

**Tabla 18: Especificidad: porcentaje de recuperación entre el agregado medido y el agregado teórico (%) - PRP no adsorbido total**

Nivel	Porcentaje de recuperación
+1	103%
+2	102%

Puesto que para cada nivel de agregado, el porcentaje de recuperación se encuentra entre el 80% y el 120%, el método es específico para el PRP no adsorbido total.

### 3.2.2.1.2.2 Determinación del PRP despolimerizado

**Tabla 19: Especificidad: porcentaje de recuperación entre el agregado medido y el agregado teórico (%) - PRP despolimerizado**

Nivel	Porcentaje de recuperación
+1	98%
+2	97%
+3	95%

Puesto que para cada nivel de agregado, el porcentaje de recuperación se encuentra entre el 80% y el 120%, el método es específico para el PRP despolimerizado.

### 3.2.2.2 Linealidad

El diseño experimental fue el siguiente: 2 operadores realizaron 3 series separadas en días diferentes. Para el PRP no adsorbido total, cada serie incluía el ensayo de un rango de 5 concentraciones (2 vacunas diluidas, 1 vacuna sin diluir y 2 vacunas con agregado).

Para el porcentaje de PRP despolimerizado, cada serie incluía el ensayo de un rango de 6 concentraciones (2 vacunas diluidas, 1 vacuna sin diluir y 3 vacunas con agregado).

#### 3.2.2.2.1 Resultados analíticos

##### 3.2.2.2.1.1 Determinación del PRP no adsorbido total

El dato sometido a análisis es la concentración de PRP no adsorbido total, expresada en  $\mu\text{g/mL}$ .

En la Tabla 20 se resumen los resultados del estudio.

La concentración media de PRP no adsorbido total en la vacuna sin diluir (nivel 0) es igual a  $22,0154 \mu\text{g/mL}$  (media de las 3 series). Por lo tanto, la concentración teórica prevista de PRP no adsorbido total en la muestra se calcula de la siguiente manera:





Para la vacuna con agregado:

$$\text{Theoretical expected concentration} = \frac{(\text{concentration of Hexaxim} \times \text{volume of vaccine}) + (\text{concentration of PRP - AH spike} \times \text{volume of PRPAH spike})}{\text{volume of Hexaxim} + \text{volume of PRP - AH spike}}$$

Para la vacuna diluida:

$$\text{Concentración teórica prevista} = \text{concentración de la vacuna} \times \text{dilución}$$

Donde:

- Concentración de la vacuna = 22,0154 µg/mL
- Concentración de PRPC = 175 µg/mL;
- Y volumen expresado en mL.

Ejemplos:

- En el nivel -2:

$$\text{Concentración teórica prevista} = 22,0154 \times \frac{1}{2} = 11,0077 \text{ µg/mL}$$

- En el nivel +2:

$$\text{Concentración teórica prevista} = \frac{(22.0154 \times 1.00) + (175 \times 0.090)}{1.090} = 34,6471 \text{ µg/mL}$$

Se obtienen los siguientes resultados:

**Tabla 20: Linealidad: concentraciones medidas frente a concentraciones teóricas previstas (µg/mL) - PRP no adsorbido total**

Nivel	Vacuna Hexaxim		Solución PRPT		Dilución	Concentración teórica prevista (µg/mL)	Concentración medida (µg/mL)		
	Concentración (µg/mL)	Volumen (mL)	Concentración (µg/mL)	Volumen (mL)			Serie 1	Serie 2	Serie 3
-2	22,0154	1	175	/	1/2	11,0077	12,1241	11,1198	11,2942
-1		1		/	1/1,3	16,9349	18,2283	17,3677	16,5786
0		/		/	/	22,0154	22,4319	21,3801	22,2341
+1		1		0,040	/	27,8994	29,1782	27,8767	27,2178
+2		1		0,090	/	34,6471	37,5867	33,0340	34,1202

### 3.2.2.2.1.2 Determinación del porcentaje de PRP despolimerizado

El dato sometido a análisis es la concentración de PRP despolimerizado expresada en µg/mL, pero la linealidad se expresará en %.

