



Tabla 9: LQ: concentraciones de formaldehído residual ($\mu\text{g/mL}$)

Serie 1	Serie 2	Serie 3
0,453	0,456	0,437
0,447	0,457	0,439
0,451	0,456	0,435
0,431	0,453	0,436
0,451	0,455	0,437
0,449	0,459	0,439

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

La exactitud y la precisión del método se han determinado al nivel del LQ. La precisión del LQ a este nivel se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la Tabla 9:

- La homogeneidad de las varianzas intragrupalas se verifica mediante la prueba de Cochran.
- Una vez obtenida la homogeneidad, se calculan los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia.

Los principales resultados del análisis estadístico son:

- Media general = $-0,350$; en expresión aritmética: $0,45 \mu\text{g/mL}$;
- La prueba de Cochran muestra que las varianzas de las 3 series no son homogéneas. Por lo tanto, se mantiene la varianza más alta (el caso más desfavorable) como estimación de la varianza de la repetibilidad, es decir, la varianza de la serie 1.

La exactitud se ha demostrado en la sección relativa a la exactitud: $R = 102 \%$

Los resultados obtenidos para el LQ se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10: LQ: Repetibilidad y precisión intermedia

Característica	Desviación estándar relativa	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95 % con $k = 1$ corrida y $n = 1$ medición
Características de repetibilidad	1,84 %	0,008	/
Características de precisión intermedia	2,69 %	0,012	$\pm 0,028$; es decir, $x \pm 1,07$ en expresión aritmética

Puesto que la recuperación media se encuentra entre el 80 % y el 120 % y el intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia es $\leq x/\pm 1,3$, el método es exacto y preciso en el nivel de concentración de $0,45 \mu\text{g/mL}$. Por lo que $LQ = 0,45 \mu\text{g/mL}$.



2.2.1.4 Conclusión

Todos los criterios de aceptación de la validación del método se cumplen:

- El método es específico.
- El método es lineal en el rango: [0,4-82,7] $\mu\text{g/mL}$, en una escala log-log.
- Se demuestra la exactitud en el mismo rango, con recuperaciones incluidas entre el 101 % y el 107 %.
- El método es preciso: el intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia es $x \pm 1,05$ para 1 serie con 1 medición, con una media igual a 31,4 $\mu\text{g/mL}$.
- El LQ definido a la concentración de LQ = 0,4 $\mu\text{g/mL}$ es:
 - Exacto, con una recuperación porcentual igual a $\bar{R} = 102 \%$.
 - Preciso, ya que el intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia es $x \pm 1,07$.

En consecuencia, el método es específico, lineal, exacto y preciso, y el LQ de 0,4 $\mu\text{g/mL}$ es exacto y preciso.

El método es válido para cuantificar el formaldehído residual en la QIV en las etapas de PFAG y FP.

2.2.2 Contenido proteico total

2.2.2.1 Panorama

Las proteínas se precipitan con un reactivo sulfovolfámico y, a continuación, se recolecta el precipitado.

Durante la mineralización sulfúrica el nitrógeno orgánico se transforma en sulfato de amonio. Tras la alcalinización con hidróxido de sodio se recupera amoníaco destilado y después se analiza con una solución titulada de ácido clorhídrico.

Como el método es un análisis cuantitativo, se validaron las siguientes características de validación: linealidad, exactitud y precisión (precisión intermedia y repetibilidad).

No se evaluó la especificidad durante esta validación, ya que la prueba de proteínas totales (determinación de nitrógeno después de la mineralización sulfúrica) está basada en el método n.º 2.5.9 de la Ph. Eur., edición actual. Este método es específico para la determinación del nitrógeno.

Puesto que el LQ se calcula en cada análisis, no se validó.

2.2.2.2 Resumen de la validación

Se presenta un resumen de los resultados de validación en la Tabla 11.

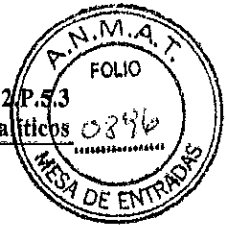


Tabla 11: Contenido proteico total, resumen de la validación

Característica	Criterio de aceptación	Resultado
Precisión	El intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia debe ser menor o igual que $\pm 30 \mu\text{g/mL}$.	Coeficiente de variación: <ul style="list-style-type: none"> • Repetibilidad: 1,35 % • Precisión intermedia: 1,35 % Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para una serie con una medición realizada del modo habitual: $\pm 8 \mu\text{g/mL}$.
Linealidad	$P_{\text{linealidad}} < 0,01$ $P_{\text{desviación de la linealidad}} \geq 0,05$	$P_{\text{linealidad}} < 0,01$ $P_{\text{desviación de la linealidad}} > 0,98$ Después del ajuste lineal de $Y = \text{concentración medida en función de } X = \text{concentración teórica}$, se establece la siguiente ecuación: $Y = 5,274 + 0,975 \cdot X$ Rango de linealidad: [36-753] $\mu\text{g/mL}$.
Exactitud	La recuperación porcentual promedio debe estar comprendida entre el 90 % y el 110 %.	La recuperación porcentual promedio y sus límites de confianza del 95 % son los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> • - Para la concentración proteica teórica total 56,989 $\mu\text{g/mL}$: 108 % [102 – 113] % - Para las concentraciones proteicas teóricas totales 142,472; 427,417; 569,889 y 740,856 $\mu\text{g/mL}$: 99 % [96 – 102] %

El método es específico, lineal y exacto en el rango de [36-753] $\mu\text{g/mL}$ con recuperaciones promedio del 108 % para una concentración proteica teórica total de 56,989 $\mu\text{g/mL}$ y del 99 % para concentraciones proteicas teóricas totales de 142,472; 427,417; 569,889 y 740,856 $\mu\text{g/mL}$.

La precisión del método es aceptable con un intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia de $\pm 8 \mu\text{g/mL}$ para 1 corrida en condiciones de rutina.

2.2.2.3 Resultados y análisis

2.2.2.3.1 Precisión

El diseño experimental fue el siguiente:

- Precisión (precisión intermedia): se realizaron 3 grupos independientes de análisis utilizando el mismo método, en el mismo laboratorio y los realizaron 3 operadores en días diferentes.
- Precisión (repetibilidad): dentro de cada uno de los grupos antes citados se realizaron 6 análisis independientes con el mismo método, en una muestra primaria homogénea, en el mismo laboratorio, con el mismo equipo, a cargo del mismo operador, en un período breve.

