

Tabla 29: Resultados experimentales para la cepa B/Brisbane/60/2008.....

Tabla 30: Resultados experimentales para la cepa B/Massachusetts/2/2012.....

Tabla 31: Resumen de los resultados de validación, prueba de actividad enzimática de la neuraminidasa.....38

Tabla 32: Especificidad, resultados de DO39

Tabla 33: Límite de detección: última concentración para la que se detecta la presencia de actividad enzimática de NA (UN/mL)39

Tabla 34: Límite de detección: Cálculos para el DS de la cepa A/H1N141

Tabla 35: Límite de detección: Cálculos para el DS de la cepa A/H3N241

Tabla 36: Límite de detección: Cálculos para el DS de la cepa B41

Tabla 37: Resumen de los resultados de validación, contenido de octoxinol 942

Tabla 38: Especificidad, recuperación calculada entre la cantidad medida de octoxinol 9 y la cantidad teórica.....43

Tabla 39: Resultados de especificidad, recuperación promedio y límites de confianza43

Tabla 40: Precisión, concentraciones de octoxinol -944

Tabla 41: Resultados de repetibilidad y precisión intermedia.....44

Tabla 42: Linealidad, concentraciones medidas de octoxinol 9 ($\mu\text{g/mL}$)45

Tabla 43: Recuperación calculada entre la concentración medida y la concentración teórica de octoxinol 946

Tabla 44: Resultados de exactitud.....47



Lista de figuras

Figura 1: Gráfico de linealidad, cepa A/H1N1	15
Figura 2: Gráfico de linealidad, cepa A/H3N2.....	17
Figura 3: Gráfico de linealidad, cepa B/linaje Victoria.....	19
Figura 4: Gráfico de linealidad, cepa B/linaje Yamagata.....	21
Figura 5: Gráfico de linealidad, contenido de octoxinol 9.....	46



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

1 Introducción

Esta sección presenta un resumen detallado de los informes de validación de los métodos analíticos utilizados para la liberación del principio activo (DS) de la vacuna antigripal tetravalente (QIV) cuando la prueba no se lleva a cabo de conformidad con la Farmacopea Europea o cuando la prueba no está detallada en la Farmacopea Europea.

2 Método analítico detallado en la Farmacopea Europea

Las siguientes pruebas se realizan conforme a la Farmacopea Europea:

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

No se aporta información de validación para este método farmacopeico.

3 Pruebas no descritas o no detalladas en la Farmacopea Europea

3.1 Contenido de antígeno hemaglutinina

3.1.1 Introducción

El contenido de antígeno hemaglutinina (HA) del principio activo (DS) se determina por el método de inmunodifusión radial simple (SRID). El método utilizado para el control y la liberación del DS para las 4 cepas de QIV es el método clásico de SRID, que se describe en la sección 3.2.S.4.2 Procedimientos analíticos.

Dado que el método es un análisis cuantitativo, las diferentes características estudiadas para la validación son la especificidad, la precisión, la linealidad y la exactitud.

La validación del método de SRID se llevará a cabo según los requisitos de la ICH y de la directriz EMA/CHMP/BWP/310834/2012 en cada cambio de cepa (o cepa reordenante) y/o lote de reactivos.

3.1.2 Panorama

La prueba para la cuantificación del contenido de HA por SRID se ha validado en la etapa de DS, según las guías de la ICH, para las siguientes cepas gripales:



- A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1), lote FA528537
- A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2), lote FA523944
- B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria), lote FA518527
- B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata), lote FA525566

El contenido de antígeno HA se determina para cada cepa según un método específico para cada una basado en antisueros específicos de cada cepa y antígenos de referencia. El antisuero y el antígeno de las referencias proceden del NIBSC (Instituto Nacional de Control y Normas Biológicas) para las 3 cepas siguientes: A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1), A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2) y B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata). El antisuero y el antígeno de referencia para la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) proceden de la TGA (Administración de Artículos Terapéuticos). La identificación de los reactivos para cada cepa se indica a continuación.

- A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1): antígeno NIBSC 13/164, antisuero NIBSC 12/108
- A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2): antígeno NIBSC 13/116, antisuero NIBSC 13/178
- B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria): antígeno TGA 2011/89B, antisuero TGA AS397.
- B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata): antígeno NIBSC 13/134, antisuero NIBSC 13/182

3.1.3 Resumen de la validación

Dado que el método es un análisis cuantitativo, las diferentes características estudiadas son la especificidad, la linealidad y la precisión.

Los resultados de la validación, así como los criterios de aceptación, se resumen a continuación en la Tabla 1.



Tabla 1: Resumen de los resultados de la validación, método de SRID

Característica	Criterio de aceptación	Resultado												
Especificidad	Para el control negativo no se debe observar ningún anillo de precipitación. No hay presencia de anillos dobles. La intensidad del anillo es similar a la referencia evaluada en la misma placa.	Para el control negativo no se observa ningún anillo de precipitación para las 4 cepas. Ausencia de anillos dobles La intensidad del anillo es similar al anillo de referencia.												
Precisión	El intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para k = 2 corridas con n = 1 medición debe ser igual o menor que $x \pm 1,11$	El intervalo de confianza del 95% de la precisión intermedia para k = 2 corridas con n = 1 medición es menor que $x \pm 1,11$: <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <thead> <tr> <th colspan="4">Strains</th> </tr> <tr> <th>A/H1N1</th> <th>A/H3N2</th> <th>B B/Massachusetts</th> <th>B B/Brisbane</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>= 0.029; that is 1.07 in arithmetic</td> <td>= 0.018; that is : 1.04 in arithmetic</td> <td>= 0.032; that is: 1.08 in arithmetic</td> <td>= 0.025 that is : 1.06 in arithmetic</td> </tr> </tbody> </table> El redondeo recomendado para las 4 cepas es a la unidad	Strains				A/H1N1	A/H3N2	B B/Massachusetts	B B/Brisbane	= 0.029; that is 1.07 in arithmetic	= 0.018; that is : 1.04 in arithmetic	= 0.032; that is: 1.08 in arithmetic	= 0.025 that is : 1.06 in arithmetic
Strains														
A/H1N1	A/H3N2	B B/Massachusetts	B B/Brisbane											
= 0.029; that is 1.07 in arithmetic	= 0.018; that is : 1.04 in arithmetic	= 0.032; that is: 1.08 in arithmetic	= 0.025 that is : 1.06 in arithmetic											
Linealidad	$P_{\text{linealidad}} < 0,01$ $P_{\text{desviación}} = 0,05$	Después de un ajuste lineal de Y = concentración medida ($\mu\text{g/mL}$) en función de X = concentración teórica ($\mu\text{g/mL}$), en escala log-log, se observa la siguiente relación: <ul style="list-style-type: none"> • Cepa A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1): $P_{\text{linealidad}} < 0,0001$ $P_{\text{desviación de la linealidad}} = 0,99$ $Y = 0,066 + 0,975 \cdot X$ Rango de linealidad: [139,19-241,70] $\mu\text{g/mL}$ • Cepa A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2): $P_{\text{linealidad}} < 0,0001$ $P_{\text{desviación de la linealidad}} = 0,15$ $Y = 0,113 + 0,961 \cdot X$ Rango de linealidad: [147,64-241,88] $\mu\text{g/mL}$ • Cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria): $P_{\text{linealidad}} < 0,0001$ $P_{\text{desviación de la linealidad}} = 0,10$ $Y = 0,096 + 0,96 \cdot X$ Rango de linealidad: [152,32-248,24] $\mu\text{g/mL}$ • Cepa B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata): $P_{\text{linealidad}} < 0,0001$ $P_{\text{desviación de la linealidad}} = 0,99$ $Y = -0,192 + 1,097 \cdot X$ 												



		Rango de linealidad: [120,88-208,79] µg/mL
Exactitud	La recuperación porcentual promedio calculada para los seis niveles teóricos de concentración debe estar entre el 80 % y el 120 %.	Según el nivel de concentración, la recuperación porcentual promedio es: <ul style="list-style-type: none"> • <u>Cepa A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1):</u> 102,3 % [99,0 %-105,5 %] • <u>Cepa A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2):</u> 105,2 % [103,5 %-107,0 %] • <u>Cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria):</u> 104,9 % [100,6 %-103,3 %] • <u>Cepa B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata):</u> 102,0 % [100,8 %-109,0 %]

3.1.4 Resultados y análisis

3.1.4.1 Especificidad

Para cada cepa, el diseño experimental se basó en un análisis, realizado con cada antisuero para las diferentes cepas con el fin de verificar la ausencia de anillos cuando se analizan con otras cepas. La placa se prepara utilizando el DS de la cepa considerada y el DS con el antígeno de referencia de las otras tres cepas, así como solución salina tamponada con fosfato (PBS) como control negativo.

Los resultados de las pruebas se presentan en la Tabla 2.

Para el DS de las cepas A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1), A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2) y B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria):

- Para el control negativo no se observa ningún anillo de precipitación para las 4 cepas.
- No se observan anillos dobles.

La intensidad del anillo es similar a la de los anillos de referencia. Para el DS de la cepa B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata), en la placa con antisuero B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria), se detectan anillos de precipitación. Por consiguiente, se observa reactividad cruzada. No obstante, estos anillos tienen bajo contraste, y su intensidad es inferior a la de los anillos de precipitación de referencia, por lo que no existe efecto alguno sobre la evaluación de la especificidad.

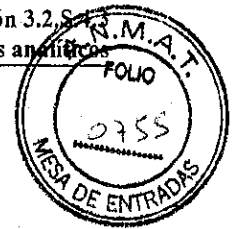
La especificidad es satisfactoria.

Tabla 2: Presencia o ausencia de anillo en cada referencia

Cepa (antisuero de ref.)	Principio activo (antígeno de ref.)	A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1) FAS28537	A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2) FAS23944	B/Brisbane/60/2008 (Imagen Victoria) FAS18527	B/Massachusetts/2/2012 (Imagen Yamagata) FAS25566	PBS (control negativo)
A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1) (Reactivos del NIBSC)	Presencia de anillos de precipitación Ausencia de anillos dobles La intensidad del anillo es similar a la de los anillos de referencia	Ausencia de anillos de precipitación	Ausencia de anillos de precipitación	Ausencia de anillos de precipitación	Ausencia de anillos de precipitación	Ausencia de anillos de precipitación
A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2) (Reactivos del NIBSC)	Ausencia de anillos de precipitación	Presencia de anillos de precipitación Ausencia de anillos dobles La intensidad del anillo es similar a la de los anillos de referencia	Ausencia de anillos de precipitación	Ausencia de anillos de precipitación	Ausencia de anillos de precipitación	Ausencia de anillos de precipitación
B/Brisbane/60/2008 (Imagen Victoria) (reactivos de la TGA)	Ausencia de anillos de precipitación	Ausencia de anillos de precipitación	Ausencia de anillos de precipitación	Presencia de anillos de precipitación Ausencia de anillos dobles La intensidad del anillo es similar a la de los anillos de referencia	Presencia de anillos de precipitación, pero con bajo contraste Ausencia de anillos dobles La intensidad del anillo es inferior a la de los anillos de referencia	Ausencia de anillos de precipitación
B/Massachusetts/2/2012 (Imagen Yamagata) (Reactivos del NIBSC)	Ausencia de anillos de precipitación	Ausencia de anillos de precipitación	Ausencia de anillos de precipitación	Ausencia de anillos de precipitación	Presencia de anillos de precipitación Ausencia de anillos dobles La intensidad del anillo es similar a la de los anillos de referencia	Ausencia de anillos de precipitación

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
APODERADA
SANOFI PASTEUR S. A.





