

Tabla 2: Especificaciones del producto llenado (PL)

Pruebas	Ph. Eur./Métodos	Criterios de aceptación
Aspecto	Ph. Eur. 2.9.20 Inspección visual	Suspensión turbia y blancuzca
Medición de pH	Ph. Eur. 2.2.3 Método potenciométrico	6,8-7,5
Volumen extraíble	Ph. Eur. 2.9.17 Volumen = masa/densidad	Al menos el volumen nominal
Contenido de aluminio	Basado en Ph. Eur. 2.5.13 Ensayo de complejometría (EDTA)	0,50-0,70 mg/dosis
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Ph. Eur. 2.6.1 Filtración por membrana	No se observa crecimiento microbiano
Prueba de pirógenos	Ph. Eur. 2.6.8 Medición del aumento de la temperatura corporal en animales	Conforme al criterio de la Ph. Eur.
Identidad de la difteria	Ph. Eur. 2.7.1 Método Luminex o como alternativa* difusión doble en gel de Ouchterlony	Positivo
Identidad del tétanos	Ph. Eur. 2.7.1 Método Luminex o como alternativa* difusión doble en gel de Ouchterlony	Positivo
Identidad de <i>B. pertussis</i>	Ph. Eur. 2.7.1 Método Luminex o como alternativa* difusión doble en gel de Ouchterlony	Positivo
Identidad de la poliomielitis	Ph. Eur. 2.7.1 Método Luminex o como alternativa* Método ELISA	Positivo
Identidad de la hepatitis B	Ph. Eur. 2.7.1 Método Luminex o como alternativa* Método ELISA	Positivo
Identidad de <i>Haemophilus</i>	Ph. Eur. 2.7.1 Método Luminex o como alternativa* difusión doble en gel de Ouchterlony	Positivo

* Se utiliza el método Luminex para liberar los lotes de Hexaxim. No obstante, se puede usar el método alternativo en caso de avería del equipo Luminex y/o en caso de imposibilidad importante de obtener suministros de microesferas unidas a antígenos.





2 Especificaciones del producto final durante los programas anuales de estabilidad

Las especificaciones que se deben utilizar para el control del producto final durante los programas anuales de estabilidad se presentan en la tabla 3.

Estas tablas incluyen para cada prueba:

- El nombre de la prueba;
- La referencia a la monografía de la Farmacopea Europea (Ph. Eur.);
- El método usado;
- Los criterios de aceptación aplicados al producto durante el estudio de estabilidad.

Las descripciones de los métodos analíticos se presentan en la sección 3.2.P.5.2 Procedimientos analíticos, mientras que los informes de validación asociados se resumen en la sección 3.2.P.5.3 Validación de los procedimientos analíticos.

