

## Evaluación de cartuchos de filtración Sartobran® P en la producción de la vacuna Gavac®

## Assessment of Sartobran® G filtration cartridges in Gavac® vaccine production

## Avaliação de cartuchos de filtração Sartobran® P nas fases da purificação e filtração esterilizada da vacina Gavac®

ARLENIS ALFARO-MARTÍNEZ<sup>1</sup>, RUTHDALI MARÍA SEGURA-SILVA<sup>2</sup>,  
DIASMARYS SALINAS-RODRÍGUEZ<sup>3</sup>, NIUVIS MONTOYA-ECHAVARRIA<sup>4</sup>,  
AMAURY PÉREZ-SÁNCHEZ<sup>5</sup>

### Historial del Artículo

**Recibido para evaluación:** 21 de Noviembre de 2018.

**Aprobado para publicación:** 22 de Marzo de 2019.

- 1 Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey, Departamento de Mantenimiento. Ingeniera Química. Camagüey, Cuba.
- 2 Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey, Departamento de Control de la Calidad. Ingeniera Química. Camagüey, Cuba.
- 3 Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey, Departamento de Control de la Calidad. Licenciada en Veterinaria. Camagüey, Cuba.
- 4 Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey, Departamento de Control de la Calidad. Licenciada en Microbiología. Camagüey, Cuba.
- 5 Universidad de Camagüey, Facultad de Ciencias Aplicadas, Departamento de Ingeniería Química. Ingeniero Químico. Camagüey, Cuba.

**Correspondencia:** [amauryps@nauta.cu](mailto:amauryps@nauta.cu)

**Cómo citar este artículo:** ALFARO-MARTÍNEZ, ARLENIS, SEGURA-SILVA RUTHDALI MARÍA, SALINAS-RODRÍGUEZ, DIASMARYS, MONTOYA-ECHAVARRIA, NIUVIS, PÉREZ-SÁNCHEZ, AMAURY. (2019). EVALUACIÓN DE CARTUCHOS DE FILTRACIÓN SARTOBRAN® P EN LA PRODUCCIÓN DE LA VACUNA GAVAC®. Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, 17(2), 53-65, DOI:<http://dx.doi.org/10.18684/bsaa.v17n2.1253>

## RESUMEN

La filtración de líquidos a través de filtros de 0,2  $\mu\text{m}$  es un método común de remover microorganismos y partículas indeseadas contenidas en soluciones sensibles al calor, para obtener un filtrado estéril. En el presente trabajo se realizó la evaluación del empleo de cartuchos de filtración Sartobran® P en las etapas de purificación y filtración estéril del proceso productivo de la vacuna Gavac®. El empleo de cartuchos de filtración Sartobran® P permite obtener un ahorro económico de \$ 121.267/lote por concepto de reducción del consumo de energía eléctrica y material de filtración en las sub-etapas de filtración, y en \$ 129,5/lote a causa de producto no derramado durante la etapa de filtración estéril. La introducción de las cápsulas de filtración Sartobran® P permite excluir la sub-etapa de filtración primaria de la etapa de filtración estéril sin afectar la calidad del producto filtrado obtenido. Se concluye que resulta factible desde el punto de vista técnico-económico emplear los cartuchos de filtración Sartobran® P tanto en la sub-etapa de filtración no estéril de la etapa de purificación, como en las sub-etapas de filtración primaria y esterilizante de la etapa de filtración estéril.

## ABSTRACT

Filtration of liquids through 0,2  $\mu\text{m}$  diameter filters is a common method of removing microorganisms and unwanted particles contained in heat-sensitive solutions to obtain a sterile filtrate. At the present work the evaluation of the use of Sartobran® P filtration cartridges both in the purification and in sterile filtration stages of the production process of Gavac® vaccine was carried out. The use of Sartobran® P filtration cartridges allowed to obtain total economic savings of \$ 121.267 per batch due to the reduction of electricity and filtration material consumption in the filtration sub-stages considered, and of \$ 129,5/batch because of product not spilled during the sterile filtration stage. The introduction of Sartobran® P filtration cartridges allow to exclude the primary filtration sub-stage from the sterile filtration step, without affecting the main quality indicators of the filtered product obtained. It is deduced from the techno-economic point of view that is feasible to employ Sartobran® P filtration cartridges both in the non-sterile sub-stage of the purification stage, and in the primary and sterilizing sub-stages of the sterile filtration stage.

## RESUMO

A filtração de líquidos através de filtros de 0,2  $\mu\text{m}$  é um método comum de remoção de microrganismos e partículas indesejáveis contidos em soluções sensíveis ao calor, para obter um filtrado estéril. No presente trabalho é realizada a avaliação técnica e econômica da utilização de cartuchos de filtro Sartobran® P nas etapas de purificação e filtração estéril do processo de produção da vacina Gavac®. Geralmente, o uso de cartuchos de filtro Sartobran® P permite a poupança de custos completos de \$ 121.267/lote de redução de consumo de energia e material do filtro em subetapas de filtro considerados, e \$ 129,5/lote devido ao produto não desperdiçado durante o estágio de filtração estéril. A introdução da filtração cápsulas Sartobran® P para excluir a subeta-

## PALABRAS CLAVE:

Cápsula de filtración,  
Purificación, Filtración estéril,  
Calidad, Costos.

## KEYWORDS:

Filtration capsule, Purification,  
Sterile filtration, Quality, Costs.

## PALAVRAS-CHAVE:

Cápsula de filtração, Purificação,  
Filtração estéril, Qualidade,  
Custos.

pa de filtração primária fase de filtração esterilizada, sem afectar os principais indicadores de filtrado a qualidade dos produtos obtidos. Concluiu-se que é viável desde o ponto de vista técnico-económico o uso de cartuchos de filtro Sartobran® P tanto para a subetapa de filtração não esteril da etapa de purificação, quanto nas subetapas de filtração primaria e esterilizante da filtração estéril.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente no se pueden diseñar y/o evaluar procesos en el campo de la biotecnología sin referirse al término esterilización. La esterilización se define como cualquier proceso que elimina o remueve efectivamente agentes transmisibles (tales como hongos, bacterias y virus) presentes en superficies, equipos, alimentos, medicamentos o medios de cultivo biológicos [1]. En la práctica la esterilización se lleva a cabo a partir de la exposición del producto u objeto a esterilizar a agentes químicos o físicos por un tiempo requerido.