Los datos analizados son concentraciones proteicas totales expresadas en $\mu\text{g/mL}$.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la precisión se presentan en la Tabla 12.


 ROXANA MONTEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 APODERADA
 SANOFI PASTEUR S. A.



Tabla 12: Precisión, contenido proteico total medido (µg/mL)

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
285	282	284
290	283	283
288	282	284
276	283	287
292	282	291
286	287	284

Según el análisis estadístico realizado con los datos de la Tabla 12.

- La prueba de Cochran muestra que las varianzas de los 3 grupos son heterogéneas. Como la prueba de Cochran se halla en el límite de significancia, la ligera heterocedasticidad es aceptable.
- Las características de repetibilidad y de precisión intermedia, y el intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 corrida y 1 medición que se realizan de la manera habitual se presentan en la Tabla 13.
- Media general: $\bar{m} = 284,944 \mu\text{g/mL}$.

Tabla 13: Características de repetibilidad y precisión intermedia

	Coefficiente de variación	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95%
Características de repetibilidad	1,35 %	3,840	No es aplicable
Características de precisión intermedia	1,35 %	3,843	$\pm 8,108 \mu\text{g/mL}^*$

* Se recomienda redondear los resultados a la unidad.



La precisión es satisfactoria.

2.2.2.3.2 Linealidad

Para la linealidad (y la exactitud), el diseño experimental se basó en 3 pruebas independientes realizadas por 3 operadores en 3 días diferentes. Cada prueba incluía un rango de seis niveles de dilución.

Los datos analizados son concentraciones proteicas totales expresadas en µg/mL.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la linealidad se presentan en la Tabla 14.

Tabla 14: Linealidad, concentraciones proteicas totales medidas

Nivel	Concentración teórica (µg/mL)	Concentración medida (µg/mL)		
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
1	56,989	64	60	60
2	142,472	148	146	137
3 (muestra pura)	284,944	286	287	273
4	427,417	432	429	413
5	569,889	566	568	545
6	740,856	734	737	713

Según el análisis estadístico realizado con los datos de la Tabla 14.

- La prueba de Cochran revela que las varianzas de los 6 niveles son homogéneas.
- La dependencia entre la concentración proteica total teórica y la concentración proteica total medida, así como la linealidad de esta relación, se verifican mediante una regresión lineal no ponderada utilizando el método de los mínimos cuadrados. Se observa una pendiente significativa al nivel del 1 % y una desviación no significativa de la linealidad al nivel del 5 %.
- La ecuación de la recta de regresión se presenta en la Tabla 15:
- El gráfico de linealidad se presenta en la Figura 2.

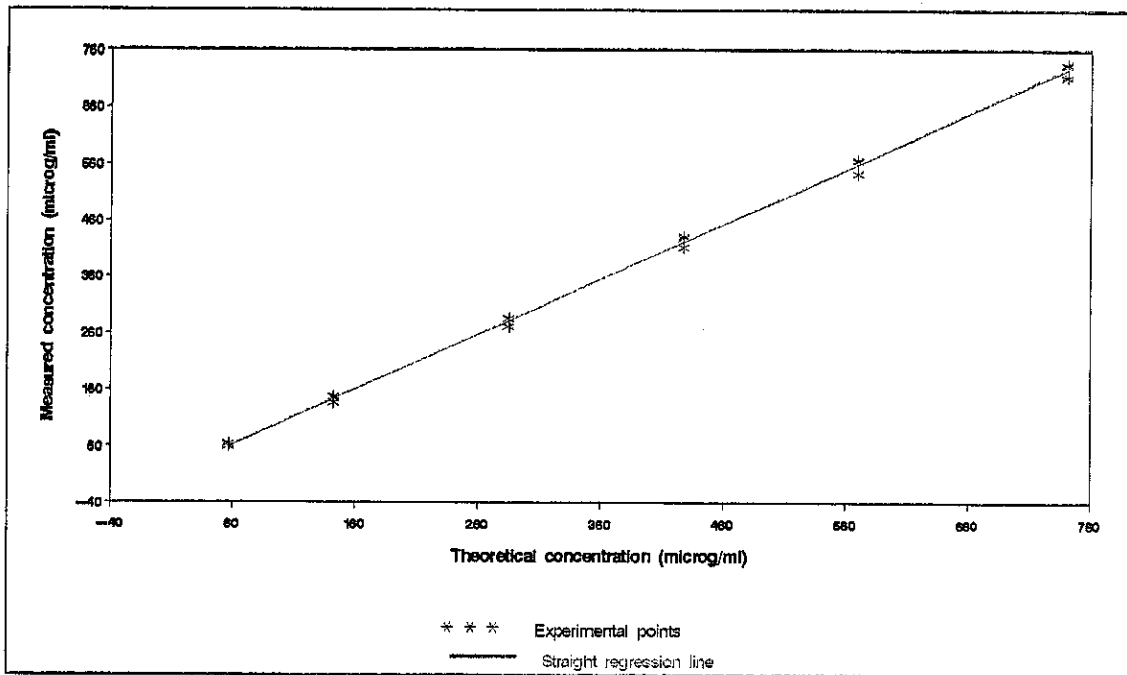
Tabla 15: Linealidad: ecuación de la recta de regresión

ecuación de la recta de regresión	Coefficiente de correlación lineal	Rango de linealidad en µg/mL
$Y = (5,274 \pm 7,709) + (0,975 \pm 0,018) \cdot X$	R = 0,9994 con 16 grados de libertad	[35,893 – 752,800]
Donde: X = concentración proteica total teórica expresada en µg/mL. Y = concentración proteica total medida expresada en µg/mL.		

ROXANA MONTEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 APODERADA
 SANOFI PASTEUR S. A.



Figura 2: Gráfico de linealidad, concentración proteica



La linealidad es satisfactoria.

2.2.2.3.3 Exactitud

La exactitud se evalúa a partir de los resultados obtenidos del estudio de linealidad presentado en la Tabla 14; los resultados de la muestra pura no se incluyen en esta evaluación.

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

- La recuperación porcentual se calcula para cada nivel de concentración teórica del contenido proteico total y para cada grupo.

La recuperación porcentual se presenta en la Tabla 16.