3.1.4.2 Precisión

El objetivo del análisis estadístico es demostrar que el procedimiento es preciso; es decir, repetible y reproducible.

Para cada cepa: Tres operadores realizan análisis en el mismo laboratorio, en diferentes medios días (condiciones de precisión intermedia). Para cada operador, se llevan a cabo 6 pruebas en condiciones de repetibilidad; es decir, utilizando el mismo equipo, en el tiempo más corto, usando el mismo preparado para la referencia. Cada prueba se realizó de manera independiente (preparaciones independientes de la muestra).

Según el análisis estadístico realizado con los datos: para cada lote, se ha utilizado la prueba de Cochran para estudiar la repetibilidad y las varianzas de precisión intermedia.

3.1.4.2.1 Resultados de precisión, cepa A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1)

El contenido de antígeno HA en los tres lotes analizados se presenta en la Tabla 3.

Tabla 3: Precisión, concentración de antígeno HA (µg/mL), cepa A/H1N1

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
229,04	235,45	214,60
237,40	244,12	230,17
234,56	250,38	227,49
234,63	244,06	224,05
233,84	253,39	226,45
234,43	242,03	235,18

Los parámetros de repetibilidad, los parámetros de precisión intermedia y el intervalo de confianza del 95 % para 1 corrida se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4: Resultados de repetibilidad y precisión intermedia, cepa A/H1N1

	Desviación estándar	Varianzas	Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para k = 2 corridas y n = 1 medición
Parámetros de repetibilidad	0,010	0,000110	-
Parámetros de precisión intermedia	0,020	0,000388	± 0,029 µg/mL que equivale en expresión aritmética a x/+ 1,07

Estos resultados cumplen los criterios de aceptación de la validación.

3.1.4.2.2 Resultados de precisión, cepa A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2)

El contenido de antígeno HA en el lote analizado se presenta en la Tabla 5.

ROXANA MONTEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 APODERADA
 SANOFI PASTEUR S. A.



Tabla 5: Precisión, concentración de antígeno HA ($\mu\text{g}/\text{mL}$), cepa A/H3N2

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
188,97	199,64	200,36
200,43	205,17	196,86
194,79	192,63	201,47
200,28	192,81	204,31
199,87	198,87	206,00
198,55	196,90	210,85

Los parámetros de repetibilidad, los parámetros de precisión intermedia y el intervalo de confianza del 95 % para 1 corrida se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6: Resultados de repetibilidad y precisión intermedia, cepa A/H3N2

	Desviación estándar	Varianzas	Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para $k = 2$ corridas y $n = 1$ medición
Parámetros de repetibilidad	0,010	0,000105	-
Parámetros de precisión intermedia	0,012	0,000143	$\pm 0,018 \mu\text{g}/\text{mL}$ que equivale en expresión aritmética a $\times/\pm 1,04$

Estos resultados cumplen los criterios de aceptación de la validación.

3.1.4.2.3 Resultados de precisión, cepa B/Brisbane/60/2008 (B/linaje Victoria)

El contenido de antígeno HA en el lote analizado se presenta en la Tabla 7.

Tabla 7: Precisión, concentración de antígeno HA ($\mu\text{g}/\text{mL}$), cepa B/linaje Victoria

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
199,73	195,67	201,49
215,07	197,96	194,32
207,86	198,76	216,03
212,30	202,55	221,55
209,73	200,95	204,11
208,64	215,35	201,73

Los parámetros de repetibilidad, los parámetros de precisión intermedia y el intervalo de confianza del 95 % para 1 corrida se presentan en la Tabla 8.

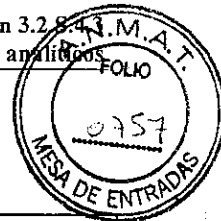


Tabla 8: Resultados de repetibilidad y precisión intermedia, cepa B/linaje Victoria

	Desviación estándar	Varianzas	Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para k = 2 corridas y n = 1 medición
Parámetros de repetibilidad	0,016	0,000263	-
Parámetros de precisión intermedia	0,017	0,000277	± 0,025 µg/mL que equivale en expresión aritmética a x/+ 1,06

Estos resultados cumplen los criterios de aceptación de la validación.

3.1.4.2.4 Resultados de precisión, cepa B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata)

El contenido de antígeno HA en el lote analizado se presenta en la Tabla 9.

Tabla 9: Precisión, concentración de antígeno HA (µg/mL), cepa B/linaje Yamagata

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
174,80	145,96	159,16
171,42	160,42	163,08
172,15	158,13	164,48
158,16	159,96	160,45
166,38	160,49	160,61
176,87	158,59	169,23

Los parámetros de repetibilidad, los parámetros de precisión intermedia y el intervalo de confianza del 95 % para 1 corrida se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10: Resultados de repetibilidad y precisión intermedia, cepa B/linaje Yamagata

	Desviación estándar	Varianzas	Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para k = 2 corridas y n = 1 medición
Parámetros de repetibilidad	0,015	0,000220	-
Parámetros de precisión intermedia	0,022	0,000468	± 0,032 µg/mL que equivale en expresión aritmética a x/+ 1,08

Estos resultados cumplen los criterios de aceptación de la validación.

3.1.4.2.5 Conclusión

La precisión es satisfactoria.



3.1.4.3 Linealidad

El objetivo del análisis estadístico es demostrar que el procedimiento es lineal en el rango de concentraciones elegido.

Para cada cepa, el diseño experimental se basó en series independientes realizadas por 3 operadores. Cada corrida incluye el análisis de un rango de 6 concentraciones de HA.

La linealidad en el rango elegido se analiza mediante los siguientes pasos:

- La homogeneidad de las varianzas límite se verifica mediante la prueba de Cochran.
- La dependencia entre la concentración teórica de HA y la concentración medida de HA, así como la linealidad de esta relación, se analizan mediante una regresión lineal no ponderada utilizando el método de los mínimos cuadrados. Debe mostrar una pendiente significativa y una desviación no significativa de la linealidad.

3.1.4.3.1 Resultados de linealidad, cepa A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1)

Los resultados detallados del estudio de linealidad se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11: Linealidad, concentración de antígeno HA (µg/mL), cepa A/H1N1

Nivel	Cantidades de vacuna (mL)	Diluyente (PBS)	Cantidad de solución agregada a razón de 36,84 µg/mL (mL)	Concentraciones teóricas de HA (µg/mL)*	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
1	1,6	1,1	0	139,19434718	129,60	147,30	156,16
2	1,8	0,9	0	156,59364057	144,85	164,33	166,59
3	2,1	0,6	0	182,69258067	175,78	190,56	201,23
4	2,4	0,3	0	208,79152076	213,97	203,55	217,56
5	2,7	0	0	234,89046086	232,43	235,85	247,13
6	1,9	0	0,8	241,70217616	243,76	236,53	255,04

* Las concentraciones teóricas de HA se calculan a partir de la media de los análisis de precisión realizados con el mismo lote: la media de los análisis de precisión es igual a 234,89046086 µg/mL. La dilución de la solución con agregado es de 1/7. Entonces, las concentraciones teóricas en µg/mL son:

Nivel 1: $7 * (234,89046086 * 1,6/7)/(1,6 + 1,1) = 139,19434718 \text{ µg/mL}$
 Nivel 2: $7 * (234,89046086 * 1,8/7)/(1,8 + 0,9) = 156,59364057 \text{ µg/mL}$
 Nivel 3: $7 * (234,89046086 * 2,1/7)/(2,1 + 0,6) = 182,69258067 \text{ µg/mL}$
 Nivel 4: $7 * (234,89046086 * 2,4/7)/(2,4 + 0,3) = 208,79152076 \text{ µg/mL}$
 Nivel 5: 234,89046086 (media de los análisis de precisión en µg/mL)
 Nivel 6: $7 * ((234,89046086 * 1,9/7) + (0,8 * 36,84)) / (1,9 + 0,8) = 241,70217616 \text{ µg/mL}$



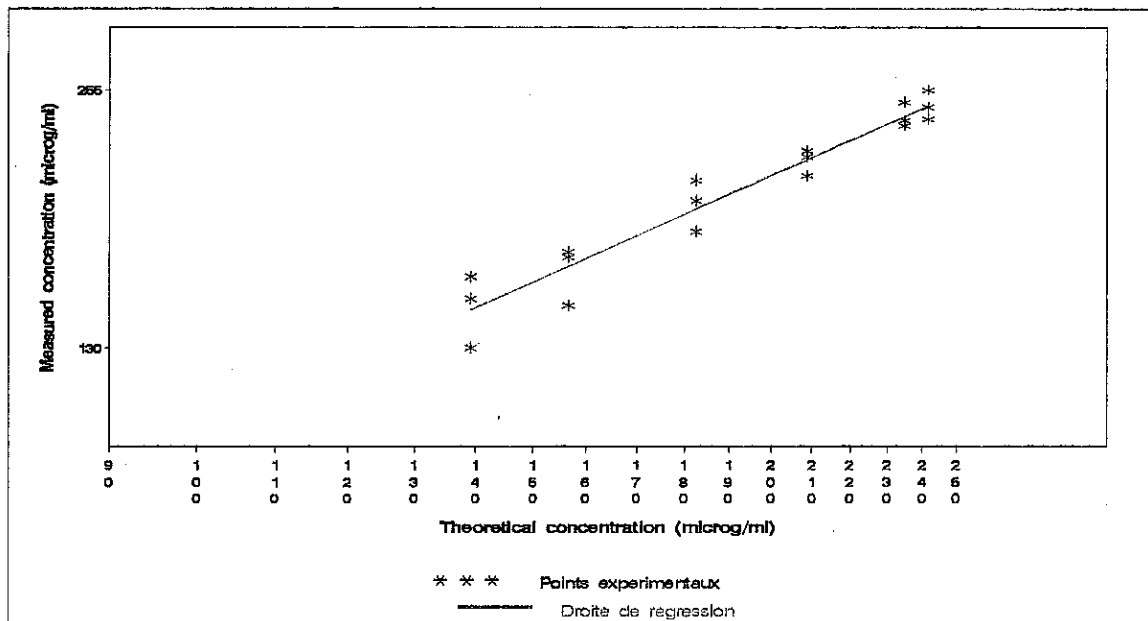
La ecuación de la recta de regresión (ilustrada en la Figura 1) es la siguiente:

$$Y = (0,066 \pm 0,307) + (0,975 \pm 0,135) X$$

Donde:

- X = concentración teórica (log($\mu\text{g/mL}$));
- Y = concentración medida (log($\mu\text{g/mL}$));
- Coeficiente de correlación lineal: $r = 0,9677$ con 16 grados de libertad;
- Rango de linealidad: [139,19-241,70] $\mu\text{g/mL}$.

