

A, y se registra el peso obtenido. Tras la adición, se agita la solución durante aproximadamente 15 minutos.

### **Procedimiento de mezcla**

El proceso de fabricación del granel es una operación de mezclado simple.

### **Adición de componentes**

La adición de cada componente es verificada por controles de peso. La secuencia correcta y la integridad de estas adiciones se documentan en el Registro de Producción.

### **Llenado**

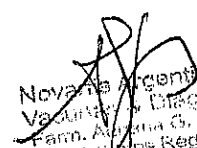
Las jeringas se llenan bajo Flujo Aéreo Laminar (LAF) en un cuarto aséptico clase B. Se introducen las jeringas y los émbolos en la sala de llenado mediante una máquina de desempaque de jeringas en un cuarto adyacente Clase C. El recipiente del producto final formulado a granel, sellado, provisto de un agitador, se lleva a un cuarto Clase C adyacente al cuarto de llenado. La tubería de salida del recipiente del producto a granel se conecta asépticamente a la tubería de entrada de las bombas de llenado. Se ceban las bombas de llenado, se investigan burbujas de aire en la vía de llenado, y se controlan los volúmenes de entrega y se ajustan si es necesario; cuando finalizan todos los controles, comienza el llenado. Las bombas de llenado llenan cinco o diez jeringas en forma simultánea (lo que depende de la máquina de llenado utilizada). Los pistones de los émbolos se introducen automáticamente en las jeringas, y las jeringas llenadas y cerradas se vuelven a colocar en sus bandejas originales. Después, las bandejas regresan al cuarto de desempaque de jeringas sobre una cinta transportadora, a través de una abertura en la pared. Después del llenado, las bandejas de jeringas pueden ser sometidas a inspección inmediata o pueden ser separadas, identificadas y almacenadas adecuadamente a +2 y +8°C mientras aguardan la inspección.

### **Inspección**

Cuando se practica la inspección directamente después del llenado, las bandejas de jeringas son movidas automáticamente del cuarto de llenado al cuarto de inspección a través de una abertura en la pared, y después, son transferidas a la máquina de inspección mediante un manipulador automático.

Cuando la inspección no se realiza directamente después del llenado, se conservan las paletas que contienen las jeringas llenas, cerradas, a +2 y +8°C. Cuando tiene lugar la inspección, se mueven las paletas al cuarto de inspección. Se retira la sobreenvoltura

  
**Novartis Argentina S.A.**  
Dr. Lucio Jeronice  
Director Técnico  
N°N 14040

  
Novartis Argentina S.A.  
Vend. de Diagnóstico  
Farm. Argentina S. Jiménez  
Cte. Asist. Regulatorias  
Aprobada



plástica, y se transfieren las jeringas a la máquina de inspección con un manipulador automático.

Tras la inspección, las jeringas inspeccionadas se conservan a +2 y +8°C mientras aguardan el envase.

### **Envasado**

El envase tiene lugar en las líneas de envasado, compuestas por un rotulador, un termoformador, un cartoner y una empacadora de cajas.

Se retiran las jeringas llenas y cerradas de las bandejas, se las coloca sobre un rotulador utilizando un manipulador automático.

En esta etapa, el rotulador atornilla el émbolo a la jeringa.

Cuando se emplean jeringas no preimpresas, un dispositivo controlado electrónicamente imprime la línea de dosis pediátrica en el cilindro de la jeringa.

El etiquetado es efectuado por una máquina que imprime sobre una etiqueta autoadhesiva los datos del lote en proceso, y la pega al cilindro de la jeringa.

Después, las jeringas etiquetadas pasan a una máquina ensambladora que termoforma una tira de PVC o PET en blísters. Las jeringas junto con un émbolo introducido en la jeringa se colocan en los blísters que se cubren con papel desprendible.

Los blísters son envasados, junto con el prospecto, por otra máquina en cajas de cartón donde se imprime el número de lote y su fecha de vencimiento.

Se practica una Prueba de Identidad de HA para cada cepa en una muestra del producto terminado, envasado. El producto envasado se conserva a 2-8°C hasta que es liberado.

## **2.4. Controles de los pasos críticos e intermedios**

### **Controles intraproceso**

#### **Preparación del Granel Final**

Después de cada adición al tanque de mezcla, se verifica el peso de la solución agregada. Se investiga la integridad del filtro estéril empleado para el amortiguador final después del uso. Después de la mezcla, se verifica el pH de la vacuna final a granel.

#### **Preparación de Buffer A y Buffer Final**

pH: determinado potenciométricamente. Vida útil: 24 horas a temperatura ambiente.

