



3 Procedimientos analíticos

Los siguientes métodos se describen en la sección 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios.

- Observación.
- Prueba de virus hemadsorbentes.
- Identificación de células de simio.
- Prueba de detección de agentes extraños utilizando células.
- Prueba de detección de *Mycoplasma* por el método de cultivo.
- Identificación de poliovirus (tipos 1, 2 y 3).
- Concentración de poliovirus (tipos 1, 2 y 3).
- Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica

3.1 Prueba de detección de *Mycobacteria in vitro*

La prueba se lleva a cabo de conformidad con la Ph. Eur. 2.6.2 “Mycobacteria” (micobacterias).

3.2 Prueba de detección de agentes extraños en animales

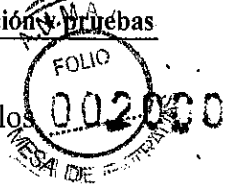
La prueba se lleva a cabo de conformidad con la Ph. Eur. 2.6.16 “Tests for extraneous agents in viral vaccines for human use” (pruebas para agentes extraños en vacunas virales para uso en seres humanos).

Además de la monografía 2.6.16 de la Ph. Eur., se inoculan 10 conejos (de 1,5 a 2,5 kg) con el virus neutralizado. Se inyectan 10 mL de la suspensión viral neutralizada en cada animal del siguiente modo:

- 1 mL por vía intradérmica (0,2 mL en 5 puntos diferentes),
- 9 mL por vía subcutánea.

Los conejos se observan durante un mínimo de 21 días para detectar signos de enfermedad. Todos los animales que mueren después de las primeras 24 horas de la prueba o que muestran signos de enfermedad se someten a autopsia y los órganos se examinan con detalle para establecer un diagnóstico.

La prueba es válida si al menos el 80 % de los animales conservan la salud y sobreviven durante el período de observación.



- Cabinas de seguridad biológica (BSC); una cabina dedicada a la manipulación de los controles positivos.
- Campana de humos.

3.3.4 Reactivo

- Células Vero.
- Cepas de *Mycoplasma hyorhinis* y *Mycoplasma orale*.
- Solución de fijación: ácido acético glacial + alcohol metílico (v/v).
- Medio fijador: glicerol-PBS (4 v/1 v).
- Solución de Hoechst: fluorocromo de bis-bencimida.
- PBS [1 x C] sin calcio ni magnesio.

Preparación del PBS [1 x C]:

Solución de PBS [10 x C] sin calcio ni magnesio 100 mL
Agua purificada ultrafiltrada hasta 1000 mL

- Tripsina-Versene [1 x C]

Preparación de tripsina-Versene [1 x C]

Solución de tripsina-Versene (EDTA) [10 x C] 100 mL
Solución de PBS [10 x C] sin calcio ni magnesio 90 mL
Agua purificada ultrafiltrada hasta 1000 mL

- Medio de células Vero

MEM GIBCO [10 x C] 100 mL
Suero fetal de ternero 50 mL
Bicarbonato sódico sin rojo de fenol al 5,6 % 33 mL
L-glutamina 200 mM 20 mL
Agua purificada ultrafiltrada hasta 1000 mL

3.3.5 Procedimiento operativo

Descongelar el producto. Homogeneizar por agitación con vórtice e inocular los productos y los controles en una monocapa de células Vero. Comprobar la confluencia de las células.



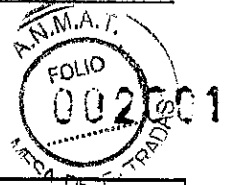


Tabla 6: Preparación celular

Control negativo	Muestra de prueba	Control de <i>Mycoplasma hyorhinis</i>	Control de <i>Mycoplasma orale</i>
Desechar el medio invirtiendo el matraz o por aspiración.			
Añadir medio de cultivo fresco hasta 40 mL	Añadir al menos 1 mL del producto a analizar.	Añadir 1 mL de medio de cultivo fresco e inóculo de control de <i>Mycoplasma hyorhinis</i> .	Añadir 1 mL de medio de cultivo fresco e inóculo de control de <i>Mycoplasma orale</i> .
Incubar durante 1 hora a +36 °C ± 1 °C, 6,5 % ± 1,5 % CO ₂			
/	Añadir medio de cultivo fresco hasta 40 mL.	Añadir medio de cultivo fresco hasta 40 mL.	Añadir medio de cultivo fresco hasta 40 mL.
Incubar durante 7 días a +36 °C ± 1 °C, 6,5 % ± 1,5 % CO ₂			

• **Amplificación**

Añadir 40 mL de medio de crecimiento celular a cada matraz secundario.

Desechar el medio de cultivo de los matraces primarios a tripsinizar por inversión o por aspiración.

Enjuagar la capa celular con unos 10 mL de solución de PBS agitando los matraces de un lado a otro.

Desechar la solución de PBS en un recipiente específico por inversión del matraz o por aspiración.

Añadir unos 10 mL de solución de tripsina-Versene para cubrir la capa celular entera durante unos 40 segundos.

Desechar el exceso de tripsina-Versene en un recipiente dedicado, por inversión del matraz o por aspiración.

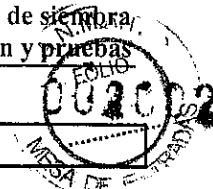
Cuando las células estén completamente disociadas y ya no estén adheridas al matraz, añadir 10 mL de medio de crecimiento celular. Incubar el matraz a +36 °C ± 1 °C, y después golpearlo suavemente.

Llevar a cabo sucesivas aspiraciones y expulsiones utilizando una pipeta de 10 mL con bulbo. Dispensar 2 mL de la suspensión celular obtenida (diluida 1:5) en los matraces secundarios correspondientes. Incubar los matraces secundarios a +36 °C ± 1 °C, 6,5 % ± 1,5 % CO₂ 96 % HR durante 3 o 4 días (2 pasajes por semana).

