2	Equipo.....	13
3.5.3	Reactivos	14
3.5.4	Procedimiento operativo.....	14
3.5.4.1	Condiciones cromatográficas	14
3.5.4.2	Procedimiento analítico.....	14
3.5.5	Lectura, cálculo, resultados	15
3.5.6	Criterios de validez.....	15



Lista de tablas

Tabla 1: Matriz experimental8



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

1 Introducción

En este documento se presentan resúmenes de los procedimientos analíticos no descritos ni detallados en las farmacopeas y utilizados para la liberación del principio activo (DS) de la vacuna antigripal tetravalente (QIV).

2 Métodos analíticos descritos en la Farmacopea Europea

La siguiente prueba se realiza de acuerdo con el método de la farmacopea y no se describe en este documento

- La prueba de esterilidad bacteriana y fúngica se realiza conforme al método n.º 2.6.1, edición actual (método de filtración por membrana) "Esterilidad" de la Ph. Eur., edición actual, y no se describe en esta sección.
- La prueba de virus infecciosos residuales se realiza conforme a la monografía n.º 0158, edición actual, con "Vacuna antigripal (virión fraccionado, inactivada)" de la Ph. Eur., edición actual, y no se describe en esta sección.

3 Métodos analíticos no descritos o no detallados en la Farmacopea Europea

A continuación se presentan los resúmenes de los métodos analíticos para los procedimientos analíticos no descritos ni detallados en las farmacopeas.

3.1 Contenido de antígeno hemaglutinina

3.1.1 Referencias

Monografía n.º 158 "Vacuna antigripal (virión fraccionado, inactivada)" de la Ph. Eur., edición actual.

3.1.2 Principio

La cuantificación del antígeno hemaglutinina (HA) se realiza mediante el método de inmunodifusión radial simple (SRID) de conformidad con el método n.º 2.7.1 "Métodos inmunoquímicos" de la Ph. Eur., edición actual. Dado que la monografía solo constituye una guía general, a continuación se ofrece una descripción más detallada del método analítico.

Tras su tratamiento con un detergente (Zwittergent), se difunden diferentes diluciones de la muestra evaluada y del antígeno de referencia (vea la sección 3.2.S.5 Estándares o materiales de referencia) en un gel de agarosa que contiene un antisuero específico. Se trata de un antisuero



policlonal específicamente dirigido contra el antígeno HA gripal objetivo. Luego de la difusión completa se visualiza el anillo de precipitación de cada dilución de muestra y referencia mediante tinción (azul de Coomassie) y después se miden.

Se determina el contenido de antígeno HA para cada cepa mediante la ecuación de la curva de calibración establecida a partir de la referencia.

3.1.3 Equipo

Equipo habitual de laboratorio de inmunología.

3.1.4 Reactivos

- Antisuero:

Existen antisueros policlonales disponibles para cada cepa (origen: NIBSC (Instituto Nacional de Control y Normas Biológicas), Londres o TGA (Administración de Artículos Terapéuticos), Australia o CBER (Centro para la Evaluación e Investigación de Productos Biológicos)).

- Antígeno de referencia:

Referencias internacionales representativas de cada cepa gripal, suministradas por un centro de referencia de la gripe (NIBSC o TGA o CBER) con sus títulos y condiciones de uso.

Los antígenos de referencia para las cepas A (H1N1, H3N2) y para las cepas B (B/Victoria, B/Yamagata) son soluciones de referencia específicas de cada cepa. El método de SRID que utiliza soluciones de referencia específicas se denomina SRID clásico.

- Agarosa;

- Detergente: solución de Zwittergent (3-14) en agua purificada.

- Reactivo de tinción: azul de Coomassie.

- reactivo para destefir.

- Solución salina tamponada con fosfato (PBS): 1 x C.

3.1.5 Procedimiento operativo

Para cada análisis independiente:

Se prepara un gel mezclando polvo de agarosa y solución PBS. Se agrega al gel una cantidad determinada del antisuero policlonal específico (según las recomendaciones de los proveedores del antisuero y según los análisis de calibración). Luego de la solidificación del gel, se perfora una serie de pocillos circulares.

Cada antígeno de referencia se rehidrata con agua purificada. De ser necesario, se diluye el DS con solución PBS. Las muestras de referencia y de prueba se tratan con Zwittergent durante unos 30 minutos a temperatura ambiente.

Se realizan diluciones en serie adicionales de muestras tratadas y de referencia tratada en PBS. Se añade un volumen de cada dilución a los pocillos. El análisis se realiza por triplicado, empleando tres series independientes de por lo menos 3 diluciones.