Figura 1: Gráfico de linealidad, cepa A/H1N1



3.1.4.3.2 Resultados de linealidad, cepa A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2)

Los resultados detallados del estudio de linealidad se presentan en la Tabla 12.



Tabla 12: Linealidad, concentración de antígeno HA ($\mu\text{g/mL}$), cepa A/H3N2

Nivel	Cantidades de vacuna (mL)	Diluyente (PBS)	Cantidad de solución agregada a razón de 49 $\mu\text{g/mL}$ (mL)	Concentraciones teóricas de HA ($\mu\text{g/mL}$)*	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
1	2	0,7	0	147,63690475	164,24	153,00	157,74
2	2,2	0,5	0	162,40059522	170,60	169,78	177,26
3	2,5	0,2	0	184,54613094	189,55	185,26	195,86
4	2,7	0	0	199,30982141	213,77	219,00	215,31
5	2,2	0	0,5	225,91911374	234,92	243,76	243,16
6	1,9	0	0,8	241,88468914	240,92	255,05	252,74

* Las concentraciones teóricas de antígeno HA se calculan a partir de la media de los análisis de precisión realizados con el mismo lote: la media de los análisis de precisión es igual a 199,30982141 $\mu\text{g/mL}$. La dilución de la solución con agregado es de 1/7.

Entonces, las concentraciones teóricas en $\mu\text{g/mL}$ son:

Nivel 1: $7 * (199,30982141 * 2,0/7)/(2 + 0,7) = 147,63690475 \mu\text{g/mL}$

Nivel 2: $7 * (199,30982141 * 2,2/7)/(2,2 + 0,5) = 162,40059522 \mu\text{g/mL}$

Nivel 3: $7 * (199,30982141 * 2,5/7)/(2,5 + 0,2) = 184,54613094 \mu\text{g/mL}$

Nivel 4: 199,30982141 (media de los análisis de precisión en $\mu\text{g/mL}$)

Nivel 5: $7 * ((199,30982141 * 2,2/7) + (0,5 * 49)) / (2,2 + 0,5) = 225,91911374 \mu\text{g/mL}$

Nivel 6: $7 * ((199,30982141 * 1,9/7) + (0,8 * 49)) / (1,9 + 0,8) = 241,88468914 \mu\text{g/mL}$

La ecuación de la recta de regresión (ilustrada en la Figura 2) es la siguiente:

$$Y = (0,113 \pm 0,194) + (0,961 \pm 0,085) X$$

Donde:

- X = concentración teórica ($\log(\mu\text{g/mL})$);
- Y = concentración medida ($\log(\mu\text{g/mL})$);
- Coeficiente de correlación lineal: $r = 0,9863$ con 16 grados de libertad;
- Rango de linealidad: [147,64-241,88] $\mu\text{g/mL}$.

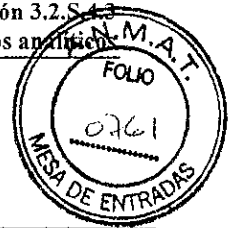
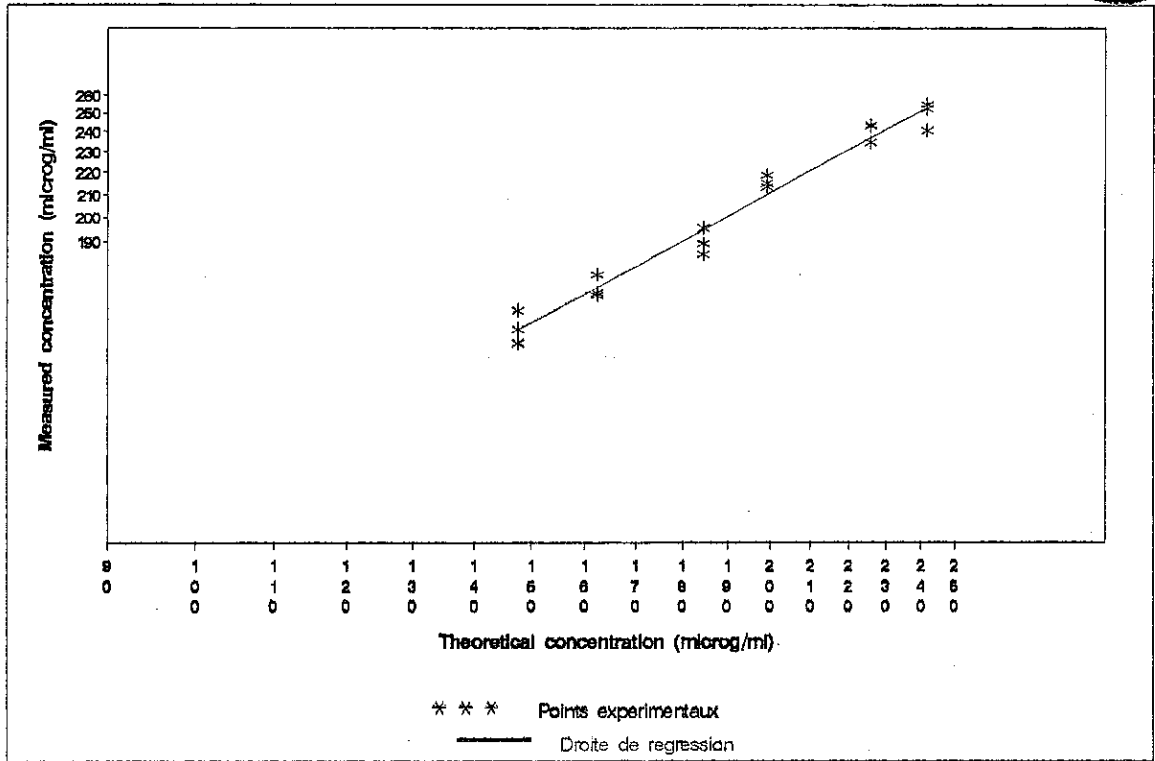


Figura 2: Gráfico de linealidad, cepa A/H3N2



3.1.4.3.3 Resultados de linealidad, cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria)

Los resultados detallados del estudio de linealidad se presentan en la Tabla 13.

ROXANA MONTEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 APODERADA
 SANOFI PASTEUR S.A.

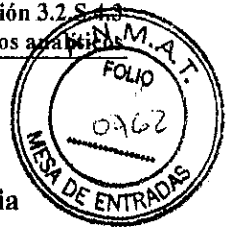


Tabla 13: Linealidad, concentración de antígeno HA ($\mu\text{g}/\text{mL}$), cepa B/linaje Victoria

Nivel	Cantidades de vacuna (mL)	Diluyente (PBS)	Cantidad de solución agregada a razón de 46,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (mL)	Concentraciones teóricas de antígeno HA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)*	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
1	2	0,7	0	152,31526539	158,93	163,11	157,59
2	2,2	0,5	0	167,54679192	167,57	169,57	170,27
3	2,5	0,2	0	190,39408173	194,73	191,73	187,48
4	2,7	0	0	205,62560827	217,49	210,54	210,69
5	2,4	0	0,3	223,88942957	233,73	228,99	227,18
6	2	0	0,7	248,24119131	255,25	254,82	240,92

* Las concentraciones teóricas de antígeno HA se calculan a partir de la media de los análisis de precisión realizados con el mismo lote: la media de los análisis de precisión es igual a 205,62560827 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La dilución de la solución con agregado es de 1/8.

Entonces, las concentraciones teóricas en $\mu\text{g}/\text{mL}$ son:

Nivel 1: $8 * (205,62560827 * 2,0/8)/(2 + 0,7) = 152,31526539/\text{mL}$

Nivel 2: $8 * (205,62560827 * 2,2/8)/(2,2 + 0,5) = 167,54679192/\text{mL}$

Nivel 3: $8 * (205,62560827 * 2,5/8)/(2,5 + 0,2) = 190,39408173\mu\text{g}/\text{mL}$

Nivel 4: 205,62560827 (media de los análisis de precisión en $\mu\text{g}/\text{mL}$)

Nivel 5: $8 * ((205,62560827 * 2,4/8) + (0,4 * 46,25))/(2,4 + 0,3) = 223,88942957/\text{mL}$

Nivel 6: $8 * ((205,62560827 * 2/8) + (0,7 * 46,25))/(2 + 0,7) = 248,24119131/\text{mL}$

La ecuación de la recta de regresión (ilustrada en la Figura 3) es la siguiente:

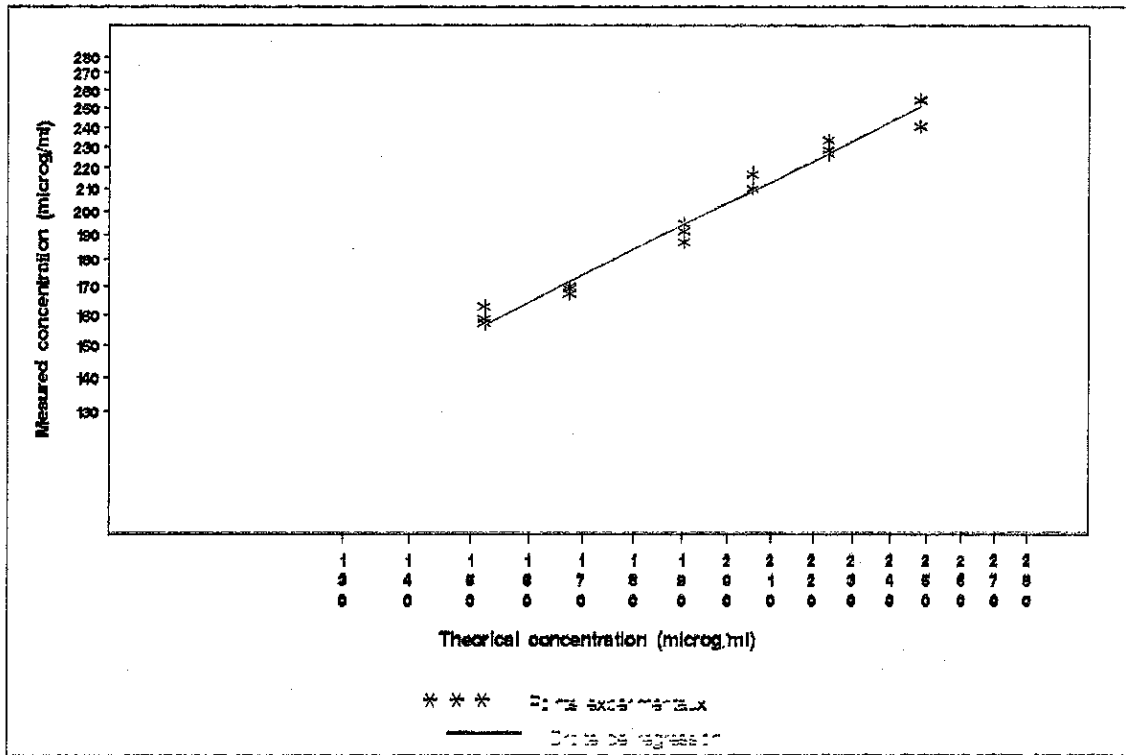
$$Y = (0,096 \pm 0,161) + (0,962 \pm 0,070) X$$

Donde:

- X = concentración teórica ($\log(\mu\text{g}/\text{mL})$);
- Y = concentración medida ($\log(\mu\text{g}/\text{mL})$);
- Coeficiente de correlación lineal: $r = 0,9907$ con 16 grados de libertad;
- Rango de linealidad: [152,32-248,24] $\mu\text{g}/\text{mL}$.



