



1.4.5 Criterios de validez

- Todos los controles negativos tienen que sobrevivir;
- Tasa de supervivencia para los controles positivos: no menos del 20 % de los ratones murieron tras recibir una dosis de toxina pertúsica de 50 ng/ratón;
- Para cumplir con la Ph. Eur., se comprueba una vez al año la sensibilidad de la variedad de ratones mediante una inyección por vía intravenosa. Se debe registrar al menos un 50 % de mortalidad en los ratones a los que se les inyectaron 50 ng de toxina pertúsica por vía intravenosa.

1.5 Fosfato de polirribosil ribitol (PRP) no adsorbido, PRP despolimerizado

Esta prueba se realiza de conformidad con los requisitos de la Ph. Eur. 2.2.29 (Cromatografía líquida).

La prueba se resume a continuación.

El objetivo de esta prueba es determinar la cantidad de PRP no adsorbido presente en la muestra de prueba y el porcentaje de PRP despolimerizado en la parte no adsorbida de la vacuna mediante una cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD).

1.5.1 Principio

Se tienen en cuenta dos fracciones.

La fracción 1 se obtiene centrifugando la muestra de prueba a baja velocidad para sedimentar el gel de aluminio. Se recolecta el sobrenadante que contiene el PRP no adsorbido.

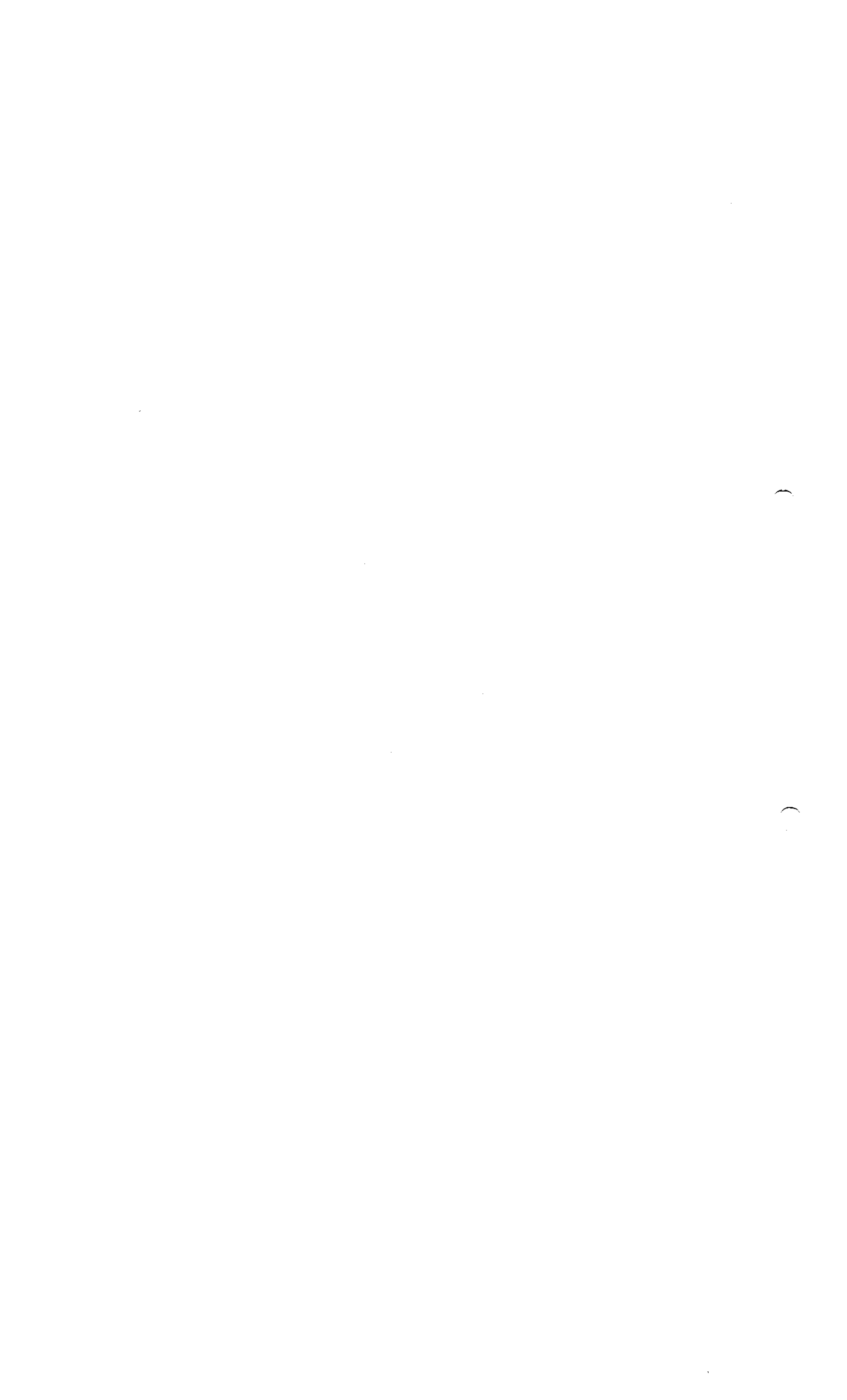
La fracción 2 se obtiene ultracentrifugando la muestra de prueba (distinta a la utilizada para la fracción 1). Se recolecta el ultrasobrenadante que contiene el PRP no adsorbido.