Tabla 7: Preparación de la amplificación

	Control negativo	Muestra de prueba	Control de <i>Mycoplasma hyorhinis</i>	Control de <i>Mycoplasma orale</i>
1.º pasaje	Tripsinización de dos matraces primarios (→ dos matraces "secundarios").			
2.º pasaje	Tripsinización de dos matraces secundarios (→ dos matraces "secundarios 2").			





3.º pasaje	Tripsinización de dos matraces "secundarios 2" (→ dos matraces "secundarios 3").
------------	--

- Siembra celular en sistemas Lab-Tek

Tabla 8: Preparación de la siembra celular

Control negativo	Muestra de prueba	Control de <i>Mycoplasma hyorhinis</i>	Control de <i>Mycoplasma orale</i>
Tripsinizar 2 matraces "secundarios 3".			
Agrupar las 2 suspensiones celulares.			
Preparar una suspensión de 5×10^4 células/mL.			
Sembrar 300 µL de suspensión celular de control negativo.	Sembrar 300 µL de suspensión celular correspondiente a la muestra de prueba.	Sembrar 300 µL de suspensión celular de control de <i>Mycoplasma hyorhinis</i> .	Sembrar 300 µL de suspensión celular de control de <i>Mycoplasma orale</i> .
Incubar durante 5 horas a $+36 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$, $6,5 \% \pm 1,5 \%$.			
Añadir 300 mL de medio de crecimiento celular.			
Incubar durante 7 días a $+36 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$, $6,5 \% \pm 1,5 \%$.			

- Fijación y tinción:

Desechar el medio de cultivo celular.

Fijar con ácido acético glacial + alcohol metílico durante 15 minutos.

Secar los portaobjetos a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Sumergir los portaobjetos en un baño de solución de Hoechst durante 30 minutos en la oscuridad.

Enjuagar los portaobjetos en 3 baños sucesivos de agua ultrafiltrada. Montar con solución de glicerol-PBS.

3.3.6 Lectura, cálculo, resultados

La presencia o ausencia de *Mycoplasma* no cultivable se observa en microscopio de fluorescencia a 330 - 380 nm.


El *Mycoplasma* no cultivable aparece como pequeños cuerpos fluorescentes redondos.


3.3.7 Criterios de validez

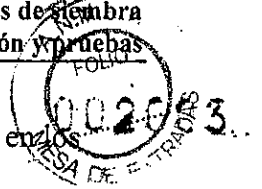
La prueba se considera válida si se cumplen los siguientes requisitos:

- Control positivo

Las células infectadas por *Mycoplasma hyorhinis* y *Mycoplasma orale* deben mostrar una fluorescencia azulada que es característica de *Mycoplasmas*, en el espacio extracelular. La


 ROXANA MONTEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 SANOFI PASTEUR S.A.


 CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
 GERENTE
 SANOFI PASTEUR S.A.



sensibilidad de las células diana se verifica por la prueba de detección de *Mycoplasmas* en los controles positivos.

- Control negativo

Los controles negativos están libres de cuerpos fluorescentes aparte de los presentes en el núcleo de las células Vero.

- Muestra de prueba

El resultado es negativo si ninguno de los pocillos Lab-Tek muestra una fluorescencia azulada que es característica de *Mycoplasmas*.

Prueba realizada sobre la suspensión viral y sobre la suspensión viral concentrada

En las etapas de suspensión viral y de suspensión viral concentrada, el cultivo de células Vero ya no puede utilizarse debido a su sensibilidad a los poliovirus.

El método analítico para la prueba de *Mycoplasma* por epifluorescencia es el mismo que se llevó a cabo sobre los sobrenadantes de las células de control (vea más arriba) con las siguientes excepciones:

- Las células Vero se sustituyen por células diana 3T3.
- Se utiliza solución de tripsina al 0,25 % en lugar de tripsina-Versene [1 x C].
- Se utiliza medio celular 3T3 en lugar de medio de células Vero.

Las células 3T3 utilizadas para la prueba se derivan de tejido embrionario de ratón suizo. La preparación de la solución y del medio se describen a continuación.

- Preparación de tripsina al 0,25 %:

Tripsina al 2,5 % 100 mL
Solución de PBS [10 x C] sin calcio ni magnesio 90 mL
Agua purificada ultrafiltrada hasta 1000 mL


- Preparación de medio celular 3T3:


Suero fetal de ternero 100 mL
L-glutamina 200 mM..... 10 mL
Medio de Mac Coy [1 x C]..... hasta 1000 mL

3.4 Detección de actividad de transcriptasa inversa mediante el análisis de transcriptasa inversa estimulada con productos fluorescentes (FPERT)

3.4.1 Principio

La transcriptasa inversa estimulada con productos fluorescentes (FPERT) es un análisis extremadamente sensible para la detección de actividad de transcriptasa inversa (RT). Es un


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
GERENTE
SANOFI PASTEUR S.A.



análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y por lo tanto combina la amplia especificidad de los ensayos de RT convencionales con la elevada sensibilidad de la PCR. Como los análisis de RT convencionales, se utiliza para detectar la actividad de la RT empaquetada en partículas retrovirales extracelulares.

El análisis FPERT comprende dos reacciones:

- Una reacción de la transcriptasa inversa, donde la actividad de la RT dentro de la muestra convierte una plantilla de ARN del *virus del mosaico del bromo* (BMV) en ADNc, utilizando un cebador de ADN específico de la plantilla presente en la mezcla de reacción.
- Un paso de amplificación, donde se utilizan cebadores específicos del producto en un ensayo de PCR para amplificar el ADNc.

Como no se añade ninguna actividad de RT exógena, solo se generará ADNc si la propia muestra contiene actividad de RT. La ausencia de detección de actividad de RT indica la ausencia de detección de retrovirus.