Figura 3: Gráfico de linealidad, cepa B/linaje Victoria



3.1.4.3.4 Resultados de linealidad, cepa B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata)

Los resultados detallados del estudio de linealidad se presentan en la Tabla 14.

ROXANA MONTEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 APODERADA
 SANOFI PASTEUR S. A.



Tabla 14: Linealidad, concentración de antígeno HA ($\mu\text{g/mL}$), cepa B/linaje Yamagata

Nivel	Cantidades de vacuna (mL)	Diluyente (PBS)	Cantidad de solución agregada a razón de 50 $\mu\text{g/mL}$ (mL)	Concentraciones teóricas de antígeno HA ($\mu\text{g/mL}$)*	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
1	2	0,7	0	120,88236872	113,28	135,08	124,34
2	2,2	0,4	0	138,08485965	125,77	152,80	148,88
3	2,5	0,2	0	151,1029609	146,02	163,81	161,10
4	2,7	0	0	163,19119777	156,07	188,03	180,03
5	2,3	0	0,4	183,45916847	180,46	209,66	204,59
6	1,8	0	0,9	208,79413185	207,82	234,54	226,66

* Las concentraciones teóricas de antígeno HA se calculan a partir de la media de los análisis de precisión realizados con el mismo lote: la media de los análisis de precisión es igual a 163,19119777 $\mu\text{g/mL}$. La dilución de la solución con agregado es de 1/6.

Entonces, las concentraciones teóricas en $\mu\text{g/mL}$ son:

Nivel 1: $6 * (163,19119777 * 2,0/6)/(2 + 0,7) = 120,88236872 \mu\text{g/mL}$

Nivel 2: $6 * (163,19119777 * 2,2/6)/(2,2 + 0,4) = 138,08485965 \mu\text{g/mL}$

Nivel 3: $6 * (163,19119777 * 2,5/6)/(2,5 + 0,2) = 151,1029609 \mu\text{g/mL}$

Nivel 4: 163,19119777 (media de los análisis de precisión en $\mu\text{g/mL}$)

Nivel 5: $6 * ((163,19119777 * 2,3/6) + (0,4 * 50)) / (2,3 + 0,4) = 183,45916847 \mu\text{g/mL}$

Nivel 6: $6 * ((163,19119777 * 1,8/6) + (0,9 * 50)) / (1,8 + 0,9) = 208,79413185 \mu\text{g/mL}$

La ecuación de la recta de regresión (ilustrada en la Figura 4) es la siguiente:

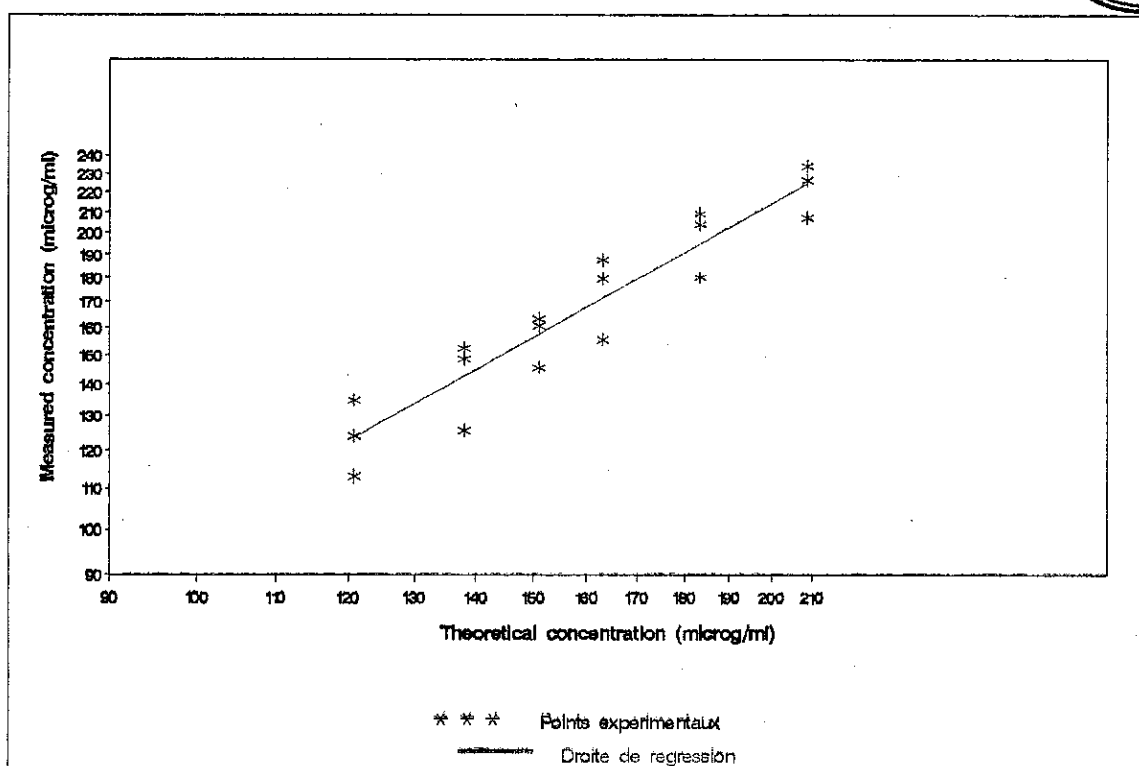
$$Y = (-0,192 \pm 0,452) + (1,097 \pm 0,205) X$$

Donde:

- X = concentración teórica ($\log(\mu\text{g/mL})$);
- Y = concentración medida ($\log(\mu\text{g/mL})$);
- Coeficiente de correlación lineal: $r = 0,9428$ con 16 grados de libertad.
- Rango de linealidad: [120,88-208,79] $\mu\text{g/mL}$.



Figura 4: Gráfico de linealidad, cepa B/linaje Yamagata



3.1.4.3.5 Conclusión

La linealidad es satisfactoria.

3.1.4.4 Exactitud

La exactitud se evalúa a partir del resultado obtenido para el estudio de la linealidad con los niveles de dilución y adición (no se toma en cuenta el punto del 100 %): la concentración medida se divide entre la concentración teórica.

La exactitud se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos generados en las pruebas.

- Se calculan los porcentajes de recuperación para cada nivel de concentración teórica de antígeno HA y para cada grupo.
- Se verifica la homogeneidad de las varianzas intraniveles mediante la prueba de Cochran.
- Una vez obtenida la homogeneidad, la no significancia de las diferencias entre los niveles de concentración teórica de antígeno HA se demuestra mediante un análisis de varianza.



- Una vez demostrada la igualdad de las medias interniveles, el porcentaje medio de recuperación se calcula con los límites de confianza del 95 % (en caso contrario se calcula el porcentaje medio de recuperación por nivel de concentración).

Los resultados detallados del estudio de exactitud de las cuatro cepas estudiadas se presentan a continuación.

3.1.4.4.1 Resultados de exactitud, cepa A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1)

Las recuperaciones calculadas entre las concentraciones medidas de antígeno HA y las concentraciones teóricas de antígeno HA se presentan en la Tabla 15.

Tabla 15: Recuperación porcentual, cepa A/H1N1

Concentración de antígeno HA (µg/mL)	Recuperación porcentual (%)		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
139,19434718	93,11	105,82	112,19
156,59364057	92,50	104,94	106,38
182,69258067	96,22	104,31	110,15
208,79152076	102,48	97,49	104,20
241,70217616	100,85	97,86	105,52

Según el análisis estadístico para cada nivel de concentración, se calculó la recuperación porcentual promedio y se presenta en la Tabla 16.

Tabla 16: Recuperación porcentual promedio, cepa A/H1N1

Recuperación media	Límite de confianza del 95 %
102,3 %	[99,0 %-105,5 %]

Estos resultados cumplen con los criterios de aceptación de la validación, es decir, la recuperación porcentual promedio calculada para los niveles teóricos de concentración se encuentra entre el 80 % y el 120 %.

3.1.4.4.2 Resultados de exactitud, cepa A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2)

Las recuperaciones calculadas entre las concentraciones medidas de HA y las concentraciones teóricas de HA se presentan en la Tabla 17.



Tabla 17: Recuperación porcentual, cepa A/H3N2

Concentración de antígeno HA (µg/mL)	Recuperación porcentual (%)		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
147,63690475	111,25	103,63	106,84
162,40059522	105,05	104,54	109,15
184,54613094	102,71	100,39	106,13
225,91911374	103,98	107,90	107,63
241,88468914	99,60	105,44	104,49

Según el análisis estadístico para cada nivel de concentración, se calculó la recuperación porcentual promedio y se presenta en la Tabla 18.

Tabla 18: Recuperación porcentual promedio, cepa A/H3N2

Recuperación media	Límite de confianza del 95 %
105,2%	[103,5 %-107,0 %]

Estos resultados cumplen con los criterios de aceptación de la validación, es decir, la recuperación porcentual promedio calculada para los niveles teóricos de concentración se encuentra entre el 80 % y el 120 %.

3.1.4.4.3 Resultados de exactitud, cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria)

Las recuperaciones calculadas entre las concentraciones medidas de HA y las concentraciones teóricas de HA se presentan en la Tabla 19.

Tabla 19: Porcentajes de recuperación (%), cepa B/linaje Victoria

Concentración de antígeno HA (µg/mL)	Recuperación porcentual (%)		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
152,31526539	104,34	107,09	103,46
167,54679192	100,01	101,21	101,63
190,39408173	102,28	100,70	98,47
223,88942957	104,40	102,28	101,47
248,24119131	102,82	102,65	97,05

Según el análisis estadístico para cada nivel de concentración, se calculó la recuperación porcentual promedio y se presenta en la Tabla 20.