Los controles durante el proceso descritos no incluyen ningún tipo de control del contenido del buffer final.

#### **Preparación de Solución B**



**Novartis Argentina S.A.**  
Dr. Lucio Jaramila  
Director Técnico  
MN 14840



Novartis Argentina S.A.  
Vacuna B. Diagnóstico  
Ej. Ad. Ana G. Jimenez  
Cto. Asuntos Regulatorios  
Aporada



pH: determinado potenciométricamente. Vida útil: 24 horas a temperatura ambiente.

### **Llenado - Controles durante el proceso**

Volumen de llenado: se calcula pesando cinco jeringas llenas, se elimina el contenido y se vuelven a pesar las jeringas vacías. Se realiza cada hora durante el proceso de llenado.

Verificación del Indicador de Esterilidad (ETO) de los cuerpos de las jeringas: la tira del indicador de esterilidad de los cilindros de las jeringas deben ser del color apropiado.

Verificación del Indicador de Esterilidad (rayos γ) de los pistones del émbolo: la tira del indicador de esterilidad del pistón del émbolo de las jeringas debe ser del color apropiado.

## **2.5 Validación y evaluación de los procesos**

### **2.5.1 Resumen**

#### **Validación del proceso de Formulación**

El proceso de fabricación a granel es una operación de mezclado simple. Se ha realizado la validación del procedimiento de mezclado y el informe de validación se encuentra disponible.

#### **Validación del Proceso de Llenado (con medios de cultivo)**

Cada seis meses se realiza una corrida de llenado con medios en la que los envases finales se llenan con medios microbiológicos en lugar del producto. Esta prueba se utiliza para validar la configuración del equipo de llenado, los cambios y el proceso de llenado, y se realiza de acuerdo con las exigencias internacionales de GMP vigentes.

Una tasa de contaminación de menos de 0,1% con un límite de confianza del 95% se considera aceptable. Se investiga toda contaminación.



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



Novartis Argentina S.A.  
Vacunas y Productos  
Farm. Argentina S.A. S.A.  
Cte. Avda. Pellegrini 14840  
Buenos Aires



### 3) CONTROL DE CALIDAD-METODOS CONTROL EXCIPIENTES DEL PRODUCTO TERMINADO.

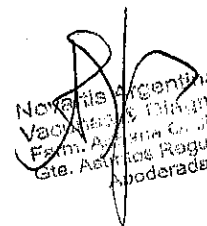
#### 3.1 Especificaciones

Los excipientes utilizados cumplen con las siguientes especificaciones:

Excipiente	Especificación
Cloruro de sodio	Cumple Farmacopea Europea
Cloruro de potasio	Cumple Farmacopea Europea
Fosfato diácido de potasio	Cumple Farmacopea Europea
Fosfato disódico dihidratado	Cumple Farmacopea Europea
Cloruro de magnesio hexahidratado	Cumple Farmacopea Europea
Cloruro de calcio dihidratado	Cumple Farmacopea Europea
Agua para inyección (WFI)	Cumple Farmacopea Europea



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



Novartis Argentina S.A.  
Vacunación y Diagnóstico  
Farm. Argentina Co. Almirante  
Gte. Asesorías Regulatorias  
Aboderada



## 4) CONTROL DE CALIDAD-METODOS CONTROL PRODUCTO TERMINADO

### 4.1 Especificaciones

#### Granel Final (Especificaciones para la liberación)

Los parámetros de prueba listados para la especificación de liberación del granel final son los requeridos por la Farmacopea Europea.

**Tabla 2: Granel Final (especificaciones de liberación)**

Ensayo	Método	Especificación
Esterilidad	Ph.Eur.	Esteril
Endotoxinas	LAL cinético cromogénico.	<100 UI/0,5 ml
Osmolaridad	Ph.Eur.	240-360mOsm/kg
Ovoalbúmina	Ph.Eur.	≤ 0,4 µg/ml

La prueba de pH se realiza solamente a título informativo, no como parte de la especificación de liberación:

**Tabla 3: Granel Final (pruebas realizadas solamente a título informativo)**

Ensayo	Método	Especificación
pH	Ph.Eur.	6,9 – 7,7

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

  
**Novartis Argentina S.A.**  
 Vacunas & Diagnóstico  
 Farm. Asunta G. Jimenez  
 Gte. Asunta Regulatorias  
 Apoderada




Producto Terminado (Especificaciones de liberación)