Los polímeros contenidos en cada fracción se hidrolizan para formar disacáridos de fosfato de polirribosil ribitol. Los hidrolizados se analizan mediante HPAEC-PAD para determinar el contenido de PRP en cada fracción. El análisis de la fracción 1 permite determinar la cantidad de PRP no adsorbido, mientras que el análisis de la fracción 2 permite calcular el porcentaje de PRP despolimerizado.

El porcentaje de PRP despolimerizado se calcula como la proporción entre el contenido de PRP en la fracción de ultrasobrenadante y el PRP no adsorbido.

1.5.2 Muestras

- Estándar de referencia: granel interno de polisacárido conjugado de *Haemophilus* tipo b a razón de aproximadamente 20 µg/mL;
- Control interno: lote de producción interno de *Haemophilus influenzae* tipo b;
- Estándar interno: glucosamina-1-fosfato (125 µg/mL).





1.5.3 Procedimiento operativo

- Preparación de las muestras

Estándar de referencia: el rango del estándar de referencia se prepara con agua purificada ultrafiltrada y soluciones de NaCl. Se realizan varias diluciones para obtener un rango de [0,5-12,5] µg/mL de PRP.

Muestra de prueba (determinación del contenido de PRP no adsorbido): la muestra de prueba se centrifuga a 5.000 g durante 5 min. a temperatura ambiente. Se recolecta el sobrenadante. El control interno utilizado para determinar el PRP no adsorbido se somete a la misma centrifugación que la muestra de prueba.

Muestra de prueba (determinación del contenido de PRP despolimerizado): la muestra de prueba se somete a ultracentrifugación a 500.000 g durante 30 min. a +12°C. Se recolecta el sobrenadante. El control interno utilizado para determinar el PRP despolimerizado se somete a la misma centrifugación que la muestra de prueba. Se integra un control interno por corrida.

Las muestras de prueba, los controles internos (para PRP no adsorbido y para PRP despolimerizado) y el estándar de referencia se hidrolizan con una solución de hidróxido de sodio 1,5 N que contiene el estándar interno. Se prepara una solución "testigo de hidrólisis" con NaCl al 0,9 % e hidróxido de sodio 1,5 N que contiene el estándar interno.

- Características de la HPAEC-PAD

A continuación, las muestras (controles internos, estándar de referencia, muestras de prueba y testigo de hidrólisis) se transfieren a viales de muestreo para cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y se analizan con HPAEC-PAD.

La cromatografía se realiza con una columna de HPLC de intercambio aniónico, a +30 °C con una fase móvil de NaOH 35 mM/acetato de sodio 114 mM, que se inyecta en la columna con una velocidad de flujo de 1,2 mL/min.

1.5.4 Resultados

Se calcula la proporción entre el área del pico del PRP y el área del pico de la glucosamina-1-fosfato (estándar interno) para cada dilución estándar y muestra de prueba.

Los parámetros a (pendiente), b (ordenada) y r (coeficiente de correlación) se determinan por la regresión lineal del estándar de referencia:

$$(\text{área del PRP} / \text{área del estándar interno}) = a[\text{concentración del PRP}] + b$$

luego se calcula la concentración del PRP para cada muestra de prueba (expresada en µg/mL).