Las reacciones de PCR se controlan midiendo el aumento de fluorescencia de las reacciones de FPERT mediante cinética en tiempo real. Durante la amplificación con cebadores de PCR, una sonda oligonucleotídica fluorógena específica con un colorante indicador y otro extintor unidos se hibrida con el producto amplificado entre los amplímeros. La reacción de detección utiliza la actividad de 5' nucleasa de la ADN polimerasa AmpliTaq Gold para escindir el colorante indicador de la sonda, lo cual ocasiona un aumento de la fluorescencia cuando existe RT.

3.4.2 Muestras

Las siguientes muestras se analizan en paralelo:

- Alícuotas de muestra sin diluir y diluida 1:10 en presencia de ADN activado de timo de ternero (esto interfiere con la actividad similar a RT de la ADN polimerasa, reduciendo al mínimo la señal falsa positiva).
- Alícuotas de muestra sin diluir y diluida 1:10 en ausencia de ADN activado de timo de ternero (para indicar el nivel de actividad de ADN polimerasa presente en las muestras).
- Controles negativos (medio DMEM, agua libre de nucleasas y controles centinela^a). Los controles negativos se analizan en presencia de ADN de timo de ternero.
- Controles positivos (10^3 partículas de un virus de la leucemia murina y una muestra con agregado de 10^3 partículas retrovirales). Los controles positivos se analizan en presencia de ADN de timo de ternero.
- Controles de contaminación (la amplificación del ADNc de BMV se lleva a cabo en presencia de dUTP en lugar de dTTP y se utiliza uracil N'-glucosilasa [UNG] AmpErase con las reacciones de FPERT. La UNG AmpErase actúa sobre el ADN de cadena simple y doble que contiene dU e impide la reamplificación de cualquier producto de arrastre de la PCR).

^a Se prefijan controles centinela para la contaminación atmosférica, que consisten en tubos abiertos que contienen todos los reactivos y amplímeros, en todas las etapas de la preparación de muestras. Estos se procesan junto con las muestras de prueba.



3.4.3 Procedimiento operativo

El sobrenadante de cultivo se prepurifica mediante una etapa de centrifugado lento y una filtración (0,45 µm). Este paso se lleva a cabo dos veces para eliminar la actividad de ADN polimerasa. Después se concentran las partículas virales en microgránulos por ultracentrifugación y cada microgránulo se suspende en un tampón de fragmentación para liberar la actividad de RT. Se lleva a cabo la reacción de FPERT.

3.4.4 Criterios de validez

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

- No se detecta producto específico en los controles negativos (valores de C_T entre 35,7 y 40,0).
- Se detecta producto específico en las reacciones de FPERT de control positivo y de muestra de prueba con agregado (C_T inferior a 35,69).
- El control positivo de 10^3 es, al menos en tres de cuatro reacciones, inferior a 35,69 para garantizar que la sensibilidad del ensayo está cumpliendo las especificaciones.

3.5 Detección de virus símico 40 (SV40)

3.5.1 Principio

La PCR en tiempo real utiliza dos cebadores específicos de SV40 y una sonda fluorescente específica TaqMan que flanquean el fragmento de ADN a amplificar.

La detección de la PCR en tiempo real se vale de la actividad 5' exonucleasa de la polimerasa *Taq* para hidrolizar la sonda específica TaqMan marcada con un colorante indicador fluorescente 5' y una molécula extintora 3'. Mientras estén presentes en la sonda ambos fluorocromos, el extintor evita la señal fluorescente. La proximidad entre el extintor y el colorante indicador conduce a la ausencia de fluorescencia.

Durante la fase de amplificación, la 5' exonucleasa degrada la sonda y después libera la señal fluorescente.

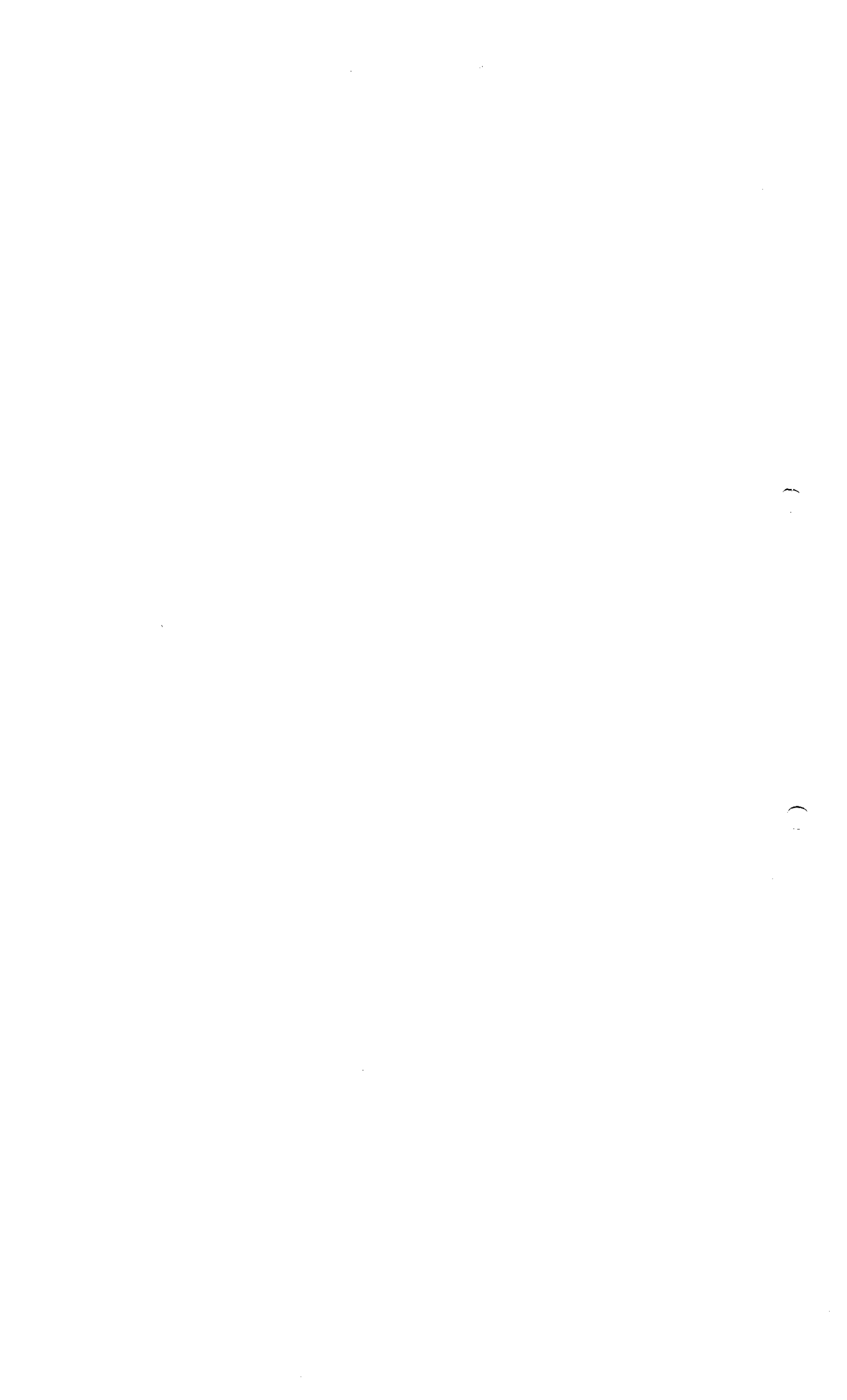
La tasa de fluorescencia es proporcional a la cantidad de productos de PCR generados por ciclo de PCR.

El sistema de detección de secuencias procesa los datos brutos de fluorescencia para producir un umbral de ciclo (C_T) para cada muestra,

3.5.2 Muestras

Las siguientes muestras se analizan en paralelo:

- Muestras de prueba.
- Controles negativos:
 - Control centinela: mezcla de reacción sin plantilla de ADN.





- Control negativo: extractos de ADN de células libres de SV40 o mezcla de sustrato y reacción.
- Controles positivos:
 - Control positivo exógeno: amplificación del control positivo.
 - Control posterior a la extracción con agregado: amplificación del ácido nucleico de la muestra de prueba, con agregado de una cantidad conocida de control positivo tras la extracción de ADN.
 - Control positivo interno: control negativo de ácido nucleico con agregado de una cantidad conocida de control positivo.
 - Control interno del artículo de prueba: amplificación del ácido nucleico de la muestra de prueba, con agregado de una cantidad conocida de control positivo antes de la extracción de ADN.

3.5.3 Lectura, cálculo, resultados

Se registra el C_T de cada muestra.

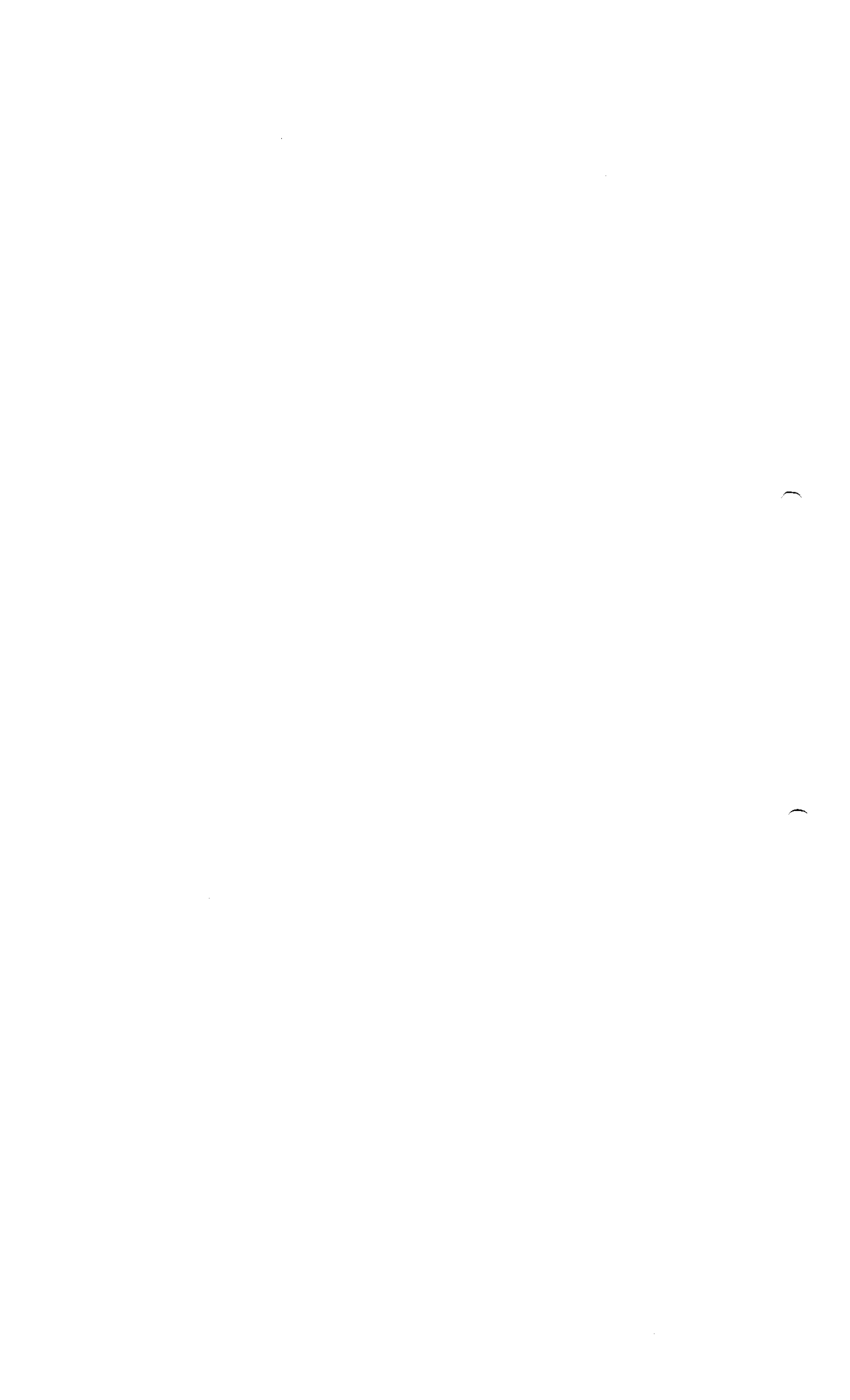
Una muestra es negativa si el C_T es igual a 40.

Una muestra es positiva si el C_T es menor o igual a 39,99.

3.5.4 Criterios de validez

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

- El C_T en los controles negativos es igual a 40.
- El C_T en los controles positivos es menor o igual a 39,99.





4 Resultados de control

Los siguientes documentos de resultados de control están incluidos el final de esta sección:

- Certificados de análisis originales de 1977 para los lotes de siembra maestros del virus tipo 1 (lote 1011), tipo 2 (lote 2011) y tipo 3 (lote 3011).
- Certificados de análisis para los lotes de siembra submaestros del virus tipo 1 (lote 10112), tipo 2 (20112) y tipo 3 (30113).

Se presentan a continuación los resultados obtenidos para los lotes de siembra de trabajo de cada serotipo del virus:

- Lote de siembra de trabajo FA350158 del poliovirus tipo 1 (elaborado el 09 de septiembre de 2009).
- Lote de siembra de trabajo FA189575 del poliovirus tipo 2 (elaborado el 05 de octubre de 2004).
- Lote de siembra de trabajo FA331115 del poliovirus tipo 3 (elaborado el 16 de diciembre de 2008).

Todos los resultados presentados a continuación cumplen con su perfil de control de calidad.

Tabla 9: Resultados para los lotes de siembra de trabajo FA350158 (poliovirus tipo 1), FA189575 (poliovirus tipo 2) y FA331115 (poliovirus tipo 3) en células de control

Pruebas	Criterios de aceptación	Resultados		
		FA350158 (tipo 1)	FA189575 (tipo 2)	FA331115 (tipo 3)
Observación	Ausencia de efecto citopático debido a agentes extraños.	Cumple.	Cumple.	Cumple.
Prueba de virus hemadsorbentes	Ausencia de hemadsorción.	Cumple.	Cumple.	Cumple.
Identificación de células de simio (línea celular continua Vero)	Identificación positiva.	Cumple.	Cumple.	Cumple.

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
ROGERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

