

40 ml, se neutraliza con amoníaco diluido y se filtra a través de un tamiz poroso (G4). El filtrado se lleva a 50 ml con agua.

Se analizan 10 ml de esta solución de acuerdo con Ph.Eur. "Hierro, prueba límite" (Límite: 50 ppm). Se utiliza como estándar 10 ml de una solución de hierro de 1 ppm.

Metales pesados

Analizar 1,666 g de producto de acuerdo con Ph. Eur. "Metales pesados, prueba límite" (Límite: 50 ppm), método C, utilizando 10 ml de una solución estándar de Plomo de 5 ppm.

iii. Prueba funcional

Capacidad de absorción de CTAB

Preparación y lavado de la muestra de resina:

Preparar 3 vasos de precipitación cada uno con la resina y denominarlos I, II y III. Pesar aproximadamente 0,8 g de la resina en ensayo en un vaso de precipitados y registrar el valor exactamente. Añadir un volumen de agua, en ml, equivalente a 10 veces la cantidad de resina pesada expresada en g. Dejar agitando durante 5 minutos, luego eliminar el sobrenadante por aspiración. Repetir la operación de lavado dos veces. Resuspender la resina con un volumen de PBS, en ml, equivalente a 5 veces la cantidad de resina pesada expresada en g. Dejar agitando durante 5 min.

Preparación de la solución para absorción:

Añadir 20 ml de solución de polisorbato 80 0,6% a 100 ml de PBS. Preparar esta solución para cada una de las tres preparaciones de resina.


Preparación de las muestras:

Realizar esta operación para cada una de las tres preparaciones de resina. La muestra de resina se transfiere a un matraz Erlenmeyer de 250 ml usando 120 ml de solución para absorción.


- Preparación de la muestra I: añadir 3,75 ml de la solución de CTAB al 1% y llevar a un volumen final de 150 ml con PBS.
- Preparación de la muestra II: añadir 7,50 ml de la solución de CTAB al 1% y llevar a un volumen final de 150 ml con PBS.
- Preparación de la muestra III: añadir 15,0 ml de la solución de CTAB al 1% y llevar a un volumen final de 150 ml con PBS.

Fase de absorción:

Dejar las muestras I, II y III agitando durante una noche a temperatura ambiente. Recolectar por separado 10 ml de cada sobrenadante, colocar en tres embudos de separación y seguir el "Procedimiento".



Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeroncio
Director Técnico
MN 14840



Novartis Argentina S.A.
Vacunas & Diagnóstico
Farm. Adriana G. Jimenez
Gta. Asesoría Regulatoria
Aprobada



Preparación de la curva estándar:

- Preparación de la solución estándar de 10 µg/ml: pesar exactamente 10 mg de CTAB en un matraz volumétrico y disolver en PBS llevando a un volumen de 1.000 ml.
- Preparación de la solución de 5 µg/ml: añadir 25 ml de una solución estándar de 10 µg/ml a 25 ml de PBS.
- Preparación de la solución de 2,5 µg/ml: añadir 25 ml de la solución estándar de 5 µg/ml a 25 ml de PBS.
- Preparación de la solución de 1 µg/ml: añadir 2,5 ml de la solución estándar de 10 µg/ml a 22,5 ml de PBS.

Pesar 10 ml de cada solución estándar, colocarlas en un embudo de separación y seguir el "Procedimiento".

Preparación del blanco:

Recolectar 10 ml de PBS, colocarlos en un embudo de separación y seguir el "Procedimiento".

Procedimiento

Añadir 1,6 ml de hidróxido de sodio 1N a cada solución, blanco, estándar y muestra. Añadir 4,4 ml de solución de azul de bromofenol y luego 2 ml de cloroformo. Agitar enérgicamente y dejar reposar hasta que se separe la fase orgánica. Transferir esta última a un tubo de ensayo de vidrio adecuado para centrifugación. Centrifugar a 4.000 rpm durante 15 minutos con refrigeración. Leer con un espectrofotómetro llevando a cero con el blanco a una longitud de onda de 542 nm.

Cálculo:

Construir una curva de calibración en la que la absorbancia para cada estándar es proporcional a la concentración expresada en µg/ml de CTAB.

Los µg de CTAB no absorbido/ml se calculan trazando el valor de absorbancia de la muestra en la curva de calibración.

La cantidad de CTAB absorbida se calcula por la diferencia entre la cantidad de CTAB añadida y la cantidad hallada.

El porcentaje de CTAB absorbido debe ser $\geq 90\%$.



Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeroncio
Director Técnico
MN 14840



Novartis Argentina S.A.
Laboratorio de Diagnóstico
Farm. Adriana G. Jironez
Gte. Arg. Regulatorias
Apoderada

2.3.3 Soluciones utilizadas en producción

Tabla 3: Lista de soluciones utilizadas durante la producción

SOLUCIÓN	MÉTODO DE ESTERILIZACIÓN	CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO
Solución de buffer fosfato pH 8,0	filtración esterilizante	5 ± 3 °C
Solución de buffer fosfato pH 7,3	filtración esterilizante	5 ± 3 °C
Solución antibiótica	filtración esterilizante	< -70 °C
Citrato de sodio 1,2 M	filtración esterilizante	TA
Formaldehido 40%	no estéril	TA
Polisorbato 80 (0,6 %)	Autoclave	TA
CTAB 1%	Autoclave	TA
Amberlite	Autoclave	5 ± 3 °C
Solución B	Autoclave	5 ± 3 °C
Sacarosa 20%	filtración esterilizante	TA
Sacarosa 60%	filtración esterilizante	TA
Agua para inyección	filtración esterilizante o autoclave	5 ± 3 °C
Sulfato de bario 12,5%	autoclave	5 ± 3 °C
Citrato de sodio 0,45 M	filtración esterilizante	TA

TA = temperatura ambiente

Los métodos de esterilización son aceptables.

2.3.4 Materias primas y reactivos biológicos utilizados en la producción

2.3.4.1 Lotes de semillas

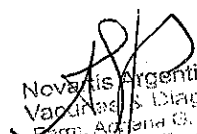
La semilla viral se obtiene del Instituto Nacional de Estándares y Control Biológico (NIBSC), South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire, Reino Unido.

2.3.4.2 Calidad microbiológica de las materias primas y reactivos

Huevos Libres de Patógenos Específicos (SPF)

El estado de SPF de las aves cumple con la Ph. Eur. Los huevos SPF se obtienen de conformidad con la Ph. Eur. (5.2.2) de un proveedor certificado.


Novartis Argentina S.A.
 Dr. Lucio Jeroncio
 Director Técnico
 MN 14840


Novartis Argentina S.A.
 Vaccines & Diagnostic
 Farm. Adriana G. Jimenez
 Gte. Asuntos Regulatorios
 Apoderada

Huevos para Producción

Los huevos para producción proceden de aves sanas certificadas. Los controles aplicados a los huevos para producción por los proveedores y Novartis Vaccines and Diagnostics S.r.l. son aceptables.

- Requerimientos para las bandadas de gallinas

Novartis Vaccines and Diagnostics S.r.l. cuenta con dos proveedores de huevos embrionados en Italia. Los huevos proceden de bandadas de gallinas específicas. Ambos proveedores son auditados regularmente por el personal de Novartis Vaccines and Diagnostics S.r.l. Se realizan tres auditorías de rutina por campaña.

El proveedor debe suministrar toda la documentación relativa a: compra de las gallinas, vacunación, resultados de las autopsias, número diario de las gallinas y número de huevos embrionados producidos.

Las zonas de cría deben estar ubicados en una planta instalación aislada e higiénica en la que se mantengan las normas sanitarias.

Deben realizarse exámenes post mortem en las gallinas que mueren.

No se administrarán antibióticos.

Las intervenciones terapéuticas adicionales deben ser comunicadas previamente a Novartis Vaccines and Diagnostics S.r.l. y documentadas.

Los gallos y las gallinas son sometidos a un programa de vacunación contra enfermedad de Marek, bronquitis infecciosa, difteria-viruela aviar, pseudopeste, síndrome de Caída de la Postura, enfermedad de Gumboro, laringo-traqueítis, encefalomiелitis, y vacunación doble contra Mycoplasma (en casos no certificados como "sin Mycoplasma").

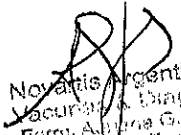
Las gallinas son sometidas a pruebas serológicas mensuales entre septiembre y julio por laboratorios aprobados por el Ministerio Italiano de Salud. Se recolecta el suero de 3 gallinas por cada mil y se analiza para las siguientes enfermedades aviares: virus de pseudopeste aviar (virus de la Enfermedad de Newcastle, NDV), Síndrome de Caída de la Postura (EDS 76), virus de Rinotraqueítis del Pavo, Virus de la Enfermedad de Gumboro (Enfermedad de Bursitis Infecciosa IBD), Virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar (IBV), Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma synoviae, Virus de Anemia del Pollo, Virus Hemaglutinantes (virus de influenza), Fago tipo 4 de Salmonella, Virus de Leucosis Aviar, y Encefalomiелitis.

Además, una gallina por cada mil es sometida a las siguientes pruebas por laboratorios aprobados por el Ministerio de Salud de Italia. Estas pruebas se efectúan primero en gallinas de alrededor de 60 días de vida, después se repiten cada 2 meses durante un mínimo de 4 veces.