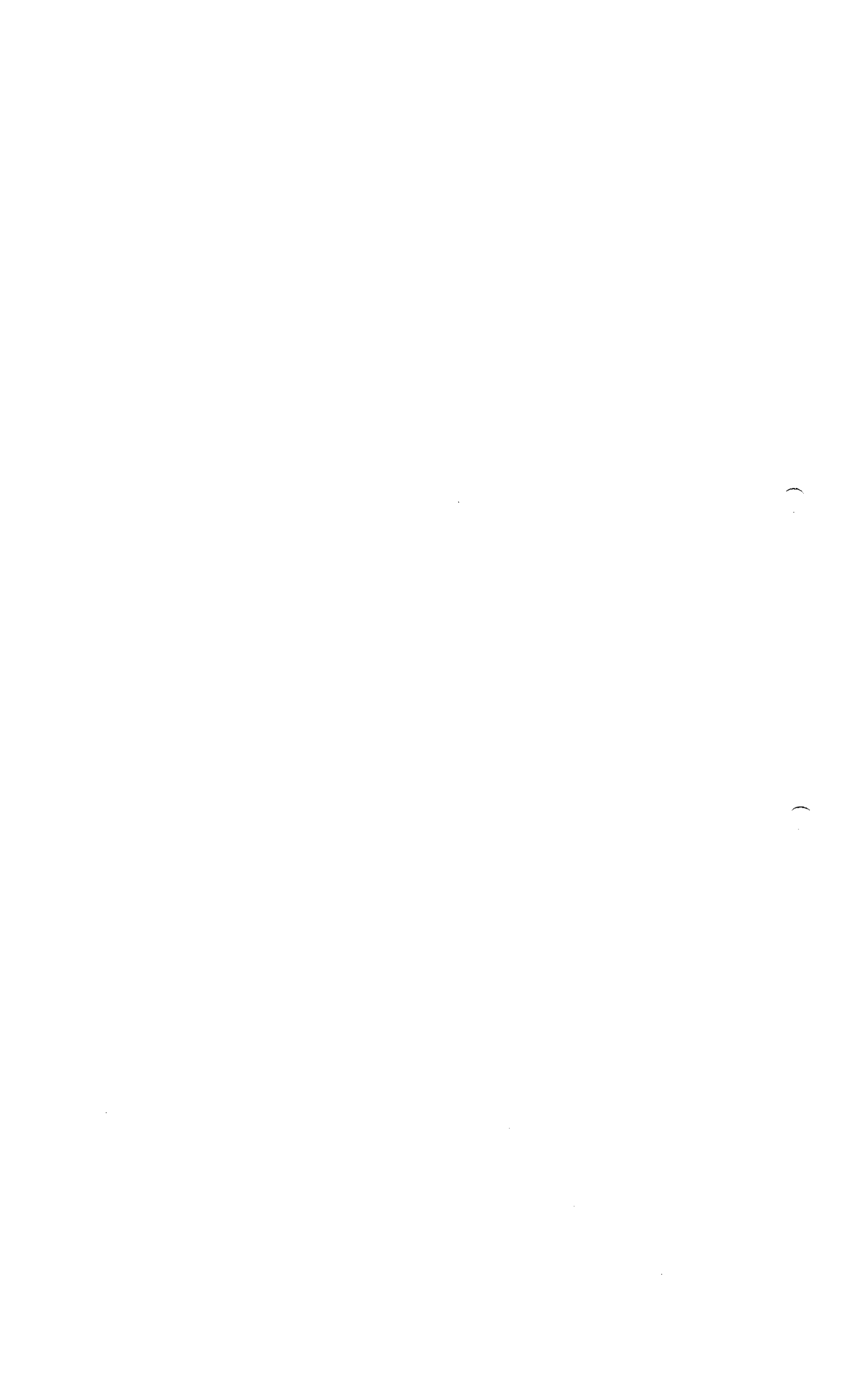
Las justificaciones de los criterios de aceptación evolutivos (PRP despolimerizado y porcentaje de adsorción de hepatitis B) se presentan en la sección 3.2.P.8.1 Resumen y conclusiones sobre la estabilidad.





Tabla 3: Especificación del producto final durante los programas anuales de estabilidad