El porcentaje del PRP despolimerizado se calcula de la forma siguiente:

$$\% \text{ PRP despolimerizado} = (\text{contenido de PRP despolimerizado} / \text{contenido de PRP no adsorbido}) \times 100$$

El porcentaje del PRP despolimerizado y el contenido de PRP no adsorbido se tienen que obtener en el mismo análisis. Si un resultado no es válido, ambos resultados quedan invalidados.





El valor final obtenido es el resultado de dos corridas independientes.

1.5.5 Criterios de validez

- El testigo de hidrólisis no debe tener ningún pico en la zona de elución del PRP;
- El coeficiente de correlación r debe ser mayor o igual que 0,995;
- El valor del porcentaje de PRP despolimerizado del control interno se debe encontrar dentro de los límites del gráfico de control;
- Si una muestra de prueba produce un cromatograma atípico con resultados satisfactorios, se debe volver a analizar;
- Se aplican criterios de aceptación cromatográficos específicos para el control interno en función de la referencia de la columna, tales como la altura equivalente de una placa teórica (HETP) mínima, resolución posterior al pico, asimetría del pico y área del pico.

1.6 Porcentaje de adsorción, toxoide diftérico (en cohete)

El porcentaje de adsorción del toxoide diftérico se determina mediante el método de inmunolectroforesis en cohete de conformidad con los requisitos de la Ph. Eur. 2.7.1 (Métodos inmunoquímicos).

La prueba se resume a continuación.

1.6.1 Principio

El objetivo de esta prueba es determinar la concentración de toxoide diftérico no adsorbido presente en las muestras de prueba. Este método se basa en la migración, bajo un campo eléctrico, del sobrenadante de la vacuna en un gel de agarosa al 1 % que contiene suero contra toxoide diftérico. Se forman líneas de precipitación en forma de cohete en la zona de equivalencia. La altura de las curvas en forma de cohete es proporcional a la cantidad de toxoide diftérico presente en la muestra de prueba.

1.6.2 Procedimiento operativo

- Preparación del gel

El gel se prepara a partir de una solución de agarosa al 1 % a la que se añade la cantidad correcta de antisuero contra toxoide diftérico. La cantidad de antisuero que se tiene que añadir se determina en el paso de cualificación.

El antisuero antidiftérico interno se obtiene por inmunización con toxoide diftérico purificado.

- Preparación de las muestras

Estándar de referencia: El estándar de referencia es el lote interno de toxoide diftérico purificado a granel utilizado para la formulación de la vacuna analizada (vea la justificación que se presenta en la sección 3.2.P.6 Estándares o materiales de referencia, párrafo 1.3).

C

—

—



El rango de referencia incluye varias diluciones (*p. ej.*: puro - 0,5 - 0,25 - 0,125). El estándar de referencia puro se prepara para obtener una concentración de toxoide diftérico purificado que sea equivalente a su concentración teórica en la vacuna. Se llevan a cabo diluciones en una solución tampón de barbital 1 x. Cada dilución se carga por duplicado en ambos lados del gel de agarosa.

Productos analizados: Los productos se centrifugan a 5.200 g durante 5 min. a +5 °C. Los sobrenadantes se recolectan y se cargan puros por duplicado en el gel de agarosa.

El control de migración es azul de bromofenol cargado en uno o más pocillos libres.

- Inmunolectroforesis en cohete

Las muestras (estándar de referencia, productos analizados y control de migración) se cargan en el gel como se ha descrito anteriormente y se lleva a cabo la inmunolectroforesis como sigue:

- Tampón de migración: barbital 1 x;
- Migración: bien 15-16 h a 2 V/cm o bien 5 h a 4 V/cm;
- Temperatura: +10 °C a +15 °C
- Amperios: 100 mA;
- Potencia: 50 vatios.

A continuación el gel se lava (con NaCl a 0,9 % y agua purificada), se seca con un sistema de aire ventilado, se tiñe con solución de tinción de Coomassie y se destiñe usando una solución de ácido acético y metanol.

1.6.3 Resultados

La altura de los cohetes se mide en centímetros desde la base inicial de los cohetes de difteria hasta el pico de cada cohete.