Tabla 16: Exactitud, recuperaciones calculadas entre las concentraciones proteicas totales medidas y las concentraciones proteicas teóricas

Nivel	Concentración teórica (µg/mL)	Recuperación porcentual (%)			Recuperación promedio (%)
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	
1	56,989	112,30	105,28	105,28	107,623
2	142,472	103,88	102,48	96,16	100,838
3	427,417	101,07	100,37	96,63	99,357
4	569,889	99,32	99,67	95,63	98,265
5	740,856	99,07	99,48	96,24	98,206

El análisis estadístico se realiza en 5 niveles de concentración proteica total, ya que no se incluyen los resultados de la muestra pura.

- La prueba de Cochran muestra que las varianzas de los 5 niveles son homogéneas.
- Como el análisis de varianzas no permite llegar a una conclusión acerca de la equivalencia de las medias de los niveles, se lleva a cabo una prueba de Student-Newmann-Keuls:

Esta prueba demuestra que la recuperación para la concentración proteica teórica total del nivel de dilución n.º 1 es significativamente diferente de las recuperaciones para la concentración teórica de los niveles de dilución n.º 2, 3, 4 y 5 (vea la Tabla 16). Las recuperaciones promedio se calculan entonces por un lado para la concentración proteica teórica total del nivel de dilución n.º 1 y por el otro lado para la concentración teórica de los niveles de dilución n.º 2, 3, 4 y 5. Las recuperaciones promedio y sus límites de confianza se presentan en la Tabla 17.

Tabla 17: Resultados de exactitud

Concentración teórica (µg/mL)	Recuperación promedio	Límites de confianza del 95 %
56,989	108 %	[102 – 113] %
142,472	99 %	[96 – 102] %
427,417		
569,889		
740,856		

La exactitud es satisfactoria.

2.2.2.4 Conclusión

El método es válido para cuantificar las proteínas totales en QIV en las etapas de PFAG y FP.



2.2.3 Contenido de ovoalbúmina

2.2.3.1 Panorama

Dado que el método es un análisis cuantitativo de una impureza, los parámetros estudiados fueron la linealidad, la exactitud, la precisión (precisión intermedia y repetibilidad), el LQ y la especificidad.

2.2.3.2 Resumen de la validación

En la Tabla 18 se presenta un resumen de la validación.

Tabla 18: Contenido de ovoalbúmina, resumen de validación

Característica	Criterio de aceptación	Resultado
Especificidad	En el lote sin ovoalbúmina: la especificidad es satisfactoria cuando los títulos obtenidos son inferiores al límite de cuantificación.	Los resultados obtenidos son inferiores al LQ.
	En el lote con agregado, la recuperación porcentual promedio debe estar comprendida entre el 80 % y el 120 %.	Recuperación porcentual promedio: 101 %.
Precisión	El intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia debe ser menor o igual que s^* : 1,50.	Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para una corrida con 1 medición realizada del modo habitual: s^* : 1,41 en expresión aritmética.
Linealidad	$P_{\text{linealidad}} < 0,01$ $P_{\text{desviación de la linealidad}} \geq 0,05$	$P_{\text{linealidad}} < 0,01$ $P_{\text{desviación de la linealidad}} = 0,24$ Después del ajuste lineal de $Y = \log$ concentración medida en función de $X = \log$ concentración teórica, se observa la siguiente ecuación: $Y = 0,055 + 0,964 \cdot X$ Rango de linealidad: [1,501-206,486] redondeado a [2-206] ng/mL.
Exactitud	La recuperación porcentual promedio debe estar comprendida entre el 80% y el 120%.	La recuperación porcentual promedio y sus límites de confianza del 95 % son los siguientes: 101 % [97 % - 105 %].
Límite de cuantificación	A una concentración próxima al límite de cuantificación: El intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia debe ser menor o igual que s^* : 1,50. La recuperación porcentual promedio debe estar comprendida entre el 80% y el 120%.	Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para una serie con una medición realizada del modo habitual: s^* : 1,33 Recuperación porcentual promedio: 110 %
Especificidad	En el lote sin ovoalbúmina: la especificidad es satisfactoria cuando los títulos obtenidos son inferiores al límite de cuantificación.	Los resultados obtenidos son inferiores al LQ.
	En el lote con agregado, la recuperación porcentual promedio debe estar comprendida entre el 80 % y el 120 %.	Recuperación porcentual promedio: 101 %.



El método es específico, lineal y exacto en el rango de [2 - 206] ng/mL con una recuperación promedio del 101 %.

La precisión del método es aceptable con un IC del 95 % de la precisión intermedia de $\pm 1,41$ para 1 corrida en condiciones de rutina.

El LQ es igual al límite más bajo de la curva estándar; es decir, 1,25 ng/mL.

2.2.3.3 Resultados y análisis

2.2.3.3.1 Especificidad

La evaluación de la especificidad se basa en:

- Los resultados de linealidad obtenidos para las muestras con agregado presentados en la Tabla 24.
- Los resultados de una muestra de vacuna comercial sin ovoalbúmina analizada por 3 operadores de forma independiente. Estos resultados se presentan en la Tabla 21.

Resultados de las muestras con agregado:

La recuperación porcentual se presenta en la Tabla 19.

Tabla 19: Especificidad: recuperación porcentual promedio calculada entre la ovoalbúmina agregada medida y la ovoalbúmina agregada teórica

Concentración teórica (ng/mL)	Recuperación porcentual (%)		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
54,46	107,76	60,11	86,50
104,46	96,40	92,29	96,66
124,46	110,91	87,37	91,59
174,46	94,92	73,67	83,38

El análisis estadístico se realiza en 4 niveles de concentración de ovoalbúmina:

- La prueba de Cochran muestra que las varianzas de los 4 niveles son homogéneas.
- El análisis de varianzas permite concluir que las medias interniveles son iguales.
- La recuperación promedio y sus límites de confianza se presentan en la Tabla 20.

Tabla 20: Especificidad, resultados de las muestras con agregado

Recuperación promedio	Límites de confianza del 95 %
101 %	[95 - 107] %



Muestra de vacuna sin ovoalbúmina

Las densidades ópticas medidas en la muestra de la vacuna comercializada sin ovoalbúmina se presentan en la Tabla 21.

Tabla 21: Densidad óptica (DO) medida en la muestra sin ovoalbúmina

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
0,053	0,056	0,084	0,064

Por ende, el método es específico.