Uno de los métodos de esterilización más utilizados en la industria biotecnológica actual es la filtración esterilizante. Emplea materiales granulares o fibrosos, y membranas porosas para llevar a cabo la clarificación y esterilización de soluciones y productos biológicos sensibles al calor, así como también para la filtración de aire y otros gases, formando parte de sistemas de venteo en fermentadores, centrifugas, autoclaves y secadores por liofilización [1].

La filtración esterilizante remueve los microorganismos presentes en líquidos y gases, sin destruirlos, al evitar el paso de partículas de determinada talla.

Para la filtración esterilizante de líquidos biológicos y medios de cultivo se emplean filtros de membrana con un diámetro de poro nominal de 0,2 – 0,45 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ). Los parámetros que más influyen en el rendimiento de un filtro esterilizante son el factor de reducción de la valoración o título (*titer*) (esto es, la relación entre el número de organismos retando el filtro, bajo condiciones definidas, sobre el número de organismos que lo penetran); la profundidad de la membrana, su carga y el retorcimiento que presenten los canales internos [2].

Entre las cápsulas de filtración esterilizante más empleadas en la industria biofarmacéutica actual se encuentra la Sartobran® P [2]. Está compuesta por una capa protectora de polipropileno y una membrana de

acetato de celulosa reforzada, y se comercializan en diferentes combinaciones de tamaño de poro, siendo las más usuales las siguientes [2]:

- 0,65 + 0,45  $\mu\text{m}$
- 0,45 + 0,2  $\mu\text{m}$
- 0,45 + 0,1  $\mu\text{m}$

Presentan un área de filtración de 0,56 m<sup>2</sup> (6 ft<sup>2</sup>) por cada 0,254 m (10 in) del elemento, y se aplican fundamentalmente en la filtración esterilizante de soluciones parenterales, vacunas, antibióticos, fracciones de suero y plasma, medios de cultivos celulares, reactivos de diagnóstico, agentes terapéuticos, soluciones de proteínas, vitaminas y preservantes, así como también la filtración sub-estéril (0,1  $\mu\text{m}$ ) [2].

Varios autores han utilizado los cartuchos de filtración Sartobran® P en diversas aplicaciones, entre estas se encuentran la clarificación de caldos de fermentación empleando adenovirus [3]; la filtración esterilizante del Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) de la vacuna anti-hepatitis B recombinante (HBsAg) [4]; la filtración de agua de mar para determinar concentraciones de mercurio metilado [5] y trazas de metales de cobre (Cu), plomo (Pb) y cadmio (Cd) [6]; la purificación y concentración de soluciones de proteínas durante el proceso de producción de anticuerpos monoclonales [7]; la filtración de orina humana [8] y orina artificial [9]; la aplicación de operaciones de filtración esterilizante para la obtención de inmunoglobulina G altamente pura en fase líquida [10], y la filtración estéril de soluciones de virus [11].

Beldarraín *et al.* [4] evaluaron el empleo de cápsulas Sartobran P® como medio filtrante para la etapa de filtración esterilizante del ingrediente farmacéutico activo de la vacuna contra la hepatitis B recombinante (IFA-HBsAg). El estudio demostró que la integridad física de las cápsulas empleadas se mantuvo antes y después del proceso de filtración. El estudio de extractables por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (EIRTF) y cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (CLAR-FI) mostró la ausencia de compuestos contaminantes provenientes de las membranas, mientras que la prueba de retención bacteriana a escala industrial reveló que estas cápsulas pueden retener una carga microbiológica  $\geq 10^7$  UFC/cm<sup>2</sup> de *Brevundimona diminuta*, lo

cual garantiza la esterilidad del material filtrado. Los resultados obtenidos durante los ensayos efectuados indicaron la eficacia y seguridad del empleo de cápsulas Sartobran® P durante el proceso de filtración esterilizante del IFA-HBsAg.

En la actualidad el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de Camagüey produce la vacuna Gavac®, un inmunógeno destinado a combatir la garrapata del ganado bovino *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus*, *R. annulatus* y *R. decoloratus*. La proteína Bm86, principio activo de la vacuna, se expresa con elevados niveles en la levadura *Pichia pastoris*.

Durante la etapa de purificación de la proteína Bm86 se realiza un filtrado no estéril de una solución de proteínas concentradas, empleando para ello tres tipos de filtros circulares de membrana plana de 142 mm de diámetro. Estos filtros son: un pre-filtro de fibra de vidrio, un segundo filtro de acetato o nitrato de celulosa de 0,45 µm de tamaño de poro, y un tercer filtro del mismo material de 0,2 µm, los cuales se encuentran colocados en orden descendente dentro de una carcasa circular de acero inoxidable. Por su parte, en la etapa de filtración estéril se llevan a cabo dos sub-etapas consistentes en (1) filtración primaria (no estéril) y (2) filtración esterilizante (estéril) del IFA bajo flujo laminar, empleando ambas los tres tipos de filtros de membranas planas descritos anteriormente.

Con el objetivo de incrementar la seguridad, rapidez y eficacia de todas las etapas de filtración previamente descritas, tanto estériles como no estériles, así como también reducir costos, se ha propuesto la sustitución de las membranas circulares planas utilizadas en la actualidad en las etapas de filtración mencionadas con anterioridad, por cartuchos de filtración Sartobran® P de 0,2 µm. En el siguiente trabajo se muestran los resultados de la evaluación técnico-económica de la introducción de cartuchos de filtración Sartobran® P de 0,2 µm tanto en la sub-etapa de

filtración no estéril de la etapa de purificación, como en las sub-etapas de filtración primaria y esterilizante correspondientes a la etapa de filtración estéril del proceso productivo de la vacuna Gavac®.

## MÉTODO

### Etapas del proceso de producción del IFA

El proceso de producción del Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) de la vacuna Gavac® consta de las siguientes etapas principales: fermentación, recobrado, purificación y filtración estéril, las cuales se muestran en la Figura 1, junto con las sub-etapas por las cuales está compuesta cada una de ellas.