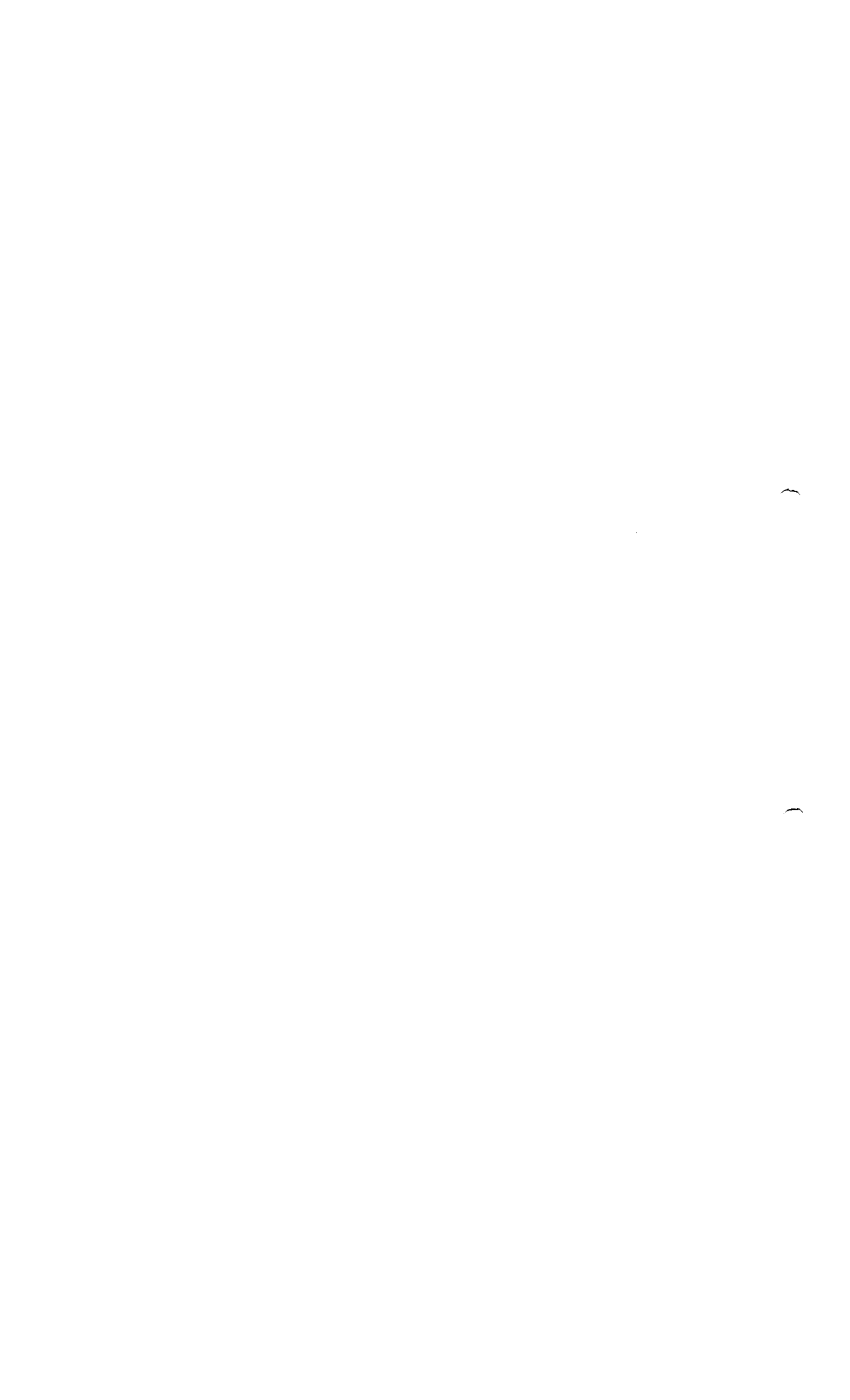
**Tabla 4: Producto terminado (Especificaciones de liberación)**

Ensayo	Método	Especificación
Aspecto	Visual	Emulsión blanca lechosa
Identidad de hemaglutinina: A (H3N2) A (H1N1) B	IDRS	Positiva
Contenido de hemaglutinina: A (H3N2) A (H1N1) B	IDRS	Para cada cepa: límite de confianza inferior (p = 0,95): ≥ 12 µg/dosis (≥ 80% de lo estipulado en la etiqueta)
Esterilidad	Ph. Eur.	Estéril
Endotoxina	LAL cinético cromogénico	< 100 UI/0,5 ml
Identidad de escualeno	HPLC	Positiva
Contenido de escualeno	HPLC	1,55-2,35% w/w
Distribución del tamaño de las partículas: Diámetro medio de las partículas Número de partículas > 1,2 µm/ml	Dispersión lumínica dinámica Sensado óptico de partículas	130-180 nm ≤ 1 x 10 <sup>7</sup> /ml
pH	Ph. Eur.	6,9-7,7
Volumen extraíble	USP	≥ 0,5 ml
Proteína total (distinta de HA)	Ácido bicinconínico	≤ 120 µg/0,5 ml
Inactivación viral	Prueba practicada en las Cosechas Monovalentes Combinadas	
Formaldehído libre	Prueba practicada en las Cosechas Monovalentes Combinadas	

Las pruebas siguientes no forman parte de la especificación de liberación del producto terminado a granel, pero se realizan sólo a título informativo.