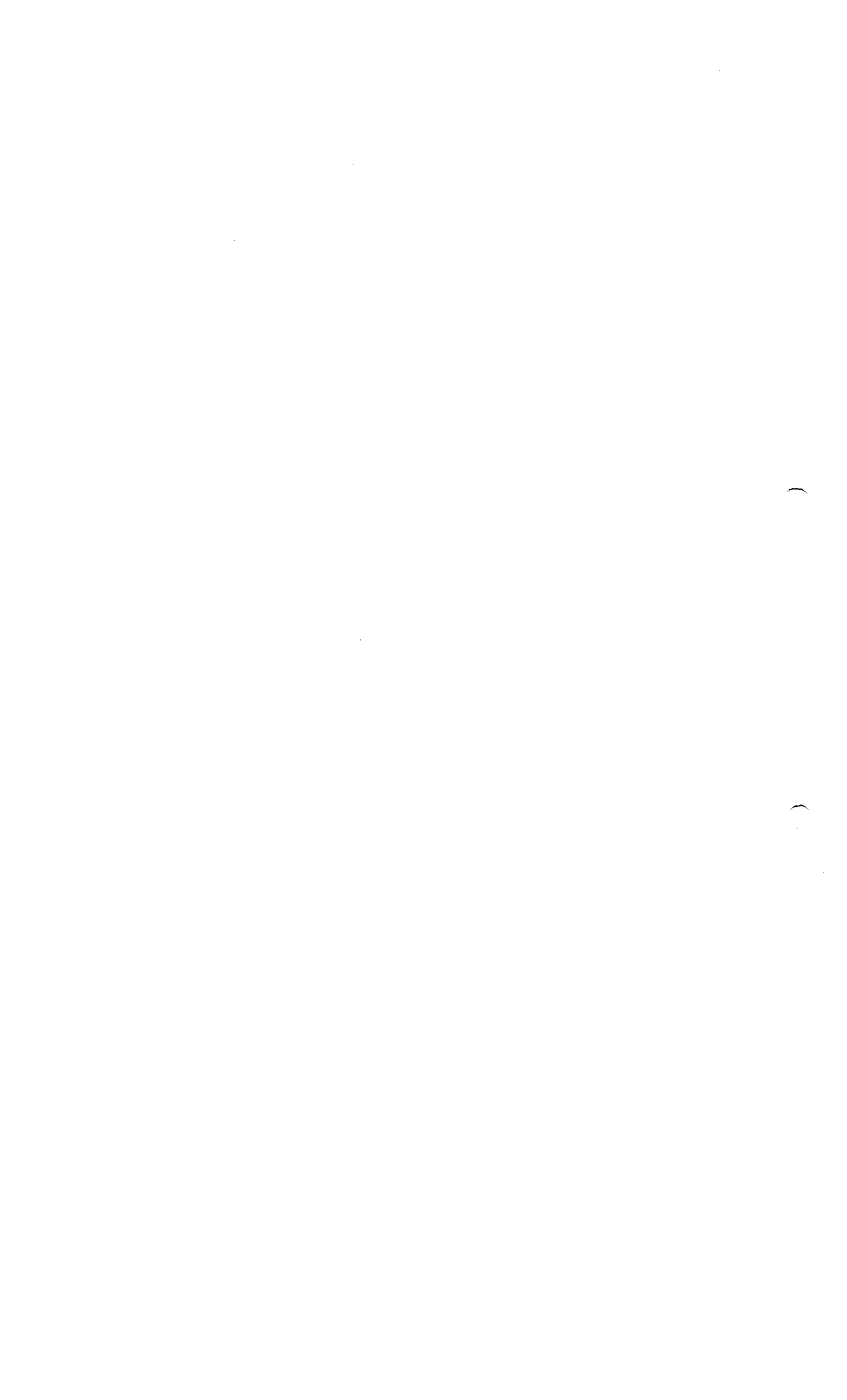
- Examen Clínico y post mortem. (Incluidos anatomía patológica macroscópica e histopatología) de lesiones macroscópicas secundarias a enfermedades infecciosas y/o trastornos metabólicos. Además del examen normal, se deben realizar pruebas para descartar cualquier lesión asociada con virus de la leucosis aviar.



Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeroncio
Director Técnico
MN 14840



Novartis Argentina S.A.
Vacunas y Diagnóstico
Farm. Adriana G. Jimenez
Gte. Asesor Regulatorio
Apoderada



- Examen bacteriológico de diversos tejidos para detección de Salmonella.
- Pruebas de detección de sustancias inhibitorias de antimicrobianos.
- Pruebas de detección de protozoos y huevos de helmintos en intestino.
- Examen virológico (utilizando huevos embrionados) de la tráquea, los pulmones y el cerebro para detectar virus hemaglutinantes (enfermedad de Newcastle y gripe aviar), y de ovarios y oviductos para detectar adenovirus del síndrome de caída de la puesta.
- Examen virológico (utilizando cultivos celulares) de la tráquea y el seno nasal para detectar el virus de la rinotraqueítis del pavo, y del bazo, el hígado y la médula ósea para detectar el virus de la anemia infecciosa aviar.

- **Requisitos para los huevos**

Los huevos sucios o con cáscaras rotas o defectuosas son desechados.

Los huevos se analizan mensualmente para determinar la presencia de especies de Salmonella. Se toman muestras de 3 huevos por cada 1000, tanto del exterior de la cáscara como desde el interior del huevo. El peso de los huevos debe estar entre 55 y 65 gramos.