En la Tabla 21 se resumen los resultados del PRP despolimerizado expresados en in µg/mL





El porcentaje medio de PRP despolimerizado en la vacuna sin diluir (nivel 0) es de 4,1576 (media de las 3 series). Por lo tanto, el porcentaje teórico previsto de PRP despolimerizado en la muestra se calcula del siguiente modo:

Para la vacuna con agregado:

$$\text{Theoretical expected concentration} = \frac{(\text{concentration of Hexaxim} \times \text{volume of vaccine}) + (\text{concentration of PRP - AH spike} \times \text{volume of PRPAH spike})}{\text{volume of Hexaxim} + \text{volume of PRP - AH spike}}$$

Para la vacuna diluida:

$$\text{Concentración teórica prevista} = \text{concentración de la vacuna} \times \text{factor de dilución}$$

Donde:

- Concentración de la vacuna = 4,1576 µg/mL
- Concentración de PRP-AH = 150 µg/mL, y el volumen expresado en mL.

Ejemplos:

- En el nivel -2:

$$\text{Concentración teórica prevista} = 4,1576 \times \frac{1}{3} = 1,3859 \mu\text{g/mL}$$

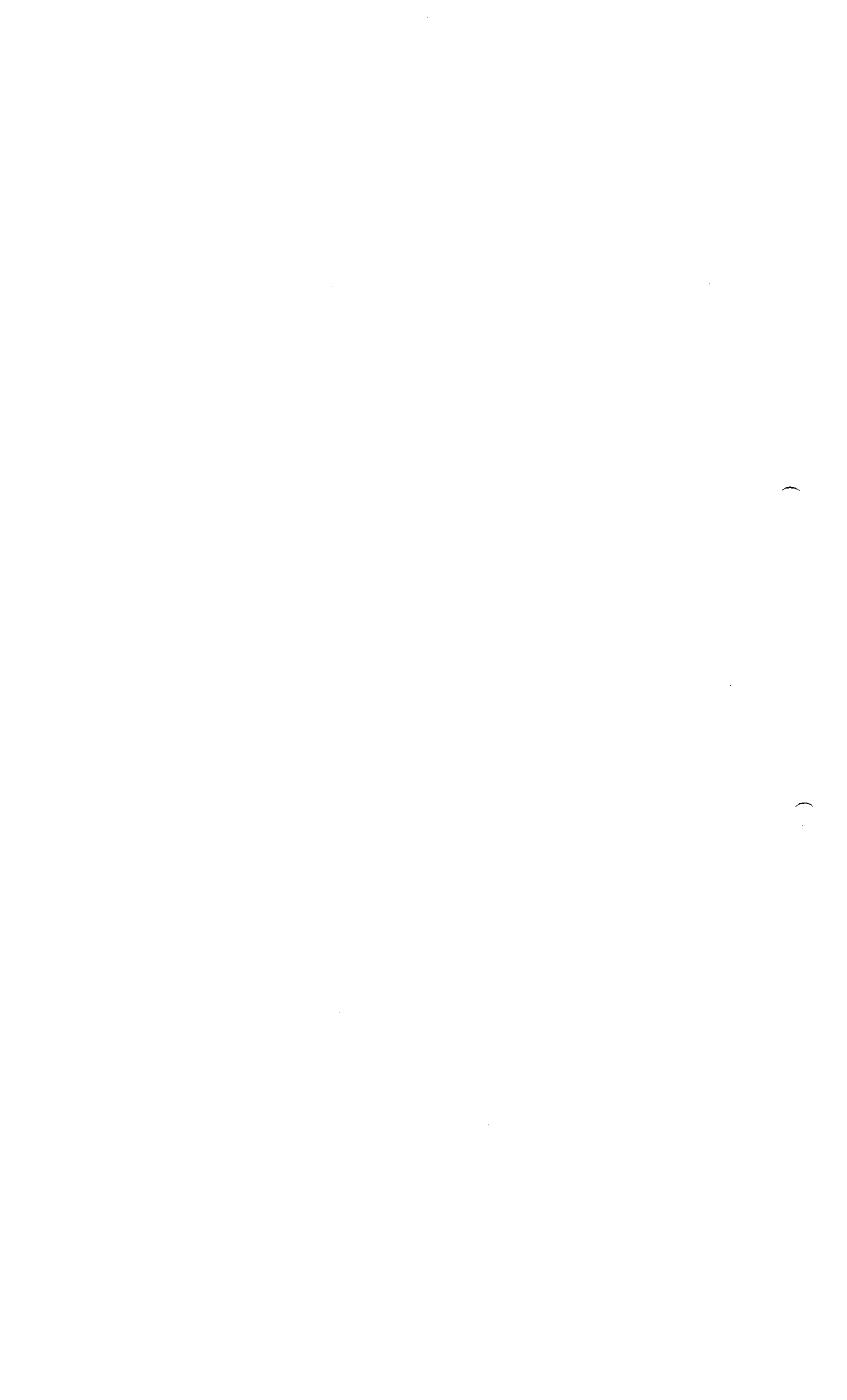
- En el nivel +2:

$$\text{Concentración teórica prevista} = \frac{(4.1576 \times 1.00) + (150 \times 0.050)}{1.050} = 11,1024 \mu\text{g/mL}$$

Se obtienen los siguientes resultados:

**Tabla 21: Linealidad: concentraciones medidas frente a concentraciones teóricas previstas (µg/mL) - PRP despolimerizado**

Nivel	Vacuna Hexaxim		Solución PRP-AH		Dilución	Concentración teórica prevista (µg/mL)	Concentración medida (µg/mL)		
	Concentración (µg/mL)	Volumen (mL)	Concentración (µg/mL)	Volumen (mL)			Serie 1	Serie 2	Serie 3
-2	4,1576	0,5	150	/	1/3	1,3859	1,7267	1,5920	1,5931
-1		1		/	1/1,5	2,7717	3,4465	2,8578	3,2369
0		/		/	/	4,1576	4,3341	4,2302	3,9084
+1		1		0,025	/	7,7147	8,0813	7,3699	7,5162
+2		1		0,050	/	11,1024	11,4548	10,6533	10,6438
+3		1		0,080	/	14,9607	15,1600	13,4223	14,5124





### 3.2.2.2.2 Análisis

La linealidad en el rango seleccionado se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la Tabla 20 y la Tabla 21:

- La homogeneidad de las varianzas vinculadas se verifica mediante la prueba de Cochran;
- La dependencia entre la concentración teórica prevista y la concentración medida, así como la linealidad de esta relación, se analizan mediante una regresión lineal no ponderada utilizando el método de mínimos cuadrados. Se debe mostrar una pendiente significativa y una desviación no significativa de la linealidad.

#### 3.2.2.2.2.1 Determinación del PRP no adsorbido total

La prueba de Cochran se halla en el límite de significancia, pero la pequeña heterocedasticidad es aceptable.

El análisis de varianza permite concluir la significancia de la pendiente y el ajuste correcto de la regresión lineal: existe una dependencia lineal entre la concentración teórica y la concentración medida.

**Tabla 22: Linealidad: ecuación de la recta de regresión -PRP no adsorbido total**

Ecuación de la recta de regresión	Coefficiente de determinación	Rango de linealidad en $\mu\text{g/mL}$
$Y = (0,554 \pm 1,811) + (0,988 \pm 0,076) \cdot X$	$R^2 = 0,9840$	[8,08-38,14]
donde: X= concentración teórica de PRP ( $\mu\text{g/mL}$ ) Y = concentración medida de PRP ( $\mu\text{g/mL}$ )		

$$P_{\text{linealidad}} < 0,0001$$

$$P_{\text{Falta de ajuste}} = 0,97$$

El método es lineal en el rango [8,1-38,1]  $\mu\text{g/mL}$ .

Se cumplen todos los criterios de aceptación; por lo tanto, el método es lineal.