Tabla 20: Recuperación porcentual promedio, cepa B/linaje Victoria

Recuperación media	Límite de confianza del 95 %
102,0%	[100,6 %-103,3 %]

Estos resultados cumplen con los criterios de aceptación de la validación, es decir, la recuperación porcentual promedio calculada para los niveles teóricos de concentración se encuentra entre el 80 % y el 120 %.

3.1.4.4.4 Resultados de exactitud, cepa B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata)

Las recuperaciones calculadas entre las concentraciones medidas de antígeno HA y las concentraciones teóricas de antígeno HA se presentan en la Tabla 21.



Tabla 21: Porcentajes de recuperación, cepa B/linaje Yamagata

Concentración de antígeno HA (µg/mL)	Recuperación porcentual (%)		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
120,88236872	93,71	111,74	102,86
138,08485965	91,08	110,66	107,82
151,1029609	96,64	108,41	106,62
183,45916847	98,37	114,28	111,52
208,79413185	99,53	112,33	108,56

Según el análisis estadístico para cada nivel de concentración, se calculó la recuperación porcentual promedio y se presenta en la Tabla 22.

Tabla 22: Recuperación porcentual promedio, cepa B/linaje Yamagata

Recuperación media	Límite de confianza del 95 %
104,9%	[100,8 %-109,0 %]

Estos resultados cumplen con los criterios de aceptación de la validación, es decir, la recuperación porcentual promedio calculada para los niveles teóricos de concentración se encuentra entre el 80 % y el 120 %.

3.1.4.4.5 Conclusión

La exactitud es satisfactoria.

3.1.5 Conclusión

El método es específico, preciso, lineal y exacto para las cepas A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1), A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2), B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) y B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata).

El método de SRID es válido para cuantificar el antígeno HA en la vacuna antigripal tetravalente (QIV) para las cepas A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1), A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2), B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) y B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata).

ROXANA MONJEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 APODERADA
 SANOFI PASTEUR S. A.



3.2 Identificación del antígeno HA

3.2.1 Panorama

El método de inhibición de la hemaglutinación (IHA) se validó en el DS; esta validación se aplica al MSL y al WSL ya que:

- la prueba de identidad consiste en un reconocimiento específico del antígeno HA por anticuerpos específicos de hurón, tanto si el antígeno HA se encuentra en el virus entero (caso del WSL y del MSL) como si se encuentra en el antígeno purificado (caso del DS).
- Los anticuerpos de hurón se produjeron por inmunización de hurones con antígeno HA nativo del virus entero. La identificación del antígeno HA en el DS se considera, por lo tanto, el caso más desfavorable porque el antígeno HA del MSL y del WSL está más próximo al utilizado para la producción de los anticuerpos de hurón.
- Además, la prueba de identidad requiere un paso de estandarización (la estandarización consiste en diluir las muestras para obtener una concentración de entre 4 y 8 UHA) y se lleva a cabo del mismo modo, independientemente de la etapa controlada.

Esta validación se llevó a cabo con dos cepas A (H1N1 y H3N2) y dos cepas B (B/linaje Yamagata y B/linaje Victoria):

- cepa A/California/07/2009 (NYMC X-179A) (H1N1);
- cepa A/Victoria/210/2009 (NYMC X-187) (H3N2);
- cepa B/Brisbane/60/2008 (B/linaje Victoria);
- cepa B/Florida/4/2006 (B/linaje Yamagata).

3.2.2 Resumen de la validación

La especificidad es el único parámetro evaluado durante la validación de este método y es una prueba de identidad.

La especificidad del método se asegura incluyendo varios antígenos de referencia en cada análisis (el mismo subtipo/linaje de antígeno HA que la muestra de prueba y subtipos/linajes de antígeno HA distintos) (vea la descripción del procedimiento analítico en la sección 3.2.S.4.2 Procedimientos analíticos).

El objetivo de la validación es demostrar la capacidad de la técnica para identificar el subtipo/linaje viral (A/H1N1 o A/H3N2 o B/linaje Victoria o B/linaje Yamagata). En la Tabla 23 se resumen los criterios de aceptación y los resultados de validación para la especificidad.

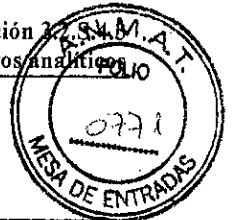


Tabla 23: Resumen de los resultados de validación, identidad del antígeno HA

Características	Criterios de validez	Resultados
Especificidad	-El título antigénico de la muestra analizada debe hallarse entre 4 y 8 unidades hemaglutinantes (UHA). -El título de inhibición de la hemaglutinación (IHA) del antígeno de referencia debe ser el mismo que el título teórico (obtenido durante la validación de los reactivos) con ± 2 diluciones.	-El título antigénico de la muestra analizada se halla entre 4 y 8 UHA. -El título de IHA del antígeno de referencia es el mismo que el título teórico obtenido durante la validación de los reactivos con ± 2 diluciones.
	Criterios de aceptación	Resultados
	-El título antigénico del DS modificado debe ser equivalente al título del antígeno de referencia ± 2 diluciones. -El DS modificado debe reaccionar solo débilmente frente a la referencia heteróloga (diferentes tipos de antígeno HA) ($\leq 1/40$ °).	-El título antigénico del DS modificado es equivalente al título del antígeno de referencia ± 2 diluciones. -El DS modificado reacciona solo débilmente frente a la referencia heteróloga (diferentes tipos de antígeno HA) ($\leq 1/40$ °).
	Criterio de aceptación de la validación analítica	Resultado
	-Los títulos de IHA de las muestras analizadas para los tres ensayos de validación deben ser equivalentes entre sí ± 2 diluciones.	-Los títulos de IHA de las muestras analizadas para los tres ensayos de validación son equivalentes entre sí ± 2 diluciones.

3.2.3 Resultados y análisis

Se llevaron a cabo tres análisis independientes por el mismo método, realizados por tres operadores diferentes en días diferentes con tres extracciones de sangre diferentes.

Primero, se validan los antisueros y antígenos específicos. Después se lleva a cabo una estandarización del contenido de antígeno HA hasta 4-8 UHA. Los resultados se presentan en la Tabla 24 y en la Tabla 25.

Después, se lleva a cabo la reacción de identidad con las muestras de DS; los resultados se presentan en la Tabla 26.

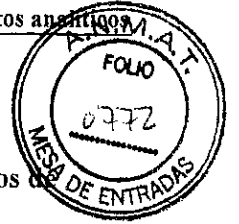


Tabla 24: Títulos teóricos de los antisueros de referencia obtenidos contra antígenos de referencia (validación de los reactivos)

Antisueros de referencia	Título teórico Antisueros de referencia/antígenos de referencia (validación de los reactivos)	Antígenos de referencia
A/Victoria/210/2009 255319R (09/04/2010)	2560	A/Victoria/210/2009 (10/03/2011)
A/California/7/2009 F65-3 (07/07/2009)	1280	A/California/7/2009 2009/83B
B/Brisbane/60/2008 F65-N2 (27/03/2009)	1280	B/Brisbane/60/2008 FA343657 (15/03/2009)
B/Florida/4/2006 F63-2 (14/04/2008)	1280	B/Florida/4/2006 (24/07/2008)

Tabla 25: Títulos de los antígenos

Antígenos de referencia y DS por analizar	Título del antígeno/antisuero de referencia					
	Análisis 1		Análisis 2		Análisis 3	
	UHA	Título del antígeno de referencia	UHA	Título del antígeno de referencia	UHA	Título del antígeno de referencia
A/Victoria/210/2009 (10/03/2011)	8	2560	8	2560	4	2560
A/California/7/2009 2009/83B	4	640	4	640	4	1280
B/Brisbane/60/2008 FA343657 (15/03/2009)	4	320	8	320	8	640
B/Florida/4/2006 (24/07/2008)	4	1280	8	1280	8	1280
A/California/07/2009 (NYMC X-179A) (H1N1) FA432424	8	/	8	/	8	/
A/Victoria/210/2009 (NYMC X-187) (H3N2) FA427592	4	/	4	/	4	/
B/Florida/4/2006 (B/linaje Yamagata) FA430512	4	/	4	/	4	/
B/Brisbane/60/2008 (B/linaje Victoria) FA430216	4	/	8	/	4	/

Sanofi Pasteur

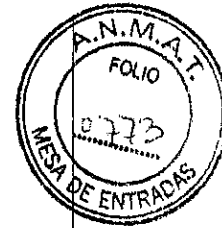
Vacuna antigripal tetravalente (virión fraccionado, inactivada)

Sección 3.2.S.2.3

Sistema de lotes de siembra viral, caracterización y pruebas

Tabla 26: Resultados de la reacción de identidad

Principio activo	Antisueros	Análisis 1		Análisis 2		Análisis 3	
		Título	Resultados (identidad positiva)	Título	Resultados (identidad positiva)	Título	Resultados (identidad positiva)
A/California/07/2009 (NYMC X-179A) (H1N1) FA432424	A/California/7/2009 (A/H1N1)	320	Cumple	320	Cumple	640	Cumple
	A/Victoria/2/10/2009 (A/H3N2)	<20		<20		<20	
	B/Florida/4/2006 (B/linaje Yamagata)	<20		<20		<20	
	B/Brisbane/60/2008 (B/linaje Victoria)	<20		<20		<20	
A/Victoria/2/10/2009 (H3N2) (NYMC X-187) FA427592	A/Victoria/2/10/2009 (A/H3N2)	2560	Cumple	1280	Cumple	2560	Cumple
	A/California/7/2009 (A/H1N1)	<20		<20		<20	
	B/Florida/4/2006 (B/linaje Yamagata)	<20		<20		<20	
	B/Brisbane/60/2008 (B/linaje Victoria)	<20		<20		<20	
B/Florida/4/2006 (B/linaje Yamagata) FA430512	B/Florida/4/2006 (B/linaje Yamagata)	1280	Cumple	1280	Cumple	2560	Cumple
	B/Brisbane/60/2008 (B/linaje Victoria)	<20		<20		<20	
	A/California/7/2009 (A/H1N1)	<20		<20		<20	
	A/Victoria/2/10/2009 (A/H3N2)	<20		<20		<20	
B/Brisbane/60/2008 (B/linaje Victoria) FA430216	B/Brisbane/60/2008 (B/linaje Victoria)	320	Cumple	320	Cumple	640	Cumple
	B/Florida/4/2006 (B/linaje Yamagata)	<20		<20		<20	
	A/California/7/2009 (A/H1N1)	<20		<20		<20	
	A/Victoria/2/10/2009 (A/H3N2)	<20		<20		<20	



RA_0920477

Confidential/Proprietary Information
Página 29 of 47

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
APODERADA
SANOFI PASTEUR S. A.