Pruebas	Ph. Eur./Métodos	Criterios de aceptación
Aspecto	Ph. Eur. 2.9.20, edición actual Inspección visual	Suspensión turbia y blancuzca
Medición de pH	Ph. Eur. 2.2.3, edición actual Método potenciométrico	6,8-7,5
Fosfato de polirribosil ribitol (PRP) no adsorbido	Ph. Eur. 2.2.29, edición actual Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD)	$\geq 8 \mu\text{g/dosis}$
PRP despolimerizado		$\leq 50,0 \%$
Potencia diftérica	Ph. Eur. 2.7.6, edición actual Prueba de desafío intradérmico en cobayos - Inyección de la vacuna en animales por vía intradérmica	Actividad ≥ 30 UI/dosis El límite inferior de confianza ($P=0,95$) de la potencia estimada es ≥ 20 UI/dosis
Potencia tetánica	Ph. Eur. 2.7.8, edición actual Prueba de desafío en ratones - Inyección de la vacuna en animales por vía subcutánea	El límite inferior de confianza ($P=0,95$) de la potencia estimada es ≥ 40 UI/dosis
Inmunogenicidad contra pertussis	Ph. Eur. 2.7.16, edición actual Prueba de inmunogenicidad en ratones (análisis serológico: método de ELISA)	Los títulos de anticuerpos antitoxoide pertúsico (PTxd) y antihemaglutinina filamentosa (FHA) obtenidos para la vacuna no son significativamente ($P = 0,95$) inferiores a los de la vacuna de referencia
Contenido de antígeno D (líneas paralelas)	Ph. Eur. 2.7.1, edición actual Método ELISA	Tipo 1: 20,0-43,0 UD/dosis Tipo 2: 5,0-9,0 UD/dosis Tipo 3: 17,0-36,0 UD/dosis
Potencia relativa <i>in vitro</i> de la hepatitis B (IVRP)	Ph. Eur. 2.7.15, edición actual Método ELISA	$\geq 0,70$
Porcentaje de adsorción del toxoide diftérico	Método de inmunoelectroforesis Rocket	$\geq 23 \%$
Porcentaje de adsorción de hepatitis B	Ph. Eur. 2.7.1 Método ELISA	$\geq 28 \%$
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Ph. Eur. 2.6.1, edición actual Filtración por membrana	No se observa crecimiento microbiano





S 3.2.P.5.2

I km 10.221
f 10.2.3 ✓
1.2 VAC

3.2.P.5.2

Procedimientos Analíticos


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
SECRETARIO
SANOFI PASTEUR S.A.