### Filtración no estéril empleando filtros de membrana plana

El diagrama del sistema de filtración no estéril de la solución de proteínas se muestra en la Figura 2. La solución de proteínas contenida en un frasco de polipropileno de 10 L de capacidad pasa a través del filtro mediante una bomba peristáltica a un flujo de ± 200 mL/min. El filtrado se colecta en otro frasco a través de una manguera de salida. Al concluir el proceso se toman muestras del filtrado para la realización de ensayos analíticos según la norma NP 4285 [12]. Si el filtrado de BM86 cumple con las especificaciones de calidad se envasa en frascos de polipropileno de 10 L de capacidad y se almacena en una cámara frigorífica operando a  $-20 \pm 2^\circ\text{C}$  de temperatura. En caso contrario el material filtrado es desechado según Procedimiento Patrón de Operación (PPO) 2.14.009.03 [13]

### Filtración esterilizante empleando filtros de membrana plana

El proceso de filtración es similar al descrito en el epígrafe anterior (Figura 2), pero las operaciones se

Figura 1. Principales etapas del proceso de producción del IFA de la vacuna Gavac®.



realizan dentro de una cabina de flujo laminar horizontal, previamente higienizada con una solución de etanol al 70% y esterilizada con luz ultravioleta por 20 minutos [15]. Antes y durante el proceso de filtración esterilizante se realizan controles microbiológicos ambientales, mediante la ubicación de placas abiertas conteniendo agar triptona soya en el interior del flujo laminar, con el objetivo de monitorear la esterilidad del proceso. Al concluir se toman muestras del filtrado obtenido para analizar su calidad mediante las características organolépticas, proteínas totales, pureza, pH esterilidad y contenido de timerosal, según la norma NP 4046 [14]. De cumplir con las especificaciones de calidad, los frascos de polipropileno conteniendo la solución filtrada son almacenados en una cámara frigorífica operando a  $-20 \pm 2^\circ\text{C}$  de temperatura, hasta el momento de la formulación del inmunógeno Gavac®. En caso contrario, el material filtrado es desechado según PPO 2.14.009.03 [13].

### Descripción del proceso de filtración esterilizante propuesto empleando cartuchos de filtración Sartobran® P

El proceso de filtración esterilizante propuesto empleando cartuchos Sartobran® P se lleva a cabo en el interior de una cabina de flujo laminar horizontal, a través del arreglo mostrado en la Figura 3. Primeramente, se vierte la solución de proteínas a filtrar en frascos de polipropileno de 10 L de capacidad, y a continuación se conecta uno de los extremos de la manguera de alimentación a la conexión de entrada del cartucho Sartobran® P, luego se inserta el cuerpo de la misma en el cabezal de la bomba peristáltica, y por último se introduce el otro extremo en el frasco que contiene la solución a filtrar. Por su parte, un extremo de la manguera de descarga es conectado a la salida del cartucho, mientras que el extremo restante es introducido en el frasco de polipropileno de 10 L que almacenará la solución filtrada. Posteriormente se conecta la bomba peristáltica, se efectúa un venteo previo y se ajusta el flujo de alimentación en  $\pm 200$  mL/min. Concluido el proceso de filtración se procede a tomar muestra del filtrado obtenido para efectuar los ensayos de calidad requeridos de acuerdo con el proceso de filtración realizado. En caso de realizar la filtración no estéril, se llevan a cabo los 2 ensayos de calidad establecidos en el NP 4285 [12], mientras que en caso de efectuar la filtración estéril se efectúan los 6 ensayos de calidad requeridos según NP 4046 [14]. De cumplir con cada uno de los ensayos de calidad

Figura 2. Esquema de la instalación del sistema de filtración no estéril empleando filtro de membranas planas

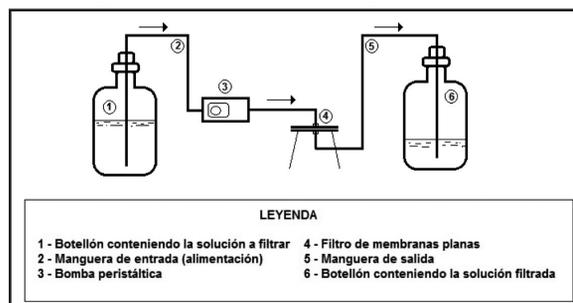
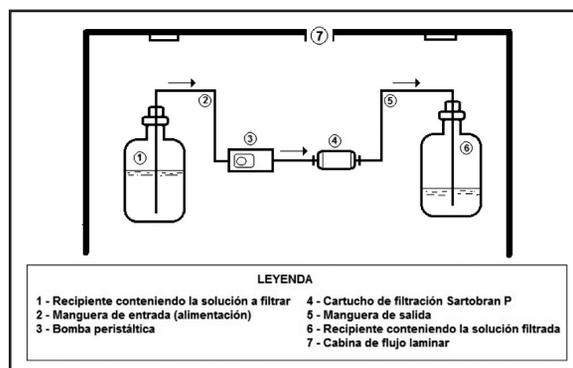


Figura 3. Esquema de la instalación del sistema de filtración estéril empleando cartucho de filtración Sartobran® P.



efectuados según el proceso de filtración, los frascos de polipropileno conteniendo la solución filtrada son finalmente almacenados en una cámara frigorífica a  $-20 \pm 2^\circ\text{C}$  de temperatura. Si el lote de IFA filtrado no cumple con las especificaciones de calidad es desechado según PPO 2.14.009.03 [13]

## PRINCIPALES ENSAYOS DE CALIDAD EFECTUADOS A LOS PRODUCTOS OBTENIDOS DURANTE LA FILTRACIÓN

**Características organolépticas.** Para llevar a cabo la evaluación de las características organolépticas se siguen los pasos descritos en el PPO 4.09.140.98 [16]. Se utiliza un gabinete de revisión con fondo blanco y negro, equipado con lámparas fluorescentes de 20 W, las cuales mantengan la iluminación del punto de inspección en una intensidad mínima entre 2000 y 3750 lux. La muestra a evaluar se observa a través de la luz de la lámpara de revisión, girándola durante 5 segundos en todos los sentidos sobre cada uno de los fondos del gabinete de revisión. Debe presentar carac-

terísticas de líquido transparente de color amarillo, sin partículas en suspensión. Se rechaza el lote si al menos 1 de las unidades analizadas no cumple con las características organolépticas del producto que se analiza.

**Concentración de proteínas totales.** La concentración de proteínas totales se determina mediante el ensayo de Lowry según PPO 4.09.002.91 [17], y su valor debe ser igual o mayor que 1 mg/mL para aceptar el lote.