Los parámetros a (pendiente) y b (ordenada) de la curva del estándar de referencia se calculan de la manera siguiente:

$$\log_{10} \text{ de la concentración del toxoide diftérico (Lf/dosis)} = a \cdot (\log_{10} \text{ de las alturas de los cohetes (cm)}) + b$$

La concentración de toxoide diftérico por dosis de la muestra de prueba (media de las alturas de los cohetes del producto) se determina por extrapolación de la curva estándar.

La adsorción del toxoide tetánico en gel de aluminio se expresa en porcentaje de adsorción.

El porcentaje de adsorción del toxoide diftérico presente en la muestra de prueba se calcula de la forma siguiente:

$$\text{Adsorción del toxoide diftérico (\%)} = 100 \cdot \frac{\text{Concentración del toxoide diftérico en el sobrenadante}}{\text{Concentración teórica del toxoide diftérico en la vacuna inicial}} \times 100$$

La adsorción del toxoide tetánico en gel de aluminio se expresa en porcentaje de adsorción.

1.6.4 Criterios de validez

- La altura del cohete del antígeno de referencia más concentrado es de entre 20 y 50 mm;





- Los cohetes se deben haber teñido correctamente;
- Las curvas de los cohetes tienen que ser claras y contrastadas;
- El coeficiente de correlación de la curva de referencia no debe ser inferior a 0,98;
- El porcentaje de desviación estándar relativa calculado en la altura del cohete de las diluciones de cada referencia y de las muestras de prueba no debe ser superior al 20 %.

1.7 Porcentaje de adsorción, hepatitis B (ELISA)

El porcentaje de adsorción de la hepatitis B se determina mediante un método ELISA de conformidad con los requisitos de la Ph. Eur. 2.7.1 (Métodos inmunoquímicos).

La prueba se resume a continuación.

1.7.1 Principio

El antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) es capturado en primer lugar por un anticuerpo monoclonal contra hepatitis B en una placa con 96 pocillos. Luego el antígeno unido es reconocido por un segundo anticuerpo monoclonal contra hepatitis B que es detectado por un anticuerpo contra inmunoglobulina conjugado con peroxidasa. Al agregar un sustrato cromogénico (tetrametilbencidina o TMB), se produce un color cuya intensidad es proporcional a la cantidad de antígeno capturado en el pocillo. El análisis de los resultados sigue el método de líneas paralelas descrito en la Ph. Eur. 5.3.3.

El porcentaje de adsorción se obtiene a partir de la determinación del contenido de HBsAg total y del contenido de HBsAg no adsorbido presentes en la muestra de prueba.