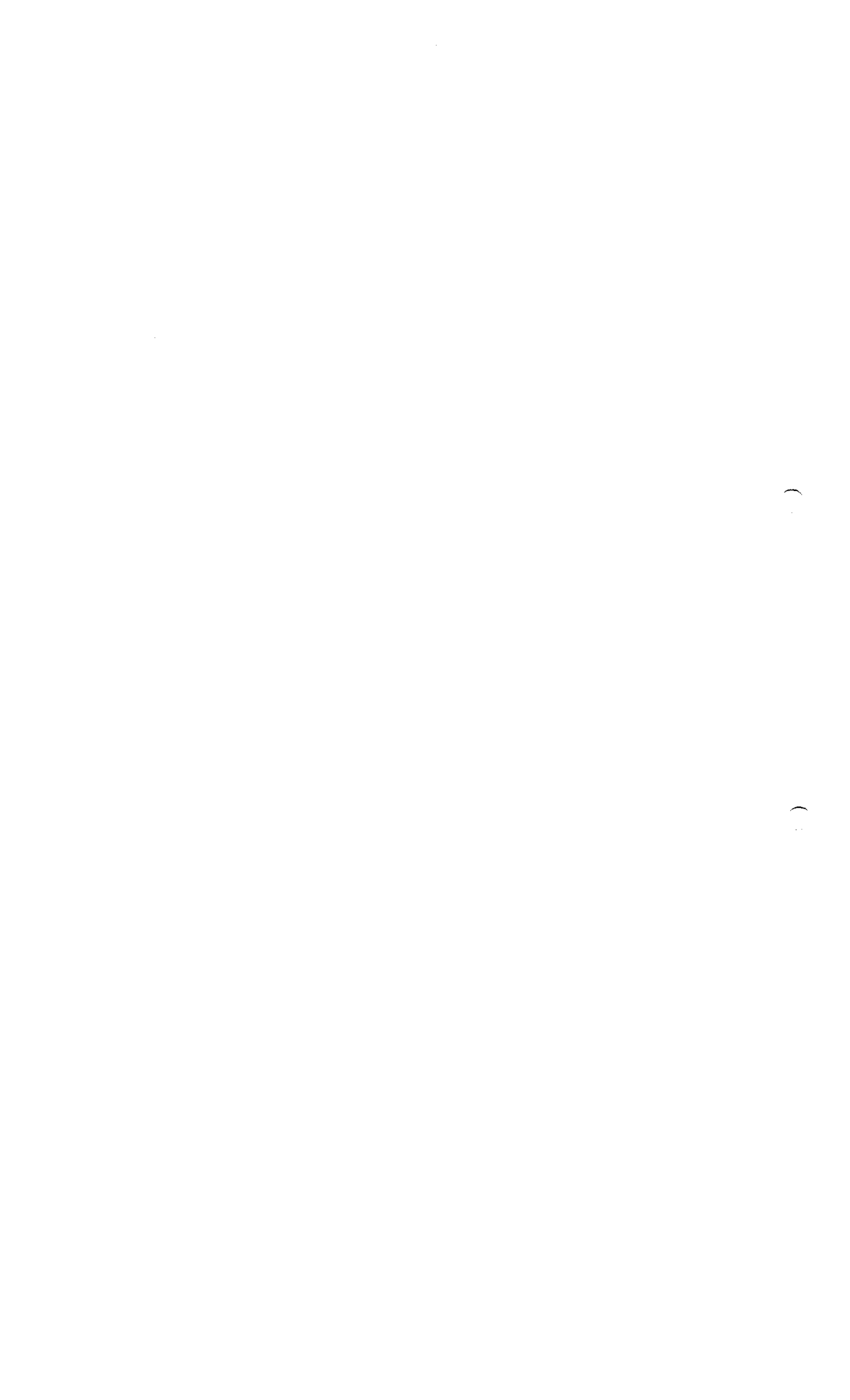




Sección 3.2.P.5.2 Procedimientos analíticos

Índice

Lista de tablas	4
1 Descripción de los métodos analíticos aplicados al producto final a granel	5
1.1 Medición de osmolalidad	5
1.2 Contenido de formaldehído libre	5
1.2.1 Principio	5
1.2.2 Muestras	6
1.2.3 Procedimiento operativo	6
1.2.4 Resultados	6
1.2.5 Criterios de validez	6
1.3 Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	6
1.4 Actividad de sensibilización a la histamina (HSA)	7
1.4.1 Principio	7
1.4.2 Muestras	7
1.4.3 Procedimiento operativo	7
1.4.4 Resultados	7
1.4.5 Criterios de validez	8
1.5 Fosfato de polirribosil ribitol (PRP) no adsorbido, PRP despolimerizado	8
1.5.1 Principio	8
1.5.2 Muestras	8
1.5.3 Procedimiento operativo	9
1.5.4 Resultados	9
1.5.5 Criterios de validez	10
1.6 Porcentaje de adsorción, toxoide diftérico (en cohete)	10
1.6.1 Principio	10
1.6.2 Procedimiento operativo	10
1.6.3 Resultados	11
1.6.4 Criterios de validez	11
1.7 Porcentaje de adsorción, hepatitis B (ELISA)	12
1.7.1 Principio	12
1.7.2 Procedimiento operativo	12
1.7.3 Resultados	13