  
**Novartis Argentina S.A.**  
 Dr. Lucio J. Juncos  
 Director Técnico  
 MN 14840

  
 Novartis Argentina S.A.  
 Vacunas y Diagnóstico  
 Farm. Adm. B. Jimenez  
 Cte. Asunto Regulatorio  
 Apoderada



**Tabla 5: Producto Terminado (pruebas realizadas solamente a título informativo)**

Ensayo	Método	Especificación
pH	Ph.Eur.	6,9 – 7,7
Volumen extraíble	Ph.Eur.	≥ 0,5 ml

Producto envasado (Especificaciones de liberación)
**Tabla 6: Producto envasado (Especificaciones de liberación)**

Ensayo	Método	Especificación
Identidad de hemaglutinina para cada cepa	SRID	positivo

**4.2 Procedimientos analíticos**

Los métodos de ensayo cumplen con los requerimientos de la Ph.Eur., cuando son aplicables. A continuación solo se describen los métodos no incluidos en Farmacopea.

**4.2.1 Contenido de Hemaglutinina e Identidad de Hemaglutinina (SRID: Single radial Immunodiffusion Test)**

Se lleva a cabo mediante inmunodifusión radial simple (IDRS).

La muestra que se analiza se trata con un detergente zwitteriónico que permite la separación de los antígenos en un gel de agarosa que contiene un antisuero específico. De esta manera, los antígenos forman un anillo de precipitación con el antisuero. El anillo de precipitación se visualiza mediante tinción con azul de Coomassie. Los diámetros de los anillos de precipitación obtenidos para cada muestra, se comparan con los obtenidos con un estándar internacional suministrada por el NIBSC, Londres o instituto equivalente reconocido por la OMS.

**a- Reactivos**

La composición descrita mas abajo es dependiente del volumen y la misma debe ajustarse en función del volumen total requerido.

*i- WHO Estandar de Referencia*

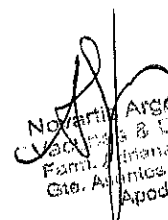
Antisueros específicos y los antígenos distribuidos por el NIBSC, Londres o instituto equivalente reconocido por la OMS.

*ii- Solución al 10% de azida de sodio*

Disolver 10 g de azida de sodio en un matraz aforado de 100 ml conteniendo aproximadamente 80 ml de agua destilada. Llevar a volumen (100 ml) con agua destilada).

*iii- Solución al 10% de Zwittergent*

  
**Novartis Argentina S.A.**  
 Dr. Lucio Jeroncio  
 Director Técnico  
 MN 14040

  
 Novartis Argentina S.A.  
 Facturas & Diagnóstico  
 Fam. Mariana G. Jimenez  
 Gte. Adjuntos Regulatorios  
 Apoderada



En un matraz aforado de 100 ml conteniendo aproximadamente 80 ml de agua destilada, disolver 10 g de zwittergent 3-14. Llevar a volumen (100 ml) con agua destilada.

*iv- Buffer Dulbecco PBS-A pH 7,3*

En un matraz aforado de 5000 ml conteniendo aproximadamente 4000 ml de agua destilada, disolver en el siguiente orden:

50,00g NaCl

1,25g KCl

7,20g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:2H<sub>2</sub>O (14,50 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O)

1,25g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Agregar 25 ml de solución al 10% de azida de sodio, medir el pH y ajustarlo a  $7,3 \pm 0,1$  con solución de NaOH o HCl. Llevar a volumen (5000 ml) con agua destilada.

*v- Agarosa 1,5 %*

En un recipiente de 3000 ml conteniendo aproximadamente 1500 ml de la solución Buffer Dubelcco (PBS-A), suspender 30 g de Agarosa (Indubiosa A 37 o equivalente). Llevar a 2000 ml utilizando la solución Buffer Dubelcco (PBS-A). Colocar en baño de agua hasta que la agarosa se disuelva completamente. Distribuir la agarosa en viales, cerrar y etiquetar y almacenar a 2-8 °C.