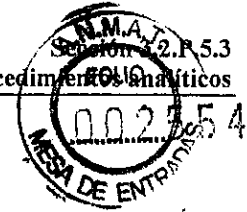
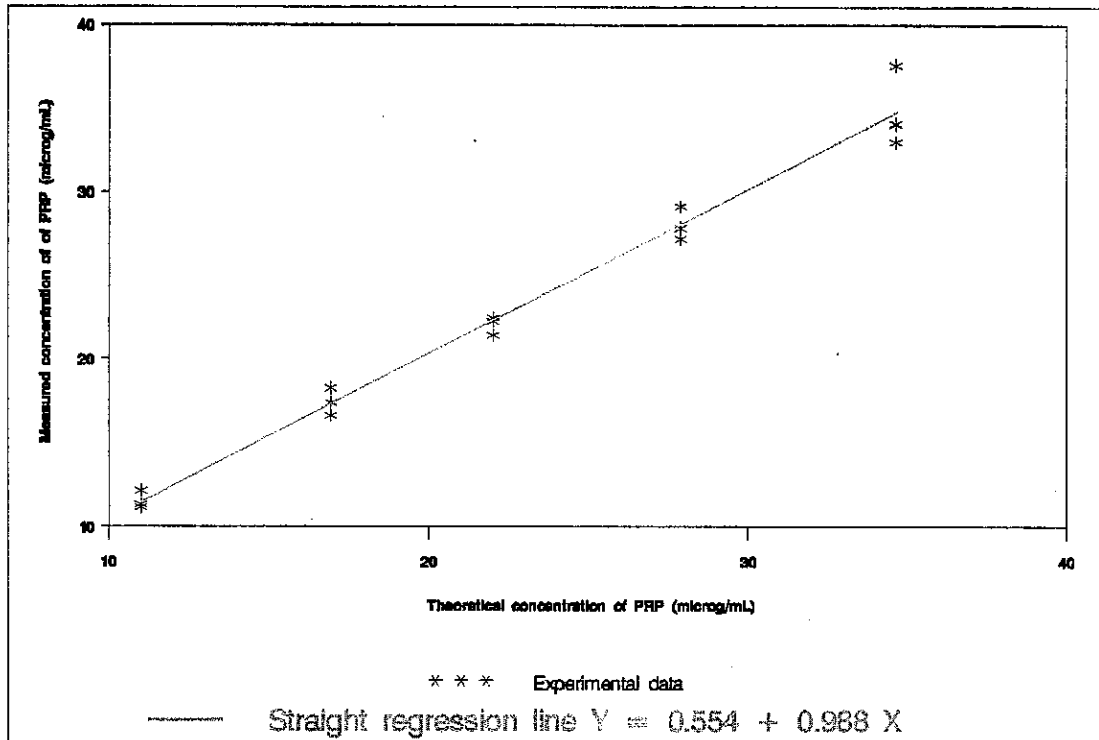


Figura 2: Gráfico de linealidad - PRP no adsorbido total



3.2.2.2.2 Determinación del porcentaje de PRP despolimerizado

La prueba de Cochran demuestra que las varianzas son homogéneas.

El análisis de varianza permite concluir la significancia de la pendiente y el ajuste correcto de la regresión lineal: existe una dependencia lineal entre el porcentaje teórico y el porcentaje medido.

Tabla 23: Linealidad: ecuación de la recta de regresión - Porcentaje de PRP despolimerizado

Ecuación de la recta de regresión	Coefficiente de determinación	Rango de linealidad en $\mu\text{g/mL}$
$Y = (0,411 \pm 0,368) + (0,937 \pm 0,043) \cdot X$	$R^2 = 0,9925$	[0,46-15,68]
donde: X = porcentaje teórico de PRP despolimerizado ( $\mu\text{g/mL}$ ) Y = porcentaje medido de PRP despolimerizado ( $\mu\text{g/mL}$ )		

$P_{\text{linealidad}} < 0,0001$

$P_{\text{Falta de ajuste}} = 0,90$

El método es lineal en el rango [0,5-15,7]  $\mu\text{g/mL}$ .