**Porcentaje (%) de pureza de la proteína Bm86.** El porcentaje de pureza de la proteína Bm86 se determina mediante el método SDS-PAGE según PPO 2.31.272.10 [18], en donde la banda de 89 kDa debe tener una pureza igual o mayor del 85%.

**pH.** Se toman 3 muestras de 10 mL cada una y se le mide el valor de pH en un medidor digital de pH (Mettler Toledo®, modelo Seven Compact PH/ION S220). Se determina el promedio de los 3 valores obtenidos para obtener el resultado final de pH de la muestra evaluada [19].

**Esterilidad.** El ensayo de esterilidad se realiza de acuerdo al procedimiento descrito en el PPO 2.31.700.97 [20]. Inicialmente, 2 mL de la muestra a analizar se disuelven en 200 mL de una solución dispersante contentiva de peptona bacteriológica, Tween 80 y agua reactivo tipo II. Luego, la mezcla resultante se agrega a razón de 1:10 v/v a frascos Erlenmeyers que contienen Caldo Triptona Soya, y a erlenmeyers que contienen Medio Tioglicolato, respectivamente. Los frascos con Medio Tioglicolato se incuban durante 14 días a 30–35°C de temperatura; y los contentivos de Caldo Triptona Soya se incuban a 20–25°C durante el mismo período de tiempo que el anterior. Los cultivos se observan los días 3, 5, 7, 9, 11 y 14 para detectar la presencia de turbidez, la formación de bio - películas, grumos o cualquier otra forma de crecimiento microbiano. Las muestras cumplen con los requerimientos de calidad si no se observa ninguna forma de crecimiento bacteriano en los cultivos.

**Contenido de timerosal.** Se basa en la determinación indirecta de timerosal mediante la cuantificación espectrofotométrica del mercurio a 490 nm, el cual forma un complejo con la Ditizona. Su separación se realiza posteriormente mediante un paso de extracción con cloroformo, según PPO 2.31.226.11 [21].

### **Factibilidad de emplear los cartuchos Sartobran P® durante la sub-etapa de filtración no estéril de la etapa de purificación**

Se realizó la filtración no estéril de 6 lotes consecutivos de concentrados purificados de la proteína Bm86 (14.1206-2; 14.1206-3; 14.1206-4; 14.1206-5; 14.1302-1 y 14.1302-2) utilizando cartuchos de filtración Sartobran® P. En paralelo, otros seis lotes de la proteína Bm86 purificada (14.1101-1; 14.1101-2; 14.1101-3; 14.1101-4; 14.1101-5 y 14.1101-6) se filtraron mediante filtros de membrana plana. A los filtrados obtenidos de cada lote se le determinaron los 2 ensayos de calidad que se describen a continuación: (1) concentración de proteínas totales (PPO 2.31.246.10) el cual presenta un Límite de Aceptación (LA)  $\geq$  1mg/mL, y (2) Pureza de la proteína Bm86 (SDS PAGE) (PPO 4.32.050.99) con LA  $\geq$  85%. Ambos ensayos de calidad están definidos en la norma NP 4285 [12]. Luego, se compararon los resultados obtenidos por ambos métodos. Por último se determinó el tiempo de filtración total para ambos tipos de filtración evaluados, y se compararon entre sí los resultados obtenidos.

### **Factibilidad de emplear los cartuchos Sartobran P® en la etapa de filtración estéril**

Para determinar la factibilidad del empleo de los cartuchos Sartobran® P durante la etapa de filtración estéril, se elaboraron dos variantes:

Variante 1: Procesamiento de 3 lotes consecutivos (14.1206-2, 14.1206-3 y 14.1206-4) mediante cartuchos Sartobran® P, efectuando tanto la filtración primaria como la filtración esterilizante.

Variante 2: Procesamiento de 3 lotes consecutivos (14.1206-5, 14.1302-1 y 14.1302-2) mediante cartuchos Sartobran® P, pero realizando solamente la filtración esterilizante (es decir, sin efectuar la filtración primaria).

Al filtrado obtenido en todos los lotes procesados para ambas variantes se le efectuó los siguientes ensayos de calidad mostrados en el Cuadro 1, los cuales se encuentran establecidos en la norma NP 4046 [14].

Se determinaron además los tiempos de filtración de cada una de las dos variantes consideradas, y se compararon los resultados obtenidos con respecto a los resultados de tiempos de filtración registrados

durante el procesamiento de 3 lotes consecutivos (14.1101-1; 14.1101-2 y 14.1101-3) utilizando filtros de membrana plana. Se determinó también el volumen de pérdida de producto obtenido en ambas variantes evaluadas, y se compararon los resultados alcanzados con relación al volumen de pérdida de producto obtenido para los tres lotes procesados con filtros de membrana plana. Por último se efectuó una comparación de los resultados obtenidos en cuanto a los 6 ensayos de calidad descritos en el Cuadro 1, entre los 6 lotes procesados para las dos variantes propuestas utilizando cartuchos Sartobran® P, y los 3 lotes filtrados empleando filtros de membrana plana.

### Cálculos económicos

Se consideraron los costos por concepto de consumo de electricidad y de materiales de filtración por ser los más significativos durante el proceso.

#### Costo por concepto de consumo de electricidad

Existen dos equipos que se emplean en las diferentes etapas consideradas, los cuales son la bomba peristáltica y el flujo laminar. De esta manera, las bombas peristálticas empleada en las etapas de filtración no estéril, filtración primaria y filtración esterilizante presenta un consumo nominal de energía de 0,55 kW, mientras que el flujo laminar empleado en la etapa de filtración esterilizante tiene un consumo nominal de energía de 1,10 kW.

El costo relacionado con el consumo de energía por un equipo se determina según la siguiente expresión:

$$C_{energía(i)} = t_{op(i)} \cdot P_i \cdot C_{el} \quad (\text{Ec. 1})$$

Dónde:

$t_{op(i)}$ : Tiempo de operación del equipo  $i$  (h)

$P_i$ : Potencia nominal del equipo  $i$  (kW)

$C_{el}$ : Costo de la electricidad = 1,20 \$/kWh

$C_{energía(i)}$ : Costo debido al consumo de electricidad del equipo  $i$  (\$)

De esta manera, el costo total relacionado con el consumo de energía de todos los equipos utilizados, según el tipo de filtración tomado en cuenta, será:

$$C_{energía(tipo)} = \sum_1^n C_{energía(i)} \quad (\text{Ec. 2})$$

Dónde:

$C_{energía(tipo)}$ : Costo total por consumo de energía de todos los equipos utilizados según el tipo de filtración tomando en cuenta (filtros de membrana plana o cartuchos Sartobran® P)

$n$ : Cantidad total de equipos utilizados en el tipo de filtración considerado.