1.7.4	Criterios de validez.....	14
1.8	Potencia diftérica	14
1.9	Potencia tetánica	14
1.10	Inmunogenicidad antipertúsica	14
1.10.1	Principio	14
1.10.2	Muestras	15
1.10.3	Procedimiento operativo.....	15
1.10.4	Resultados.....	16
1.10.5	Criterios de validez.....	16
1.11	Contenido de antígeno D (potencia de poliomiелitis <i>in vitro</i>).....	17
1.11.1	Principio	17
1.11.2	Procedimiento operativo.....	17
1.11.3	Resultados.....	18
1.11.4	Criterios de validez.....	19
1.12	Potencia relativa <i>in vitro</i> de la hepatitis B (IVRP)	19
1.12.1	Principio	19
1.12.2	Procedimiento operativo.....	19
1.12.3	Resultados.....	20
1.12.4	Criterios de validez.....	20
2	Descripción de los métodos analíticos aplicados al producto llenado	21
2.1	Aspecto	21
2.2	Medición de pH.....	21
2.3	Volumen extraíble.....	21
2.4	Contenido de aluminio.....	21
2.4.1	Principio	21
2.4.2	Muestras	22
2.4.3	Procedimiento operativo.....	22
2.4.4	Resultados.....	22
2.4.5	Criterios de validez.....	23
2.5	Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica.....	23
2.6	Prueba de pirógenos.....	23
2.7	Identificación de difteria, tétanos, tos ferina, poliomiелitis, hepatitis B y <i>Haemophilus</i> por el método Luminex	23
2.7.1	Principio	23
2.7.2	Equipos	23
2.7.3	Reactivos	24
2.7.4	Procedimiento operativo.....	24
2.7.5	Resultados.....	24
2.7.6	Criterios de validez.....	25



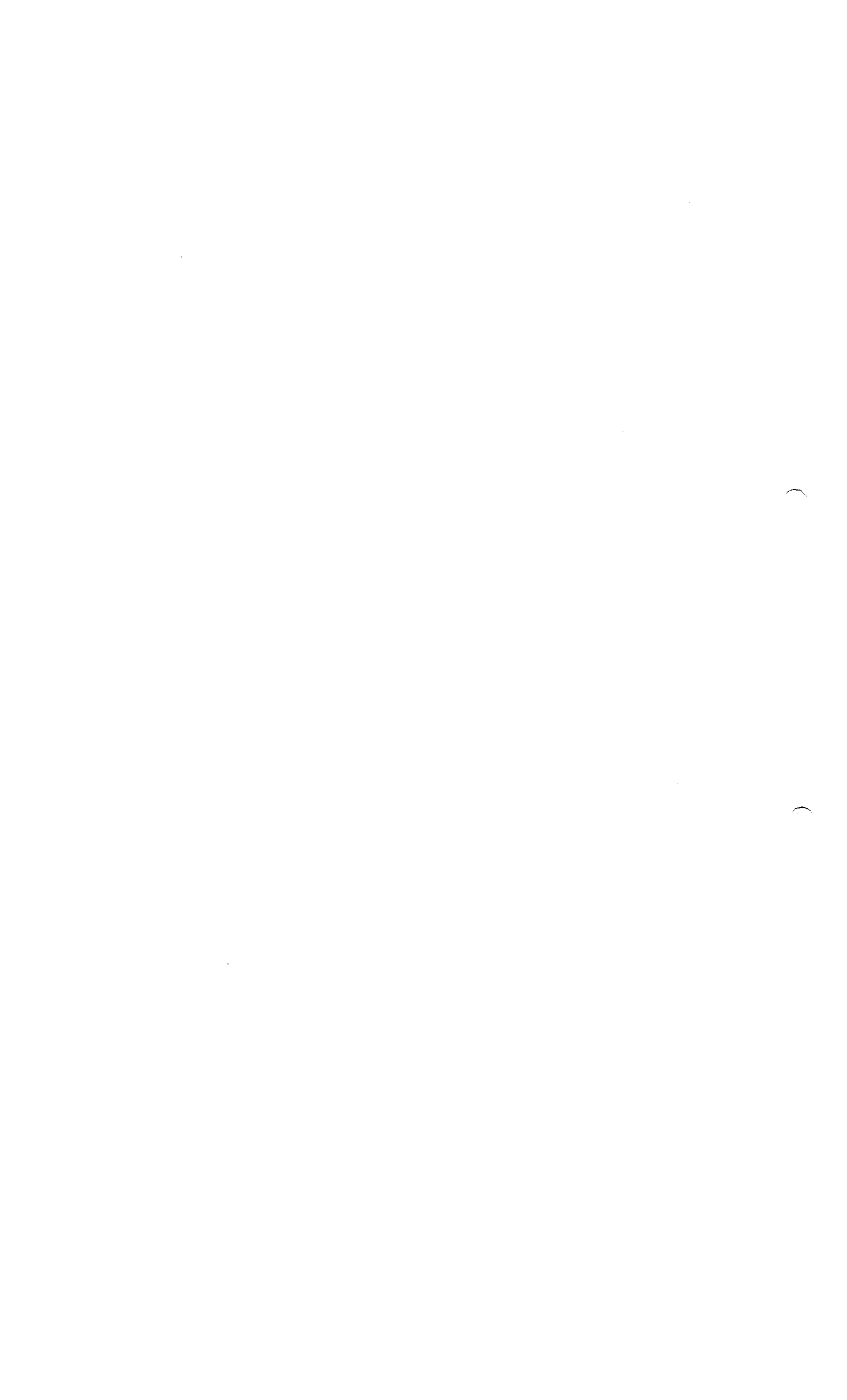


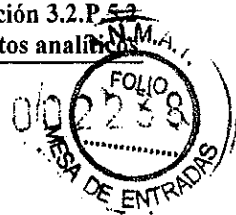
2.8	Prueba de Ouchterlony de difusión doble en gel (método alternativo)	25
2.8.1	Principio	25
2.8.2	Procedimiento operativo.....	25
2.8.3	Resultados.....	26
2.8.4	Criterios de validez.....	26
2.9	Identidad de la poliomielitis inactivada mediante ELISA (método alternativo)	27
2.10	Identidad de la hepatitis B mediante ELISA (método alternativo).....	27
2.10.1	Principio	27
2.10.2	Procedimiento operativo.....	27
2.10.3	Resultados.....	28
2.10.4	Criterios de validez.....	28



Lista de tablas

Tabla 1: Estándar de referencia y antisuero para cada principio activo26





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

En esta sección se describen los métodos analíticos utilizados para la liberación de lotes comerciales de producto final a granel (PFAG) y de producto llenado (PL). Se incluye una referencia a la monografía correspondiente para los métodos analíticos detallados en la Ph. Eur. Los métodos analíticos que no se describen ni se detallan en la Ph. Eur. se resumen a continuación.

Los procedimientos analíticos utilizados en los estudios de estabilidad del producto farmacéutico que no se describen en esta sección se tratan en la sección 3.2.P.8.3 Datos de estabilidad.

Los procedimientos analíticos utilizados en el desarrollo del producto farmacéutico que no se describen en esta sección ni en la sección relativa a la estabilidad de los productos farmacéuticos se tratan en la sección 3.2.P.5.4 Análisis de lotes.

1 Descripción de los métodos analíticos aplicados al producto final a granel

1.1 Medición de osmolalidad

Esta prueba se realiza de conformidad con la Ph. Eur. 2.2.35 (Osmolalidad).

1.2 Contenido de formaldehído libre

La determinación del contenido de formaldehído libre en una vacuna se lleva a cabo con el método de Nash, que es un método cuantitativo. Esta prueba se realiza siguiendo un procedimiento distinto al descrito en Ph. Eur. 2.4.18, ya que la prueba descrita en la Farmacopea Europea es un análisis semicuantitativo con un valor objetivo de 200 µg/mL de formaldehído.

El principio de estos dos métodos es el mismo y se basa en la reacción entre la acetilacetona y el formaldehído para producir un compuesto de color. La muestra de prueba se compara con una referencia con un contenido de formaldehído conocido. Por último, las principales ventajas del método de Nash son sus buenos resultados para evaluar la especificidad, linealidad, exactitud, precisión y límite de cuantificación.

Este método totalmente cuantitativo se ha validado para la vacuna (vea la sección 3.2.P.5.3 Validación de los procedimientos analíticos) y se describe a continuación.

1.2.1 Principio

El formaldehído produce un compuesto amarillo (3,5-diacetil 1,4 dihidrolutidina) al agregar acetilacetona y en presencia de un exceso de sales de amoníaco. Después, este compuesto de color se analiza por espectrofotometría (413 nm).

La intensidad de la coloración es proporcional a la cantidad de formaldehído presente en la muestra de prueba.





1.2.2 Muestras

Se analizan las siguientes muestras:

- Estándar de referencia: se diluye una solución de formaldehído de 10 µg/mL para obtener un rango de cinco puntos, con adición final de un tampón de acetato con acetilacetona;
- Control interno: solución de formaldehído de 2 µg/mL con adición de un tampón de acetato con acetilacetona para la prueba;
- Muestras de prueba: se diluyen en agua para que estén en el rango del método, con la adición final de un tampón de acetato con acetilacetona;
- Muestra testigo: agua con adición de tampón de acetato con acetilacetona para la prueba;
- Control de interferencia: muestra del producto potencialmente diluida en agua de manera idéntica a la muestra de prueba, con adición final de un tampón de acetato sin acetilacetona.

1.2.3 Procedimiento operativo

Tras la preparación de las muestras (1 análisis para el testigo y para cada punto del rango de referencia, 2 análisis para el control interno y para cada muestra de prueba y un análisis para el control de interferencia), la reacción cromogénica se lleva a cabo a +37 °C durante 50 min. Las muestras de prueba se centrifugan (no debe quedar ninguna suspensión turbia). Cada tubo se mide después mediante espectrometría a 413 nm contra agua purificada.

1.2.4 Resultados

La concentración de formaldehído presente en la muestra de prueba se determina tras restar la absorbancia del testigo, comparándola con la curva estándar. Todos los cálculos se realizan en logaritmos.

1.2.5 Criterios de validez

La prueba se considera válida si:

- El coeficiente de correlación de la línea de calibración es mayor o igual a 0,9990;
- La desviación estándar relativa tolerada entre dos pruebas es menor o igual al 10 %;
- El valor del control interno (promedio de duplicados) se encuentra dentro de los límites del gráfico de control.

1.3 Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica

Esta prueba se realiza de conformidad con la Ph. Eur. 2.6.1 (Esterilidad).



1.4 Actividad de sensibilización a la histamina (HSA)

Esta prueba se realiza de conformidad con la Ph. Eur. 1356 (Vacuna contra la tos ferina de componentes acelulares, adsorbida)

La ausencia de toxina pertúsica residual se comprueba en el producto final a granel, mientras que la prueba de irreversibilidad del toxoide pertúsico se lleva a cabo en la solución de toxoide pertúsico purificado (vea la justificación en la sección 3.2.P.5.6 Justificación de las especificaciones, párrafo 3.7).

A continuación se ofrece información más específica.

El objetivo de esta prueba es verificar la ausencia de toxina pertúsica nativa en la vacuna.

1.4.1 Principio

En primer lugar, todas las muestras se inyectan por vía intraperitoneal a los ratones. Luego se inyecta una solución base de histamina a todos los ratones. Los ratones se observan y se registra el número de ratones muertos.

1.4.2 Muestras

- Control positivo: 1 grupo de 10 ratones a los que se les inyecta la toxina pertúsica, 50 ng/ratón;
- Control negativo: 1 grupo de 10 ratones a los que se les inyecta 1 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) - tampón de gelatina;
- Productos que se analizarán: 1 grupo de 10 ratones a los que se les inyecta 1 mL de muestra de prueba de la vacuna con 50 µg/mL de PTxd.

1.4.3 Procedimiento operativo

La prueba dura 6 días.

Día 0, a los ratones se les inyectan las muestras de prueba descritas anteriormente por vía intraperitoneal (control positivo, control negativo y muestras de prueba).

Día 5, a todos los grupos de 10 ratones se les inyecta 0,5 mL de solución base de histamina por vía intraperitoneal .

Los ratones se observan justo después de la inyección de histamina y un día después.

1.4.4 Resultados

Se registra el número de ratones muertos el día 5 y el día 6.