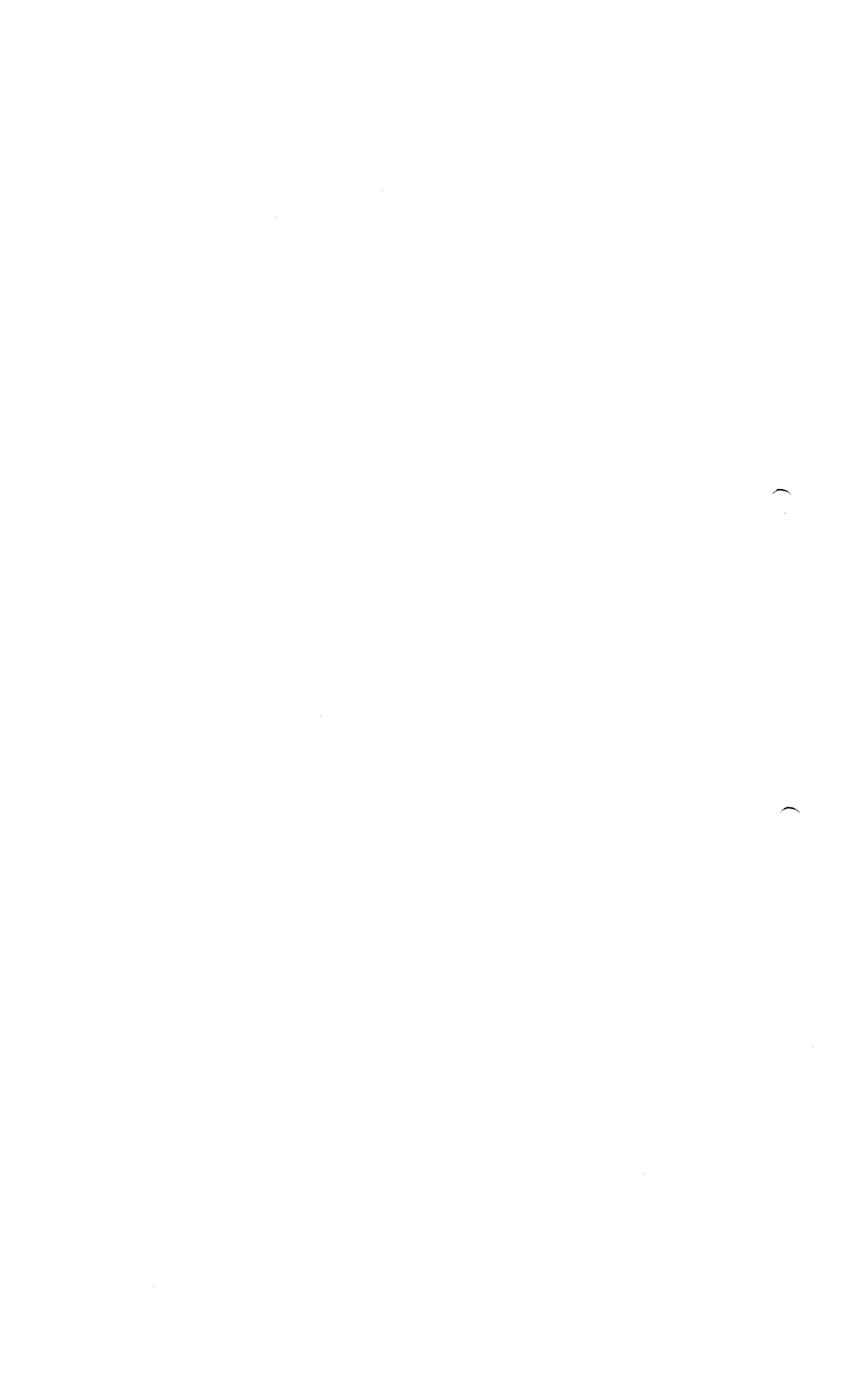
1.7.2 Procedimiento operativo

- Preparación de las muestras
Se preparan cuatro muestras:
- El estándar de referencia, que es un lote de Hexaxim se diluye en serie (unas 6 diluciones) y se preparan duplicados independientes.
- El control interno, que es un lote de Hexaxim.
- La muestra de prueba. Se realizan dos preparaciones: una para determinar el HBsAg no adsorbido (sobrenadante de la vacuna) y la otra para determinar el contenido de HBsAg total (vacuna total).

Se preparan duplicados independientes para cada muestra.

- Preparación del sobrenadante de la vacuna:

Para determinar el contenido de HBsAg no adsorbido, se centrifuga un volumen de la muestra de prueba a 8.800 g durante 5 min. a +20 °C. Se recolecta el sobrenadante (que contiene el HBsAg no adsorbido).





Tratamiento de las muestras:

El estándar de referencia, el control interno, el sobrenadante de la vacuna y la vacuna total (que se usa para determinar el contenido de HBsAg total) se diluyen a razón de 1/4 con una solución PBS-tritón-DEA y se conservan durante 1 hora a temperatura ambiente con mezclado.

Dilución de las muestras:

A continuación, las muestras tratadas se diluyen en el tampón de ELISA mediante dilución seriada con una proporción de 2. Por ejemplo, se pueden realizar 6 diluciones seriadas a 1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400, 1/12800 y 1/25600 para el estándar de referencia, el control interno y la muestra de vacuna total, según su concentración de HBsAg.

La muestra de sobrenadante de la vacuna se diluye en el tampón de ELISA mediante dilución seriada con una proporción de 2. Por ejemplo, se pueden realizar 6 diluciones seriadas a 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400 y 1/12 800, según la concentración de HBsAg presente en la muestra de sobrenadante de la vacuna.

• Titulación mediante ELISA

El método ELISA permite titular la hepatitis B en cada fracción.