#### Costo por concepto de consumo de material de filtración.

El costo por concepto de consumo de materiales de filtración se calculó a partir del costo unitario, en donde un pre-filtro de membrana plana presenta un costo unitario de \$8,08, un filtro de membrana plana de 0,45  $\mu\text{m}$  cuesta \$ 4,04, un filtro de membrana plana cuesta \$ 4,12, y un cartucho de filtración Sartobran® P cuesta \$ 221,91.

**Cuadro 1.** Ensayos de calidad establecidos para el producto obtenido durante la etapa de filtración estéril de la vacuna Gavac® según NP 4046.

Ensayo	Referencia	Límite de aceptación
Características organolépticas	PPO 4.09.140.98	Líquido transparente de color amarillo, sin partículas en suspensión
Proteínas totales	PPO 4.09.002.91	$\geq 1$ mg/mL
Pureza	PPO 4.09.004.91	Banda de 89 kDa $\geq 85\%$ de pureza
pH	PPO 2.31.235.97	Entre 7,8 y 8,5
Esterilidad	PPO 4.09.028.92	Pasa la prueba
Contenido de timerosal	PPO 2.31.226.11	$\leq 0,05$ mg/mL

El costo total relacionado con el consumo de material de filtración por lote y por etapa se determina según la siguiente ecuación:

$$C_{mat(etapa)} = \sum_{i=1}^n (Q_{mat(i)} \cdot P_{mat(i)}) \quad (\text{Ec. 3})$$

Dónde:

$Q_{mat(i)}$ : Cantidad de material de filtración  $i$  consumido por lote (U/lote)

$P_{mat(i)}$ : Costo unitario del material de filtración  $i$  (\$/U)

$n$ : Tipo(s) de material(es) de filtración consumido(s) en la etapa evaluada.

$n = 3$  cuando se emplean pre-filtro de membrana plana, filtro de membrana plana de 0,45  $\mu\text{m}$  y filtro de membrana plana de 0,20  $\mu\text{m}$ ;

$n = 1$  cuando se emplean cartuchos de filtración Sartobran® P.

$C_{mat(etapa)}$ : Costo total debido al consumo de los materiales de filtración por lote en la etapa de filtración evaluada (\$/lote).

Luego, el costo total por lote debido al consumo de material de filtración en todas las etapas incluidas según el tipo de filtración tomado en cuenta será:

$$C_{mat(tipo)} = \sum_{i=1}^s C_{mat(etapa)} \quad (\text{Ec. 4})$$

Dónde:

$C_{mat(tipo)}$ : Costo total por lote a causa del consumo del material filtrante de acuerdo al tipo de filtración considerado (\$/lote)

$s$ : Cantidad de etapas incluidas (filtración no estéril, filtración primaria y/o filtración esterilizante) en el tipo de filtración evaluado (filtros de membrana plana o cartuchos Sartobran® P).

## RESULTADOS

### Uso del Sartobran® P en la sub-etapa de filtración no estéril

El Cuadro 2 muestra los resultados obtenidos de los dos ensayos de calidad considerados (concentración de proteínas totales y % de pureza de la proteína Bm86) para todos los lotes procesados tanto mediante filtros de membrana plana como cartuchos de filtración Sartobran® P, durante la sub-etapa de filtración no estéril de la etapa de purificación.

Según se puede observar en el Cuadro 2, todos los lotes procesados empleando los cartuchos Sartobran® P, cumplieron con los criterios o límites de aceptación establecidos para esta etapa según norma NP 4285.

También se puede observar que los valores promedios obtenidos tanto de la concentración de proteínas totales como el % de pureza de la proteína Bm86 aumentan para los lotes procesados mediante cartuchos Sartobran® P. Lo anterior influye positivamente

**Cuadro 2.** Resultados de concentración de proteínas y pureza para ambos tipos de filtración evaluados en la sub-etapa de filtración no estéril de la etapa de purificación.

Filtros de membrana plana			Cartuchos Sartobran® P		
Lotes	Proteínas totales (mg/mL)	Pureza (%)	Lotes	Proteínas totales (mg/mL)	Pureza (%)
14.1101-1	1,615	95,22	14.1206-2	1,727	95,99
14.1101-2	1,654	95,18	14.1206-3	1,471	95,19
14.1101-3	1,322	95,99	14.1206-4	1,794	95,29
14.1101-4	1,398	95,32	14.1206-5	1,493	95,12
14.1101-5	1,526	94,13	14.1302-1	1,432	94,48
14.1101-6	1,571	95,26	14.1302-2	1,951	95,31
Promedio	1,51433	95,1833	Promedio	1,64467	95,23
Desviación Estándar	0,129239	0,597684	Desviación Estándar	0,210385	0,482452
Coficiente Variación	8,53437%	0,62793%	Coficiente Variación	12,792%	0,50661%

en el proceso de fabricación global de la vacuna Gavac<sup>®</sup>, debido a que el aumento de la cantidad de proteína de interés (Bm86) a obtener al final de la etapa de purificación traerá consigo un incremento de la cantidad de bulbos producidos al finalizar la etapa de formulación y, con ello, un incremento en las ventas de dosis de vacuna terminada a comercializar.

En el Cuadro 3 se muestran los resultados obtenidos en cuanto a volumen a filtrar y tiempo de filtración total para todos los lotes procesados mediante ambos tipos de filtración.

De acuerdo con el Cuadro 3, el tiempo de filtración de un lote en la subetapa de filtración no estéril de la etapa de purificación se reduce desde un promedio de 46,15 min (~ 0,77 h) para el filtro de membrana plana, hasta 35,6533 min (~ 0,59 h) para los cartuchos Sartobran<sup>®</sup> P, es decir, el tiempo de filtración de esta sub-etapa se reduce 1,29 veces si se emplean las cápsulas Sartobran<sup>®</sup> P, a pesar de que el volumen

a filtrar utilizando los cartuchos Sartobran<sup>®</sup> P superó en aproximadamente 1,4 veces al que se filtró en el sistema de membrana plana.

