



2.9 Identidad de la poliomielitis inactivada mediante ELISA (método alternativo)

La identificación de la poliomielitis inactivada se lleva a cabo con el método utilizado para determinar el contenido de antígeno D (párrafo 1.11). Solo se diferencia en la expresión de los resultados: los resultados se expresan como negativo o positivo para la prueba de identificación.

2.10 Identidad de la hepatitis B mediante ELISA (método alternativo)

La identificación de los antígenos de superficie de hepatitis B se realiza por el método ELISA de conformidad con los requisitos de la Ph. Eur. 2.7.1 (Métodos inmunoquímicos).

La prueba se basa en el método ELISA utilizado para la cuantificación de HBsAg (párrafo 1.7), utilizando los mismos reactivos, anticuerpos y conjugados. Se han introducido modificaciones menores y simplificaciones para usarlo como prueba de identidad para HBsAg.

La prueba se resume a continuación.

2.10.1 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 resultado es la presencia o ausencia de HBsAg en la muestra.

2.10.2 Procedimiento operativo

- Preparación de las muestras

Se preparan dos muestras:

- El control positivo que es un lote de Hexaxim;
- La muestra de prueba.

Se preparan duplicados independientes para cada muestra.

Tratamiento de las muestras:

El control positivo y la vacuna se diluyen a razón de 1/4 con una solución PBS-tritón-DEA y se conservan durante 1 hora a temperatura ambiente con mezclado.

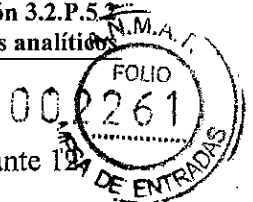
Dilución de las muestras:

A continuación, las muestras tratadas se diluyen en el tampón de ELISA para alcanzar una concentración final de aproximadamente 25 ng/mL de HBsAg en el pocillo. Se puede realizar una dilución a razón de 1/800 según la concentración de HBsAg en la vacuna. Tras esta dilución, el duplicado dependiente de cada dilución se transfiere a la microplaca.

- Titulación mediante ELISA

El método ELISA permite detectar la hepatitis B en la muestra.





- 1) Las microplacas que contienen los anticuerpos de recubrimiento se incuban durante 120 horas a +5 °C y luego se lavan con una solución PBS-Tween;
- 2) Las preparaciones de vacuna diluida y control positivo 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.

2.10.3 Resultados

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

Se calcula la DO media del control positivo y de la muestra.

Si la DO media de la muestra es $\leq T$: la identidad del antígeno de hepatitis B es negativa.

Si la DO media de la muestra es $> T$: la identidad del antígeno de hepatitis B es positiva.

T (umbral) se define como: la media de la DO de los testigos x 5

2.10.4 Criterios de validez

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

Control positivo: Positivo para la identidad del antígeno de hepatitis B





Sección 3.2.P.5.6 - Justificación de las especificaciones

Índice

Lista de tablas	3
Lista de figuras	4
1 Introducción.....	5
2 Justificación de los criterios de aceptación	10
2.1 Fase de producto final a granel	10
2.1.1 Medición de la osmolalidad.....	10
2.1.2 Contenido de formaldehído libre.....	11
2.1.3 Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	12
2.1.4 Actividad de sensibilización a la histamina.....	12
2.1.5 PRP no adsorbido	13
2.1.6 PRP despolimerizado.....	13
2.1.7 Porcentaje de adsorción del toxoide diftérico.....	13
2.1.8 Porcentaje de adsorción de hepatitis B.....	14
2.1.9 Potencia diftérica	14
2.1.10 Potencia tetánica.....	15
2.1.11 Inmunogenicidad contra pertussis	15
2.1.12 Contenido de antígeno D.....	16
2.1.12.1 Introducción	16
2.1.12.2 Estudio de validación de la omisión del ensayo <i>in vivo</i> para la vacuna contra la poliomielitis.....	16
2.1.13 Potencia relativa <i>in vitro</i> de la hepatitis B (IVRP).....	37
2.1.13.1 Introducción	37
2.1.13.2 Estudio de validación de la omisión de la prueba <i>in vivo</i> de la hepatitis B	38
2.2 Etapa de producto llenado.....	47
2.2.1 Aspecto	47
2.2.2 Medición de pH	47
2.2.3 Volumen extraíble	48
2.2.4 Contenido de aluminio	48
2.2.5 Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	49
2.2.6 Prueba de pirógenos	49
2.2.7 Identidad de cada valencia.....	50



3	Pruebas no realizadas de forma rutinaria en el momento de la liberación	51
3.1	Porcentaje de adsorción del toxoide tetánico	51
3.2	Inmunogenicidad contra Haemophilus en ratones	52
3.3	Toxicidad específica de los componentes diftéricos y tetánicos	52
3.4	Toxicidad anormal	52
3.5	PT no adsorbido y FHA no adsorbida mediante ELISA	53
3.6	Porcentaje de adsorción - IPV	53
3.7	Irreversibilidad del toxoide pertúsico	53
3.8	Contenido de endotoxinas	53


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
ALBERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





Lista de tablas

Tabla 1: Evolución de los criterios de aceptación para la liberación	6
Tabla 2: Medición de osmolalidad: análisis estadístico	11
Tabla 3: Contenido de formaldehído libre: análisis estadístico.....	12
Tabla 4: Porcentaje de adsorción de hepatitis B: análisis estadístico.....	14
Tabla 5: Resultados del contenido de antígeno D	20
Tabla 6: Resultados de la actividad relativa obtenidos en la prueba <i>in vivo</i> de la poliomielitis	22
Tabla 7: Análisis descriptivo de los resultados del contenido de antígeno D (UD/mL) para el tipo 1: método <i>in vitro</i>	23
Tabla 8: Análisis descriptivo de los resultados de actividad relativa (tipo 1): método <i>in vivo</i>	24
Tabla 9: Análisis descriptivo de los resultados del contenido de antígeno D (UD/mL) para el tipo 2: método <i>in vitro</i>	28
Tabla 10: Análisis descriptivo de los resultados de actividad relativa (tipo 2): método <i>in vivo</i>	29
Tabla 11: Análisis descriptivo de los resultados del contenido de antígeno D (UD/mL) para el tipo 3: método <i>in vitro</i>	33
Tabla 12: Análisis descriptivo de los resultados de actividad relativa (tipo 3): método <i>in vivo</i>	34
Tabla 13: Potencia relativa <i>in vitro</i> : análisis estadístico	38
Tabla 14: Descripción de los lotes de Hexaxim utilizados para el estudio y las condiciones de degradación por calor	40
Tabla 15: Resultados de la IVRP.....	41
Tabla 16: Análisis descriptivo de los resultados de la IVRP.....	42
Tabla 17: Resultados de la actividad relativa obtenidos en las pruebas <i>in vivo</i>	44
Tabla 18: Análisis descriptivo de los resultados de la actividad relativa <i>in vivo</i>	45
Tabla 19: Contenido de aluminio: análisis estadístico	49
Tabla 20: Resultados obtenidos en las pruebas de potencia tetánica en lotes de Hexaxim (prueba de desafío en ratones)	51





Lista de figuras

Figura 1: Resultados de contenido de antígeno D para el tipo 1 (log UD/mL) de la prueba *in vitro* para cada lote.....25

Figura 2: Actividad relativa en la prueba *in vivo* de cada lote de tipo 1 (expresada en logaritmos)27

Figura 3: Resultados de contenido de antígeno D para el tipo 2 (log UD/mL) de la prueba *in vitro* para cada lote.....30

Figura 4: Actividad relativa en la prueba *in vivo* de cada lote de tipo 2 (expresada en logaritmos)32

Figura 5: Resultados de contenido de antígeno D para el tipo 3 (log UD/mL) de la prueba *in vitro* para cada lote.....35

Figura 6: Actividad relativa en la prueba *in vivo* de cada lote de tipo 3 (expresada en logaritmos)36

Figura 7: Actividad relativa de la prueba *in vitro* de cada lote (expresada en logaritmos).....43

Figura 8: Actividad relativa en la prueba *in vivo* de cada lote (expresada en logaritmos).....46