- 1) Las microplacas que contienen los anticuerpos de recubrimiento se incuban durante 12 horas a +5 °C y luego se lavan con una solución PBS-Tween;
- 2) Las preparaciones de sobrenadante de la vacuna, vacuna total, control interno y estándar de referencia se colocan en los pocillos;
- 3) A continuación se añaden anticuerpos monoclonales anti-HBsAg secundarios;
- 4) El complejo se revela con peroxidasa conjugada a anticuerpos anti-IgG y TMB. La reacción se detiene con una solución de HCl 1 N.

Las microplacas se incuban durante 30 min. a +25 °C y se lavan con una solución PBS-Tween 20 tras los pasos 1, 2 y 3.

Se añade el testigo (tampón de dilución) en los pocillos libres y se somete a los mismos tratamientos que las muestras de prueba.

1.7.3 Resultados

La densidad óptica (DO) de cada pocillo se registra a 450 nm y a 630 nm. La DO registrada a 630 MN se resta de la DO registrada a 450 nm.

La DO media de los pocillos del testigo se resta de la DO de los pocillos de la muestra.

Se utiliza el modelo de líneas paralelas para determinar el contenido de HBsAG de cada muestra, de conformidad con la Ph. Eur. 5.3.3.

Se comprueba la validez estadística. A continuación, se calcula la pendiente común, los títulos de las muestras y los límites de confianza.

El porcentaje de adsorción se calcula como sigue:



$$\% \text{ de adsorción del HBsAg} = 100 - \left(\frac{\text{Contenido de HBsAg no adsorbido}}{\text{Contenido de HBsAg total}} \right) * 100$$

1.7.4 Criterios de validez

Testigos: La DO media de los testigos debe ser inferior o igual a 0,150.

Control interno y muestras:

- Se utiliza un mínimo de 3 diluciones para determinar cada título con el método de líneas paralelas;
- El intervalo de confianza (IC) calculado para los títulos de las muestras se expresa en porcentaje y se debe encontrar dentro del siguiente intervalo : $80 \% \leq IC \leq 125 \%$;
- Para cada pareja de placas duplicadas, el título del control interno debe estar dentro de los límites del gráfico de control en un 99,8 %.

Referencia: Para cada pareja de placas duplicadas, la pendiente de la curva de referencia debe estar dentro de los límites del gráfico de control en un 99,8 %.

1.8 Potencia diftérica

Esta prueba se realiza de conformidad con la Ph. Eur. 2.7.6 (Análisis de la vacuna antidiftérica adsorbida). Se aplica el método A (prueba de desafío intradérmico en cobayos).

1.9 Potencia tetánica

Esta prueba se realiza de conformidad con la Ph. Eur. 2.7.8 (Análisis de la vacuna antitetánica adsorbida). Se aplica el método B (prueba de desafío en ratones, método de parálisis).

Para minimizar el sufrimiento de los animales, se siguen las directrices de la monografía de la Ph. Eur. 2.7.8. (Análisis de la vacuna antitetánica adsorbida).

1.10 Inmunogenicidad antipertúsica

Esta prueba de inmunogenicidad se realiza para evaluar la respuesta de anticuerpos contra el toxoide pertúsico y la hemaglutinina filamentosa (FHA) tras la inmunización de ratones con una vacuna que contiene el principio activo antígeno pertúsico acelular de dos componentes. Los anticuerpos contra PTxd y FHA se titulan mediante ELISA.

Esta prueba se realiza de conformidad con la Ph. Eur. 2.7.16 (Vacuna contra la tos ferina, de componentes acelulares, adsorbida).

A continuación se ofrece información más específica.

1.10.1 Principio

Esta prueba se divide en 2 etapas:





- 1) Los ratones se inmunizan por vía intraperitoneal con 1/5 de una dosis humana única diluida en tampón PBS. Cuatro semanas después, se les extrae sangre a los ratones y los sueros de esta se almacenan antes de analizarlos.
- 2) La titulación por ELISA de los anticuerpos contra la toxina pertúsica y los anticuerpos anti-FHA en suero de ratón se basa en la monografía 2.7.1. de la Ph. Eur.