### Etapa de filtración estéril

En el Cuadro 4 se pueden observar los resultados obtenidos con respecto al uso del Sartobran<sup>®</sup> P durante los procesos de filtración primaria y esterilizante (Variante 1). En el Cuadro 5 se muestran resultados alcanzados con el uso del Sartobran<sup>®</sup> P para la Variante 2, en la cual solamente se realizó la filtración esterilizante. Por último, en el Cuadro 6 se exponen los resultados de volumen a filtrar, tiempo de filtración, volumen final de filtrado y volumen total de pérdida de producto para la variante de filtración actual empleando filtros de membrana plana.

Comparando los resultados mostrados en el Cuadro 4 con los del Cuadro 6, se puede observar que, para volúmenes a filtrar relativamente iguales entre sí, el

**Cuadro 3.** Comparación de los tiempos de filtración obtenidos para ambos tipos de filtración durante la sub-etapa de filtración no estéril de la etapa de purificación.

Filtros de membrana plana			Cartuchos Sartobran P <sup>®</sup>		
Lotes	Volumen a filtrar (L)	Tiempo (min)	Lotes	Volumen a filtrar (L)	Tiempo (min)
14.1101-1	12,70	40,13	14.1206-2	18,82	47,05
14.1101-2	12,20	59,78	14.1206-3	16,56	50,01
14.1101-3	14,00	45,08	14.1206-4	16,91	29,93
14.1101-4	11,40	49,93	14.1206-5	14,90	19,97
14.1101-5	8,20	41,98	14.1302-1	15,99	36,94
14.1101-6	7,03	40,00	14.1302-2	10,04	30,02
Promedio	10,9217	46,15	Promedio	15,5367	35,6533
Desviación Estándar	2,72228	7,65065	Desviación Estándar	2,98455	11,3852
Coeficiente Variación	24,9255%	16,5778%	Coeficiente Variación	19,2097%	31,933%
Total	65,53	276,90	Total	93,22	213,92

**Cuadro 4.** Resultados obtenidos de volumen a filtrar, tiempo de filtración, volumen final de filtrado y volumen total de pérdida de producto para la Variante 1.

Lotes	Filtración primaria		Filtración esterilizante		Volumen de muestra (L)	Volumen final de filtrado (L)	Volumen total de pérdida de producto (mL)
	Volumen a filtrar (L)	Tiempo (min)	Volumen a filtrar (L)	Tiempo (min)			
14.1206-2	18,82	35	18,64	40	0,12	18,29	410
14.1206-3	16,56	35	16,36	30	0,12	16,17	270
14.1206-4	16,91	31	16,83	35	0,12	16,63	160
Promedio	17,43	33,67	17,28	35	0,12	17,03	280,00
Total	52,29	101	51,83	105	0,36	51,09	840,00

tiempo de filtración de la sub-etapa de filtración primaria se reduce desde 66,67 min (1,11 h) utilizando los filtros de membrana plana, hasta 33,67 min (0,56 h) cuando se emplean los cartuchos de filtración Sartobran® P. Es decir, el tiempo de la sub-etapa de filtración primaria se reduce 1,98 veces si se emplean cartuchos Sartobran® P. También ocurre una reducción del tiempo de filtración en la subetapa de filtración esterilizante desde 53,67 min (0,89 h) empleando filtros de membrana plana hasta 35 min (0,58 h) usando cartuchos Sartobran® P; esto es, el tiempo de la subetapa de filtración esterilizante disminuye 1,53 veces si se utilizan cartuchos Sartobran® P. Por último se obtiene una reducción del volumen total promedio de pérdida de producto, desde 500 mL (1,5 L en total) cuando se emplean filtros de membrana plana, hasta 280 mL (0,84 L en total) cuando se utilizan los cartuchos Sartobran® P. En resumen, el tiempo de filtración total y el volumen total de pérdida de producto de la etapa de filtración estéril (incluyendo las subetapas de filtración primaria y esterilizante) se reduce 1,752 veces y 1,786 veces respectivamente, si se emplean los cartuchos de filtración Sartobran® P.

En el Cuadro 7 se exponen los resultados de los ensayos de calidad efectuados tanto para los 6 lotes procesados durante las dos variantes estudiadas, como los 3 lotes procesados empleando filtros de membrana plana. En la misma se puede observar que el empleo de las cápsulas Sartobran® P no afectó la calidad del filtrado obtenido en ninguno de los lotes procesados, lo cual indica que es factible sustituir los filtros de membrana plana por los cartuchos de filtración Sartobran® P en la etapa de filtración estéril del proceso productivo de la vacuna Gavac®. Los resultados mostrados en el Cuadro 7 permiten concluir además que se puede eliminar la sub-etapa de filtración primaria siempre y cuando se empleen los cartuchos de filtración Sartobran® P, ya que los resultados de los ensayos de calidad realizados al filtrado obtenido durante la Variante 2 (es decir, llevando a cabo únicamente la filtración esterilizante) estuvieron dentro de los límites establecidos según la norma NP 4046. Los resultados obtenidos en esta etapa concuerdan con aquellos alcanzados en [4], en donde se recomienda el empleo de cápsulas de filtración Sartobran® P para llevar a cabo la filtración esterilizante del IFA de la vacuna contra la hepatitis B recombinante (IFA-HBsAg), concluyendo que este medio de filtración puede retener la contaminación bacteriana en las condiciones reales del proceso.

## Consumo de material de filtración

Durante los procesos de filtración efectuados se pudo comprobar que se puede emplear hasta un cartucho de filtración Sartobran® P por cada tres lotes, mientras que se necesitan consumir 4 filtros de membrana plana de 0,2 µm y 0,45 µm, respectivamente, así como 7 pre-filtros, para hacerle frente a la demanda de filtración de un lote.

## Comparación de los costos obtenidos debido al consumo de electricidad y material de filtración por lote para ambos métodos de filtración evaluados

En los Cuadros 8 y 9 se muestran los resultados de costo obtenidos debido al consumo de electricidad y material de filtración por lote, respectivamente, para ambos métodos de filtración evaluados. Observar que en ambas tablas no se toma en cuenta el empleo de los cartuchos Sartobran® P en la sub-etapa de filtración primaria de la etapa de filtración estéril, ya que según se demostró con anterioridad, se puede eliminar la misma sin afectar los principales parámetros de calidad del producto filtrado obtenido.