2.2.3.3.2 Precisión

Para la precisión, el diseño experimental fue el siguiente:

- Precisión (precisión intermedia): se realizaron 3 grupos independientes de análisis utilizando el mismo método, en el mismo laboratorio y los realizaron 4 operadores en días diferentes.
- Precisión (repetibilidad): dentro de cada uno de los grupos antes citados se realizaron 6 análisis independientes con el mismo método, en una muestra primaria homogénea, en el mismo laboratorio, con el mismo equipo, a cargo del mismo operador, en un período breve.

Los datos analizados son concentraciones de ovoalbúmina expresadas en ng/mL.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la precisión se presentan en la Tabla 22.

Tabla 22: Precisión, concentraciones medidas de ovoalbúmina en la vacuna pura (ng/mL)

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
25,3	33,9	27,8	27,8
23,9	31,7	25,2	25,2
23,6	35,3	25,6	25,6
23,9	32,9	22,4	22,4
23,4	34,3	25,1	25,1
21,1	27,8	22,7	22,7

Según el análisis estadístico realizado con los datos de la Tabla 22:

- la prueba de Cochran muestra que las varianzas de los 4 grupos son homogéneas.
- Las características de repetibilidad y de precisión intermedia, y el intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 corrida y 1 medición que se realizan de la manera habitual se presentan en la Tabla 23.
- Media general: $\bar{m} = 27,17$ ng/mL.



Tabla 23: Características de repetibilidad y precisión intermedia

	Varianza	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95%
Características de repetibilidad	0,001144	0,034	No se aplica
Características de precisión intermedia	0,005106	0,071	$\times/1,41$ en expresión aritmética (para $k = 1$ corrida y $n = 1$ medición)

La precisión es aceptable.

2.2.3.3.3 Linealidad

Para la linealidad y la exactitud, el diseño experimental se basó en 3 corridas independientes, realizadas por 3 operadores en 3 días diferentes. Cada corrida incluía un rango de 9 niveles de dilución (4 vacunas diluidas, 1 vacuna pura y 4 vacunas con agregado).

Los datos analizados son concentraciones de ovoalbúmina expresadas en ng/mL.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la linealidad se presentan en la Tabla 24.

Tabla 24: Linealidad, concentraciones medidas de ovoalbúmina (ng/mL)

Nivel	Concentración teórica (ng/mL)*	Concentraciones medidas (ng/mL)		
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
1	1,70	1,8	1,9	2,0
2	3,40	3,5	3,5	3,9
3	6,79	7,1	7,3	7,4
4	13,59	13,6	12,9	13,2
5 (muestra pura)	27,17	29,0	28,9	30,9
6 (muestra con agregado)	54,46	58,4	45,3	54,5
7 (muestra con agregado)	104,46	103,5	100,3	105,6
8 (muestra con agregado)	124,46	136,9	113,9	120,0
9 (muestra con agregado)	174,46	168,8	137,4	153,7

* Las concentraciones teóricas de ovoalbúmina se calculan a partir de la media de los análisis de precisión realizados con el mismo lote ($m = 27,17$ ng/mL):
 Nivel 1: $(0,1 * 27,17) / (0,1 + 1,5 + 0) = 1,70$ ng/mL
 Nivel 2: $(0,2 * 27,17) / (0,2 + 1,4 + 0) = 3,40$ ng/mL
 Nivel 3: $(0,4 * 27,17) / (0,4 + 1,2 + 0) = 6,79$ ng/mL
 Nivel 4: $(0,8 * 27,17) / (0,8 + 0,8 + 0) = 13,59$ ng/mL
 Nivel 5: 27,17 (media de los análisis de precisión)
 Nivel 6: $(0,9 * 27,17 + 0,1 * 300) / (0,9 + 0 + 0,1) = 54,46$ ng/mL



Nivel 7: $(0,9 * 27,17 + 0,1 * 800) / (0,9 + 0 + 0,1) = 104,46 \text{ ng/mL}$
 Nivel 8: $(0,9 * 27,17 + 0,1 * 1000) / (0,9 + 0 + 0,1) = 124,46 \text{ ng/mL}$
 Nivel 9: $(0,9 * 27,17 + 0,1 * 1500) / (0,9 + 0 + 0,1) = 174,46 \text{ ng/mL}$

Según el análisis estadístico realizado con los datos de la Tabla 24:

- La prueba de Cochran revela que las varianzas de los 9 niveles son homogéneas.
- La dependencia entre la concentración teórica de ovoalbúmina y la concentración medida de ovoalbúmina, así como la linealidad de esta relación, se verifican mediante una regresión lineal no ponderada utilizando el método de los mínimos cuadrados. Se observa una pendiente significativa al nivel del 1 % y una desviación no significativa de la linealidad al nivel del 5 %.
- Luego se calcula el límite inferior y superior del rango de linealidad de la siguiente manera:

$$\text{Límite inferior} = \hat{Y}_{(\text{mín.})} - 3\sqrt{s^2}$$

$$\text{Límite superior} = \hat{Y}_{(\text{máx.})} + 3\sqrt{s^2}$$

donde Y(mín.) y Y(máx.) son respectivamente las concentraciones estimadas mediante la recta de regresión en el nivel mínimo y máximo analizado y s^2 es la varianza residual de la regresión.

La ecuación de la recta de regresión se presenta en la Tabla 25.

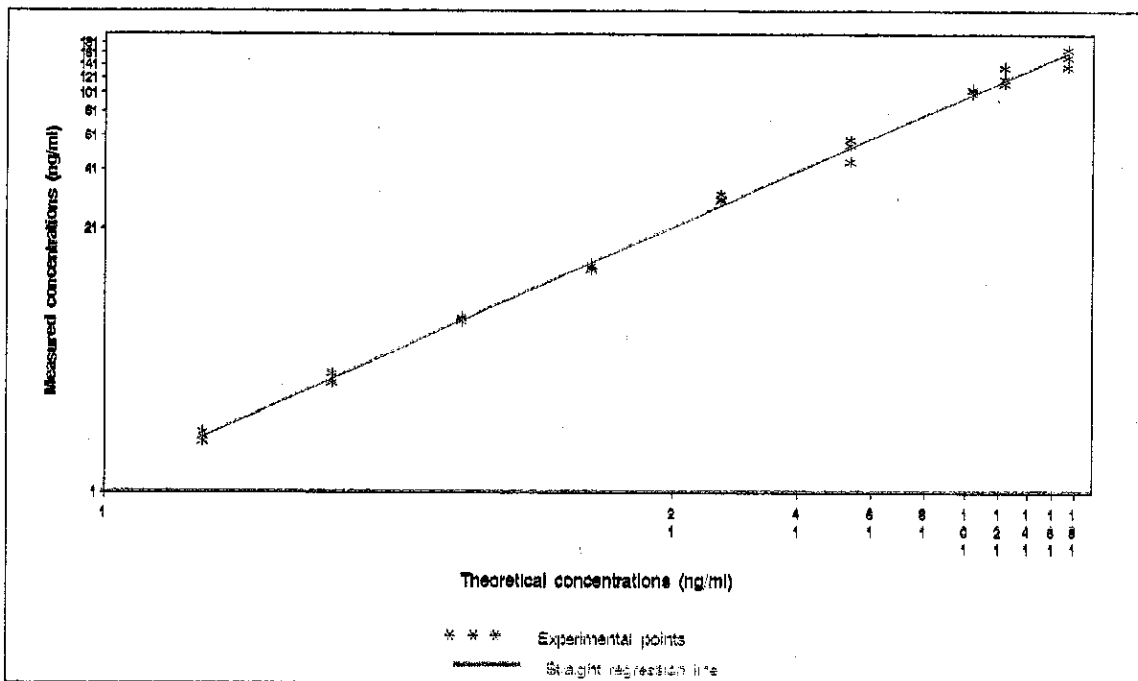
El gráfico de linealidad se presenta en la Figura 3.

Tabla 25: Linealidad: ecuación de la recta de regresión

ecuación de la recta de regresión	Coefficiente de correlación lineal	Rango de linealidad en ng/mL
$Y = (0,055 \pm 0,029) + (0,964 \pm 0,019) \cdot X$	0,9988 con 25 grados de libertad	[1,501 – 206,486]
Donde: X = concentración teórica de ovoalbúmina expresada en log (ng/mL). Y = concentración medida de ovoalbúmina expresada en log (ng/mL).		



Figura 3: Gráfico de linealidad, concentración de ovoalbúmina



La linealidad es aceptable.

2.2.3.3.4 Exactitud

La exactitud se evalúa a partir de los resultados obtenidos del estudio de linealidad presentado en la Tabla 24; los resultados de la muestra pura no se incluyen en esta evaluación.

Los porcentajes de recuperación calculados entre las concentraciones medidas de ovoalbúmina y las concentraciones teóricas de ovoalbúmina se presentan en la Tabla 26.

Tabla 26: Exactitud, porcentajes de recuperación

Concentración teórica (ng/mL)	Recuperación porcentual (%)		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
1,70	105,99	111,87	117,76
3,40	103,04	103,04	114,82
6,79	104,51	107,46	108,93
13,59	100,10	94,95	97,15
54,46	107,24	83,19	100,08
104,46	99,08	96,02	101,10
124,46	110,00	91,52	96,42
174,46	96,76	78,76	88,10

NOXANA MONTEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 APODERADA
 SANOFI PASTEUR S.A.



El análisis estadístico se realiza en 8 niveles de concentración de ovoalbúmina, ya que no se incluyen los resultados obtenidos para la muestra pura.

- La prueba de Cochran muestra que las varianzas de los 8 niveles son homogéneas.
- Como el análisis de varianza no permite llegar a una conclusión acerca de la equivalencia de las medias interniveles, se lleva a cabo una prueba de Student-Newmann-Keuls:

Este test demuestra que la recuperación para la concentración teórica de ovoalbúmina del nivel de dilución n.º 1 (111,874 %) es significativamente diferente de la recuperación para la concentración teórica del nivel de dilución n.º 9 (87,873 %). No obstante, estas recuperaciones no son significativamente diferentes de las recuperaciones de los demás niveles de dilución. Como la prueba se halla en el límite de significancia y las recuperaciones a niveles de dilución extremos (niveles de dilución n.º 1 y n.º 9) cumplen el criterio de aceptación, se calcula la recuperación promedio para todos los niveles de dilución.

- La recuperación promedio y sus límites de confianza se presentan en la Tabla 27.

Tabla 27: Resultados de exactitud

Recuperación promedio	Límites de confianza del 95 %
101 %	[97 – 105] %

La exactitud es aceptable.

2.2.3.3.5 Límite de cuantificación

Determinación del LQ

Los datos analizados son las DO medidas en la muestra testigo (18 corridas).

Los resultados obtenidos en la evaluación del LQ se presentan en la Tabla 28.



Tabla 28: DO de la muestra testigo

Corrida	DO de la muestra testigo
1	0,047
2	0,055
3	0,068
4	0,055
5	0,059
6	0,055
7	0,056
8	0,051
9	0,050
10	0,053
11	0,055
12	0,060
13	0,054
14	0,071
15	0,057
16	0,098
17	0,060
18	0,055

El límite inferior de cuantificación (LLOQ) expresado en concentración es $LQ_{(C)} = 0,66 \text{ ng/mL}$.

El límite inferior de la curva estándar es $1,25 \text{ ng/mL}$ y corresponde a la menor concentración que se puede medir en la vacuna.

El LLOQ calculado a $0,66 \text{ ng/mL}$ es menor que el límite más bajo de la curva estándar; por consiguiente, el LQ se establecerá en $1,25 \text{ ng/mL}$.

Verificación de la exactitud y la precisión del LQ

El diseño experimental fue el siguiente:

- Cuatro operadores realizan seis análisis independientes en el mismo laboratorio en días diferentes, a una concentración próxima al LQ.
- Cada análisis se llevó a cabo de forma independiente (preparado independiente de la muestra y de la referencia).

Los resultados se presentan en la Tabla 29.



Tabla 29: LQ, recuperación porcentual calculada entre la dilución medida y la dilución teórica

	Concentración medida de ovoalbúmina próxima al LQ (ng/mL)	Resultados promedio para la precisión por operador (ng/mL)	Dilución medida	Recuperación porcentual*
Operador 1	1,4	23,50	0,0596	95,32
	1,8		0,0766	122,56
Operador 2	1,9	32,55	0,0584	93,39
Operador 3	1,8	24,73	0,0728	116,44
	1,9		0,0768	122,91
Operador 4	2,0	28,82	0,0694	111,05
	1,9		0,0659	105,49

* Las recuperaciones se calculan a partir de las diluciones teóricas y medidas. La dilución teórica corresponde a la proporción entre la concentración próxima al LQ (nivel de dilución 1) y la concentración próxima a la de rutina (media general obtenida para la precisión): $1,698/27,173 = 0,0625$.