*vi- Solución de decoloración*

En un matraz aforado de 2000 ml, que contenga aproximadamente 1000 ml de agua destilada, agregue 200 ml de ácido acético y 500 ml de metanol, agite. Complete a volumen con agua destilada.

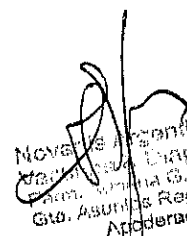
*vii- Solución de coloración*

Agregue 1,5 g de Coomassie Brilliant Blue G 250 en un matraz aforado de 500 ml conteniendo 400 ml de la solución de decoloración. Lleve a volumen de 500 ml utilizando la solución de decoloración. La concentración de la solución de coloración puede variar acorde a la cepa (ej. 12 g/l para Resvir 9).

*viii- Preparación de las placas para SRID*

La agarosa contenida en los viales se funde en baño de agua y luego se agrega el antisuero siguiendo las instrucciones del proveedor y los ensayos de optimización realizados. La agarosa luego es colocada en placas de vidrio limpias y enfriadas por aproximadamente 3-5 minutos y mantenidas a 55 – 57°C

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

  
Novartis Argentina S.A.  
Departamento Diagnóstico  
Lic. Mariana G. Jimenez  
Gto. Asuntos Regulatorios  
Aptoderada



Luego de enfriadas, realizar los pocillos de aproximadamente 4 mm de diámetro sobre la superficie de la agarosa con un instrumento metálico y remover la agarosa del interior del cada uno de los pocillos. En cada placa realizar aproximadamente 16 pocillos

#### **b- Procedimiento**

Agregar 50 µl de la solución de Zwittergent (10%) a 450 µl de la solución de mayor concentración del estándar y de la muestra. Incubar a temperatura ambiente durante media hora. Utilizando PBS-A como diluyente, preparar diluciones seriadas de cada uno de los antígenos tratados con el detergente.

Agregar al menos 4 diluciones del estándar y 4 diluciones de la muestra a ser examinada en cantidades de 20 µl por pocillo, a las placas preparadas con 16 pocillos aproximadamente. Preparar una línea de estándares y una de muestras.

Permitir a las muestras (estándar y muestra) difundir por 20 a 24 horas en un cuarto humidificado y a temperatura de entre 20 a 25°C y luego colocar las placas en agua purificada por aproximadamente 1 hora. El número de placas es diferente dependiendo del tipo de muestra.

Presionar las placas, colocando una hoja de papel de filtro entre la placa y el peso. Dejar por media hora. Secar las placas a 37°C y luego teñir por 15 minutos en la solución de coloración. Destañir las placas utilizando la solución de decoloración hasta que los anillos de precipitación se hagan claramente visibles.

Medir el diámetro de los anillos de precipitación.

Los diámetros para las muestras y el estándar son calculados y se calcula la línea de regresión para ambas (estándar y muestras)

#### **c- Cálculos**

Calcular la pendiente de las dos líneas de regresión, el intercepto (ordenada al origen) y el coeficiente de correlación.

El contenido de hemaglutinina en la muestra se obtiene aplicando la siguiente fórmula:

$$\frac{\mu\text{gHA}}{\text{mL}} = \frac{\text{SC} * \text{Dil.C} * \text{Conc STD}}{\text{SSTD} * \text{Dil.STD}}$$

donde:

SC: es la pendiente de la curva de la muestra


SSTD: es la pendiente de la curva del estándar

Dil C: es la dilución inicial de la muestra

Conc. STD: concentración del estándar



**Novartis Argentina S.A.**  
Dr. Lucía Jeroncio  
Director Técnico  
MN 14840



**Novartis Argentina S.A.**  
Farm. Adriana C. Jimenez  
Gte. Asuntos Regulatorios  
Apoderada



Dil STD: es la dilución inicial del estándar

#### 4.2.2 Esterilidad

Se lleva a cabo según la Ph. Eur.

#### 4.2.3 Endotoxina

Se lleva a cabo según la prueba de LAL cinética cromogénica.

##### a- Equipos

- PC, pentium 75 o superior, con sistema operativo Windows 95.
- Lector Kqcl (o equivalente)
- Pipetas certificadas de volumen fijo o variable.

##### b- Reactivos

- 1) Kit Cinético - Limulus QCL (Bio-Whittaker o equivalente) conteniendo:
  - viales de endotoxina de E.coli
  - viales de reactivo LAL
- 2) Reactivo acuoso LAL

##### c- Materiales


- microplacas estériles y aprirrogénicas
- tubos de vidrio certificados para ensayo de endotoxinas
- Tapas estériles libre de pirógenos para pipetas libre de pirógenos

##### d- Procedimiento

Se realiza acorde a las instrucciones del fabricante.