Se realiza la inspección por observación al trasluz sobre el 100% de los huevos embrionados para eliminar los huevos no fertilizados y con embriones muertos, que pueden estar contaminados, así como los huevos con doble yema, manchas de sangre.

Los huevos se recogen dos veces por día y se desinfectan de inmediato mediante uno de los dos procedimientos detallados a continuación:

1. En el momento de recoger los huevos, éstos son fumigados con formaldehído al 40% y KMnO4 durante 15-20 minutos o

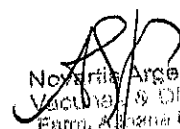
2. Se rocían los huevos con una solución desinfectante compuesta por agua oxigenada al 35%, ácido acético acuoso al 4%, solución de amonio cuaternario al 1% y agua destilada al 60%, en el momento de la recolección. Después, se fumigan los huevos con formaldehído en el lugar o en el camión durante el transporte a la instalación de incubación. Al llegar a la incubadora, los huevos son tratados con Virkon al 1%, un desinfectante viricida.

Si no se incuban los huevos el día de la recolección, se los debe conservar a una temperatura de $16 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y a una humedad relativa de $70 \pm 15\%$ durante no más de 7 días.

Durante la incubación, los huevos son sometidos a los siguientes procedimientos de fumigación:

- Al comienzo de la incubación de los huevos, dentro de las primeras 24 horas en el interior de la incubadora, se fumigan los huevos con formaldehído al 40% y agua, que se evaporan hasta la sequedad.


Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeroncio
Director Técnico
MN 14840


Novartis Argentina S.A.
Vacunas y Diagnóstico
Farm. Roberto G. Gómez
Gta. Ana María Regulatorias
Apoderada



– Al final de la incubación de los huevos, antes de la entrega a Chriron S.r.l., se vuelven a fumigar los huevos con formaldehído y agua, que se evaporan hasta la sequedad.

Los huevos se deben incubar sin interrupción a una temperatura de $37.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa de $55 \pm 10\%$, y se los gira una vez por hora, durante 10-11 días.

Los huevos se transportan en camiones especialmente diseñados con equipo de control de temperatura, que mantienen los huevos a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, y los protegen de choques durante el transporte:


Los huevos se fumigan con formaldehído antes de la entrega a Novartis Vaccines and Diagnostics S.r.l.

Procedimientos realizados por Novartis Vaccines and Diagnostics S.r.l. una vez recibida la producción de huevos:


Por lo menos el 1,5% de los huevos de cada entrega se inspeccionan aleatoriamente mediante observación al trasluz. El número de huevos con los siguientes defectos no debe superar el 3% de cada entrega:

- Cáscaras no formadas perfectamente y limpias
- Huevos de peso por debajo del mínimo recomendado (55 g)
- Huevos sin fertilizar
- Huevos que contienen embriones muertos

Los huevos son desinfectados inmediatamente antes de su entrada a la planta de producción con TEGO 51, una sal de amonio cuaternario.



Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeroncic
Director Técnico
MN 14840



Novartis Argentina S.A.
Vaccines and Diagnostics
Patricia C. Jimenez
Gte. Asunto Regulatorio
Apoderada



2.4 Controles de los pasos críticos e intermedios

Los parámetros de control durante el proceso garantizan la conformidad con Ph.Eur. como se indica en la siguiente tabla

Tabla 4: Parámetros de control durante el proceso y criterios de aceptación

ETAPA DEL PROCESO	PRUEBAS DE CONTROL APLICADAS	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
Huevos SPF	Inspección a trasluz (100%)	
Pasaje en huevos SPF	Título de HA; Infectividad en huevos	Informar resultados
Preparación de Semilla Maestra	Título de HA; Esterilidad	Informar resultados; Estéril
Preparación de Semilla de Trabajo	Identidad de HA y NA; Título de HA; Infectividad; Infectividad en huevos; Esterilidad; Mycoplasmas	Identidad positiva, Informar resultados; $\geq 10^{5,0}$ EID ₅₀ /ml; Informar resultados; Estéril; Estéril
Huevos para Producción	Inspección a trasluz (1,5%)	
Preparación de Inóculo de Semilla	Esterilidad	Estéril
Incubación durante 3 días	Inspección visual en la máquina cosechadora y extracción de huevos no aptos antes de la cosecha	
Cosecha de líquido alantoideo	Título de HA	Informar resultados
Líquido alantoideo clarificado	Título de HA	Informar resultados
Líquido alantoideo después de ultrafiltración	Título de HA; Carga biológica, Endotoxina	Informar resultados
Líquido alantoideo inactivado	Título de HA; Carga biológica; Formaldehído libre; pH	Informar resultados
Fin de la primera fracción	Contenido de sacarosa	47 ± 1%