Además, el porcentaje de PRP despolimerizado se calcula con la fórmula:

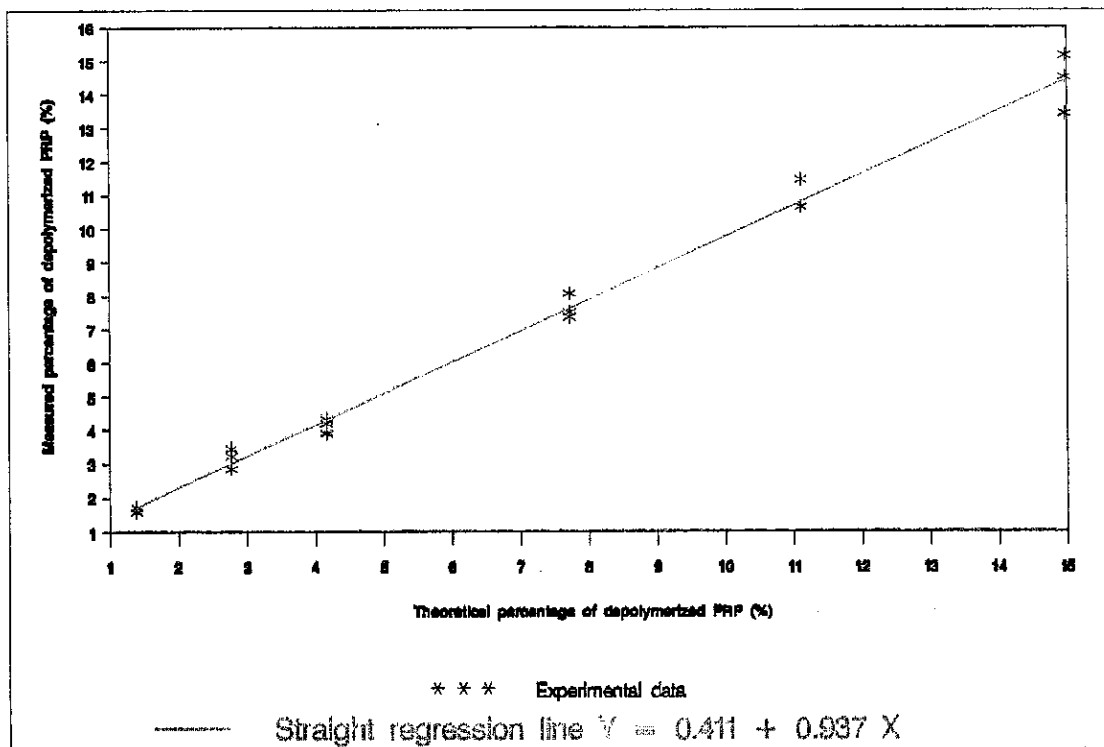
$$\frac{\text{Concentration of depolymerized PRP in } \mu\text{g/mL}}{\text{Average concentration of total non adsorbed PRP of the neat vaccine}} \times 100$$

Con una concentración media de PRP no adsorbido total en la vacuna sin diluir = 22,0154  $\mu\text{g/mL}$  (calculada en el apartado 3.2.2.2.1.1).

Por lo tanto, el método es lineal en el rango [0,5-15,7]  $\mu\text{g/mL}$ , lo que equivale a [2,1-71,2]% de PRP despolimerizado. Asimismo, el límite de cuantificación es de 7,1%, por consiguiente el método es lineal en el rango [7,1-71,2]% (vea el apartado 3.2.2.5.2).

Se cumplen todos los criterios de aceptación; por lo tanto, el método es lineal.

Figura 3: Gráfico de linealidad - Porcentaje de PRP despolimerizado ( $\mu\text{g/mL}$ )

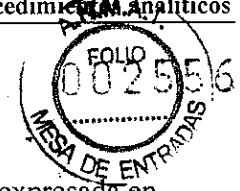


### 3.2.2.3 Exactitud

El diseño experimental fue el siguiente: 2 operadores realizaron 3 series separadas en días diferentes. Para el PRP no adsorbido total, cada serie incluía el ensayo de un rango de 5 concentraciones (2 vacunas diluidas, 1 vacuna sin diluir y 2 vacunas con agregado).