- Ingresar en el programa de la PC y seleccionar en el siguiente orden:
  - Número y concentración de estándares de endotoxina
  - Número de repeticiones
  - Información de la muestra
  - Distribución de los estándares
  - Diluciones de las muestras en las microplacas
- Reconstituir el estándar de endotoxina de E. coli (solución CSE) con un volumen de reactivo acuoso LAL reportado en el certificado de análisis y agite al menos 15 minutos. Esta solución contiene 50 UI/ml.
- Reconstituir el estándar de endotoxina de E. coli (solución CSE) con reactivo acuoso LAL. Además diluir 1:10 para obtener 5; 0,5; 0,05 y 0,005 UI/ml.
- Efectuar el control positivo directamente en la placa mediante el agregado de 10 ml de la solución estándar elegida en dos de los cuatro pocillos conteniendo la muestra.
- Reconstituir el reactivo LAL inmediatamente antes de usarlo con un volumen de reactivo acuoso LAL indicado en la etiqueta del vial y mezclar suavemente.

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

  
Novartis Argentina S.A.  
Vendedor de Clonástico  
Farm. Asunta C. Jirassenz  
Gto. Asunta Reguladora  
Apoderada



- Si fuera necesario, ajustar el pH de la muestra a 7,0-8.0 con HCl 0,1 N libre de pirógenos o NaOH 0,1 N y diluir con reactivo acuoso LAL .
- Colocar una alícuota de 100 µl de muestra en cada pocillo de la placa microtitulada por cuadruplicado, 100 µl para cada dilución de solución estándar por duplicado, y 100 µl de reactivo acuoso LAL como blanco por duplicado. Ubicar la placa llena en el lector Cinético - QCL y presionar la tecla direccional UP para posicionar la placa en la cámara de incubación.
- Pre-incubar la placa microtitulada por lo menos 10 minutos.
- Agregar 100 µl de la suspensión de reactivo LAL y presionar la tecla ENTER para iniciar el ensayo.
- La PC edita los resultados del ensayo (por regresión lineal).

#### 4.2.4 Proteínas

Realizado mediante el método de micro-Kjeldhal, con la diferencia de que se toma una muestra de 20 ml. El contenido de Proteínas distintas de Hemaglutinina se obtiene restando el contenido total de HA del las Proteínas Totales.

##### Proteínas totales:

Este control se lleva a cabo después de la diálisis a través de una membrana con un cut-off de 10000 Daltons, lo 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 de amoniaco en un entorno básico.

##### a) Reactivos:

Las composiciones que se presentan a continuación refieren al volumen específico, puede ser ajustado de acuerdo con el volumen total requerido.

Membrana de diálisis: Cut-off 10000

Ácido sulfúrico concentrado.

Sulfato de potasio

Oxícloruro de selenio

Sulfato cúprico

Hidróxido de sodio

Peróxido de hidrógeno 120 volúmenes.

Ácido sulfúrico 0,01 N (Normex, o equivalente)

Tiosulfato de sodio 0,01 N (Normex, o equivalente)

Yoduro de potasio

Almidón soluble

Yodato de potasio

Agua Milli-Q



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



Novartis Argentina S.A.  
Laboratorio Diagnóstico  
Farm. Adriana G. Jimenez  
Gta. Asunción Regulatorias  
Apoderada



Estándar de albúmina bovina al 7% (material de referencia estándar de 927, provisto por el Instituto Nacional de Estándar y Tecnología, o equivalente).

b) Soluciones:

*i. Mezcla ácida*

200 g de sulfato de potasio y 10 ml de oxocloruro de selenio se disuelven en una mezcla compuesta de 1.250 ml de agua y 680 ml (1.250 g) de ácido sulfúrico concentrado.

*ii. Solución ácido sulfúrico 0,01 N en medio yodado*

Un vial de Normex, para la preparación de ácido sulfúrico 0,01 N, se transfiere cuantitativamente a un matraz calibrado de 1.000 ml, que contiene 0,5 g de yodato de potasio y se lleva a volumen con agua.

*iii. Solución de yoduro de potasio al 20%*

20 g de yoduro de potasio se disuelven en agua y se llevan a 100 ml de volumen.

*iv. Solución de hidróxido de sodio al 40%*

800 g de hidróxido de sodio se disuelven en agua y se llevan a 2000 ml de volumen.