Tomando en cuenta los resultados mostrados en el Cuadro 8, se puede concluir que el empleo de los cartuchos Sartobran® P reduce el costo total por consumo de electricidad en un 48,67%. De esta manera, el ahorro económico total obtenido por lote por concepto de electricidad no consumida a causa del empleo de los cartuchos Sartobran® P en todas las etapas de filtración consideradas será de:

$$\begin{aligned}A_{energía} &= C_{energía(membrana)} - C_{energía(Sartobran)} \\A_{energía} &= \$ 3,013 - \$ 1,546 \\A_{energía} &= \$ 1,467/\text{lote}.\end{aligned}$$

Acorde a los resultados mostrados en el Cuadro 9, el costo debido al consumo de material de filtración se reduce en un 44,77% a causa del uso de las cápsulas Sartobran® P en las etapas de filtración evaluadas, obteniéndose un ahorro económico total por lote igual a:

$$\begin{aligned}A_{material} &= C_{mat(membrana)} - C_{mat(Sartobran)} \\A_{material} &= \$ 267,60 - \$ 147,80 \\A_{material} &= \$ 119,80/\text{lote}.\end{aligned}$$

**Cuadro 5.** Resultados obtenidos de volumen a filtrar, tiempo de filtración, volumen final de filtrado y volumen total de pérdida de producto para la Variante 2.

Lotes	Filtración esterilizante		Volumen de muestra (L)	Volumen final de filtrado (L)	Volumen total de pérdida de producto (mL)
	Volumen a filtrar (L)	Tiempo (min)			
14.1206-5	14,90	25,03	0,12	14,50	280
14.1302-1	15,99	37,26	0,12	15,74	130
14.1302-2	10,04	14,96	0,12	9,81	105
<b>Promedio</b>	<b>13,64</b>	<b>25,75</b>	<b>0,12</b>	<b>13,35</b>	<b>171,67</b>
<b>Total</b>	<b>40,93</b>	<b>77,25</b>	<b>0,36</b>	<b>40,05</b>	<b>515,00</b>

**Cuadro 6.** Resultados obtenidos de volumen a filtrar, tiempo de filtración, volumen final de filtrado y volumen total de pérdida de producto para la variante de filtración actual empleando filtros de membrana plana.

Lotes	Filtración primaria		Filtración esterilizante		Volumen de muestra (L)	Volumen final de filtrado (L)	Volumen total de pérdida de producto (mL)
	Volumen a filtrar (L)	Tiempo (min)	Volumen a filtrar (L)	Tiempo (min)			
14.1101-1	11,23	65	10,95	36	0,12	10,72	390
14.1101-2	19,90	60	19,43	55	0,12	19,24	540
14.1101-3	19,12	75	18,76	70	0,12	18,43	570
<b>Promedio</b>	<b>16,75</b>	<b>66,67</b>	<b>16,38</b>	<b>53,67</b>	<b>0,12</b>	<b>16,13</b>	<b>500,00</b>
<b>Total</b>	<b>50,25</b>	<b>200,00</b>	<b>49,14</b>	<b>161,00</b>	<b>0,36</b>	<b>48,39</b>	<b>1500,00</b>

**Cuadro 7.** Resultados de los ensayos de calidad realizados a los lotes en estudio para las variantes de filtración propuestas.

Ensayos /Lotes	Características organolépticas	Concent. proteínas totales (mg/mL)	Pureza (%)	pH	Esterilidad	Contenido de timerosal
<b>Variante 1</b>						
14.1206-2	Pasa la prueba	2,840	94,34	8,14	Pasa la prueba	0,020
14.1206-3	Pasa la prueba	2,678	94,08	8,13	Pasa la prueba	0,019
14.1206-4	Pasa la prueba	2,608	94,90	8,12	Pasa la prueba	0,018
<b>Variante 2</b>						
14.1206-5	Pasa la prueba	2,875	94,70	8,12	Pasa la prueba	0,029
14.1302-1	Pasa la prueba	2,353	95,86	8,19	Pasa la prueba	0,023
14.1302-2	Pasa la prueba	2,583	95,45	8,17	Pasa la prueba	0,019
<b>Filtros de membrana plana</b>						
14.1101-1	Pasa la prueba	2,861	95,27	8,14	Pasa la prueba	0,030
14.1101-2	Pasa la prueba	3,490	94,67	8,09	Pasa la prueba	0,029
14.1101-3	Pasa la prueba	3,288	94,97	8,07	Pasa la prueba	0,029

**Cuadro 8.** Resultados de costo obtenidos debido al consumo de electricidad por lote para ambos tipos de filtración evaluados.

Etapa	Equipo	Consumo de energía (kW)	Tiempo (h/lote)	Costo (\$/lote)
<b>Filtros de membrana plana</b>				
Filtración no estéril	Bomba peristáltica	0,55	0,769	0,508
Filtración primaria	Bomba peristáltica	0,55	1,111	0,733
Filtración esterilizante	Bomba peristáltica	0,55	0,895	0,591
	Flujo laminar	1,1	0,895	1,181
<b>Total [C<sub>energía(membrana)</sub>]</b>				<b>3,013</b>
<b>Cartuchos de filtración Sartobran® P</b>				
Filtración no estéril	Bomba peristáltica	0,55	0,594	0,392
Filtración esterilizante	Bomba peristáltica	0,55	0,583	0,385
	Flujo laminar	1,1	0,583	0,769
<b>Total [C<sub>energía(Sartobran)</sub>]</b>				<b>1,546</b>

**Cuadro 9.** Resultados de costo obtenidos debido al consumo de material de filtración por lote para ambos métodos de filtración considerados.