6



Los cuatro subtipos/linajes del DS se analizaron tres veces de manera independiente, en días diferentes, por tres técnicos cualificados diferentes y con tres extracciones de sangre diferentes.

Se han respetado las siguientes condiciones de especificidad:

Criterios de validez:

- El título antigénico de la muestra analizada se halla entre 4 y 8 UHA.
- Para cada cepa, el título de IHA del antígeno de referencia es el mismo que el título teórico (obtenido durante la validación de los reactivos) con ± 2 diluciones.

Criterios de aceptación:

- El título antigénico del DS modificado es equivalente al título del antígeno de referencia ± 2 diluciones.
- El DS modificado reacciona solo débilmente frente a los prototipos 2 y 3 del antisuero de referencia heteróloga (diferentes tipos de antígeno HA) ($\leq 1/40$).

Criterios de aceptación de la validación analítica:

- Los títulos antigénicos de las muestras evaluadas para los tres análisis de validación son equivalentes entre sí ± 2 diluciones.

La especificidad es satisfactoria.

3.2.4 Conclusión

El método es específico para el subtipo viral (A/H1N1, A/H3N2) o linaje (B/linaje Victoria y B/linaje Yamagata).

El método es válido para identificar el antígeno HA en la vacuna antigripal para los diferentes subtipos o linajes A/H1N1, A/H3N2, B/linaje Victoria y B/linaje Yamagata.

3.3 Identificación del antígeno neuraminidasa (método RT-PCR)

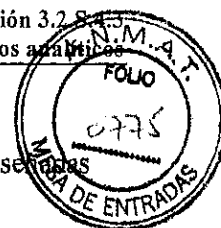
La técnica para la identificación del antígeno neuraminidasa (NA) por RT-PCR se valida para cada nueva cepa siguiendo el protocolo de validación que se describe a continuación.

3.3.1 Panorama

Dado que se trata de una prueba de identidad, la especificidad es el único parámetro que se evalúa durante el desarrollo de la técnica.

Para cada nueva cepa, se desarrolla la técnica RT-PCR y se definen sus parámetros. Se diseñan nuevos cebadores y sondas específicas utilizando una secuencia específica de oligonucleótidos de la cepa estudiada.

La evaluación de la especificidad teórica consiste en un estudio histórico, basado en la alineación de secuencias de oligonucleótidos conocidas, procedentes de la Organización Mundial de la Salud



(OMS), que permiten evaluar la especificidad de los cebadores y las sondas nucleicas diseñadas para identificar la cepa.

Además, se llevan a cabo estudios experimentales para demostrar la capacidad de la técnica para:

- identificar la cepa analizada,
- y para no detectar otras cepas vacunales del mismo subtipo (A/H1N1 o A/H3N2 o B) o de otros subtipos de virus gripales (A/H1N1 o A/H3N2 o B).

El control positivo es una suspensión de la cepa que se desea identificar (es decir, un vial original de la cepa de producción provisto por un Centro Colaborador de la OMS, lote de siembra maestro (MSL) o lote de siembra de trabajo (WSL), DS ...).

Se seleccionan otras cepas gripales distintas de la que se desea identificar a fin de evaluar la especificidad de la prueba. El subtipo de estas cepas es al menos A/H1N1, A/H3N2 y B. Se analizan dos cepas de cada subtipo, en especial las cepas utilizadas en la temporada anterior (si están disponibles).

Para los estudios experimentales, el método utilizado se considera validado si:

- se determina una identificación positiva de la cepa gripal analizada,
- se determina una identificación negativa de las otras cepas gripales seleccionadas.

Los resultados del estudio de validación basado en estudios teóricos y experimentales se presentan a continuación para las siguientes cepas:

- A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1),
- A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2),
- B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria),
- B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata).

3.3.2 Validación para la cepa A/California/7/2009 (H1N1)

Los cebadores para la identificación de la neuraminidasa (NA) se diseñaron para ser específicos para la cepa vacunal:

- Cebador directo FPNACALIF: secuencia TTA TGA AAA CAA CAC TTG GGT AAA TCA,
- Cebador inverso RPNACALIF: secuencia GCT AAT TTC ACG GAA ACC ACT GA,
- Sonda PNACALIF: secuencia FAM-TGT TAA CAT CAG CAA CAC C-MGB.

Se llevaron a cabo estudios de especificidad teóricos y experimentales con estos cebadores.

Estudio de especificidad teórica:

La especificidad teórica del método se demuestra realizando una alineación de nucleótidos de la región amplificada (genes de NA) de la cepa A/California/7/2009 (H1N1) y de otras cepas A/H1N1, donde se muestra la ubicación de los cebadores y de las sondas. En paralelo, se efectuó otra alineación de nucleótidos de las regiones amplificadas (genes de NA), incluyendo otras cepas A/H3N2, A/H5N1 y B, que muestra la ubicación de los cebadores y de las sondas.



Las alineaciones de nucleótidos muestran numerosas discrepancias entre la cepa A/California/7/2009 (H1N1) y las otras cepas A/H1N1, A/H3N2, B y A/H5N1 en las posiciones del cebador directo, del cebador inverso y de la sonda. Debido a la combinación de todas las discrepancias, es poco probable que se produzca la detección de otras cepas diferentes de A/California/7/2009.

Estudio de especificidad experimental:

La detección de A/California/7/2009 (H1N1) se llevó a cabo con lotes de WSL, DS y producto llenado representativos de los lotes de producción conforme a las BPM. Además, se analizaron otras cepas de A/H1N1, A/H3N2 y B.

La especificidad del sistema se estudió utilizando las cepas siguientes y los resultados se muestran en la Tabla 27.

Tabla 27: Resultados experimentales correspondientes a la cepa A/California/7/2009 (H1N1)

Nombre de la cepa	Detección del gen de la NA
A/California/7/2009 (A/H1N1)	Positiva
A/Brisbane/59/2007 (A/H1N1)	Negativo
A/Solomon Islands/03/2006 (A/H1N1)	Negativo
A/Uruguay/716/2007 (A/H3N2)	Negativo
A/Wisconsin/67/2005 (A/H3N2)	Negativo
B/Brisbane/60/2008 (B)	Negativo
B/Malaysia/2506/2004 (B)	Negativo
A/turkey/Turkey/1/2005-NIBRG23 (A/H5N1)	Negativo
A/Indonesia/05/2005-PR8-IBCDC-RG2 (A/H5N1)	Negativo

Los resultados obtenidos durante el estudio de especificidad experimental mostraron resultados positivos para la cepa A/California/7/2009 (H1N1) y resultados negativos para las demás cepas diferentes de A/California/7/2009 (H1N1), incluidas las cepas A/H1N1, A/H3N2, A/H5N1 y B.

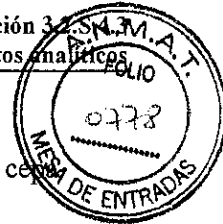
El método es específico ya que no se detectó ninguna otra cepa de gripe salvo A/California/7/2009 (H1N1).

Conclusión:

El método queda validado para la identificación del antígeno NA de la cepa A/California/7/2009 (H1N1) en esta vacuna antigripal.

3.3.3 Validación para la cepa A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2)

Dado que A/Texas/50/2012 (H3N2) es una cepa análoga a A/Victoria/361/2011 (H3N2), la homología entre las secuencias es muy elevada (solo 7 discrepancias de los aproximadamente 1400 nucleótidos del gen de la neuraminidasa) y por lo tanto, la identificación requiere la combinación de 2 resultados de RT-PCR en tiempo real. El sistema RT-PCR 1 permite la identificación de las cepas análogas a A/Victoria/361/2011 (H3N2) [A/Texas/50/2012 (H3N2) y



A/Victoria/361/2011(H3N2)], mientras que el sistema RT-PCR 2 permite diferenciar la cepa A/Texas/50/2012 (H3N2) de la cepa A/Victoria/361/2011 (H3N2).

Se determina una identificación positiva si se observa detección simultáneamente para las dos RT--PCR. El resto de combinaciones de resultados demuestra una identificación negativa.

Los cebadores para la identificación de la NA se diseñaron para que fueran específicos para la cepa vacunal:

- Para RT-PCR 1:
 - Cebador directo FNAVIC2011: secuencia GTT GGA GAC ACA CCC AGA AAA TC,
 - Cebador inverso RNAVIC2011: secuencia AAG CGT GAC GTC TCG TTG AAT,
 - Sonda MGBNAVIC2011: secuencia FAM- AGC TCC AGC AGT AGC -MGB.
- Para RT-PCR 2:
 - Cebador directo FNATEX: secuencia GCT CTG TTT CTC TCA CCA TTT AC,
 - Cebador inverso RNATEX: secuencia CCA CCA GCG GAA AGC CCA,
 - Sonda MGBNAVIC2011: secuencia CAA TAT GCT TCT TCA TGC AA.

Se llevaron a cabo estudios de especificidad teóricos y experimentales con estos cebadores.

Estudio de especificidad teórica:

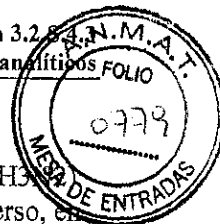
La especificidad teórica del método se demuestra realizando una alineación de nucleótidos de la región amplificada (genes de NA) de la cepa A/Texas/50/2012 (H3N2) y de otras cepas A/H3N2, donde se muestra la ubicación de los cebadores y de las sondas para cada una de las dos RT-PCR. En paralelo, se realizó otra alineación de nucleótidos de las regiones amplificadas (genes de NA), incluyendo otras cepas A/H1N1 y B, donde se muestra la ubicación de los cebadores y de las sondas para cada una de las dos RT-PCR.

- Alineaciones de nucleótidos con otro tipo de cepas A/H3N2:
 - Para RT-PCR 1:

La alineación de nucleótidos muestra 3, 4 o 5 discrepancias entre la cepa análoga a A/Victoria/361/2011 (H3N2) (A/Texas/50/2012 y A/Victoria/361/2011) y la otra cepa A/H3N2 en el cebador inverso. Los cebadores se han diseñado para situar las discrepancias específicas en el extremo 3' del cebador inverso, además se introdujo una discrepancia de un solo nucleótido en la segunda posición del extremo 3' (PCR de análisis de mutaciones por amplificación de discrepancias) con el fin de aumentar la especificidad de la PCR. Por consiguiente, gracias a todas las discrepancias observadas en el cebador inverso combinadas con la tecnología del análisis de mutaciones por amplificación de discrepancias, es poco probable que se produzca la detección de otras cepas A/H3N2 diferentes de las análogas a A/Victoria/361/2011 (H3N2) (A/Texas/50/2012 y A/Victoria/361/2011).

La alineación de nucleótidos muestra una discrepancia en el cebador directo entre las cepas A/Texas/50/2012 (H3N2) y A/Victoria/361/2011 (H3N2). Esta mutación puede disminuir la eficacia de la PCR para A/Texas/50/2012 (H3N2), pero no tendrá efecto sobre la detección, ya que el cebador inverso y la sonda son 100 % idénticos a esta cepa.

- Para RT-PCR 2:



La alineación de nucleótidos muestra dos discrepancias entre las cepas A/Texas/50/2012 (H3N2) y A/Victoria/361/2011 (H3N2) en el cebador directo y una discrepancia en el cebador inverso, es tanto que no hay ninguna diferencia entre las cepas A/Texas/50/2012 (H3N2) y las cepas diferentes de las cepas A/H3N2.

Los cebadores se han diseñado para situar las discrepancias específicas de la cepa A/Texas/50/2012 (H3N2) en el extremo 3' de los cebadores directo e inverso, y se introdujo una discrepancia de un solo nucleótido en la segunda posición desde el extremo 3' de ambos cebadores (PCR de análisis de mutaciones por amplificación de discrepancias) con el fin de aumentar la especificidad de la PCR. Por consiguiente, es poco probable la detección de la cepa A/Victoria/361/2011 (H3N2).

- Las alineaciones de nucleótidos con las cepas A/H1N1 y las cepas B muestran numerosas discrepancias para ambas PCR entre la cepa A/Texas/50/2012 (H3N2) y las cepas A/H1N1 y B en las posiciones del cebador directo, de los cebadores inversos y de las sondas. Debido a la combinación de todas las discrepancias, es poco probable la detección de las cepas A/H1N1 y B.

Estudio de especificidad experimental:

La detección de la cepa A/Texas/50/2012 (H3N2) se realizó con MSL, WSL y DS representativos de los lotes de producción conforme a las BPM. Además, se analizaron otras cepas de A/H3N2, A/H1N1 y B.

La especificidad del sistema se estudió utilizando las cepas siguientes y los resultados se muestran en la Tabla 28.

Tabla 28: Resultados experimentales para la cepa A/Texas/50/2012 (H3N2)

Nombre de la cepa	Detección del gen de la NA		Identificación
	RT-PCR 1	RT-PCR 2	
A/Texas/50/2012 (A/H3N2)	Positiva	Positivo	Positivo
A/Victoria/361/2011 (A/H3N2)	Positiva	Negativo	Negativo
A/Uruguay/716/2007 (A/H3N2)	Negativo	Positivo	Negativo
A/Victoria/210/2009 (A/H3N2)	Negativo	Positivo	Negativo
A/California/7/2009 (A/H1N1)	Negativo	Negativo	Negativo
A/Brisbane/59/2007 (A/H1N1)	Negativo	Negativo	Negativo
B/Massachusetts/2/2012 (B)	Negativo	Negativo	Negativo
B/Hubei-Wujiagang/158/09 (B)	Negativo	Negativo	Negativo

Se obtiene una identificación positiva para la cepa A/Texas/50/2012 (H3N2), ya que se observa una detección simultánea para las dos RT-PCR y se observa identificación negativa para las demás cepas diferentes de A/Texas/50/2012 (H3N2), incluidas las cepas A/H1N1, B y A/H3N2.

El método es específico ya que no se detectó ninguna otra cepa de gripe diferente de A/Texas/50/2012 (H3N2) simultáneamente para las dos RT-PCR.



Conclusión:

El método queda validado para la identificación del antígeno NA de la cepa A/Texas/50/2012 (H3N2) en esta vacuna antigripal.

3.3.4 Validación para la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria)

Los cebadores para la identificación de la NA se diseñaron para que fueran específicos para la cepa vacunal:

- Cebador directo FNABRI: secuencia AAA CGA TGG AAG CAT AAC AGT C,
- Cebador inverso RNABRI: secuencia AGT CCC ATC CCC ATC CTT CC,
- Sonda MGBNABRI: secuencia FAM-TGA ATC TAA TGG GGA CAA AG -MGB.

Se llevaron a cabo estudios de especificidad teóricos y experimentales con estos cebadores.

Estudio de especificidad teórica

La especificidad teórica del método se demuestra realizando una alineación de nucleótidos de la región amplificada (gen de NA) de la cepa B/Brisbane/60/2008 y de otros tipos de cepas B, donde se muestra la ubicación de los cebadores y de las sondas. En paralelo, se realizó otra alineación de nucleótidos de la región amplificada (gen de la NA) que incluía otras cepas A/H1N1 y A/H3N2, la cual muestra la ubicación de los cebadores y de las sondas.

La alineación de nucleótidos muestra 2, 3 o 4 discrepancias entre la cepa B/Brisbane/60/2008 y las demás cepas B en el cebador directo, 2 discrepancias con el cebador inverso y 0 o 2 en la sonda. Los cebadores se han diseñado para situar las discrepancias específicas de la cepa B/Brisbane/60/2008 en el extremo 3' de los cebadores directo e inverso, y se introdujo una discrepancia de un solo nucleótido en la segunda posición desde el extremo 3' de ambos cebadores (PCR de análisis de mutaciones por amplificación de discrepancias) con el fin de aumentar la especificidad de la PCR. En consecuencia, es improbable la detección de otras cepas B diferentes de B/Brisbane/60/2008.

Además, la alineación de nucleótidos muestra numerosas discrepancias entre la cepa B/Brisbane/60/2008 y las cepas A/H1N1 y A/H3N2 en las posiciones del cebador directo, del cebador inverso y de la sonda. Debido a la combinación de todas las discrepancias, la detección de las cepas de A/H1N1 y A/H3N2 es improbable.

Estudio de especificidad experimental

La detección de la cepa B/Brisbane/60/2008 se realizó con lotes de WSL y DS representativos de los lotes de producción conforme a las BPM. Además, se analizaron otras cepas de B, A/H1N1 y A/H3N2.

La especificidad del sistema se estudió utilizando las cepas siguientes y los resultados se muestran en la Tabla 29.

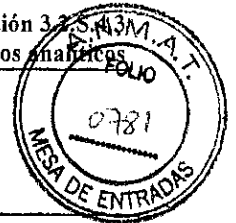


Tabla 29: Resultados experimentales para la cepa B/Brisbane/60/2008

Nombre de la cepa	Detección del gen de la NA
B/Brisbane/60/2008 (B)	Positiva
B/Florida/4/2006 (B)	Negativo
B/Malaysia/2506/2004 (B)	Negativo
A/California/7/2009 (A/H1N1)	Negativo
A/Brisbane/59/2007 (A/H1N1)	Negativo
A/Victoria/210/2009 (A/H3N2)	Negativo
A/Uruguay/716/2007 (A/H3N2)	Negativo

Los resultados obtenidos durante el estudio de especificidad experimental mostraron resultados positivos para la cepa B/Brisbane/60/2008 y resultados negativos para las demás cepas diferentes de B/Brisbane/60/2008, incluidas las cepas A/H1N1, A/H3N2 y B.

El método es específico ya que no se detectó ninguna otra cepa gripal salvo B/Brisbane/60/2008.

Conclusión:

El método queda validado para la identificación del antígeno NA de la cepa B/Brisbane/60/2008 en esta vacuna antigripal.

3.3.5 Validación para la cepa B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata)

Los cebadores para la identificación de la NA se diseñaron para que fueran específicos para la cepa vacunal:

- Cebador directo FNABMASS: secuencia TCG GAT ATA TTG CTA AAA TTT TCA CTG,
- Cebador inverso RNABMASS: secuencia CCC TTT TGC TGC AGA ATG ATC T,
- Sonda MGBNABMASS: secuencia FAM-CAG AAA TAA CTG CAC CAA TAA -MGB.

Se llevaron a cabo estudios de especificidad teóricos y experimentales con estos cebadores.

Estudio de especificidad teórica:

La especificidad teórica del método se demuestra realizando una alineación de nucleótidos de la región amplificada (gen de NA) de la cepa B/Massachusetts/2/2012 y de otros tipos de cepas B, donde se muestra la ubicación de los cebadores y de las sondas. En paralelo, se realizó otra alineación de nucleótidos de la región amplificada (gen de la NA) que incluía otras cepas A/H1N1 y A/H3N2, la cual muestra la ubicación de los cebadores y de las sondas.

La alineación de nucleótidos muestra 1, 2, 3 o 5 discrepancias entre la cepa B/Massachusetts/2/2012 y las demás cepas B en el cebador directo, 3 o 4 discrepancias con el cebador inverso y 0, 1 o 2 discrepancias en la sonda. Los cebadores se han diseñado para situar las discrepancias específicas de la cepa B/Massachusetts/2/2012 en el extremo 3' de los cebadores directo e inverso, y se introdujo una discrepancia de un solo nucleótido en la segunda posición desde el extremo 3' de ambos cebadores (PCR de análisis de mutaciones por amplificación de discrepancias) con el fin de aumentar la especificidad de la PCR. En consecuencia, es improbable la detección de otras cepas B diferentes de B/Massachusetts/2/2012.



Además, la alineación de nucleótidos muestra numerosas discrepancias entre la cepa B/Massachusetts/2/2012 y las cepas A/H1N1 y A/H3N2 en las posiciones del cebador directo, del cebador inverso y de la sonda. Debido a la combinación de todas las discrepancias, la detección de las cepas de A/H1N1 y A/H3N2 es improbable.

Estudio de especificidad experimental:

La detección de la cepa B/ Massachusetts/2/2012 se realizó con lotes de MSL, WSL y DS, representativos de los lotes de producción conforme a las BPM. Además, se analizaron otras cepas de B, A/H1N1 y A/H3N2.

La especificidad del sistema se estudió utilizando las cepas siguientes y los resultados se muestran en la Tabla 30.

Tabla 30: Resultados experimentales para la cepa B/Massachusetts/2/2012

Nombre de la cepa	Detección del gen de la NA
B/Massachusetts/2/2012 (B)	Positiva
A/Brisbane/60/2008 (B)	Negativo
B/Hubei-Wujiagang/158/09 (B)	Negativo
A/California/7/2009 (A/H1N1)	Negativo
A/Brisbane/59/2007 (A/H1N1)	Negativo
A/Victoria/361/2011 (A/H3N2)	Negativo
A/Texas/50/2012 (A/H3N2)	Negativo

Los resultados obtenidos durante el estudio de especificidad experimental mostraron resultados positivos para la cepa B/Massachusetts/2/2012 y resultados negativos para las demás cepas diferentes de B/Massachusetts/2/2012, incluidas las cepas A/H1N1, A/H3N2 y B.

El método es específico ya que no se detectó ninguna otra cepa de gripe salvo B/Massachusetts/2/2012.

Conclusión:

El método queda validado para la identificación del antígeno NA de la cepa B/Massachusetts/2/2012 en esta vacuna antigripal.

3.3.6 Conclusión

El método de identificación del antígeno NA por RT-PCR queda validado para las diferentes cepas A/H1N1, A/H3N2 y para las dos cepas B de esta vacuna antigripal. Para cada nueva cepa, se lleva a cabo una nueva validación.

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
APODERADA
SANOFI PASTEUR S. A.



3.4 Prueba de actividad enzimática de la neuraminidasa

3.4.1 Panorama

La prueba de actividad enzimática de la NA se ha validado en el DS según la guía de la ICH. Puesto que la prueba es una prueba de límites, las diferentes características estudiadas son la especificidad y el límite de detección.

3.4.2 Resumen de la validación

Los resultados de la validación se resumen en la Tabla 31.

Tabla 31: Resumen de los resultados de validación, prueba de actividad enzimática de la neuraminidasa

Característica	Criterio de aceptación	Resultado
Especificidad	Ausencia de NA en la matriz de PBS (cada densidad óptica individual de la muestra de PBS debe ser inferior al umbral de positividad de 1,3).	Ausencia de actividad enzimática de NA en la matriz de PBS (cada densidad óptica individual de la muestra de PBS es inferior al umbral de positividad de 1,3).
Límite experimental de detección [en unidades de neuraminidasa (UN)/mL]	El LD es la última detección positiva de todas las series.	LD del principio activo H1N1 = 0,475
		LD del principio activo H3N2 = 0,372
		LD del principio activo B = 0,384

3.4.3 Resultados y análisis

3.4.3.1 Especificidad

Como la matriz de cada DS (cepas H1N1, H3N2 y B) está compuesta por solución salina tamponada con fosfato (PBS), la especificidad del método queda demostrada analizando la PBS en lugar del producto.

El diseño experimental se basó en 10 análisis independientes realizados por 2 operadores dos veces (en 2 períodos diferentes). Los datos sometidos a análisis son las densidades ópticas (DO). Los diferentes resultados del estudio se presentan a continuación en la Tabla 32.



Tabla 32: Especificidad, resultados de DO

Período 1, operador 1	Período 1, operador 2	Período 2, operador 1	Período 2, operador 2
0,6394	0,6345	0,6747	0,5948
0,5911	0,5669	0,5921	0,7028
0,6808	0,5917	0,7336	0,6809
0,6087	0,5928	0,6805	0,5909
0,6189	0,6028	0,6253	0,5925

Como cada densidad óptica de la muestra de PBS es inferior al umbral de positividad igual a 1,3, no existe actividad enzimática de NA en la matriz de PBS. Por lo tanto, el método es específico.

3.4.3.2 Límite de detección

El diseño experimental se basó en 6 análisis independientes realizados para cada DS por 2 operadores. Cada operador llevó a cabo 3 análisis. Los datos sometidos a análisis son la última concentración para la que se detecta la presencia de actividad enzimática de NA en todas las series, expresada en UN/mL.

Todos los cálculos se realizan con logaritmos, dado que los datos siguen una distribución logarítmica normal.

Los resultados se presentan a continuación en la Tabla 33.

Tabla 33: Límite de detección: última concentración para la que se detecta la presencia de actividad enzimática de NA (UN/mL)

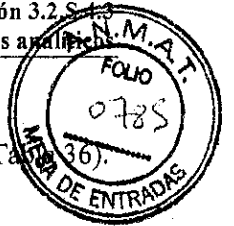
	DS, cepa A/H1N1	DS, cepa A/H3N2	DS, cepa B
Operador 1	0,238	0,372	0,192
Operador 1	0,475	0,372	0,192
Operador 1	0,238	0,372	0,192
Operador 2	0,475	0,372	0,384
Operador 2	0,475	0,372	0,192
Operador 2	0,475	0,372	0,192

Todos los cálculos se realizan en logaritmos, dado que los datos siguen una distribución logarítmica normal.

El límite de detección se expresa de dos maneras:

- El límite de detección experimental, que es la última dilución para la que se observa la presencia de actividad enzimática de NA en todos los experimentos.
- El límite de detección calculado, que se basa en un cálculo estadístico teniendo en cuenta todos los resultados (cálculo de la media y el intervalo de confianza del 95 % de las respuestas).

ROXANA MONTEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 APODERADA
 SANOFI PASTEUR S. A.



Los resultados se resumen en las siguientes tablas para cada cepa (Tabla 34, Tabla 35 y Tabla 36).

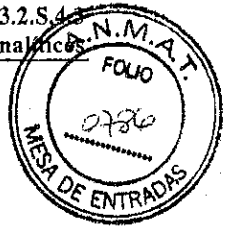


Tabla 34: Límite de detección: Cálculos para el DS de la cepa A/H1N1

	Límite de detección calculado	Límite de detección experimental
Media de las respuestas	-0.4233 en expresión aritmética: 0,377 UN/mL	0,475 UN/mL
Desviación estándar de las respuestas (en expresión logarítmica)	0,1550	/
Intervalo de confianza del 95 % de la media	[-0,5860; -0,2607] en expresión aritmética: [0,259 ; 0,549] UN/mL	

Tabla 35: Límite de detección: Cálculos para el DS de la cepa A/H3N2

	Límite de detección calculado	Límite de detección experimental
Media de las respuestas	-0.4295 en expresión aritmética: 0,372 UN/mL	0,372 UN/mL
Desviación estándar de las respuestas (en expresión logarítmica)	0,0000	/
Intervalo de confianza del 95 % de la media	Como no existe variabilidad, no se puede calcular el intervalo de confianza del 95 % de la media.	

Tabla 36: Límite de detección: Cálculos para el DS de la cepa B

	Límite de detección calculado	Límite de detección experimental
Media de las respuestas	- 0,6665 en expresión aritmética: 0,216 UN/mL	0,384 UN/mL
Desviación estándar de las respuestas (en expresión logarítmica)	0,1229	/
Intervalo de confianza del 95 % de la media	[-0,7955; -0,5376] en expresión aritmética: [0,160 ; 0,290] UN/mL	

3.4.4 Conclusión

La especificidad queda demostrada ya que no existe actividad enzimática de NA en la matriz de PBS.

La prueba es válida para la detección de la actividad enzimática de la NA en la vacuna antigripal en la etapa de DS, con un límite de detección de 0,475 UN/mL para el DS de la cepa H1N1, 0,372 UN/mL para el DS de la cepa H3N2 y 0,384 UN/mL para el DS de la cepa B.



3.5 Contenido de octoxinol 9

3.5.1 Panorama

Como el método es un análisis cuantitativo, las diferentes características estudiadas son: la especificidad, la precisión, la linealidad, la exactitud y el límite de cuantificación porque el octoxinol 9 se considera una impureza.

Los análisis se llevan a cabo según se describe en la sección 3.2.S.4.2 Procedimientos analíticos.

El estudio de validación se realizó con la cepa A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1) (lote FA545090). Esta validación es aplicable para las cepas A y B, dado que el tratamiento de la muestra y el método analítico son los mismos, las matrices de los dos tipos de cepas son similares y las diferencias del proceso de elaboración no afectan la validez del método.

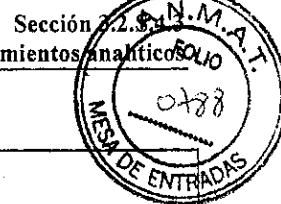
El límite de cuantificación se estableció en una concentración igual a 20 veces el ruido de fondo durante el desarrollo del método, es decir, una concentración de 100µg/mL en el principio activo. Este límite de cuantificación se debe verificar para cada análisis. Por lo tanto, no se validó.

3.5.2 Resumen de la validación

Los resultados de la validación se resumen en la Tabla 37.

Tabla 37: Resumen de los resultados de validación, contenido de octoxinol 9

Característica	Criterio de aceptación	Resultado
Especificidad	En el lote que contiene la solución de agregado, la recuperación porcentual promedio se encuentra entre el 90 % y el 110 %.	La recuperación porcentual promedio y sus límites de confianza son, respectivamente: 98,0 % [95,7 %-100,3 %]
Precisión	El intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia es menor o igual que ±30 µg/mL	- Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 corrida: ±13 µg/mL - redondeos recomendados: a la unidad
Linealidad	$P_{\text{linealidad}} < 0,01$ $P_{\text{desviación de la linealidad}} \geq 0,05$	$P_{\text{linealidad}} < 0,0001$ $P_{\text{desviación de la linealidad}} = 0,71$ Ecuación de la recta de regresión: $Y = (2.848 \pm 6.702) + (0.988 \pm 0.010) \cdot X$ Coeficiente de correlación lineal: $r = 0,9998$ Rango de linealidad: [197-978] µg/mL
Exactitud	La recuperación porcentual promedio calculada para todos los niveles de concentración teórica se halla entre el 90 % y el 110 %.	La recuperación porcentual promedio y sus límites de confianza son, respectivamente: 99,3 % [98,8 %-99,9 %]
Límite de cuantificación	El límite de cuantificación se estableció en una concentración igual a 20 veces el ruido de fondo durante el	Este límite de cuantificación se debe verificar para cada análisis. Por lo tanto, no se validó.



Característica	Criterio de aceptación	Resultado
	desarrollo del método, es decir, una concentración de 100µg/mL en el principio activo.	

3.5.3 Resultados y análisis

3.5.3.1 Especificidad

La especificidad se evalúa a partir de los resultados obtenidos del estudio de linealidad presentado en la Tabla 38.

Para cada operador, las soluciones de agregado medidas y teóricas se calculan mediante la diferencia entre las concentraciones en la vacuna con solución agregada y la vacuna sin solución agregada.

Los porcentajes de recuperación se calculan de la siguiente manera:

$$Percent\ recovery(\%) = \frac{Concentration\ Vaccine\ with\ added\ solution - Concentration\ Vaccine\ without\ added\ solution}{Octoxinol-9\ theoretical\ quantity\ added} \times 100$$

Tabla 38: Especificidad, recuperación calculada entre la cantidad medida de octoxinol 9 y la cantidad teórica

Concentraciones teóricas de octoxinol 9 (µg/mL)	Recuperación calculada entre la cantidad medida de octoxinol 9 y la cantidad teórica (%)		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
785,71695695	101,12	98,06	95,63
977,9161875	99,35	98,32	95,43

Se realiza un análisis estadístico para verificar que los porcentajes de recuperación promedio no son diferentes (después de verificar la homogeneidad de las varianzas).

La recuperación promedio y sus límites de confianza se presentan en la Tabla 39.

Tabla 39: Resultados de especificidad, recuperación promedio y límites de confianza

Recuperación promedio	Límites de confianza del 95 %
98,0%	[95,7%-100,3%]

La especificidad es satisfactoria.

3.5.3.2 Precisión

El diseño experimental fue:

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
APODERADA
SANOFI PASTEUR S. A.