• **Precisión del LQ:**

La precisión del LQ se evalúa a partir de los datos de los análisis presentados en la Tabla 29. Los resultados se presentan en la Tabla 30.

Tabla 30: Precisión del LQ

Varianza	Intervalo de confianza del 95 %
0,002609 con 6 grados de libertad (df)	x/ 1,33*

* El criterio de aceptación para la precisión es el IC del 95 % de la precisión intermedia es \leq^* : 1,20. Este criterio de aceptación no se verifica. No obstante, el criterio de aceptación establecido para la validación anterior del contenido de ovoalbúmina realizada con PFAG de vacunas antigripales de Sanofi Pasteur es: el IC del 95 % de la precisión intermedia es \leq^* : 1,50. El resultado obtenido para la precisión se considera aceptable ya que:

- El criterio de aceptación para el contenido de ovoalbúmina del PFAG sigue siendo el mismo (≤ 100 ng/mL).
- Los resultados obtenidos para el contenido de ovoalbúmina del PFAG de la vacuna antigripal tetravalente y del PFAG de otras vacunas antigripales son semejantes (entre 25 y 30 ng/mL).

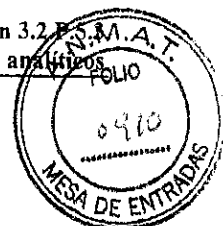
La precisión del LQ es aceptable.

• **Exactitud del LQ**

Para la evaluación de la exactitud se calcula la recuperación porcentual. Los resultados se presentan en la Tabla 29. La recuperación promedio a la concentración más próxima al LQ es del: 110 %.

La exactitud del LQ es aceptable.

ROXANA MONTEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 APODERADA
 SANOFI PASTEUR S.A.



2.2.3.4 Conclusión

El método es válido para cuantificar el contenido de ovoalbúmina por el método de ELISA en QIV en la etapa de PFAG.

2.2.4 Proporción [contenido proteico total/contenido de antígeno hemaglutinina]

La proporción [contenido proteico total/contenido de antígeno hemaglutinina (HA)] se obtiene mediante el cálculo entre el contenido proteico total, cuya validación se describe más arriba, y el contenido de antígeno HA, cuya validación se describe a continuación.

Por lo tanto no se proporciona información de validación para esta proporción.

3 Producto llenado

3.1 Pruebas farmacopeicas detalladas en la Farmacopea Europea

Las pruebas que se presentan a continuación se validaron de conformidad con los requerimientos de la Ph. Eur. (Los informes de validación están disponibles pero no se incluyen):

- Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica, realizada por filtración a través de membrana de conformidad con la Ph. Eur. 2.6.1, edición actual, "Esterilidad".
- Prueba de pH, realizada conforme a la Ph. Eur. 2.2.3, edición actual, "Determinación potenciométrica del pH".
- Contenido de endotoxinas bacterianas, llevada a cabo con el método de colorimetría cinética con lisado de amebocitos de Limulus (LAL), de conformidad con la Ph. Eur. 2.6.14, edición actual "Endotoxinas bacterianas".

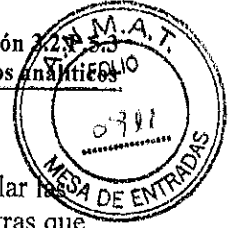
Las pruebas que se presentan a continuación, que se llevan a cabo de conformidad con los requerimientos de la Ph. Eur., no se validaron:

- La prueba de volumen extraíble se lleva a cabo de conformidad con la Ph. Eur. 2.9.17, edición actual, "Prueba de volumen extraíble de las preparaciones parenterales", y por lo tanto no se validó.
- Prueba de aspecto después de la disolución, llevada a cabo conforme a la Ph. Eur. 2.9.20, edición actual, "Contaminación por partículas: partículas visibles", no se validó, ya que el método consiste únicamente en una observación del producto analizado.

3.2 Pruebas no descritas o no detalladas en la Farmacopea Europea

3.2.1 Introducción

El contenido de antígeno HA en el DP se determina mediante inmunodifusión radial simple (SRID) con base en los antisueros específicos para las cepas y los antígenos de referencia.



Debido a la reactividad cruzada de las cepas B, el método de SRID utilizado para controlar las cepas B en lotes de DP se realiza con un antígeno de referencia bivalente estándar, mientras que las cepas A se controlan mediante el método clásico de SRID.

Cabe señalar que, en el futuro, la validación del método de SRID se llevará a cabo según los requisitos de la ICH (método clásico para las cepas A y método bivalente para las cepas B) en cada cambio de cepa (o cepa reordenante) y/o lotes de reactivos.

En el futuro, para cada nueva combinación de B (incluidos los nuevos lotes de reactivos), los análisis preliminares de exactitud se realizarán con el método de SRID bivalente para detectar posibles niveles altos de reactividad cruzada entre los 2 reactivos de la cepa B, que podrían afectar el análisis de exactitud. Estos análisis se realizarán antes de la validación del método de SRID bivalente.

3.2.2 Contenido e identificación del antígeno HA

La prueba para la cuantificación del antígeno HA por SRID se ha validado en la etapa de DP, según las guías de la ICH.

3.2.2.1 Panorama

La validación de la cuantificación del antígeno HA por SRID se lleva a cabo en el lote S4456 para las cepas y las referencias siguientes:

- A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1) (antígeno NIBSC 13/164, antisuero NIBSC 14/134);
- A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2) (antígeno NIBSC 13/116, antisuero NIBSC 13/178);
- B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) (antígeno TGA 2014/101B, antisuero TGA AS397-1);
- B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata) (antígeno NIBSC 13/134, antisuero NIBSC 13/182).

El método y el tratamiento de la muestra son idénticos y la matriz de la muestra es idéntica en las diferentes etapas, por lo que la validación también se aplica a las etapas de PFAG y FP.



3.2.2.2 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 31.