Luego de la difusión durante 18 a 22 horas a temperatura ambiente en un recipiente húmedo, las placas se enjuagan, se secan y se tiñen con azul de Coomassie.

3.1.6 Lectura, cálculo, resultados

Luego de la decoloración, se miden dos diámetros perpendiculares de cada anillo de precipitación. Después se calcula la media de todos los diámetros medidos para cada dilución de muestra.

Luego de la evaluación de la validez del análisis (vea el apartado 3.1.7), se determina el contenido de antígeno HA de la muestra de prueba utilizando la curva de calibración. La curva dosis-efecto para el preparado de referencia se calcula con la siguiente ecuación correspondiente a una regresión múltiple:

$$d = a_0 + a_1D + a_2 \log D$$

Donde d: diámetro medio

D: dosis en $\mu\text{g/mL}$

Para el DS, se llevan a cabo dos análisis independientes utilizando diferentes muestras y diferentes geles de agarosa, y se calcula la media ponderada del siguiente modo:

Se comprueba la homogeneidad de los dos análisis válidos independientes realizando una prueba estadística de χ^2 , tal como se describe en el método n.º 5.3 "Análisis estadístico de resultados de ensayos y pruebas biológicas", capítulo 6.2.2 "Homogeneidad de las potencias estimadas", de la Ph. Eur.

- Si los resultados son homogéneos, se calcula la media ponderada de conformidad con el método n.º 5.3, capítulo 6.2.3 "Cálculo de la media ponderada y de los límites de confianza" de la Ph. Eur.
- Si los resultados son heterogéneos: los dos análisis independientes se invalidan y se realizan dos nuevos análisis independientes.

3.1.7 Criterios de validez

Cada prueba independiente se considera válida si se cumplen los siguientes requisitos:

- Los parámetros estadísticos de cada prueba se cumplen para la muestra de referencia (regresión y factor de dispersión).
- Los límites de la muestra de prueba se encuentran dentro de los límites de extrapolación de la curva.
- No hay ningún efecto de dilución.
- Los límites de confianza ($P = 0,95$) no son inferiores al 80 % ni superiores al 125 % del contenido de antígeno HA estimado.
- La revisión del diámetro medio de la dilución de la referencia del antígeno sin diluir se encuentra dentro de los límites de los gráficos de control.
- Se observa un anillo para el antígeno de referencia.



3.2 Identificación del antígeno HA

3.2.1 Referencias

- Monografía n.º 0158, “Vacuna antigripal (virión fraccionado, inactivada)” de la Ph. Eur. (edición actual).
- OMS “Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of Influenza” [manual para el diagnóstico de laboratorio y la vigilancia virológica de la gripe], sección 2.E “Identification of the haemagglutinin subtype of viral isolates by haemagglutination” [identificación del subtipo de hemagglutinina de los aislamientos virales mediante la prueba de inhibición de la hemagglutinación].
- Serie de informes técnicos de la OMS (TRS) n.º 927, 2005, anexo 3, “Recommendations for the Production and Control of Influenza Vaccines (Inactivated)” [recomendaciones para la producción y el control de vacunas antigripales (inactivadas)].

3.2.2 Principio

Se realiza una identificación serológica del subtipo viral comparando la inhibición de la hemagglutinación en muestras de prueba y de referencia (cepas de referencia prototipo) mediante antisueros específicos.

3.2.3 Equipo

Equipo habitual de laboratorio de inmunología.

3.2.4 Reactivos

- Suspensión de eritrocitos de gallina.
- Reactivo de enzima destructora de receptores (RDE).
- Solución salina tamponada con fosfato (PBS) (pH 7,3).
- Tampón de dextrosa/gelatina/veronal (pH 7,3).
- Antisueros, elaborados en hurones:
 - Uno dirigido contra la cepa de referencia que se sospeche que se encuentra en la muestra de prueba (llamado “homólogo” a continuación).
 - Tres dirigidos contra cepas de referencia de otros tres subtipos/linajes incluidos en la producción (llamados “heterólogo 1”, “heterólogo 2” y “heterólogo 3”, a continuación).

Por ejemplo: para la identificación de la cepa B/Yamagata, los antisueros utilizados son los siguientes:

B/linaje Yamagata. = Homólogo

B/linaje Victoria. = Heterólogo 1

A/H3N2 = Heterólogo 2

A/H1N1 = Heterólogo 3

Se eliminan los inhibidores de hemagglutinación no específicos presentes en los antisueros, tratándolos con el reactivo RDE.