Fin de la segunda fracción	Contenido de sacarosa	47 ± 1%
Fracción pico	Título de HA; Endotoxina; Carga biológica	Informar resultados; < 1.000.000 UI/ml; Informar resultados
Fracción hombro	Título de HA; Endotoxina; Carga biológica	Informar resultados
Sobrenadante con sulfato de bario	Título de HA	Informar resultados
Fracción hombro clarificada	Título de HA; Endotoxina; Carga biológica	Informar resultados
Mezcla viral pre-diafiltración	Título de HA	Informar resultados
Mezcla viral post-diafiltración	Título de HA; Endotoxina; Carga biológica	Informar resultados
Concentrado de virus completo	Título de HA; SRID (Contenido de HA e identidad); Endotoxina; Carga biológica; Prueba de fraccionamiento; Contenido de proteína HA/Proteína total (cálculo)	Informar resultados; Informar resultados; Identidad positiva; Informar resultados; Informar resultados; Informar resultados; Informar resultados; Informar resultados
Sobrenadante agrupado post-Amberlite	CTAB residual	Informar resultados
Cosecha Monovalente Agrupada pre-filtración	Carga biológica	NMT 1 UFC/ml
Filtración esterilizante	Prueba de integridad; Carga biológica	Pasa; Informar resultados
Cosecha Monovalente Agrupada	pH; Proteína total; Prueba de integridad; Carga biológica	6,9 – 7,7 ≤ 120 µg/60 µg HA; Pasa; Informar resultados

Especificaciones para Semillas Maestra y de Trabajo

Las especificaciones para Semillas Maestra y de Trabajo cumplen con la Ph. Eur. La identidad de hemaglutinina se determina por inhibición de la hemaglutinación. La identidad de neuraminidasa se



determina por ELISA. Estos métodos están validados. La prueba de esterilidad de Ph. Eur. se ha calificado. La prueba de ausencia de micoplasmas de Ph. Eur. es realizada por un laboratorio contratado, Microsafe BV, de conformidad con las GLP. El método de ensayo se controla adecuadamente.

Tabla 5: Especificaciones para la Semilla Maestra

ENSAYO	MÉTODO	ESPECIFICACIÓN
Título de hemaglutinación	Hemaglutinación	Informar resultados
Esterilidad	Ph. Eur.	Cumple

Tabla 6: Especificaciones para la Semilla de Trabajo


ENSAYO	MÉTODO	ESPECIFICACIÓN
Identidad de hemaglutinina	serológico	positiva
Identidad de neuraminidasa	ELISA	positivo
Ausencia de micoplasmas	Ph. Eur.	cumple
Esterilidad	Ph. Eur.	cumple
Infectividad	hemaglutinación, titulación en huevos	$\geq 10^6$ EID ₅₀ /ml

2.5 Validación y evaluación de los procesos

Se realiza rutinariamente una cinética de inactivación de acuerdo con la monografía de Ph. Eur. en tres lotes de producción de cada nueva cepa de influenza introducida como consecuencia de las recomendaciones anuales de la OMS.

No se lleva a cabo ningún reprocesamiento de forma rutinaria. Si se considera necesario el reprocesamiento, este es controlado por el sistema de informe de desviaciones (DR) de la empresa.


Novartis Argentina S.A.
 Dr. Lucio Jeroncio
 Director Técnico
 MN 14840


Novartis Argentina S.A.
 Oficina de Diagnóstico
 Farm. y G. Jimenez
 Gte. Asist. Regulatorios
 Apoderada



3) CONTROL DE CALIDAD-METODOS CONTROL PRINCIPIO ACTIVO

Los métodos de control y las especificaciones para Cosechas Monovalentes Agrupadas (MPH) cumplen con los requerimientos de la Ph. Eur.

3.1 Especificaciones

Tabla 7: Resumen de especificaciones y pruebas de rutina - Características

Cosechas Monovalentes Agrupadas (Especificaciones de liberación)		
Ensayo	Método	Especificación*
Identidad de Hemaglutinina	SRID	positivo
Contenido de Hemaglutinina	SRID	informar resultados
Identidad de Neuraminidasa	ELISA	positivo
Inactivación viral	Ph. Eur.	ausencia de virus vivos
Pureza	SDS-PAGE	cumple
Esterilidad	Ph. Eur.	Cumple ensayo
Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)	espectrofotométrico	$\leq 12 \mu\text{g} / 60 \mu\text{g HA}$
Polisorbato 80	HPTLC	$\leq 300 \mu\text{g} / \text{ml}$
Bario	absorción atómica	$\leq 1 \mu\text{g} / \text{ml}$
Citratos	HPLC	$\leq 1 \text{mg} / 60 \mu\text{g HA}$
Endotoxina	LAL cromogénico cinético	$< 100 \text{IU} / 60 \mu\text{g HA}$
Formaldehído/HA	espectrofotométrico	$\leq 1 \mu\text{g} / 60 \mu\text{g HA}$
Contenido de Ovoalbúmina	ELISA	informar resultados ($\mu\text{g} / 60 \mu\text{g HA}$)

*La prueba para Inactivación viral se realiza en las Cosechas Monovalentes Agrupadas en lugar de en los Lotes Finales. Esto está, no obstante, en conformidad con los requerimientos de Ph. Eur.

Las pruebas para formaldehído y ovoalbúmina aseguran que la Vacuna a Granel Final y el Lote Final cumplan con la monografía de la Ph. Eur. para *Vacuna contra la Influenza (Antígeno de Superficie, Inactivada)*.