Tabla 31: 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.	Para el control negativo no se observa ningún anillo de precipitación para las 4 cepas.															
	No hay presencia de anillos dobles.	No hay anillos dobles para las 4 cepas.															
	La intensidad del anillo es comparable con la referencia evaluada en la misma placa.	La intensidad del anillo es similar al anillo de referencia para las 4 cepas. Para cada antisuero, hay ausencia de anillos o anillos significativamente diferentes para las otras cepas.															
Precisión	El intervalo de confianza de la precisión intermedia debe ser $\leq 1,2$ para $k = 1$ corrida con $n = 1$ medición	El intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 corrida y 3 corridas con 1 medición (redondeos recomendados al décimo) son:															
		<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Intervalo de confianza del 95 % para $k = 1$ corrida y $n = 1$ medición (para liberación)</th> <th>Intervalo de confianza del 95 % para $k = 3$ corridas y $n = 1$ medición (para información: estudios de estabilidad)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Cepa A/H1N1</td> <td>$\pm 0,041$ que equivale a $\times 1,10$ en forma aritmética</td> <td>$\pm 0,024$ que equivale a $\times 1,06$ en forma aritmética</td> </tr> <tr> <td>Cepa A/H3N2</td> <td>$\pm 0,052$ que equivale a $\times 1,13$ en forma aritmética</td> <td>$\pm 0,030$ que equivale a $\times 1,07$ en forma aritmética</td> </tr> <tr> <td>B/linaje Victoria (referencia bivalente)</td> <td>$\pm 0,047$ que equivale a $\times 1,11$ en forma aritmética</td> <td>$\pm 0,027$ que equivale a $\times 1,06$ en forma aritmética</td> </tr> <tr> <td>B/linaje Yamagata (referencia bivalente)</td> <td>$\pm 0,055$ que equivale a $\times 1,14$ en forma aritmética</td> <td>$\pm 0,032$ que equivale a $\times 1,08$ en forma aritmética</td> </tr> </tbody> </table>		Intervalo de confianza del 95 % para $k = 1$ corrida y $n = 1$ medición (para liberación)	Intervalo de confianza del 95 % para $k = 3$ corridas y $n = 1$ medición (para información: estudios de estabilidad)	Cepa A/H1N1	$\pm 0,041$ que equivale a $\times 1,10$ en forma aritmética	$\pm 0,024$ que equivale a $\times 1,06$ en forma aritmética	Cepa A/H3N2	$\pm 0,052$ que equivale a $\times 1,13$ en forma aritmética	$\pm 0,030$ que equivale a $\times 1,07$ en forma aritmética	B/linaje Victoria (referencia bivalente)	$\pm 0,047$ que equivale a $\times 1,11$ en forma aritmética	$\pm 0,027$ que equivale a $\times 1,06$ en forma aritmética	B/linaje Yamagata (referencia bivalente)	$\pm 0,055$ que equivale a $\times 1,14$ en forma aritmética	$\pm 0,032$ que equivale a $\times 1,08$ en forma aritmética
			Intervalo de confianza del 95 % para $k = 1$ corrida y $n = 1$ medición (para liberación)	Intervalo de confianza del 95 % para $k = 3$ corridas y $n = 1$ medición (para información: estudios de estabilidad)													
		Cepa A/H1N1	$\pm 0,041$ que equivale a $\times 1,10$ en forma aritmética	$\pm 0,024$ que equivale a $\times 1,06$ en forma aritmética													
		Cepa A/H3N2	$\pm 0,052$ que equivale a $\times 1,13$ en forma aritmética	$\pm 0,030$ que equivale a $\times 1,07$ en forma aritmética													
		B/linaje Victoria (referencia bivalente)	$\pm 0,047$ que equivale a $\times 1,11$ en forma aritmética	$\pm 0,027$ que equivale a $\times 1,06$ en forma aritmética													
B/linaje Yamagata (referencia bivalente)	$\pm 0,055$ que equivale a $\times 1,14$ en forma aritmética	$\pm 0,032$ que equivale a $\times 1,08$ en forma aritmética															
Se recomienda redondear el resultado final al décimo, sin embargo, como la especificación se redondea a la unidad, los resultados se redondearán a la unidad para que coincida con la especificación.																	



Característica	Criterio de aceptación	Resultado
Linealidad	$P_{\text{linealidad}} < 0,01$ $P_{\text{desviación de la linealidad}} \geq 0,05$ (o aceptado con los criterios de Bliss)	<p>Después de un ajuste lineal de $Y =$ concentración medida ($\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$) en función de $X =$ concentración teórica ($\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$), en escala log-log, se observa la siguiente relación:</p> <p>Cepa A/H1N1: $P_{\text{linealidad}} < 0,0001$ $P_{\text{desviación de la linealidad}} = 0,38$ $Y = -0,020 + 1,029 \cdot X$ Rango de linealidad: [9,58-25,72] $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$</p> <p>Cepa A/H3N2: $P_{\text{linealidad}} < 0,0001$ $P_{\text{desviación de la linealidad}} = 0,87$ $Y = 0,177 + 0,904 \cdot X$ Rango de linealidad: [8,23-23,15] $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$</p> <p>Referencia bivalente de la cepa B/Brisbane: $P_{\text{linealidad}} < 0,0001$ $P_{\text{desviación de la linealidad}} = 0,62$ $Y = 0,127 + 0,936 \cdot X$ Rango de linealidad: [8,74-24,57] $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$</p> <p>Referencia bivalente de la cepa B/Massachusetts: $P_{\text{linealidad}} < 0,0001$ $P_{\text{desviación de la linealidad}} = 0,93$ $Y = 0,094 + 0,926 \cdot X$ Rango de linealidad: [9,55-22,97] $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$</p>
Exactitud	La recuperación porcentual promedio calculada para los niveles teóricos de concentración debe hallarse entre el 80 % y el 120 %.	<p>La recuperación porcentual promedio y sus límites de confianza del 95 % son los siguientes:</p> <p>Cepa A/H1N1: 103,3 % [101,4 %-105,2 %] Cepa A/H3N2: 117,2 % [114,1 %-120,3 %] Referencia bivalente de la cepa B/Brisbane: 113,3 % [110,4 %-116,2 %] Referencia bivalente de la cepa B/Massachusetts: 102,2 % [97,6 %-106,8 %]</p>

3.2.2.3 Resultados y análisis

3.2.2.3.1 Especificidad

Para cada cepa, el diseño experimental se basó en un análisis, realizado con cada antisuero de referencia 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 más las referencias bivalentes correspondientes de las cepas B, así como solución salina tamponada con fosfato (PBS) como control negativo.

Los resultados de las pruebas se presentan en la Tabla 32.

Los resultados son:

- 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 a los anillos de referencia.
- Para cada antisuero, hay ausencia de anillos o anillos significativamente diferentes para las otras cepas.

La especificidad es satisfactoria.

Sanofi Pasteur

Vacuna antigripal tetavalente (virión fraccionado, inactivada)

Sección 3.2.P.5.3

Validación de los procedimientos analíticos

Tabla 32: Presencia o ausencia de anillo en cada referencia

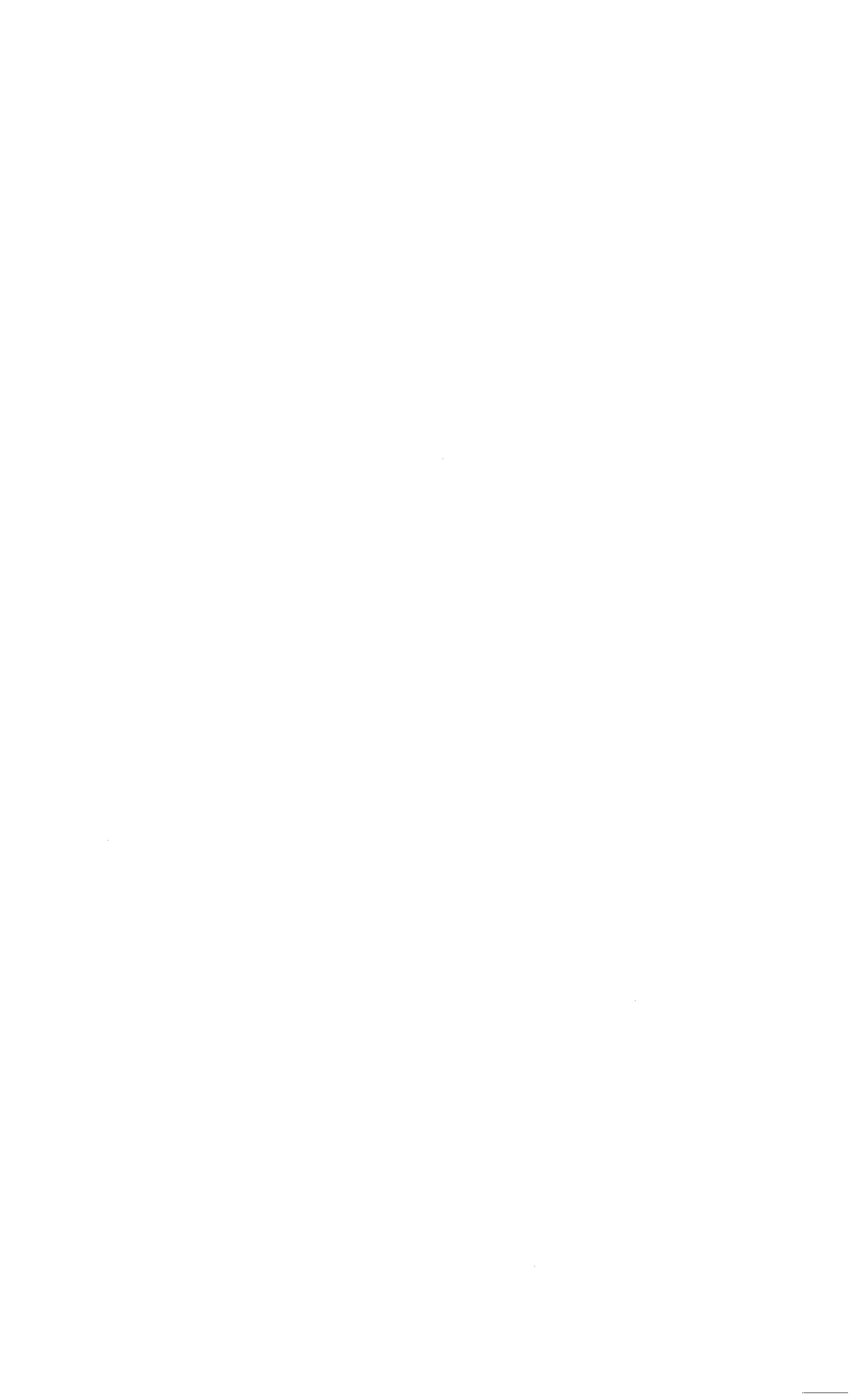
Antígeno de referencia	Antisero de referencia	PA, lote S4456	PBS (control negativo)	A/California/7/2009 (NYMC X-179A) cepa (H1N1) lote FA516286	A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) cepa (H3N2) lote FA513976	Cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) lote FA495977	Cepa B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata) lote FA492930
A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1) (Reactivos del NIBSC)	A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1 N1)	- Presencia de anillos de precipitación - Ausencia de anillos dobles	Ausencia de anillos de precipitación	- Presencia de anillos de precipitación* - Ausencia de anillos dobles	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)	A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3 N2)	- Presencia de anillos de precipitación - Ausencia de anillos dobles	Ausencia de anillos de precipitación	Ausencia de anillos de precipitación	- Presencia de anillos de precipitación - Ausencia de anillos dobles	Ausencia de anillos de precipitación	Ausencia de anillos de precipitación
B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) (Reactivos de la TGA)	B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria)	- Presencia de anillos de precipitación - Ausencia de anillos dobles	Ausencia de anillos de precipitación	Ausencia de anillos de precipitación	Ausencia de anillos de precipitación	- Presencia de anillos de precipitación - Ausencia de anillos dobles	Presencia de anillos de precipitación con intensidad baja
B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata) (Reactivos del NIBSC)	B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata) 2	- Presencia de anillos de precipitación - Ausencia de anillos dobles	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
B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) + B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata)	B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria)	- Presencia de anillos de precipitación - Ausencia de anillos dobles	Ausencia de anillos de precipitación	Ausencia de anillos de precipitación	Ausencia de anillos de precipitación	- Presencia de anillos de precipitación - Ausencia de anillos dobles	Presencia de anillos de precipitación con intensidad baja
B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) + B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata)	B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata) 2	- Presencia de anillos de precipitación - Ausencia de anillos dobles	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

RA_0920745

Información confidencial/propietaria
Página 37 de 77



NOXANA MONTEMILONE
DIRECTOR TÉCNICA
APODERADA
SANOFI PASTEUR S.A.



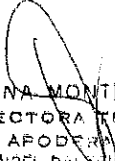
Sanofi Pasteur

Vacuna antigripal tetravalente (virión fraccionado, inactivada)

Sección 3.2.P.5.3

Validación de los procedimientos analíticos

* La intensidad del anillo es similar a los anillos de referencia


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
APODERADA
SANOFI PASTEUR S.A.

RA_0920745

Información confidencial/proprietaria
Página 38 de 77