Etapa	Tipo de filtro	Cantidad (U/lote)	Costo unitario (\$/U)	Costo (\$/lote)
<b>Filtros de membrana plana</b>				
Filtración no estéril	Pre-filtro	7	8,08	56,56
	Filtro de 0,45 µm	4	4,04	16,16
	Filtro de 0,20 µm	4	4,12	16,48
Filtración primaria	Pre-filtro	7	8,08	56,56
	Filtro de 0,45 µm	4	4,04	16,16
	Filtro de 0,20 µm	4	4,12	16,48
Filtración esterilizante	Pre-filtro	7	8,08	56,56
	Filtro de 0,45 µm	4	4,04	16,16
	Filtro de 0,20 µm	4	4,12	16,48
<b>Total [<math>C_{mat(membrana)}</math>]</b>				267,60
<b>Cartuchos de filtración Sartobran® P</b>				
Filtración no estéril	Cartucho Sartobran® P	0,333	221,91	73,90
Filtración esterilizante	Cartucho Sartobran® P	0,333	221,91	73,90
<b>Total [<math>C_{energía(Sartobran)}</math>]</b>				147,80

### Ahorro económico total por lote

Considerando los resultados obtenidos, el ahorro económico total obtenido por lote por concepto de reducción del consumo de energía eléctrica y de material de filtración a causa del empleo de las cápsulas de filtración Sartobran® P en las etapas de filtración evaluadas será de:

$$A_{total} = A_{energía} + A_{material}$$

$$A_{total} = 1,467 + 119,80$$

$$A_{total} = \$ 121,267/\text{lote}$$

### Ahorro económico por concepto de reducción del volumen de pérdida de producto al emplear los cartuchos Sartobran® P en la etapa de filtración estéril

Según se estableció con anterioridad, la introducción de los cartuchos de filtración Sartobran® P en la etapa de filtración estéril permite reducir el volumen total de pérdida de producto por lote desde 1500 mL hasta 840 mL, para un ahorro total 660 mL. Tomando en cuenta las dosis equivalentes recuperadas por este concepto, y el costo de unitario de estas, se obtendrá un ahorro económico total por lote de \$ 129,5 debido a volumen de producto no derramado a causa del empleo de las cápsulas Sartobran® P durante la etapa de filtración estéril.

### CONCLUSIONES

El empleo de los cartuchos de filtración Sartobran® P permite excluir la sub-etapa de filtración primaria de la etapa de filtración estéril.

Se obtiene un ahorro económico total de \$ 121,267/ lote por concepto de reducción tanto del consumo de energía eléctrica como material de filtración a causa de la introducción de los cartuchos de filtración Sartobran® P durante las etapas de filtración evaluadas.

Se logra un ahorro económico total de \$ 129,5/lote por motivo de volumen de producto no derramado a causa del empleo de las cápsulas Sartobran® P en la etapa de filtración estéril.

Se pueden emplear los cartuchos de filtración Sartobran® P tanto en la sub-etapa de filtración no estéril de la etapa de filtración como en las sub-etapas de filtración primaria y esterilizante de la etapa de filtración estéril, sin afectar los principales parámetros de calidad del producto final obtenido.

### REFERENCIAS

- [1] SULTANA, Y. Pharmaceutical microbiology and biotechnology-sterilization methods and princi-

- ples. New Delhi (India): Department of Pharmaceuticals, Faculty of Pharmacy, 2017, 21 p.
- [2] SARTORIUS. Sartorius Biotechnology: Filter Cartridges. Goettingen (Germany): Sartorius AG, 2017, 20 p.
- [3] PEIXOTO, C. *et al.* Towards purification of adenoviral vectors based on membrane technology. *Biotechnology Progress*, 24(6), 2008, p. 1290-1296.
- [4] BELDARRAÍN, A. *et al.* Evaluación de la filtración esterilizante del IFA-HBsAg. *Biología Aplicada*, 26(3), 2009, p. 237-243.
- [5] HEIMBÜRGER, L.E. *et al.* Methyl mercury distributions in relation to the presence of nano- and picophytoplankton in an oceanic water column (Ligurian Sea, North-western Mediterranean). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74, 2010, p. 5549-5559.
- [6] BOYE, M. *et al.* Distributions of dissolved trace metals (Cd, Cu, Mn, Pb, Ag) in the southeastern Atlantic and the Southern Ocean. *Biogeosciences*, 9, 2012, p. 3231-3246.
- [7] LIU, H.F. *et al.* Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. *mAbs*, 2(5), 2010, p. 480-499.
- [8] STAHLHUT, S.G. *et al.* Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae, *FEMS. Immunology and Medical Microbiology*, 65, 2012, p. 350-359.
- [9] MAIER, M. *et al.* In vitro dynamic model of a catheterized bladder and biofilm assay. *Bio-protocol*, 5(2), 2015, p. 1-9.
- [10] LAURSEN, I.A. *et al.* Development, manufacturing and characterization of a highly purified, liquid immunoglobulin G preparation from human plasma. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 41, 2014, p. 205-212.
- [11] TSENG, Y.F. *et al.* A fast and efficient purification platform for cell-based influenza viruses by flow-through chromatography. *Vaccine*, 2017, p. 1-7.
- [12] CUBA. CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGIA (CIGB). Filtrado no estéril (Gavac®). NP 4285. Camagüey (Cuba): Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, 2016.
- [13] CUBA. CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGIA (CIGB). Tratamiento de materiales contaminados, desechos y productos no conformes generados durante la producción, el control, el almacenamiento y la comercialización de Gavac®. PPO 2.14.009.03. Camagüey (Cuba): Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, 2003.
- [14] CUBA. CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGIA (CIGB). Ingrediente Farmacéutico Activo (Antígeno Bm86) de Gavac. NP 4046. Camagüey (Cuba): Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), 2016.
- [15] CUBA. CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGIA (CIGB). Filtración estéril del Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) del Inmunógeno Gavac®. PPO 2.14.432.96. Camagüey (Cuba): Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), 1996.
- [16] CUBA. CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGIA (CIGB). Determinación de las características organolépticas de un producto. PPO 4.09.140.98. Camagüey (Cuba): Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), 1998.
- [17] CUBA. CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGIA (CIGB). Determinación de la concentración de proteínas. Método de Lowry. PPO 4.09.002.91. Camagüey (Cuba): Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, 1991.
- [18] CUBA. CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGIA (CIGB). Lectura de bandas en Geles de poliacrilamida utilizando el software ScanProt. PPO 2.31.272.10. Camagüey (Cuba): Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), 2010.
- [19] CUBA. CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGIA (CIGB). Medición y ajuste de Ph. PPO 2.31.2.15.97. Camagüey (Cuba): Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, 1997.
- [20] CUBA. CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGIA (CIGB). Ensayo de esterilidad al Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) y al inmunógeno Gavac®. PPO 2.31.700.97. Camagüey (Cuba): Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, 1997.
- [21] CUBA. CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGIA (CIGB). Determinación de la concentración de Timerosal. PPO 2.31.226.11. Camagüey (Cuba): Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, 2011.