*v. Almidón soluble al 1%*

1 g de almidón soluble se disuelve en 100 ml de agua en un plato caliente. La solución se utiliza después del enfriamiento.

*vi. Solución de cloruro de sodio 0,5 M*

29,22 g de cloruro de sodio se disuelven en 1000 ml de agua.

c) Procedimiento:

Se toma una muestra de 10 ml, por duplicado, y se dializa contra agua. La diálisis se produce a 4 ° C durante 48 horas, cambiando la solución cada 24 horas. Después de este período, el contenido del tubo de diálisis se transfiere a un matraz para digestión.

Agregar al matraz 10 ml de la mezcla ácida, 0,1 mg de sulfato de cobre, 50-60 mg de selenio negro y permitir que se digiera hasta que la solución sea clara.

Enfriar la solución digerida, añadir aproximadamente 10 ml de agua, 2 ml de peróxido de hidrógeno y calentar hasta que se desarrolle un humo blanco.

Después de enfriar, transferir cuantitativamente el contenido del matraz en un aparato de destilación Kjeldahl. El instrumento añade de forma automática hidróxido de sodio (solución al 40%) y agua.

En un vaso de precipitados de 300 ml, agregar exactamente 25 ml de ácido sulfúrico 0,01 N en medio yodado y colocarlo debajo de un condensador refrigerado.

Destilar hasta obtener un volumen total de 150 ml, lavar con agua, recogiendo el líquido de enjuague en un vaso y añadir 10 ml de solución de yoduro de potasio. Dejar reposar durante aproximadamente 10 minutos.

El título se determina con tiosulfato de sodio 0,01 N utilizando solución de almidón soluble como indicador.

d) Cálculo:



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



Novartis Argentina S.A.  
Venezuela - Diagnóstico  
Patricia G. Jimenez  
Gta. Asuntos Regulatorios  
Apoderada



$$\frac{\text{mg N}}{\text{ml}} = \frac{(a - b) \times 0.01 \times 14}{c}$$

donde:

a: volumen de tiosulfato de sodio necesario para título de ensayo en blanco (ej. procedentes de la destilación de la solución de hidróxido de sodio con agua y procediendo como se describe con las muestras);

b: volumen promedio de tiosulfato de sodio de las dos determinaciones;

0,01: normalidad del ácido sulfúrico;

14: peso equivalente de nitrógeno;

c: ml de las muestras tomadas.

El contenido de proteína total se puede obtener multiplicando el valor obtenido por 6,25.

e) Criterios de validez de los análisis:

Cada día se realiza un análisis, un control positivo se prepara de la siguiente manera: 0,2 ml de solución estándar de albúmina bovina se diluye con 10 ml de agua, y 9 ml de esta solución se dializa contra agua.

El análisis, entonces, sigue tal como se describe en el apartado "Procedimiento" y el contenido de proteína (mg / ml), en el control positivo se calcula según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{mg proteins}}{\text{ml}} = \frac{(a - b) \times 0.01 \times 14 \times 50 \times 6.25}{9}$$

donde:

a: volumen de tiosulfato de sodio necesario para titular el ensayo del blanco;

b: volumen promedio de tiosulfato de las dos determinaciones;

0,01: normalidad del ácido sulfúrico;

14: peso equivalente de nitrógeno;

9: ml de solución diluida del estándar de albúmina

50: factor de dilución estándar de albúmina;

6,25: factor de conversión para obtener proteínas a partir del conteo de nitrógeno;

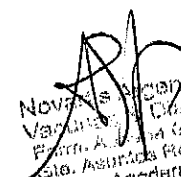
El análisis se considerará válido si el porcentaje de recuperación del control positivo, calculado de la siguiente manera, está entre 90 a 110%:

$$\text{Recovery percentage \%} = \frac{a \times 100}{b}$$

donde:

a: concentración de proteínas (mg / ml), obtenida en el análisis del control positivo (véase más arriba);

  
**Novartis Argentina S.A.**  
 Dr. Lucio Jerencio  
 Director Técnico  
 MN 14840

  
 Novartis Argentina S.A.  
 Laboratorio Diagnóstico  
 Farm. A. de la G. Jimenez  
 Cto. Asunción Regulatorios  
 Apoderada



b: concentración de proteína teórica (mg / ml), en el control positivo, como se indica en el certificado de análisis del estándar utilizado.

La diferencia de los volúmenes de tiosulfato de sodio en las dos determinaciones no debe exceder de 0,5 ml.

#### **4.2.5 Ovoalbúmina**

El ensayo utilizado es un ELISA directo. Utilizando un anticuerpo policlonal antiovoalbúmina inmovilizado y un conjugado anti-ovoalbúmina-HRP-conjugado como sistema de detección. Conjugado y muestras se incuban simultáneamente y luego la placa de ELISA es lavada y se agrega el buffer con el sustrato. La placa se incuba y se realiza la lectura

##### **a-Equipamiento**

Kit comercial Serazym Ovoalbumin ELISA (o equivalente)

Lector de placas

Lavadora de placas

##### **b- Reactivos y Soluciones**

Sustrato TMB (3,3',5,5', tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide)

Ácido Sulfúrico

##### **c- Procedimiento**

Colocar 100 µl de anti ovoalbúmina HRP conjugado en toda la placa. Agregar en triplicados 100 µl de la curva estandar (doble dilución desde 20 a 0,625 ng/ml) y del control positivo.

Agregar en cuadruplicado 100 µl de la correspondiente dilución de la muestra y de la misma muestra con un agregado de ovoalbúmina (muestra spikeada). Incubar la placa por 60 minutos a temperatura ambiente y luego lavar 5 veces en la lavadora de placas.

Agregar 100 µl/pocillo de la solución del sustrato TMB, incubar la placa a temperatura ambiente por 15 minutos.

Al finalizar la incubación detener la reacción agregando 100 µl/pocillo de solución de stop (ácido sulfúrico)

Leer la placa a una longitud de onda dual de 450 / 590-630 nm

##### **d- Cálculos**


Determinar la DO promedio de los estándares, controles positivos, muestras y muestras spikeadas.

Crear la curva de referencia de los valores medios de DO del estándar y las concentraciones de ovoalbúmina correspondiente utilizando una curva polinómica de segundo grado.

Control positivo, muestras y muestras spikeadas se interpolan en la curva estándar y se determina la concentración expresada en ng/ml.



Novartis Argentina S.A.  
Dr. Luelo Jerozic  
Director Técnico  
MN 14840



Novartis Argentina S.A.  
Vacunas y Diagnóstico  
Farm. Adriana C. Jimenez  
Gto. Asuntos Regulatorios  
Apoderada



#### 4.2.6 Formaldehido

La concentración de formaldehido se determina colorimétricamente luego de su reacción con acetilacetona. El principio del ensayo es el mismo que se describe en la Farmacopea Europea. Se prepara una curva de calibración del estándar para permitir la cuantificación.

##### a- Equipamiento

Espectrofotómetro Lambda 12 Perkin Elmer (o equivalente)

##### b- Reactivos

Acetato de amonio

Acetilacetona

Ácido Acético Glacial

Estándar de referencia de formaldehido, solución con un título  $\geq 36,5\%$ p/v (certificado por el proveedor)

Agua ultrapura tipo Milli Q (o equivalente)

##### c- Soluciones

Las siguientes composiciones son volúmenes específicas y pueden estar ajustadas al total de los volúmenes requeridos.

##### i- Solución estandar de formaldehido de 20 $\mu\text{g/ml}$

Diluir el estándar de referencia con agua para obtener una solución de concentración de 20  $\mu\text{g/ml}$

##### ii- Solución de acetato de amonio al 15 %

Disolver 15 g de acetato de amonio en 80 ml de agua, agregar 0,3 ml de ácido acético glacial y llevar con agua a 100 ml. Esta solución debe utilizarse en el transcurso de una semana luego de su preparación si se almacena a temperatura ambiente

##### iii- Solución de acetilacetona

Agregar 0,2 ml de acetilacetona a 100 ml de solución de acetato de amonio (punto ii anterior)

##### iv- Curva de formaldehido estándar

Preparar una serie de 5 diluciones por duplicado

En tubos de 15 ml, agregar 50, 100, 250, 500 y 1000  $\mu\text{l}$  de la solución estándar de 20  $\mu\text{g/ml}$  de formaldehido. Agregar agua hasta 1 ml. Los tubos contendrán 1, 2, 5, 10 y 20  $\mu\text{g}$  respectivamente de formaldehido


##### d- Procedimiento

Un mililitro de muestra es ensayado. El blanco consiste en 1 ml de agua. A cada uno de los tubos (blanco, estándar y muestras), agregar 4 ml de agua y luego 5 ml de la solución de acetilacetona. Luego de mezclar, incubar en un baño de agua a 40°C por 40 minutos. Leer la absorbancia de la solución resultante a 415 nm.

##### e- Cálculos y expresión de los resultados



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



Novartis Argentina S.A.  
Vacuna y Diagnóstico  
Ej. Adm. G. Simón  
Gte. Asunción Regulatorias  
Apoderada