Los controles durante el proceso se realizan a lo largo de las diferentes etapas del proceso de producción de la Cosecha Monovalente Agrupada. Se han añadido dos controles adicionales durante el proceso para un mejor seguimiento de la fase de inactivación, es decir, pH y formaldehído libre.


Novartis Argentina S.A.
 Dr. Lucio Jeroncio
 Director Técnico
 MN 14840



Novartis Argentina S.A.
 Vacuna contra la Influenza
 Centro Asesora C. Jimenez
 Gte. Asuntos Regulatorios
 Apoderada

Tabla 8: Pruebas adicionales que se llevan a cabo como controles durante el proceso

Ensayo	Método	Criterios de Aceptación
pH	Ph. Eur.	Informar resultados
Formaldehido libre	Ph. Eur.	Informar resultados

3.2 Procedimientos Analíticos

Los métodos de prueba han sido validados o calificados. Los métodos analíticos utilizados para la liberación de cosechas monovalentes agrupadas son los siguientes:

- SRID (identidad y contenido de hemaglutinina),
- ELISA (identidad de neuraminidasa),
- Inactivación viral según Ph.Eur,
- SDS-PAGE (pureza),
- Esterilidad según Ph. Eur,
- Espectrofotometría (CTAB y contenido de formaldehido),
- HPTLC (contenido de polisorbato 80),
- Absorción atómica (contenido de sulfato de bario),
- HPLC (contenido de citrato de sodio),
- Péptido cromogénico cinético (endotoxina),
- ELISA (ovoalbúmina).

3.2.1 Identidad y contenido de antígeno Hemaglutinina

La prueba es realizada por SRID (Inmunodifusión Radial Simple) con el estándar de antisuero y antígeno suministrado por NIBSC, Londres. Se prepara la agarosa y se añade la cantidad de antisuero sugerida por NIBSC. Junto con la mezcla se preparan las placas de vidrio. Después de enfriar, se cortan pocillos en la superficie de la agarosa. Se preparan diluciones del estándar de antígeno y diluciones de las muestras y se distribuyen alícuotas en cada pocillo. Las placas se incuban, lavan, secan y finalmente se tiñen con Azul Coomassie. La comparación de los diámetros de los anillos de difusión obtenidos para la muestra y para el estándar permite la determinación del contenido de HA en la muestra.

3.2.2 Identidad del antígeno Neuraminidasa

El ensayo se basa en la eliminación enzimática del residuo terminal de ácido siálico de la fetuína, que cubre los pocillos de placas de microtitulación, por la neuraminidasa presente en la muestra, y en el reconocimiento de los residuos de galactosa libres mediante aglutinina de maní conjugada con peroxidasa. La cantidad de aglutinina unida depende directamente de la concentración de neuraminidasa presente en la muestra. El ensayo se compone de dos etapas: (1) titulación directa de la actividad de la neuraminidasa (0,5 del título de NA), donde se determina el título enzimático; la



muestra se diluye a continuación para usar en la etapa siguiente, (2) inhibición específica de la actividad de neuraminidasa (50% del título de NI), mediante la pre-incubación de la muestra con diferentes diluciones de antisuero específico para la cepa a fin de permitir el cálculo del 50% del título de inhibición de cada uno de los tres serotipos de neuroaminidasa utilizando antisueros homólogos y heterólogos.

3.2.3 Inactivación viral

Según Ph. Eur.

3.2.4 Pureza

La pureza es determinada por electroforesis en gel de poliacrilamida - dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), con un gel de poliacrilamida aproximadamente al 10% a pH 8,9, en condiciones reductoras.

3.2.5 Esterilidad

Según Ph. Eur.

3.2.6 Esterilidad

El bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) se extrae a una fase orgánica. El material extraído se cuantifica mediante un espectrofotómetro a 542 nm. Las muestras se comparan con una curva estándar a partir de la cual se calcula la concentración en la muestra.

3.2.7 Polisorbato 80

Este método consiste en la concentración de la muestra por secado al vacío y posterior extracción del polisorbato 80 con metanol. La muestra se siembra en una placa de cromatografía en capa fina, se desarrolla y visualiza con solución de Dragendorff.

3.2.8 Bario

Este método se basa en la cuantificación de bario por espectrofotometría de absorción atómica. Los átomos de bario se obtienen por atomización de muestras en un horno de grafito. Los átomos de bario absorben en forma proporcional a su concentración a 553 nm (es decir, la radiación monocromática emitida por una lámpara de cátodo de bario). Si la concentración de la muestra informada por el espectrofotómetro es inferior a la concentración del estándar, la concentración de bario en la muestra se expresa como menos de 1 ppm (ensayo límite).

3.2.9 Citrato

El citrato se separa de los otros componentes de la muestra mediante un intercambiador iónico o una columna de HPLC y se detecta por UV a 210 nm. El contenido de la muestra se determina mediante comparación con una curva estándar.