El método ELISA implica la reacción entre los anticuerpos del suero de ratón y los antígenos de toxina pertúsica o de FHA que recubren los pocillos de las microplacas. La cantidad de anticuerpos unidos se determina mediante una reacción posterior con anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados con fosfatasa alcalina, seguida de una reacción cromogénica con sustrato de fosfatasa alcalina. La intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de anticuerpos.

1.10.2 Muestras

Etapa de inmunización

- Vacuna de referencia: se inmuniza a 1 grupo de 10 ratones con 0,5 mL de la vacuna de referencia (lote Hexaxim) (50 µg/mL de PTxd y 50 µg/mL de FHA) diluida a 1/5 en tampón PBS;
- Control negativo: se inmuniza a 1 grupo de 10 ratones con 0,5 mL de tampón PBS;
- Muestras de prueba: se inmuniza a 1 o más grupos de 10 ratones con 0,5 mL de una dosis humana única de la vacuna analizada (50 µg/mL de PTxd y 50 µg/mL de FHA) diluida a 1/5 en tampón PBS.

Titulación mediante ELISA

Se analizan las muestras siguientes en la misma corrida:

- Estándares de referencia: antisuero murino contra *Bordetella pertussis* de título conocido (anti-PTxd y anti-FHA);
- Control positivo: agrupamiento de antisueros murino (anticuerpos anti-PT y anti-FHA);
- Sueros murinos individuales de ratones inyectados con la vacuna de referencia;
- Sueros murinos individuales de ratones inyectados con el control negativo;
- Sueros murinos individuales de ratones inyectados con las muestras de prueba.

1.10.3 Procedimiento operativo

1) Etapa de inmunización

Día 0, se inmuniza a grupos de ratones con las muestras descritas anteriormente (vacuna de referencia, control negativo y muestras de prueba).

Día 28, se extrae sangre a los ratones, se recolecta el suero y se centrifuga. Los anticuerpos PTxd y FHA se titulan por el método ELISA.

2) Titulación mediante ELISA





- Preparación de las muestras

El estándar de referencia, el control positivo y los sueros recolectados (excepto los sueros de los ratones a los que se les ha inyectado el control negativo) se diluyen y cargan a distintas concentraciones.

Estándares de referencia:

El estándar de referencia de antisuero murino contra *Bordetella pertussis* se diluye en tampón PBS. Ambos rangos de referencia (PTxd y FHA) incluyen al menos 4 puntos. Las diluciones correctas se determinan durante la cualificación de la referencia.

Control positivo: El control positivo se diluye según se determine en la cualificación.

Sueros recolectados: Los sueros recolectados se diluyen en tampón PBS. El rango de diluciones incluye al menos 4 puntos.

- Pasos de la titulación mediante ELISA

- 1) Las microplacas se recubren con antígeno FHA o PTxd.
- 2) Los pocillos se saturan con solución de albúmina de suero bovino (BSA) (anti-PTxd) o suero de cabra (anti-FHA);
- 3) Se agregan el estándar de referencia, el control positivo y los sueros. Se agrega el tampón de dilución (testigo) en los pocillos libres;
- 4) Se agregan anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados con fosfatasa alcalina;
- 5) El complejo se realza con un sustrato de fosfatasa alcalina: p-nitrofenil fosfato disódico (PNPP).

La reacción se detiene con una solución de hidróxido de sodio.

Las microplacas se lavan tras los pasos 1, 2, 3 y 4.

1.10.4 Resultados

Después de la reacción cromogénica, se registra la DO de cada pocillo a 405 nm y a 620 nm. El valor de absorbancia resultante es la diferencia entre la DO obtenida a 405 y 620 nm. La absorbancia de la curva del estándar de referencia de antisuero murino se grafica como función de la concentración anti-PTxd (o de la concentración anti-FHA) usando un programa de regresión lineal/logarítmica.

Las concentraciones de anti-PTxd y anti-FHA (en UE/mL) en las muestras de prueba y en la vacuna de referencia se interpolan a partir de la curva del estándar de referencia mediante un método de líneas paralelas. La capacidad de la vacuna para inducir anticuerpos contra la tos ferina no debe ser significativamente diferente ($P = 0,95$) a la de la vacuna de referencia. El resultado final es la media de las distintas diluciones.

1.10.5 Criterios de validez

La titulación mediante ELISA se considera válida si:

