



- La DO del testigo es inferior a 0,2 para la titulación anti-PTxd e inferior a 0,3 para la titulación anti-FHA;
- La pendiente del estándar de referencia se encuentra dentro de los límites del gráfico de control;
- El coeficiente de las correlaciones (de la pendiente del estándar de referencia) cumple lo establecido en la tabla de Fisher y Yates;
- El título de la vacuna de referencia se encuentra dentro de los límites de referencia de la vacuna (3σ);
- El título del control positivo se encuentra dentro de los límites del control positivo (2σ);
- El porcentaje de ratones que responden no es menor que el 80 %;
- El porcentaje de ratones a los que se les ha inyectado el control negativo que no responden es superior al 80 %;
- La desviación estándar relativa calculada en los 7 títulos del mismo suero debe ser inferior a 25 % para la vacuna de referencia y para las muestras de prueba.

1.11 Contenido de antígeno D (potencia de poliomiелitis *in vitro*)

El objetivo de esta prueba es determinar el título de cada tipo de poliomiелitis de la vacuna utilizando un método ELISA. Esta prueba se realiza de conformidad con los requisitos de la Ph. Eur. 2.7.1 (Métodos inmunoquímicos).

La prueba se resume a continuación.

1.11.1 Principio

Los títulos del antígeno D de cada tipo de poliomiелitis se determinan mediante ELISA, específicamente para cada uno de los tipos de poliomiелitis con respecto a un estándar de referencia de título conocido.

Los antígenos de la poliomiелitis de tipo 1, 2 y 3 son capturados en primer lugar por anticuerpos antipoliomiелíticos de ternera para tipos específicos que recubren los pocillos. Los antígenos unidos son reconocidos por anticuerpos antipoliomiелíticos de conejo para tipos específicos que a su vez son detectados por anticuerpos anti-IgG conjugados con peroxidasa.

Al agregar ABTS (2,2'-azino-bis(3etil-benzotiazolina-6-acido sulfónico) como sustrato de peroxidasa, aparece un color de una intensidad proporcional a la cantidad de antígenos capturados en cada pocillo. El análisis de los resultados se basa en el método de líneas paralelas.

1.11.2 Procedimiento operativo

- Preparación de las muestras

El estándar de referencia, el control interno y las muestras de prueba se cargan a distintas concentraciones. El primer paso de la manipulación consiste en preparar estas diluciones.





Estándar de referencia: la referencia es un lote de trivalente de virus inactivado de la poliomielitis (IPV) interno calibrado con el estándar de referencia de IPV europeo tipo 1-2-3.

La referencia se diluye en una solución PBS-leche. Se cargan en la placa seis diluciones seriadas. Las diluciones se encuentran dentro del rango de linealidad de cada tipo:

- Tipo 1: 22,67-1,42 UD/mL;
- Tipo 2: 4,00-0,25 UD/mL;
- Tipo 3: 15,42-1,93 UD/mL.

Para cada análisis, el estándar de referencia se titula una vez.

Control interno: el control interno es un lote de producto final a granel (PFAg) de IPV.

El control interno se diluye en una solución PBS-leche. Se cargan en la placa seis diluciones seriadas. Las diluciones se encuentran dentro del rango de linealidad de cada tipo. El control interno se titula en una placa para cada tipo y para cada análisis.

Muestras de prueba: como la valencia de poliomielitis se adsorbe en gel de aluminio, las muestras de prueba tienen que ser desorbidas previamente. Las muestras de prueba desorbidas se diluyen en una solución PBS-leche. Se cargan en la placa seis diluciones seriadas. Las diluciones preparadas se encuentran dentro del rango de linealidad de referencia de cada tipo.

Los estándares de referencia, el control de validación y los productos analizados se someten a 3 diluciones independientes.

- Titulación mediante ELISA
 - 1) La microplaca se recubre con anticuerpos antipoliomielíticos de ternera y se saturan con solución PBS-Tween-leche;
 - 2) Las preparaciones del estándar de referencia, el control de validación y los productos analizados se colocan en los pocillos;
 - 3) Los anticuerpos de revelado (anticuerpos antipoliomielíticos) se diluyen en PBS-leche y se agregan;
 - 4) El complejo se realiza con peroxidasa conjugada con anticuerpos de cabra anti-IgG y ABTS.

La reacción se detiene con una solución SDS al 1 %.

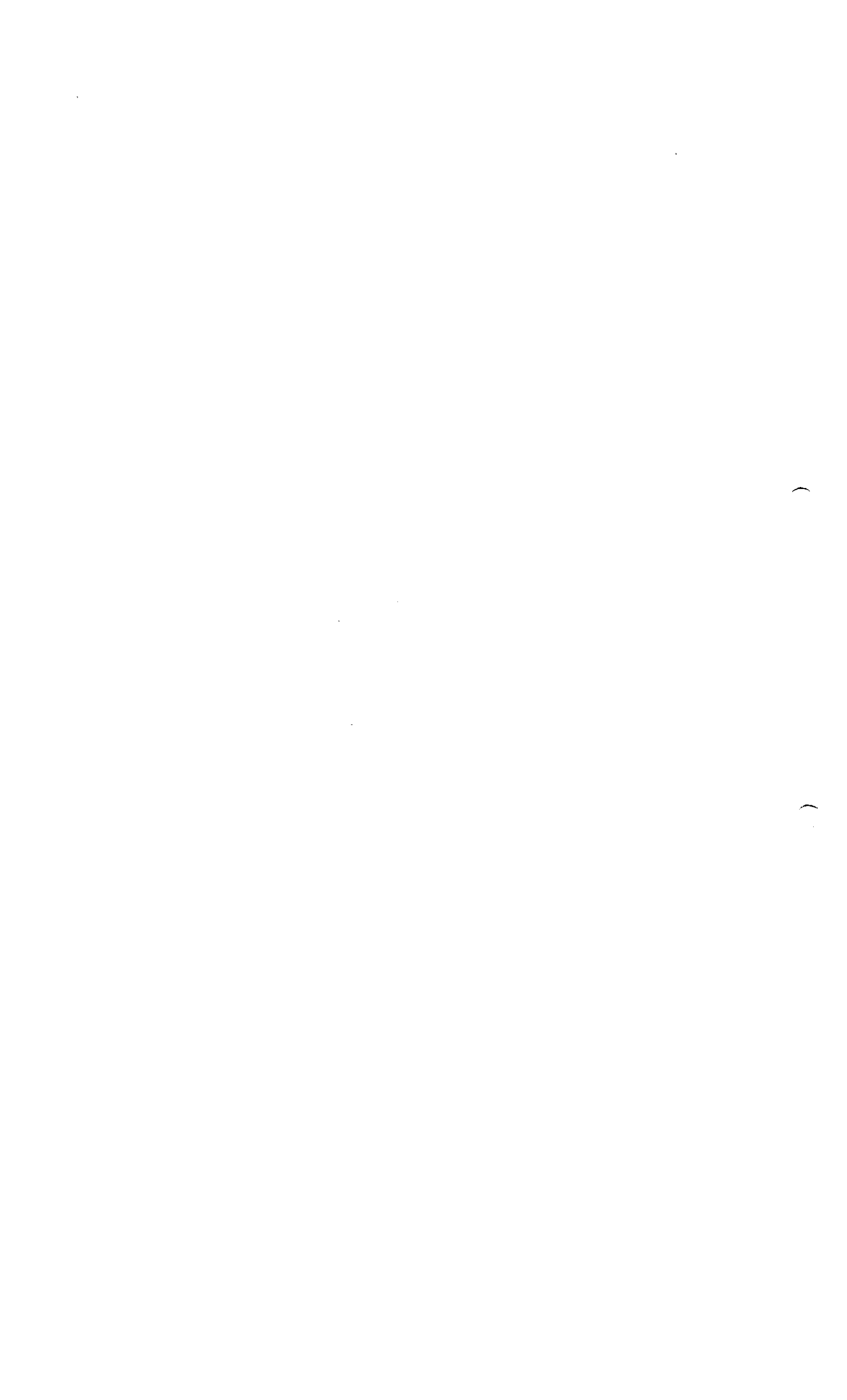
Se agrega el testigo (compuesto por todos los componentes excepto la vacuna analizada) en los pocillos libres.

Las microplacas se lavan con solución PBS-Tween-leche tras los pasos 1, 3 y 4.

1.11.3 Resultados

La densidad óptica (DO) de cada pocillo se registra a 405 nm y a 630 nm. La DO media de los pocillos del testigo se calcula y se resta de la DO de cada muestra.

El análisis permite determinar el título de cada tipo de poliomielitis mediante interpolación de la curva de referencia utilizando el método de líneas paralelas.





1.11.4 Criterios de validez

- El coeficiente de correlación de la curva de calibración debe ser mayor o igual que 0,95;
- Se debe satisfacer la prueba de la t: el valor t debe ser inferior al valor crítico de la tabla de Student;
- El valor medio de la pendiente del estándar de referencia se debe encontrar dentro de los límites del gráfico de control (3σ);
- El valor medio de concentración del estándar de referencia (50 %) se debe encontrar dentro de los límites del gráfico de control (3σ);
- Cuando se tiene que calcular el promedio de 2 valores, el resultado quedará invalidado si la desviación estándar relativa entre ambos valores es superior al 20 %;
- La curva dilución logarítmica-respuesta logarítmica de la muestra de prueba debe ser paralela a la de la referencia;
- Ninguna curva debe alejarse significativamente de un línea recta.

1.12 Potencia relativa in vitro de la hepatitis B (IVRP)

La potencia relativa *in vitro* de la hepatitis B se determina mediante un método ELISA. Esta prueba se realiza de acuerdo con los requisitos de la monografía 2.7.15 de la Ph. Eur.

La prueba se resume a continuación.

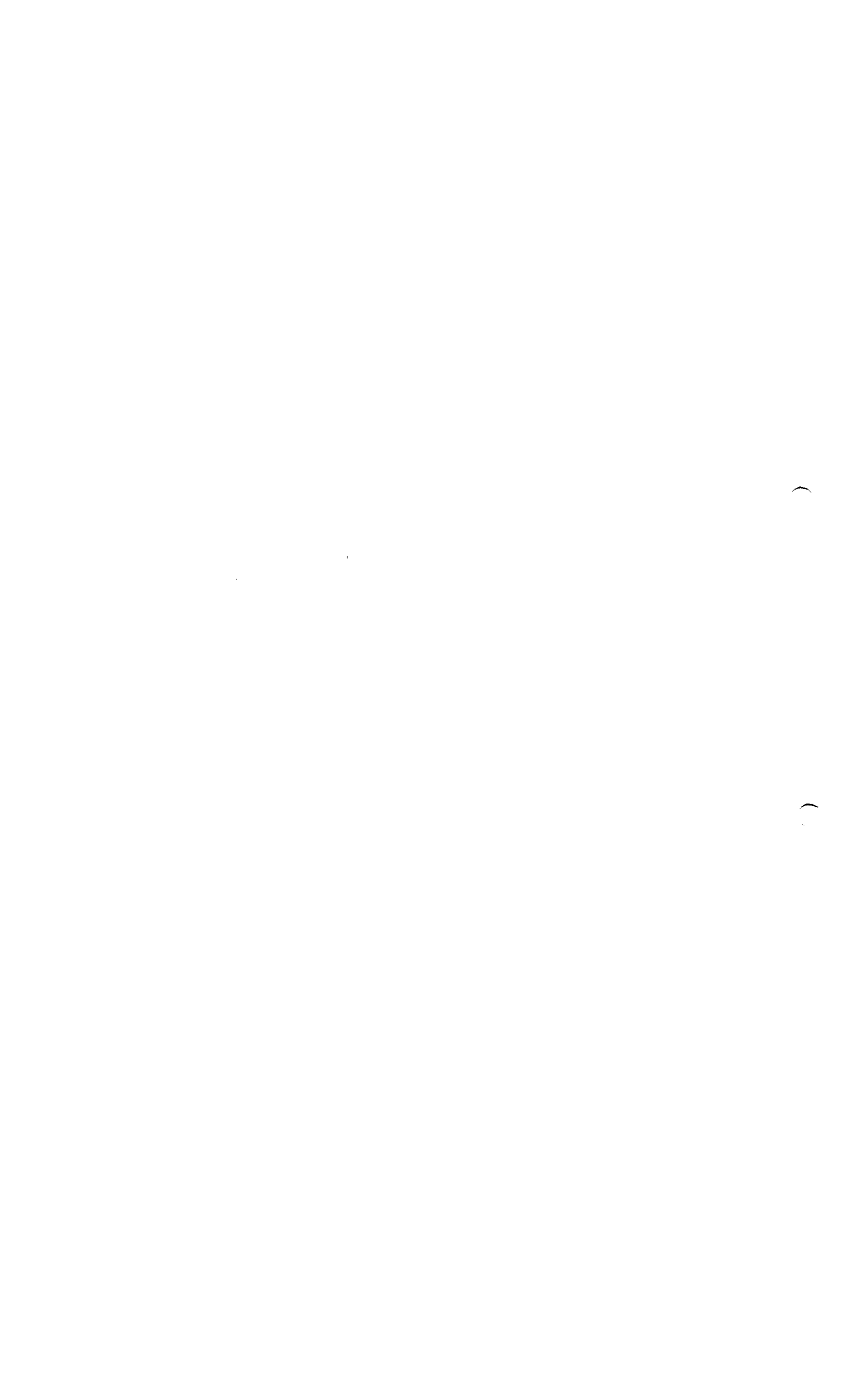
1.12.1 Principio

El antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) es capturado en primer lugar por un anticuerpo monoclonal anti-hepatitis B en una placa con 96 pocillos. Luego el antígeno unido es reconocido por un segundo anticuerpo monoclonal anti-hepatitis B que es detectado por un anticuerpo anti-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.

1.12.2 Procedimiento operativo

- Preparación de las muestras
Se preparan tres 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 distinto al de referencia;
- La muestra de prueba.

Se preparan duplicados independientes para cada muestra.





Tratamiento de las muestras:

El estándar de referencia, el control interno y la muestra de prueba se tratan con una solución PBS-tritón-DEA durante una 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.

• **Titulación mediante ELISA**

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

- 1) Los anticuerpos de recubrimiento son anticuerpos monoclonales anti-HBsAg. 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 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 utilizando peroxidasa conjugada con anticuerpos secundarios y TMB. La reacción se detiene con una solución de HCl 1 N.

Se agrega el testigo (tampón de dilución) en los pocillos libres.

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.

1.12.3 Resultados

La densidad óptica de cada pocillo se registra a 450 nm y a 630 nm. La DO registrada a 630 nm se deduce de cada DO registrada a 450 nm.

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

La determinación de la IVRP se realiza mediante el método de líneas paralelas, de conformidad con Ph. Eur. 5.3.3.

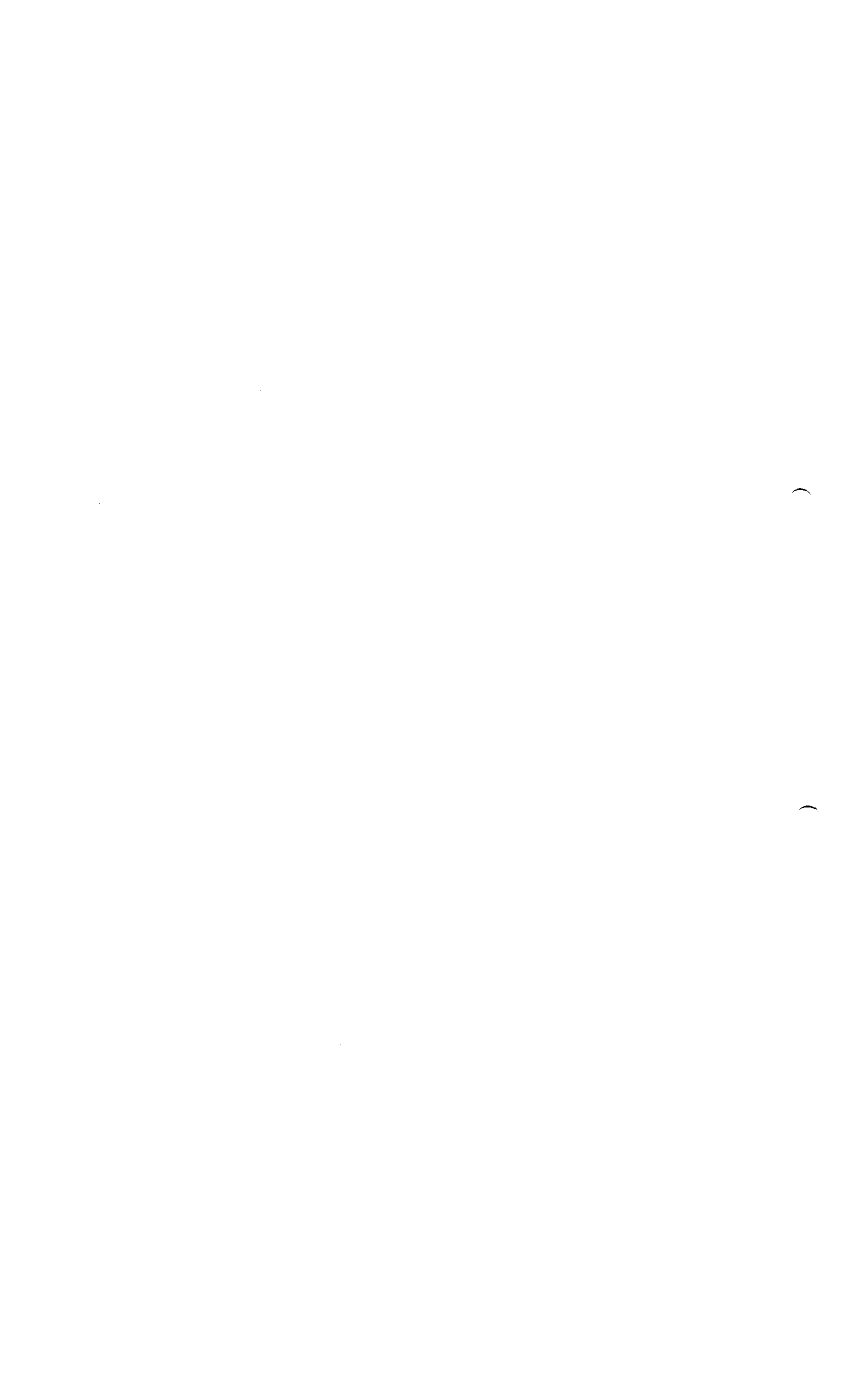
Se verifica la validez estadística. Luego se calcula la pendiente común, la potencia relativa *in vitro*, los títulos de las muestras y los límites de confianza.

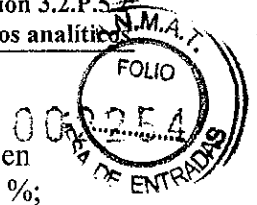
1.12.4 Criterios de validez

Testigo: La DO media debe ser inferior o igual a 0,150.

Control interno y muestras:

- Se utilizan un mínimo de 3 diluciones para determinar cada título con el método de líneas paralelas;





- El intervalo de confianza calculado para los títulos de las muestras se debe expresar en porcentaje y se debe encontrar dentro del siguiente intervalo: $80 \% \leq IC 95 \% \leq 125 \%$;
- 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 %.

2 Descripción de los métodos analíticos aplicados al producto llenado

2.1 Aspecto

Esta prueba se realiza de conformidad con la Ph. Eur. 2.9.20 (Contaminación por partículas: partículas visibles).

2.2 Medición de pH

Esta prueba se realiza de conformidad con la Ph. Eur. 2.2.3 (Determinación potenciométrica del pH).

2.3 Volumen extraíble

Esta prueba se realiza de conformidad con la Ph. Eur. 2.9.17 (Prueba de volumen extraíble de preparados parenterales).

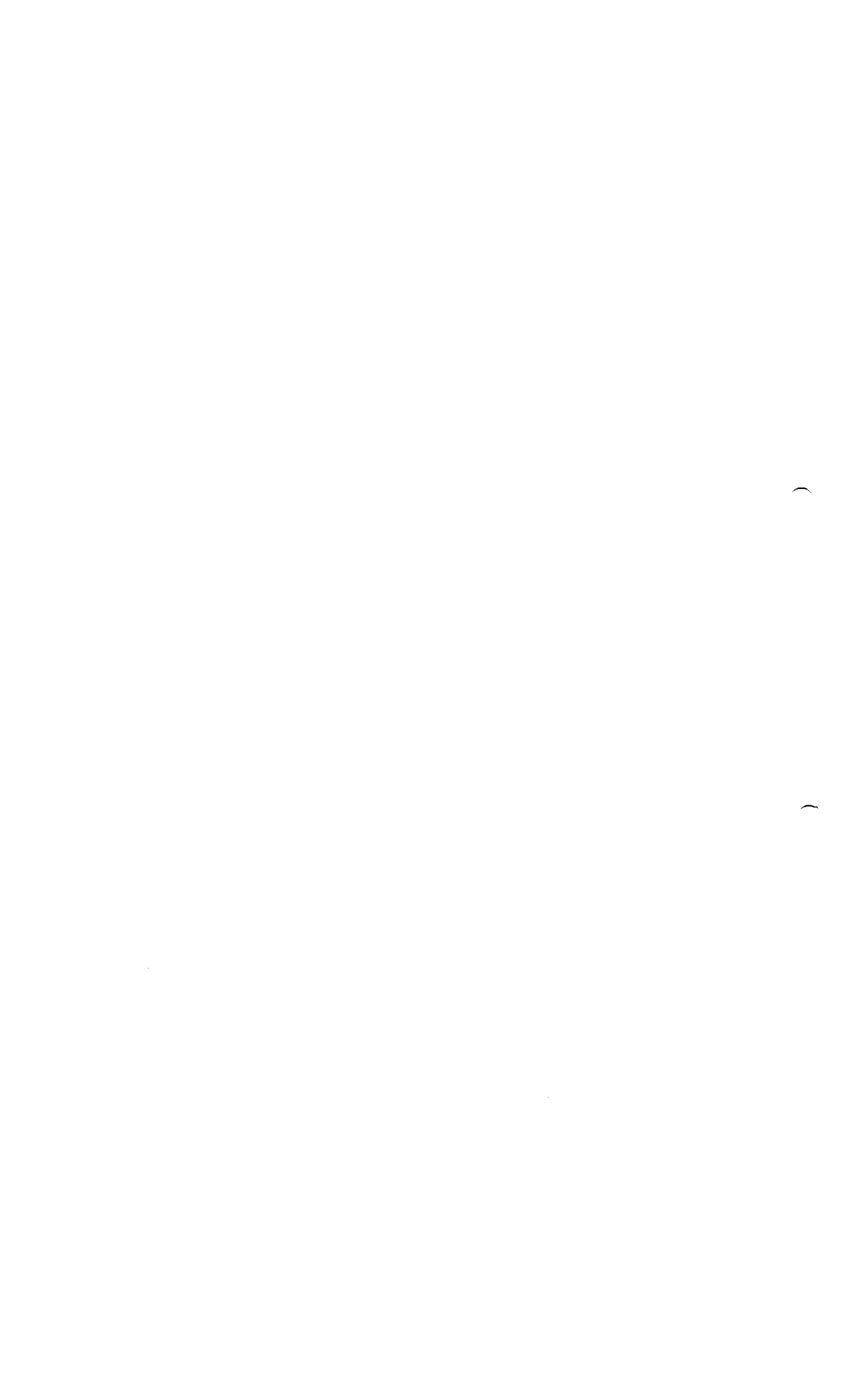
2.4 Contenido de aluminio

Esta prueba se basa en el método descrito en la Ph. Eur. 2.5.13 (Aluminio en vacunas adsorbidas), utiliza los mismos reactivos y productos químicos, y se basa en el mismo principio de formación de complejos de aluminio mediante EDTA, seguido de la titulación del exceso de EDTA. Considerando que en la muestra de prueba hay una cantidad de aluminio (de 1,5 mg a 4,6 mg) diferente a la especificada en la Farmacopea, la cantidad de reactivos utilizada se adapta en consecuencia.

Este método ha sido específicamente validado para la vacuna Hexaxim y se ha demostrado sus buenos resultados para evaluar la especificidad, linealidad, exactitud, precisión y límite de cuantificación (vea la sección 3.2.P.5.3 Validación de los procedimientos analíticos).

2.4.1 Principio

Las muestras de prueba que se van a analizar se mineralizan en presencia de ácido sulfúrico y de ácido nítrico. Luego el aluminio forma complejos con el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). El exceso de EDTA se titula con sulfato de cobre ($CuSO_4$) en presencia de piridilazonaftol (PAN).





El volumen necesario de EDTA para formar complejos con el aluminio en una muestra se calcula mediante la diferencia entre el volumen de CuSO₄ aceptado para titular el testigo y el volumen de CuSO₄ aceptado para titular la muestra.

Un mililitro (1 mL) de EDTA 0,02 M corresponde a 0,5396 mg de Al.

2.4.2 Muestras

- Estándar de referencia: solución de sulfato de cobre;
- Control interno: solución de aluminio a razón de 1 mg/mL en ácidos nítrico y sulfúrico;
- Testigo: ácidos nítrico y sulfúrico;
- Muestras de prueba en ácidos nítrico y sulfúrico.

2.4.3 Procedimiento operativo

Se realizan dos análisis para el testigo, el control interno y para cada muestra de prueba (cada una de ellas debe contener entre 1,5 mg y 4,6 mg de aluminio).

Cada muestra de prueba se coloca en un matraz con ácido nítrico y ácido sulfúrico, y se calienta para su mineralización. Se agrega una gota de heliantina (naranja de metilo), unos 3 mL de solución de hidróxido de sodio concentrada, 10 mL de tampón de acetato pH 4,4 y exactamente 10 mL de solución de EDTA 0,02 M al mineralizado para crear la complejometría.

La mezcla se lleva a ebullición suave y se agrega la solución de piridilazonaftol (PAN). La titulación del aluminio se realiza con CuSO₄ cuando la mezcla está aún caliente hasta que la solución cambia de color.

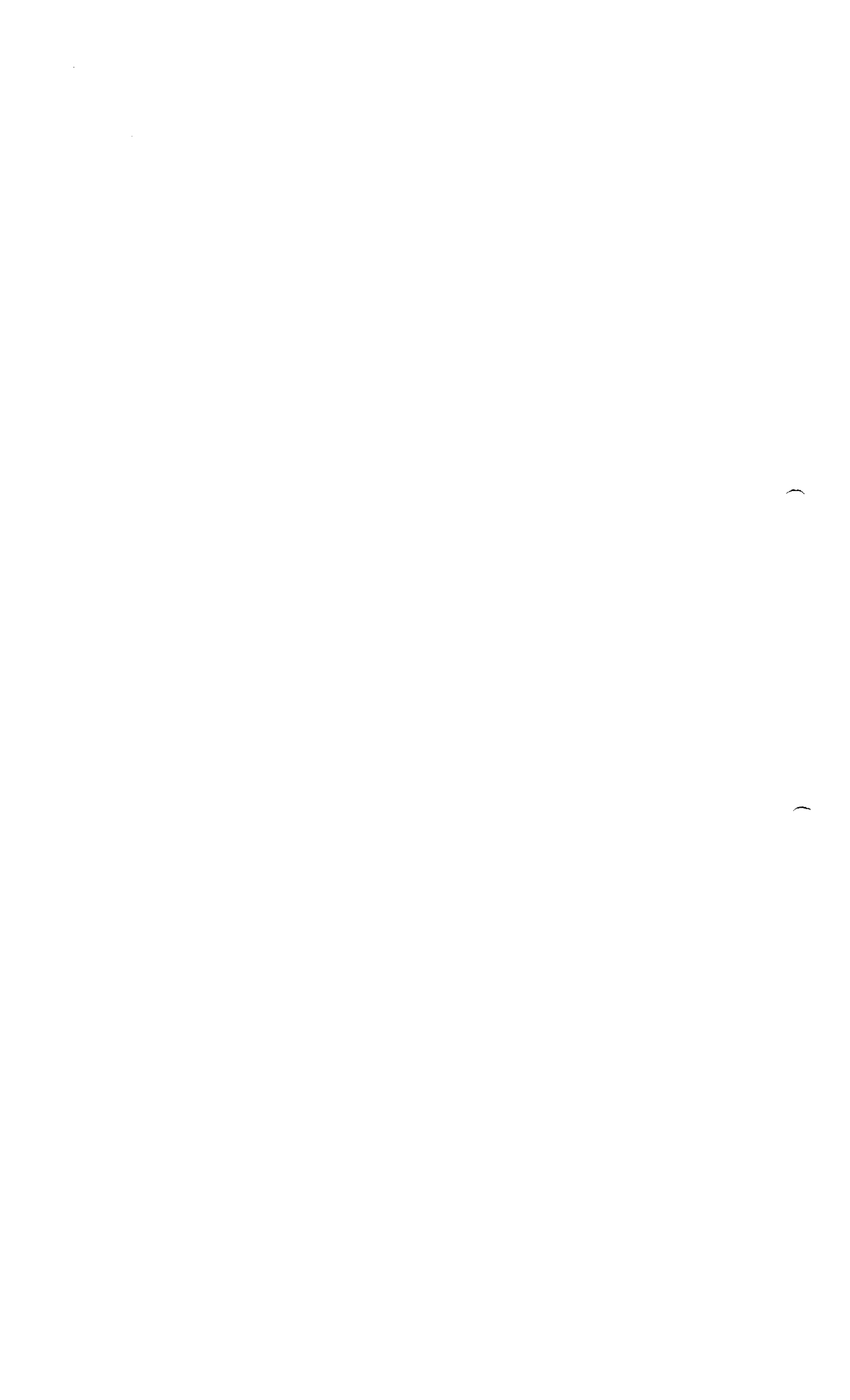
2.4.4 Resultados

La concentración de aluminio se calcula para cada análisis como sigue:

$$\frac{26,98 \times t \times (N-n) \times d}{TS} = \text{Aluminio en mg/mL}$$

Donde:

- N: el volumen de CuSO₄ utilizado para titular el testigo (mL);
- n: el volumen de CuSO₄ utilizado para titular la muestra de prueba y el control interno (mL);
- t: el título exacto de la solución de CuSO₄ (moles/L);
- TS: la muestra de prueba (mL);
- d: la dilución de la muestra de prueba.





2.4.5 Criterios de validez

- El valor del control de aluminio interno (media de las dos mediciones) tiene que estar dentro de los límites del gráfico de control;
- La desviación estándar relativa entre las 2 mediciones debe ser menor o igual que 5 %.

2.5 Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica

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

2.6 Prueba de pirógenos

Esta prueba se realiza de conformidad con la Ph. Eur. 2.6.8 (Pirógenos).

2.7 Identificación de difteria, tétanos, tos ferina, poliomielitis, hepatitis B y *Haemophilus* por el método Luminex

La identificación de los antígenos diftéricos, tetánicos, pertúsicos (FHA y toxoide pertúsico), poliomielitis, hepatitis B y *Haemophilus* se lleva a cabo mediante el método Luminex® de conformidad con los requisitos de la Ph. Eur. 2.7.1.

La prueba se resume a continuación.

2.7.1 Principio

El objetivo es detectar la presencia o ausencia de toxoide diftérico purificado (PDT), toxoide tetánico purificado (PTT), hemaglutinina filamentosa (FHA), toxoide pertúsico (PTxd), virus inactivado de la poliomielitis (IPV), antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) y fosfato de polirribosil ribitol conjugado a proteína tetánica (PRP-T) en la vacuna Hexaxim .

El análisis se basa en una técnica de inmunoanálisis tipo sándwich convencional como el método ELISA; las microesferas coloreadas unidas a antígenos (toxoides antidiftérico, toxoide antitetánico, anti-FHA, anti-PTxd, anti-IPV, anti-HBsAg y anti-PRP-T) se incuban en una microplaca con la vacuna que contiene los antígenos. Tras realizar el lavado y la incubación, los anticuerpos biotinilados se añaden a la mezcla. El complejo se revela por adición de estreptavidina-ficoeritrina, que se une a los anticuerpos biotinilados de detección.

A continuación, el inmunoanálisis de captura se lee con un citómetro de flujo por láser dual. Las microesferas se separan en función de sus firmas y, por consiguiente, de los antígenos unidos. La fluorescencia emitida por la R-ficoeritrina es proporcional a la presencia de antígenos unidos a las microesferas.

2.7.2 Equipos

- Sistema de arreglos en suspensión BioPlex;
- Incubadora/agitador de placas a +37 °C.





2.7.3 Reactivos

- Estreptavidina ligada a R-ficoeritrina;
- Siete microesferas recubiertas con anticuerpos específicos para PTT, PDT, PRP-T, FHA, PTxd, HBsAg e IPV;
- Siete anticuerpos biotinilados específicos para PTT, PDT, PRP-T, FHA, PTxd, HBsAg e IPV;
- Control positivo: lote de vacuna con todos los antígenos.

2.7.4 Procedimiento operativo

Durante las fases de espera, la placa se protege cuidadosamente de la luz.

- Humidificación de las membranas de la placa.

Se distribuye el tampón de dilución en cada pocillo. La microplaca se incuba en el laboratorio entre 5 y 10 minutos y se vacían los pocillos.

- Reacción microesfera/antígeno

Las microesferas se diluyen. Las muestras de prueba y el control positivo se diluyen a 1/50 y 1/1000 con un tampón de dilución y luego se reparten por triplicado. Los testigos son el tampón de dilución.

La placa se incuba a +37 °C con agitación constante durante 16 horas.

- Adición de anticuerpos biotinilados

Se prepara la mezcla de anticuerpos biotinilados y se distribuye en cada pocillo.

La placa se incuba a +37 °C con agitación constante durante 1 hora.

- Adición de estreptavidina R-ficoeritrina

Se lava la placa y se distribuye el tampón de dilución en cada pocillo.

La estreptavidina R-ficoeritrina se diluye en tampón de dilución y se distribuye en cada pocillo.

La placa se incuba a +37 °C con agitación constante durante 10 minutos y luego se lava.

- Preparación de la placa para la lectura

Se distribuye el tampón de dilución en cada pocillo.

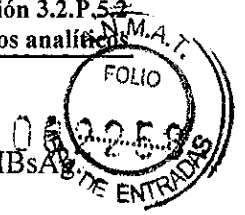
La placa se incuba con agitación constante durante 5 minutos; la temperatura no es importante. A continuación, se lee la placa con el sistema Luminex de Bioplex.

2.7.5 Resultados

La intensidad de la fluorescencia se mide con el sistema Bioplex. El software calcula el promedio de los resultados y resta el testigo medio. El software calcula la desviación estándar relativa.

Para cada antígeno, se realiza la identificación utilizando una de las diluciones de prueba:





- Diluciones de prueba a razón de 1/1000 para los antígenos de PTT, PDT, PRP-T y HBsAg.
- Diluciones de prueba a razón de 1/50 para los antígenos PTxd, FHA e IPV.

La identificación es positiva si la intensidad de la fluorescencia del principio activo (después de restar el testigo) es superior al límite de detección (p. ej., 2.000 FI para un equipo Bioplex).

La identificación es negativa si la intensidad de la fluorescencia del principio activo (después de restar el testigo) es inferior al límite de detección (p. ej., 2.000 FI para un equipo Bioplex).

2.7.6 Criterios de validez

Para todas las reacciones microesfera/antígeno del control positivo, la identificación tiene que ser positiva.

2.8 Prueba de Ouchterlony de difusión doble en gel (método alternativo)

La identificación de los toxoides diftéricos, toxoides tetánicos, antígenos pertúsicos y de *Haemophilus* se puede realizar mediante el método Ouchterlony de difusión doble en gel, de conformidad con los requisitos de la Ph. Eur. 2.7.1 (Métodos inmunoquímicos).

La prueba se resume a continuación.

2.8.1 Principio

Los antígenos presentes en la vacuna y sus anticuerpos homólogos se difunden en gel de agarosa. Durante la difusión, se forman gradientes de concentración. Si los antígenos y los anticuerpos se encuentran en concentraciones relativas óptimas se forma una línea de precipitación.

2.8.2 Procedimiento operativo

- Desorción de la vacuna

Puesto que algunos componentes de la vacuna se adsorben parcialmente en gel de aluminio, las muestras de prueba se deben tratar previamente:

- Con tetraborato disódico al 5 % con pH 10 y solución de BSA al 0,5 % para la FHA y el PTxd;
- Con una solución de citrato de trisodio al 10 % o una solución de tetraborato disódico al 5 % con pH 10 para los toxoides diftérico y tetánico.

Las muestras se centrifugan.

Para analizar la identidad del principio activo *Haemophilus influenzae*, la muestra no se desorbe ni se centrifuga.

- Preparación de las muestras

En la tabla 1 se describe la referencia y el antisuero correspondientes a cada principio activo analizado.





Estándar de referencia: en caso necesario, las referencias se diluyen en un tampón de tris-barbital pH = 9,2 (diluido a 1/2). Las diluciones correctas se determinan durante la cualificación de cada referencia.

Antisueros: en caso necesario, los antisueros se diluyen en un tampón de tris-barbital pH = 9,2. Las diluciones correctas se determinan durante la cualificación de cada antisuero.

Muestras de prueba: las muestras se diluyen en un tampón de tris-barbital pH = 9,2 o se cargan puras:

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

Principio activo que se identifica	Antisuero homólogo	Referencia homóloga
Toxoide diftérico	Suero antidiftérico (caballo)	Principio activo del toxoide diftérico purificado
Toxoide tetánico	Suero antitetánico (caballo)	Principio activo del toxoide tetánico purificado
Antígeno pertúsico de 2 componentes (FHA y toxoide pertúsico (PTxd))	Suero anti-FHA (cabra) Suero anti-FHA (cabra)	Toxoide pertúsico y FHA nativos en solución
<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b	Suero contra <i>Haemophilus influenzae</i> (conejo)	Vacuna contra <i>Haemophilus</i>

Migración

Las muestras (estándares de referencia, muestras de prueba y antisueros) se cargan en gel de agarosa y se lanza la migración como se indica a continuación:

La migración tiene lugar en una cámara húmeda durante 12-24 horas a temperatura ambiente.

El gel se lava (utilizando una solución de cloruro de sodio), se enjuaga (utilizando agua purificada ultrafiltrada), se presiona (utilizando varias capas de papel absorbente bajo un peso de aproximadamente 2 kg) y se seca. Luego el gel se tinte utilizando una solución de tinción de Coomassie y se destiñe utilizando una solución de ácido acético y metanol.

2.8.3 Resultados

Las muestras de prueba y el antisuero homólogo deben formar una línea de precipitación idéntica a la de los antígenos de referencia.

2.8.4 Criterios de validez

- Presencia de una línea de precipitación entre una referencia y su antisuero homólogo;
- Ausencia de cualquier línea parásita entre un estándar de referencia y un antisuero no homólogo;
- Ausencia de cualquier línea parásita sobre las líneas de interés.