- Antígenos de referencia, originados a partir de las cepas de referencia prototipo suministradas por los Centros Colaboradores de la OMS o el antígeno de referencia utilizado para el método SRID, descrito en la sección 3.2.S.5 Estándares o materiales de referencia.

3.2.5 Procedimiento operativo

- **Titulación y estandarización del antígeno**

La prueba de inhibición de la hemaglutinación (IHA) se lleva a cabo utilizando de 4 a 8 unidades de hemaglutinación (UHA). La concentración de antígeno que se necesita se determina antes de la prueba de IHA, realizando una titulación del antígeno HA con muestras analizadas y referencias antigénicas. Una unidad de HA se define como la dilución de antígeno más alta que presenta hemaglutinación completa.

Las soluciones de muestra de prueba y de antígeno de referencia se preparan con diluciones dobles en solución PBS, mezcladas con eritrocitos e incubadas posteriormente a $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ o a temperatura ambiente durante 1 hora aproximadamente, dependiendo de la cepa. Se determina después la dilución del antígeno que se va a utilizar para obtener de 4 a 8 HAU.

- **Reacción de identidad**

Las soluciones de antígeno, estandarizadas a entre 4 y 8 UHA, se mezclan con diluciones dobles en solución PBS de los antisueros tratados, como se muestra en la Tabla 1 y se incuban después durante aproximadamente 1 hora a $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ o a temperatura ambiente, en función de la cepa.

Tabla 1: Matriz experimental

		Antisuero			
		Homólogo (= antiprueba)	Heterólogo 1	Heterólogo 2	Heterólogo 3
Antígenos	Homólogo de referencia Antígeno la misma cepa que la muestra de prueba	X			
	Heterólogo de referencia 1		X		
	Heterólogo de referencia 2			X	
	Heterólogo de referencia 3				X
	Muestra de prueba	X	X	X	X

Nota: Las mezclas preparadas para el experimento se muestran con el símbolo X.

Se incuban controles de antisuero, consistentes cada uno en una mezcla (1/1) de solución PBS y de uno de los antisueros, en las mismas condiciones. En el experimento también se incluye un control de eritrocitos (es decir, una mezcla de 1/3 de eritrocitos y 2/3 de solución PBS).

En paralelo, se verifican los títulos de hemaglutinación (expresados en UHA) de las muestras de prueba y de referencia estandarizadas a entre 4 y 8 UHA, preparando diluciones dobles de cada dilución estandarizada del antígeno, seguidas de incubación durante 1 hora aproximadamente a $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ o a temperatura ambiente, en función de la cepa.



- **Revelado**

Después de incubar los distintos preparados, se añade la suspensión de eritrocitos de gallina a cada pocillo. Se incuban todas las placas durante 1 hora a $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ o a temperatura ambiente, en función de la cepa.

Por último, se leen las placas y se determina el título de inhibición de la hemaglutinación de cada antisuero como la inversa de la última dilución que inhibió la hemaglutinación (visible como un coágulo de sangre extendido en todo el fondo del pocillo e inmóvil al inclinar levemente la placa). El título de hemaglutinación (expresado en UHA) de las soluciones de antígeno estandarizadas se determina como la inversa de la última dilución que causó la hemaglutinación.

3.2.6 Criterios de validez

La prueba se considera válida si se cumplen todos los siguientes requisitos:

- El título de hemaglutinación (expresado en unidades de hemaglutinación UHA) del antígeno de referencia y las soluciones de la muestra analizada se debe hallar entre 4 y 8 UHA.
- El control de eritrocitos y los controles de antisueros muestran sedimentación normal (sin aglutinación);
- Para cada prueba, el título de IHA del antígeno de referencia debe ser el mismo que el título teórico (obtenido durante la validación de los reactivos) con ± 2 diluciones.

3.2.7 Criterios de aceptación

La identidad de la HA es positiva si sucede lo siguiente:

- El título de IHA de la muestra evaluada debe estar entre ± 2 diluciones con el título de IHA del antígeno de referencia.
- La muestra evaluada solo debe reaccionar ligeramente con los sueros heterólogos de referencia (distinto tipo de antígeno) ($\leq 1/40$).

3.3 Identificación del antígeno neuraminidasa

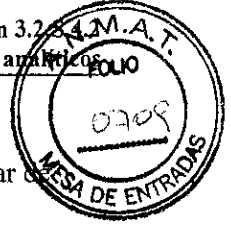
3.3.1 Referencia

Con base en el método n.º 2.6.21 "Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos" de la Ph. Eur., edición actual.

3.3.2 Principio

Las secuencias del ácido ribonucleico (ARN) viral que codifican los antígenos NA se detectan mediante transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en tiempo real^a. Se retrotranscribe el ARN viral, luego se amplifica el ADN complementario (ADNc) y se detecta

^a El método detallado en este capítulo podría adaptarse según las características de la cepa relevante en ese momento.



mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real con un conjunto de par cebadores y una sonda fluorescente.

La intensidad de la fluorescencia correspondiente a la hidrólisis de la sonda se mide en tiempo real durante la fase exponencial, cuando la proporción entre el número de copias de ADN y la intensidad de la fluorescencia puede representarse con una ecuación lineal.

Esta prueba cualitativa permite dar pruebas de la presencia o ausencia de la cepa objetivo.

3.3.3 Equipo

Equipo habitual de laboratorio de microbiología.

3.3.4 Reactivos

Para cada nueva cepa que se desea identificar se diseñan nuevos cebadores oligonucleotídicos y una sonda con doble marca para garantizar la especificidad del método.

3.3.5 Procedimiento operativo

El procedimiento para identificar un gen de una cepa específica consta de tres pasos sucesivos, que se describen a continuación:

- 1) Extracción del ARN viral.
- 2) Amplificación del gen de la NA.
- 3) Detección de los productos amplificados.

Se incluyen tres controles para evaluar la validez del método:

- Un control negativo, consistente en agua sin nucleasas que se ha sometido a todo el procedimiento, incluida la extracción.
- Un control negativo de RT-PCR, consistente en agua sin nucleasas que se ha sometido al procedimiento, excluida la extracción.
- Un control positivo, es decir, una suspensión viral de una cepa que contiene el gen que se desea identificar. La suspensión ha de someterse a todo el procedimiento.

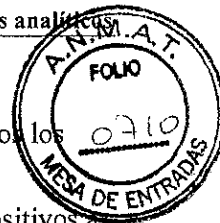
Los tres pasos sucesivos se detallan a continuación:

3.3.5.1 Extracción del ARN viral

Usando un kit de extracción de ARN viral adecuado, los controles negativos y positivos se procesan siguiendo las instrucciones del proveedor del kit.

3.3.5.2 Amplificación del gen de la neuraminidasa

- Primero, se prepara la mezcla de la reacción RT-PCR, la cual contiene una transcriptasa inversa capaz de retrotranscribir el ARN viral y la polimerasa de ADN utilizados para la amplificación del ADNc, junto con los otros componentes necesarios para las reacciones, como pueden ser una solución tampón, un cofactor enzimático, solución de trifosfato de



desoxirribonucleósido, los cebadores oligonucleotídicos y la sonda fluorescente. Todos los componentes se disuelven en agua sin nucleasas.

- Se agrega un volumen exacto de la muestra extraída y de los controles negativos y positivos a la mezcla reactiva de RT-PCR en una placa de PCR y después se mezcla. Simultáneamente, se prepara el control negativo de RT-PCR mezclando la misma cantidad de agua sin nucleasas con la mezcla reactiva de RT-PCR.
- Se coloca la placa de PCR en una máquina de qPCR (q = cuantitativa) con la configuración operativa elegida de conformidad con las instrucciones del proveedor del kit de amplificación de RT-PCR. El ciclo térmico consta de las siguientes fases:
- Transcripción inversa.
- Amplificación (desnaturalización, hibridación, extensión con cebador) repetida un número definido de ciclos.

3.3.5.3 Detección de los productos amplificados

La intensidad de la fluorescencia correspondiente a la hidrólisis de la sonda se mide en tiempo real durante la fase exponencial.

3.3.6 Criterios de validez

La prueba se considera válida si no se detecta ninguna señal en los controles negativos y si se observa una señal positiva en el control positivo para el gen de la NA específico de la cepa que se desea identificar.

3.4 Prueba de actividad enzimática de la neuraminidasa

3.4.1 Principio

La prueba de actividad enzimática de la NA se lleva a cabo como prueba de caracterización con los tres primeros lotes de principio activo elaborados a partir de un nuevo lote de siembra.

La actividad de la NA se evalúa mediante un método enzimático semicuantitativo. En presencia de sustrato de fetuina, la actividad de la NA induce la liberación de ácido N-acetilneuramínico, que se oxida para formar β -formilpiruvato mediante metaperyodato de sodio. Tras la adición de ácido tiobarbitúrico, el β -formilpiruvato se transforma en un compuesto rosado que se extrae después con reactivo de Warren (una mezcla de butanol y ácido clorhídrico). Tras la extracción, se mide por espectrofotometría la cantidad de compuesto rosado. La señal de densidad óptica resultante es directamente proporcional a la actividad de la NA.

3.4.2 Equipo

Equipo habitual de laboratorio de virología.

3.4.3 Reactivos

- Metaperyodato de sodio
- Arsenito de sodio



- Ácido tiobarbitúrico
- Tampón fosfato, pH 5,9
- NaCl al 0,9 %
- Reactivo de Warren (preparado extemporáneamente): butanol + HCl 12N
- Solución de fetuina: 22 mg por mL
- Control positivo interno (IPC) utilizado como control de validez: Lote de siembra maestro (MSL) almacenado a 70 °C.

3.4.4 Procedimiento operativo

La prueba de actividad enzimática de la NA consta de los pasos principales que se describen a continuación:

1.^{er} paso: Contacto de la neuraminidasa con el sustrato fetuina

Para cada cepa (A/H1N1, A/H3N2, B/linaje Victoria, B/linaje Yamagata), se preparan por duplicado un control interno, diluciones dobles de las muestras en NaCl al 0,9 %. Los tubos se agitan entre cada dilución. Para la preparación de fetuina, se mezcla un volumen de fetuina (22 mg/mL) con un volumen de tampón de fosfato, pH = 5,9.

Para la reacción se mezcla un volumen de dilución del producto, un volumen de NaCl al 0,9 % y un volumen de tampón de fosfato con fetuina en un tubo de reacción y se incuban durante 18-19 en una incubadora o al baño María a 37 °C ± 2 °C.

Además, se preparan dos controles de sustrato mezclando un volumen de mezcla de tampón de fosfato con fetuina y dos volúmenes de tampón de fosfato y se incuban después a 37 °C ± 2 °C del modo descrito anteriormente.

2.^o paso: Revelado de la reacción

Para el revelado se utiliza una solución de metaperyodato sódico, que se agrega a cada tubo de reacción. Tras agitar, se deja cada tubo durante 20 minutos a temperatura ambiente y se agrega arsenito de sodio a cada tubo mientras se agita: aparece un tinte marrón que se vuelve amarillo. Una vez que el color de la solución ha pasado del tinte marrón al amarillo, se puede detener la reacción almacenando los tubos a +5 °C ± 3 °C hasta la mañana siguiente. A continuación, se añade ácido tiobarbitúrico a cada tubo de reacción y se agita. Después de incubar durante 15 minutos en un baño María en ebullición, las soluciones se colorean con varios tonos de color rosado.

Se añade reactivo de Warren a cada tubo de reacción, se agita y se centrifuga durante 8 minutos a 2700 rpm. Para que la fase orgánica que contiene cromóforo se mantenga transparente, los distintos tubos se dejan al baño María a 45-60 °C antes de la lectura.

3.4.5 Lectura, cálculo, resultados

La densidad óptica (DO) de cada tubo de reacción y de los controles del sustrato se determina por medición a una longitud de onda de 549 nm.



3.4.5.1 Presencia de actividad de la neuraminidasa

La determinación de la presencia de actividad de la NA se basa en un límite positivo que se fija en una DO de 1,3.

El límite positivo se determina por el método de control del sustrato (promedio + 10 desviación estándar).

3.4.5.2 Cálculo del título

Se calcula la media de los 2 resultados obtenidos para cada dilución de producto y cada control y se determina la DO real para cada dilución de producto del siguiente modo:

$$\text{DO real} = (\text{media de DO para los tubos de reacción}) - (\text{media de DO para los tubos de control del sustrato})$$

La expresión del resultado es la siguiente:

$$(\text{DO real} \times 1000 \times 20 \times \text{dilución del producto}) / (57\ 000) = \text{unidad de NA/mL de muestra}$$

3.4.6 Criterios de validez

- El rango debe mostrar una gradación de color púrpura que puede volverse rojo, rosado y termina siendo de amarillento a blanco. Si la gradación no está presente, la titulación no es válida.
- Los valores de la DO de los controles de los sustratos individuales deben ser inferiores a 0,9.
- Según el lote de IPC, 2 diluciones predefinidas deben presentar una DO promedio $\geq 1,3$ para la primera dilución y $< 1,3$ para la segunda dilución (la DO obtenida para las diluciones predefinidas conforman la DO de umbral positivo).

3.5 Contenido de octoxinol 9

3.5.1 Principio

El contenido de octoxinol 9 en el DS se analiza mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase inversa, y se detecta por espectrofotometría de absorción UV/visible.

3.5.2 Equipo

Equipo analítico estándar (por ej., equipo de HPLC).