Para el porcentaje de PRP despolimerizado, cada serie incluía el ensayo de un rango de 6 concentraciones (2 vacunas diluidas, 1 vacuna sin diluir y 3 vacunas con agregado).





### 3.2.2.3.1 Resultados analíticos

Los datos sometidos a análisis son la concentración de PRP no adsorbido total, expresada en  $\mu\text{g/mL}$ , y el porcentaje de PRP despolimerizado ( $\mu\text{g/mL}$ ).

En la Tabla 20 y la Tabla 21 se resumen los resultados del estudio.

La exactitud se estudia en 4 niveles de concentración de PRP no adsorbido total y en 5 para el porcentaje de PRP despolimerizado.

### 3.2.2.3.2 Análisis

- Los porcentajes de recuperación se calculan para cada nivel de concentración teórica prevista y para cada grupo (media de las series);
- La homogeneidad de las varianzas intraniveles se verifica mediante la prueba de Cochran;
- Cuando se adquiere la homogeneidad, la no significancia de las diferencias entre los niveles de concentración teórica prevista se comprueba con un análisis de varianza.
- Cuando se comprueba la igualdad de las medias entre niveles, se calcula el porcentaje de recuperación promedio global con los límites de confianza del 95 %.

#### 3.2.2.3.2.1 Determinación del PRP no adsorbido total

Puesto que la concentración teórica en la muestra de rutina (nivel 0) se utiliza para calcular la concentración teórica prevista, este nivel no se incluye en los cálculos de exactitud.

Por lo tanto, la exactitud se estudia en 4 niveles de concentración.

**Tabla 24: Exactitud: porcentaje de recuperación medio por concentración - PRP no adsorbido total**

Nivel de concentración teórica ( $\mu\text{g/mL}$ )	Media (%)
11,0077	105
16,9349	103
27,8994	101
34,6471	101

Puesto que cada porcentaje de recuperación medio por concentración se encuentra entre el 80 % y el 120 %, el método es exacto para el PRP no adsorbido total.

#### 3.2.2.3.2.2 Determinación del porcentaje de PRP despolimerizado

Puesto que la concentración teórica en la muestra de rutina (nivel 0) se utiliza para calcular la concentración teórica prevista, este nivel no se incluye en los cálculos de exactitud.

Por lo tanto, la exactitud se estudia en 5 niveles de concentración.





**Tabla 25: Exactitud: porcentaje de recuperación medio por concentración - Porcentaje de PRP despolimerizado**

Nivel de concentración teórica (µg/mL)	Media (%)
1,3859	118
2,7717	115
7,7147	99
11,1024	98
14,9607	96

Puesto que cada porcentaje de recuperación medio por concentración se encuentra entre el 80 % y el 120 %, el método es exacto para el porcentaje de PRP despolimerizado.

### 3.2.2.4 Precisión

#### 3.2.2.4.1 Precisión en el nivel de rutina

El diseño experimental fue el siguiente:

- Se llevaron a cabo 3 series en condiciones de precisión intermedia: los ensayos se llevaron a cabo de manera independiente utilizando el mismo método, en una muestra primaria homogénea, en el mismo laboratorio, por 2 operadores y en días diferentes.
- En cada serie se realizaron 6 ensayos en condiciones que garantizaban la repetibilidad: los ensayos se llevaron a cabo de manera independiente, utilizando el mismo método, en una muestra primaria homogénea, en el mismo laboratorio, con el mismo equipo, por el mismo operador y el mismo día.

#### 3.2.2.4.1.1 Resultados analíticos

##### 3.2.2.4.1.1.1 Determinación del PRP no adsorbido total en el nivel de rutina

El dato sometido a análisis es la concentración de PRP no adsorbido total, expresada en µg/mL.