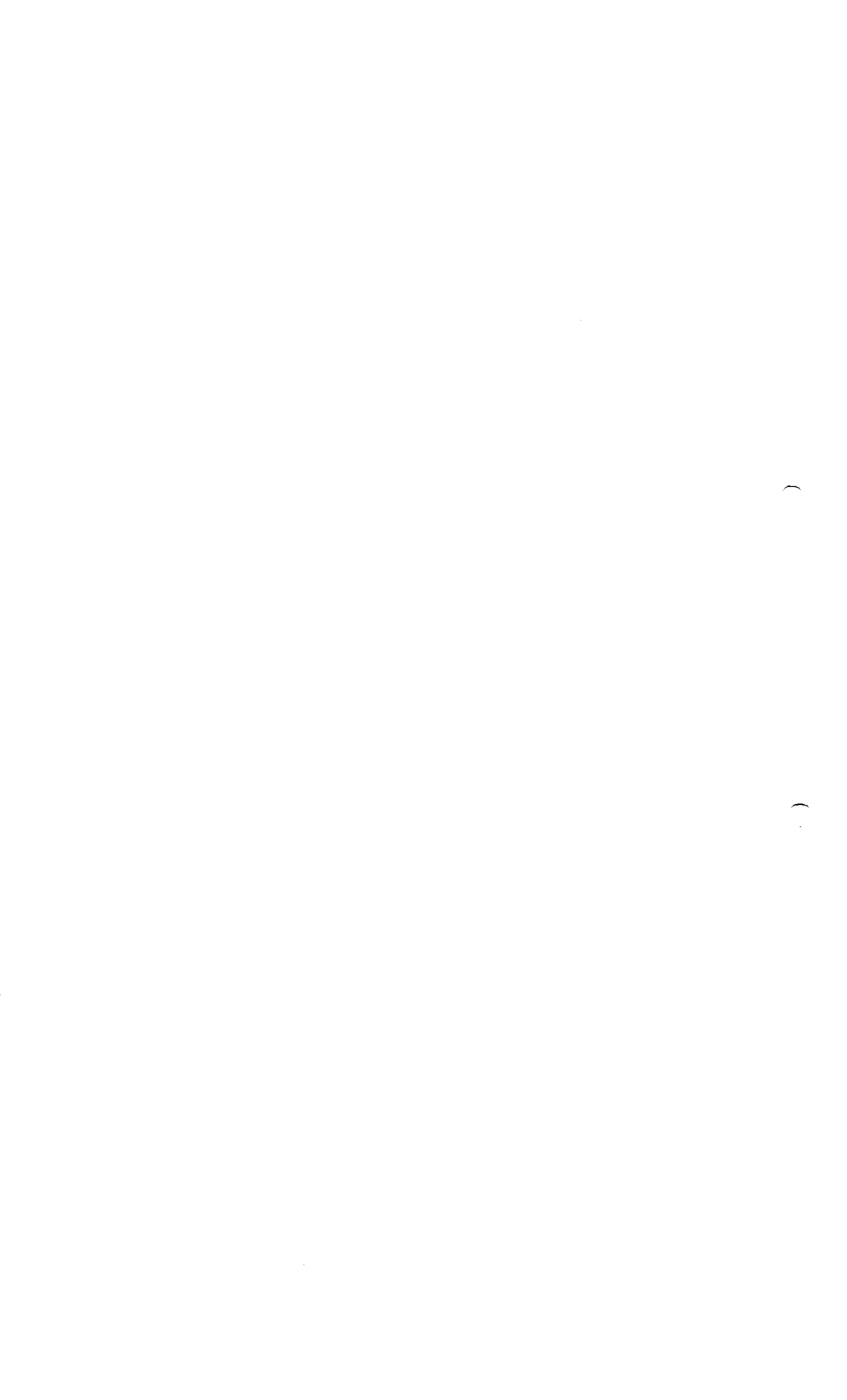





Tabla 10: Resultados para los lotes de siembra de trabajo FA350158 (poliovirus tipo 1), FA189575 (poliovirus tipo 2), FA331115 (poliovirus tipo 3) en sobrenadantes de células de control

Pruebas	Criterios de aceptación	Resultados		
		FA350158 (tipo 1)	FA189575 (tipo 2)	FA331115 (tipo 3)
Prueba de agentes extraños utilizando células: - Línea celular continua Vero - Células diploides humanas MRC-5 - Células primarias de riñón de mono	Ausencia de efecto citopático para cada tipo de célula.	Cumple.	Cumple.	Cumple.
Prueba de detección de <i>Mycoplasma</i> por el método de cultivo	Sin crecimiento de <i>Mycoplasma</i> .	Cumple.	Cumple.	Cumple.
Prueba de detección de <i>Mycoplasma</i> mediante epifluorescencia en cultivo celular	No se detectó <i>Mycoplasma</i> mediante epifluorescencia en cultivo celular.	Cumple.	Cumple.	Cumple.


 ROXANA MONTEMILOME
 DIRECTORA TÉCNICA
 SANOFI PASTEUR S.A.
 CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
 GERENTE
 SANOFI PASTEUR S.A.



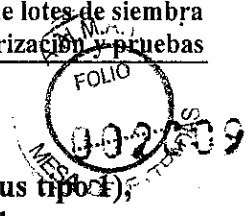


Tabla 11: Resultados para los lotes de siembra de trabajo FA350158 (poliovirus tipo 1), FA189575 (poliovirus tipo 2), FA331115 (poliovirus tipo 3) en suspensión viral

Pruebas	Criterios de aceptación	Resultados		
		FA350158 (tipo 1)	FA189575 (tipo 2)	FA331115 (tipo 3)
Identificación de poliovirus (tipo 1 o 2 o 3)	Positiva: poliovirus tipo 1, 2 o 3.	Cumple.	Cumple.	Cumple.
Concentración de poliovirus (tipo 1 o 2 o 3)	$\geq 10^7$ DICC ₅₀ /mL	10 ^{8,80}	10 ^{8,90}	10 ^{8,53}
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	No se observa crecimiento microbiano.	Cumple.	Cumple.	Cumple.
Prueba de detección de <i>Mycoplasma</i> por el método de cultivo	Sin crecimiento de <i>Mycoplasma</i> .	Cumple.	Cumple.	Cumple.
Prueba de detección de <i>Mycoplasma</i> mediante epifluorescencia en cultivo celular	No se detectó <i>Mycoplasma</i> mediante epifluorescencia en cultivo celular.	Cumple.	Cumple.	Cumple.
Prueba de detección de <i>Mycobacteria in vitro</i>	Ausencia de <i>Mycobacteria</i> .	Cumple.	Cumple.	Cumple.
Prueba de detección de agentes extraños en animales: - Conejos - Ratones adultos - Ratones lactantes - Cobayos	Sin pruebas de infección con ningún agente extraño en cada tipo de animal.	Cumple.	Cumple.	Cumple.
Prueba de agentes extraños utilizando células: - Línea celular continua Vero - Células diploides humanas - Células primarias de riñón de mono	Ausencia de efecto citopático para cada tipo de célula. Ausencia de hemadsorción para cada tipo de célula.	Cumple.	Cumple.	Cumple.
Prueba de detección de transcriptasa inversa (PERT)	Ausencia de actividad de transcriptasa inversa.	Cumple.	Cumple.	Cumple.
Detección de virus símico 40 (SV40)	Ausencia de ADN de SV40.	Cumple.	Cumple.	Cumple.

FOLIO
 207
 DE 207
 S.A.

Tabla 12: Resultados para los lotes de siembra de trabajo FA350158 (poliovirus tipo 1), FA189575 (poliovirus tipo 2), FA331115 (poliovirus tipo 3) en suspensión viral concentrada

Pruebas	Criterios de aceptación	Resultados		
		FA350158 (tipo 1)	FA189575 (tipo 2)	FA331115 (tipo 3)
Identificación de poliovirus (tipo 1 o 2 o 3)	Positiva: poliovirus tipo 1, 2 o 3.	Tipo 1 Cumple.	Tipo 2 Cumple.	Tipo 3 Cumple.
Concentración de poliovirus (tipo 1 o 2 o 3)	Para información (DICC ₅₀ /mL).	10 ^{9,97}	10 ^{10,07}	10 ^{9,73}
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	No se observa crecimiento microbiano.	Cumple.	Cumple.	Cumple.
Prueba de detección de <i>Mycoplasma</i> por el método de cultivo	Sin crecimiento de <i>Mycoplasma</i> .	Cumple.	Cumple.	Cumple.
Prueba de detección de <i>Mycoplasma</i> mediante epifluorescencia en cultivo celular	No se detectó <i>Mycoplasma</i> mediante epifluorescencia en cultivo celular.	Cumple.	Cumple.	Cumple.



3.2.S.2.3

Certificate of Analysis - Master Seed Lots Type 1, 2 and 3 - IPV



ROXANA MONTEMILIONE
DIRECTORA TÉCNICA
SAMPO PASTERS S.A



CHRISTIAN DOMINGUEZ
DIRECTOR
SAMPO PASTERS S.A

QUALITY CONTROL RELEASE
POLIOVIRUS VACCINE (Inactivated)
PRIMARY VIRUS SEED LOT
(prepared on monkey kidney cells)

Type : 1
Strain : MAHONEY
Primary seed lot : 1011

Monkey control : **Conforms**

CONTROL CELL

Observation : **Conforms**

CONTROLS OF VIRAL SUSPENSION

Sterility test : **Conforms**

Mycobacterium tuberculosis (on Löwenstein) : **Conforms**

Test in rabbits : **Conforms**

Test in guinea pigs : **Conforms**

Test in primary monkey kidney cells : **Conforms**

Identity test : **Conforms type 1**

Infectious titer : $10^{8.45}$ CCID₅₀/ml

GENERAL CONCLUSION : **Conforms**

Release date : **12 JULY 1977**


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANTO PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
SECRETARIO
SANTO PASTEUR S.A.

Batch Release Department

A. FECHARD

12/01/05

QUALITY CONTROL RELEASE
POLIOVIRUS VACCINE (Inactivated)
PRIMARY VIRUS SEED LOT
(prepared on monkey kidney cells)

Type : 2
Strain : MEF 1
Primary seed lot : 2011

Monkey control : **Conforms**

CONTROL CELL

Observation : **Conforms**

CONTROLS OF VIRAL SUSPENSION

Sterility test : **Conforms**

Mycobacterium tuberculosis (on Löwenstein) : **Conforms**

Test in rabbits : **Conforms**

Test in guinea pigs : **Conforms**

Test in primary monkey kidney cells : **Conforms**

Identity test : **Conforms type 2**

Infectious titer : **10^{8.3} CCID₅₀/ml**

GENERAL CONCLUSION : Conforms

Release date : 01 SEPTEMBER 1977

ROXANA MONTEMILONE DIRECTORA TÉCNICA
RAMÓN PASTEUR S.A.
CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
RODOLFO PASTEUR S.A.

Batch Release Department
A. FECHARD

12/01/05

QUALITY CONTROL RELEASE
POLIOVIRUS VACCINE (Inactivated)
PRIMARY VIRUS SEED LOT
(prepared on monkey kidney cells)

Type : 3
Strain : SAUKETT
Primary seed lot : 3011

Monkey control : **Conforms**

CONTROL CELL

Observation : **Conforms**

CONTROLS OF VIRAL SUSPENSION

Sterility test : **Conforms**

Mycobacterium tuberculosis (on Löwenstein) : **Conforms**

Test in rabbits : **Conforms**

Test in guinea pigs : **Conforms**

Test in primary monkey kidney cells : **Conforms**

Identity test : **Conforms type 3**

Infectious titer : **10^{8.0} CCID₅₀/ml**

GENERAL CONCLUSION : Conforms

Release date : **03 NOVEMBER 1977**

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANTO PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
SUPERADO
SANTO PASTEUR S.A.

Batch Release Department
A. FECHALDE


12/01/05





3.2.S.2.3

Certificate of Analysis - Sub-Master Seed Lots Type 1, 2 and 3 - IPV



JOXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANDEL PASTEUR S.A.



CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
GERENTE
SANDEL PASTEUR S.A.





QUALITY CONTROL RELEASE
POLIOVIRUS VACCINE (Inactivated)
SUB-MASTER VIRUS SEED LOT
(prepared on monkey kidney cells)

Type : 1
Strain : MAHONEY
Sub-master seed lot : 10112

Monkey control : **Conforms**

CONTROL CELL

Observation : **Conforms**

CONTROLS OF VIRAL SUSPENSION

Sterility test : **Conforms**

Mycobacterium tuberculosis (on Löwenstein) : **Conforms**

Test in rabbits : **Conforms**

Test in guinea pigs : **Conforms**

Test in primary monkey kidney cells : **Conforms**

Identity test : **Conforms type 1**

Infectious titer : $10^{8.65}$ CCID₅₀/ml

GENERAL CONCLUSION : Conforms

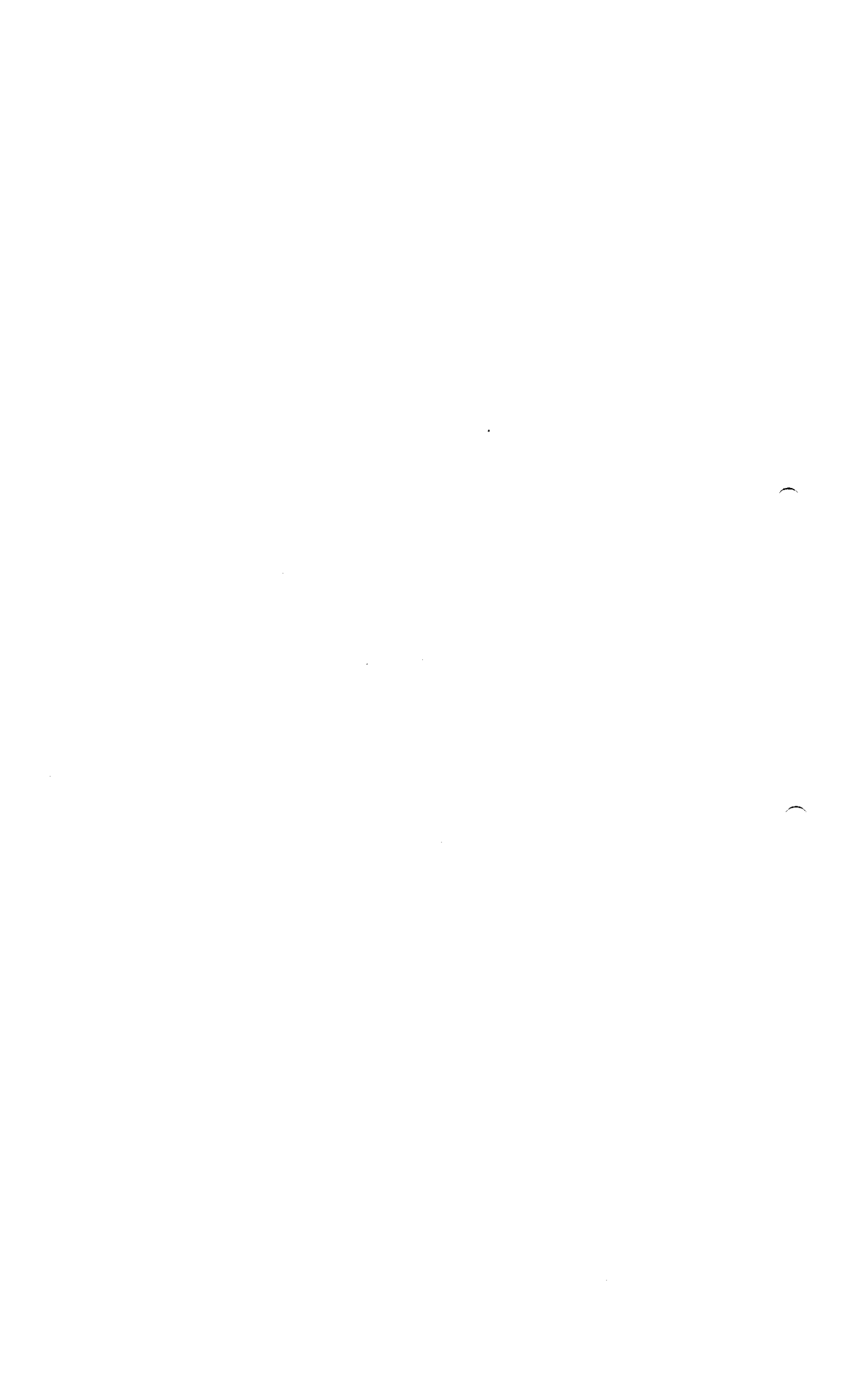
Release date : 26 SEPTEMBER 1979

[Signature]
ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANTO PASTEUR S.A.

[Signature]
CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
GERENTE
SANTO PASTEUR S.A.

Batch Release Department
A. PECHARD

12/09/05





**QUALITY CONTROL RELEASE
POLIOVIRUS VACCINE (Inactivated)
SUB-MASTER VIRUS SEED LOT
(prepared on monkey kidney cells)**

Type : 2
Strain : MEF 1
Sub-master : 20111

Monkey control : **Conforms**

CONTROL CELL

Observation : **Conforms**

CONTROLS OF VIRAL SUSPENSION

Sterility test : **Conforms**

Mycobacterium tuberculosis (on löwenstein) : **Conforms**

Test in rabbits : **Conforms**

Test in guinea pigs : **Conforms**

Test in primary monkey kidney cells : **Conforms**

Identity test : **Conforms type 2**

Infectious titer : **10^{8.5} CCID₅₀/ml**

GENERAL CONCLUSION : **Conforms**

Release date : **26 SEPTEMBER 1979**

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
GERENTE
SANOFI PASTEUR S.A.

Batch Release Department

M. BERTHIEUX
27/06/2006





QUALITY CONTROL RELEASE
POLIOVIRUS VACCINE (Inactivated)
SUB-MASTER VIRUS SEED LOT
(prepared on monkey kidney cells)

Type : 2
 Strain : MEF 1
 Sub-master : 20112

Monkey control : **Conforms**

CONTROL CELL

Observation : **Conforms**

CONTROLS OF VIRAL SUSPENSION

Sterility test : **Conforms**

Mycobacterium tuberculosis (on löwenstein) : **Conforms**

Test in rabbits : **Conforms**

Test in guinea pigs : **Conforms**

Test in primary monkey kidney cells : **Conforms**

Identity test : **Conforms type 2**

Infectious titer : **10^{8.55} CCID₆₀/ml**

GENERAL CONCLUSION : Conforms

Release date : 26 SEPTEMBER 1979

ROXANA MONTEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
 SUPERVISOR
 SANOFI PASTEUR S.A.

Batch Release Department

M. BEATHIEUX
 27/06/2006





QUALITY CONTROL RELEASE
POLIOVIRUS VACCINE (Inactivated)
SUB-MASTER VIRUS SEED LOT
(prepared on vero cells)

Type : 2
Strain : MEF 1
Sub-master : 20114

CONTROL CELL

Observation : **Conforms**

CONTROLS OF VIRAL SUSPENSION

Sterility test : **Conforms**
Mycobacterium tuberculosis (on löwenstein) : **Conforms**
Test in rabbits : **Conforms**
Test in guinea pigs : **Conforms**
Test in primary monkey kidney cells : **Conforms**
Identity test : **Conforms type 2**
Infectious titer : **10^{8.92} CCID₅₀/ml**

GENERAL CONCLUSION : **Conforms**

Release date : **24 DECEMBER 1981**

Batch Release Department
A. PECHARD

14/01/05

A large, stylized handwritten signature in black ink, overlapping the printed name of Roxana Montevilone.

ROXANA MONTEVILONE
DIRECTORA TÉCNICA
AVENTIS PASTEUR S.A.

A handwritten signature in black ink, overlapping the printed name of Christian Domínguez.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
GERENTE
AVENTIS PASTEUR S.A.