3.2.10 Endotoxina

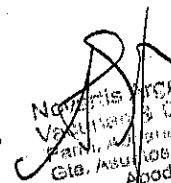
Se realiza el método de LAL cromogénico de acuerdo con la Ph. Eur.

3.2.11 Formaldehido

La concentración de formaldehido se determina por espectrofotometría después de la reacción con acetilacetona. El principio del ensayo es el mismo que el descrito en la Ph. Eur.

3.2.12 Ovoalbúmina


Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jerónimo
Director Técnico
MN 14840


Novartis Argentina S.A.
Vaccinas & Diagnóstico
para Dr. Jerónimo
Gte. ASUBOS Regulatorias
Apoderada



La ovoalbúmina se determina mediante un inmunoensayo enzimático directo (ELISA). Este utiliza anticuerpos policlonales anti-ovoalbúmina inmovilizados y un conjugado anti-ovoalbúmina-HPR como sistema de detección.

3.2.13 pH

De acuerdo con la Ph. Eur.

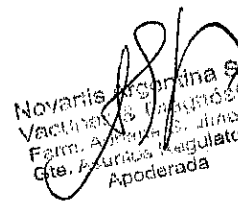
3.2.14 Proteínas totales

Este control se lleva a cabo después de la diálisis a través de una membrana con un peso molecular de corte de 10.000 que permite la eliminación de moléculas de bajo peso molecular. El método se basa en la transformación de nitrógeno en sulfato de amonio a través de la mineralización con ácido sulfúrico concentrado y posterior destilación del amoniaco en un medio alcalino (método Kjeldahl). El método de Kjeldahl se describe en la Ph. Eur.; el método utilizado sigue básicamente la Ph. Eur. con las modificaciones siguientes:

- a) el producto se dializa antes del análisis;
- b) la solución de digestión (mineralización), contiene los mismos reactivos utilizados en la Ph. Eur. pero en diferentes proporciones, y se prepara utilizando un procedimiento diferente;
- c) el amoniaco desarrollado por destilación es adsorbido en H_2SO_4/KIO_3 en lugar de en HCl;
- d) la titulación final se realiza utilizando un método yodométrico en lugar de un método ácido/base.



Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeronico
Director Técnico
MN 14840



Novartis Argentina S.A.
Vacthax & Vacthax
Farm. Amara S. Jimenez
Gte. Recursos Regulatorios
Apoderada



4) VALIDACIÓN PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

Validación de procedimientos analíticos

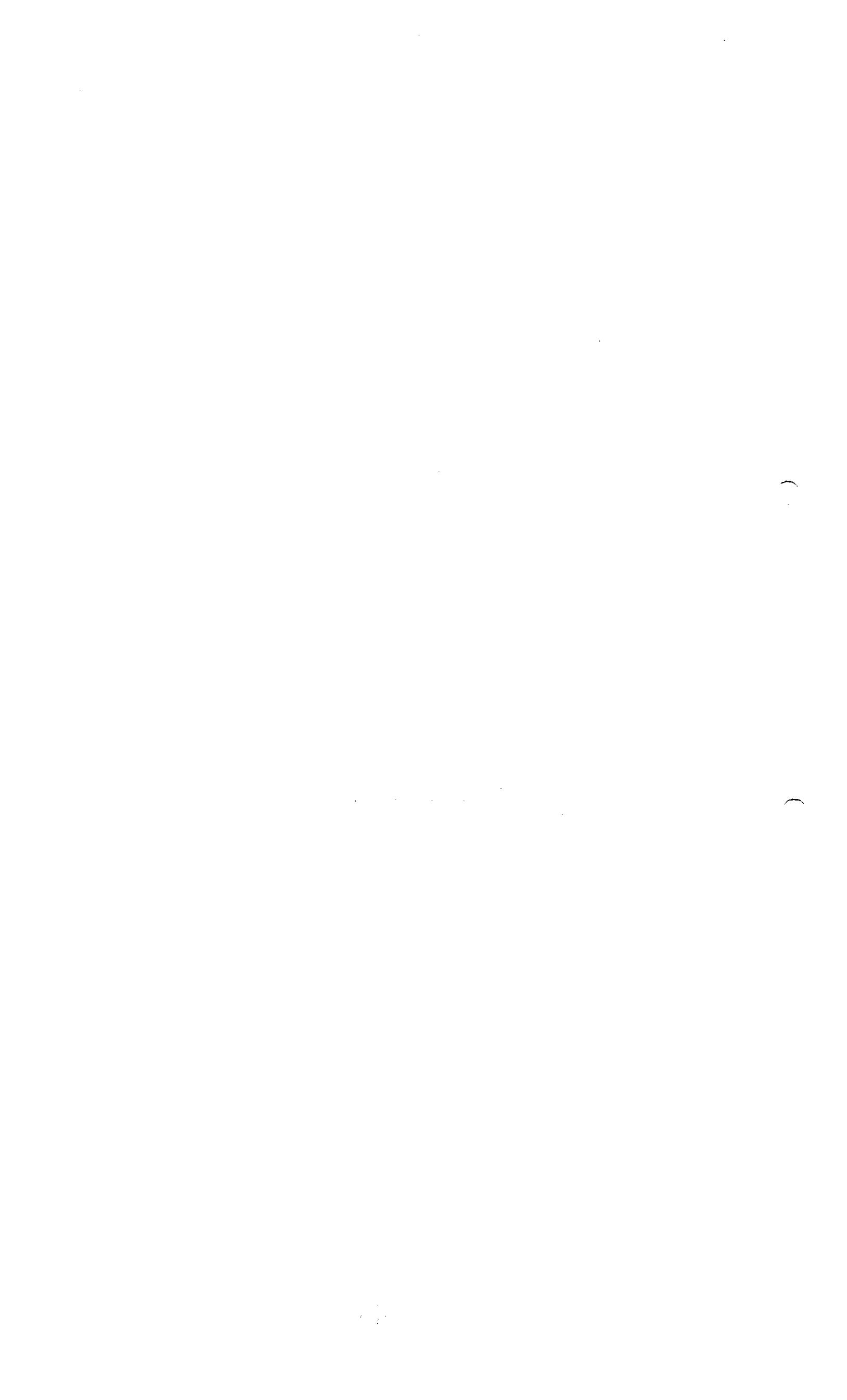
El método de identidad de neuraminidasa por ELISA utilizado para la Semilla de Trabajo ha sido validado y se calificó la prueba de esterilidad. La prueba de micoplasma es realizada por MicroSafe B.V. según los requerimientos de la Ph. Eur.

Se han realizado estudios específicos de validación en los métodos utilizados para la liberación y el monitoreo de la producción de las cosechas monovalentes agrupadas. Los ensayos críticos como endotoxina, esterilidad y SRID han sido recalificados o revalidados para el proceso sin tiomersal.

MÉTODOS DE PRUEBA DE LIBERACIÓN PARA COSECHAS MONOVALENSTES AGRUPADAS		
Parámetro de prueba	Método	Estado
Identidad y contenido de Hemaglutinina	SRID	Validado
Identidad de Neuraminidasa	ELISA	Validado
Inactivación viral	Ph. Eur.	Calificado
Pureza	SDS-PAGE	Validado
Esterilidad	Ph. Eur.	Calificado
CTAB	Espectrofotométrico	Validado
Polisorbato 80	HPTLC	Validado
Sulfato de bario	Absorción atómica	Validado
Citrato de sodio	HPLC	Validado
Contenido de endotoxina	Ph. Eur. Método D	Validado
Contenido de formaldehido	Espectrofotométrico	Validado
Contenido de ovoalbúmina	ELISA	Validado
CONTROLES DURANTE EL PROCESO APLICADOS A COSECHAS MONOVALENSTES AGRUPADAS		
Parámetro de prueba	Método	Estado
Contenido de proteína total	Kjeldahl	Validado


Novartis Argentina S.A.
 Dr. Lucio Jeroncio
 Director Técnico
 MN 14840


Novartis Argentina S.A.
 Vacunas & Diagnóstico
 Farm. Interna G. Rianez
 Gte. Asuntos Regulatorios
 Apoderada



5) CONSISTENCIA DE LA PRODUCCION

Semilla de trabajo

Table 3.2.S.4.4.1-1: Analytical results of 2011/2012 Working Seeds for strain H1N1

		Batch Number
Tests	Specifications	5 WS-H1N1B-01 (10-7) 10-7
Strain		X-181
Identity HA	Positive	Positive
Identity NA	Positive	Positive
Mycoplasmas	Sterile	Sterile
Infectivity	$\geq 10^5$ EID ₅₀ /ml	$5 \times 10^{8.4}$
Sterility	Sterile	Sterile

Table 3.2.S.4.4.1-2: Analytical results of 2011/2012 Working Seeds for strain H3N2

		Batch No.
Tests	Specifications	WS-084-01 (10-6) 10-6
Strain		X-187
Identity HA	Positive	Positive
Identity NA	Positive	Positive
Mycoplasmas	Sterile	Sterile
Infectivity	$\geq 10^5$ EID ₅₀ /ml	$5 \times 10^{8.0}$
Sterility	Sterile	Sterile

Table 3.2.S.4.4.1-3: Analytical results of 2011/2012 Working Seeds for strain B

		Batch No.
Tests	Specifications	WS-093-01 (10-5)10-6
Strain		NYMC BX-35
Identity HA	Positive	Positive
Identity NA	Positive	Positive
Mycoplasmas	Sterile	Sterile
Infectivity	$\geq 10^5$ EID ₅₀ /ml	$5 \times 10^{8.6}$
Sterility	Sterile	Sterile

		Batch No.
Tests	Specifications	WS-093-01 (10-6)10-6
Strain		NYMC BX-35


 Novartis Argentina S.A.
 Dr. Lucio Jeroncio
 Director Técnico
 MN 14840


 Novartis Argentina S.A.
 Vacunas y Diagnóstico
 Farm. Argentina G. Jimenez
 Gta. Autoridad Regulatoria
 Apoderada