**Tabla 26: Precisión: concentraciones de PRP no adsorbido total (µg/mL) en el nivel de rutina**

Serie 1	Serie 2	Serie 3	Serie 4
25,8345	25,1158	21,3172	23,5071
26,0996	24,9353	22,1945	23,1480
26,0003	24,6047	22,3159	23,4009
26,2572	25,4588	21,6732	23,6963
27,4577	24,3968	22,2891	23,1888
26,0020	25,5187	21,6797	23,6222
Media = 26,2752	Media = 25,0050	Media = 21,9116	Media = 23,4272

**Nota:** Para el PRP no adsorbido total, los cálculos de las características de repetibilidad y precisión intermedia se realizan con cuatro series.

**3.2.2.4.1.1.2 Determinación del porcentaje de PRP despolimerizado en el nivel de rutina**

El dato sometido a análisis es el porcentaje de PRP despolimerizado, expresado en µg/mL y en %.

**Tabla 27: Precisión: PRP despolimerizado (µg/mL) en el nivel de rutina**

Serie 1	Serie 2	Serie 4
4,8649	4,6920	4,3869
4,9805	4,1763	4,3236
4,4086	4,2582	4,2611
4,6150	4,2373	4,2758
4,4938	4,4899	4,1929
4,4496	4,8499	4,2231

**Nota:** Para el porcentaje de PRP despolimerizado, la serie 3 ha sido invalidada y no se comenta. Por consiguiente, los cálculos de las características de repetibilidad y precisión intermedia para el porcentaje de PRP despolimerizado en el nivel de rutina se realizan con 3 series como se indica en la tabla anterior.

El porcentaje de PRP despolimerizado se calcula mediante la fórmula:

$$\frac{\text{Concentration of depolymerized PRP in } \mu\text{g / mL}}{\text{Average concentration of total non adsorbed PRP in the neat vaccine of serie}} \times 100$$

**Ejemplos:**

- Para el primer ensayo de la serie 1:

$$\text{Porcentaje de PRP despolimerizado} = \frac{4.8649}{26.2752} \times 100 = 18,52\%$$





Así pues, los porcentajes de PRP despolimerizado obtenidos son:

**Tabla 28: Precisión: porcentaje de PRP despolimerizado (%) en el nivel de rutina**

Serie 1	Serie 2	Serie 4
18,52	18,76	18,73
18,96	16,70	18,46
16,78	17,03	18,19
17,56	16,95	18,25
17,10	17,96	17,90
16,93	19,40	18,03

**Nota:** Para el porcentaje de PRP despolimerizado, la serie 3 ha sido invalidada y no se comenta. Por consiguiente, los cálculos de las características de repetibilidad y precisión intermedia para el porcentaje de PRP despolimerizado en el nivel de rutina se realizan con 3 series como se indica en la tabla anterior.

**3.2.2.4.1.2 Análisis**

La precisión del método se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la Tabla 26 y la Tabla 28:

- La homogeneidad de las varianzas intragrupos se verifica mediante la prueba de Cochran;
- Al adquirir la homogeneidad, se calculan los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia.

**3.2.2.4.1.2.1 Determinación del PRP no adsorbido total en el nivel de rutina**

La prueba de Cochran muestra que las varianzas de las 4 series son homogéneas.

**Tabla 29: Precisión: características de repetibilidad y precisión intermedia - PRP no adsorbido total en el nivel de rutina (µg/mL)**

Características	Media general	Desviación estándar relativa	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95 %
Características de repetibilidad	24,2 µg/mL.	1,8%	0,4412	± 0,9 µg/mL.
Características de precisión intermedia		8,0%	1,9380	con k = 1 y n = 1 ± 4,0 µg/mL
				con k = 2 y n = 1 ± 2,8 µg/mL

Puesto que el intervalo de confianza del 95% de la repetibilidad es inferior a ± 2,4 µg/mL y el intervalo de confianza del 95% de la precisión intermedia para 2 series con 1 medición que se realiza de manera habitual es inferior o igual a ± 3,6 µg/mL, el método es preciso para el PRP no adsorbido total en el nivel de rutina para 2 series con 1 medición que se realiza de manera habitual.

