

Antes del 1 de septiembre de 2010, las muestras de Hexaxim se analizaban con $k = 1$ y $n = 1$.
Desde el 1 de septiembre de 2010, las muestras de Hexaxim se analizan con $k = 2$ y $n = 1$.

3.2.2.4.1.2.2 Determinación del porcentaje de PRP despolimerizado en el nivel de rutina

La prueba de Cochran muestra que las varianzas de las 3 series son homogéneas.

Tabla 30: Precisión: características de repetibilidad y precisión intermedia - Porcentaje de PRP despolimerizado en el nivel de rutina (%)

Características	Media general	Desviación estándar relativa	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95 %
Características de repetibilidad	17,9%	4,7%	0,84	$\geq 1,8\%$
Características de precisión intermedia		4,7%	0,84	con $k = 1$ y $n = 1$ $\pm 1,8\%$
				con $k = 2$ y $n = 1$ $\pm 1,2\%$

Puesto que el intervalo de confianza del 95% de la repetibilidad es inferior a $\pm 5,3\%$ y el intervalo de confianza del 95% de la precisión intermedia para 1 serie con 1 medición que se realiza de manera habitual es inferior o igual a $\pm 7\%$, el método es preciso para el PRP despolimerizado en el nivel de rutina para 1 serie con 1 medición. Asimismo, el método es preciso para el PRP despolimerizado en el nivel de rutina para 2 series con 1 medición.

Por consiguiente, para garantizar la homogeneidad con el PRP no adsorbido total, en el nivel de rutina se realizarán para el PRP despolimerizado 2 series con 1 medición realizada de la manera habitual

3.2.2.4.2 Precisión en el nivel +3

Para información, para el PRP despolimerizado se evaluó la precisión en el nivel +3.

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.

3.2.2.4.2.1 Resultados analíticos

3.2.2.4.2.1.1 Determinación del porcentaje de PRP despolimerizado en el nivel +3

El dato sometido a análisis es el porcentaje de PRP despolimerizado, expresado en $\mu\text{g/mL}$ y en %.





Tabla 31: Precisión: porcentaje de PRP despolimerizado (µg/mL) en el nivel +3

Serie 1	Serie 2	Serie 4
16,6050	14,9459	14,5253
18,7424	15,1856	15,7278
17,6033	16,3357	14,9350
17,6776	15,1029	15,3792
17,2840	14,6334	15,8790
17,1713	15,7328	15,8020

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 +3 se realizan con 3 series como se indica en la tabla anterior.

El porcentaje de PRP despolimerizado se calcula con la misma fórmula, con la concentración media por serie.

Ejemplos:

- Para el primer ensayo de la serie 1:

$$\text{Porcentaje de PRP despolimerizado} = \frac{16.6050}{26.2752} \times 100 = 63,20\%$$

Así pues, los porcentajes de PRP despolimerizado obtenidos son:

Tabla 32: Precisión: porcentaje de PRP despolimerizado (%) en el nivel +3

Serie 1	Serie 2	Serie 4
63,20	59,77	62,00
71,33	60,73	67,13
67,00	65,33	63,75
67,28	60,40	65,65
65,78	58,52	67,78
65,35	62,92	67,45

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 +3 se realizan con 3 series como se indica en la tabla anterior.

3.2.2.4.2.2 Análisis

La precisión del método se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la Tabla 33:

- 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.



La prueba de Cochran muestra que las varianzas de las 3 series son homogéneas.

Tabla 33: Precisión: características de repetibilidad y precisión intermedia - Porcentaje de PRP despolimerizado en el nivel +3 (%)

Características	Media general	Desviación estándar relativa	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95 %
Características de repetibilidad	64,5%	3,9%	2,50	≥ 5,3%
Características de precisión intermedia		5,7%	3,65	con k = 1 y n = 1 ± 7,7%
				con k = 2 y n = 1 ± 5,5%

3.2.2.5 Límite de cuantificación

Se ha realizado el siguiente diseño en un nivel (nivel -2): en el porcentaje teórico de 5% para determinar el límite de cuantificación.

- 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 3 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.

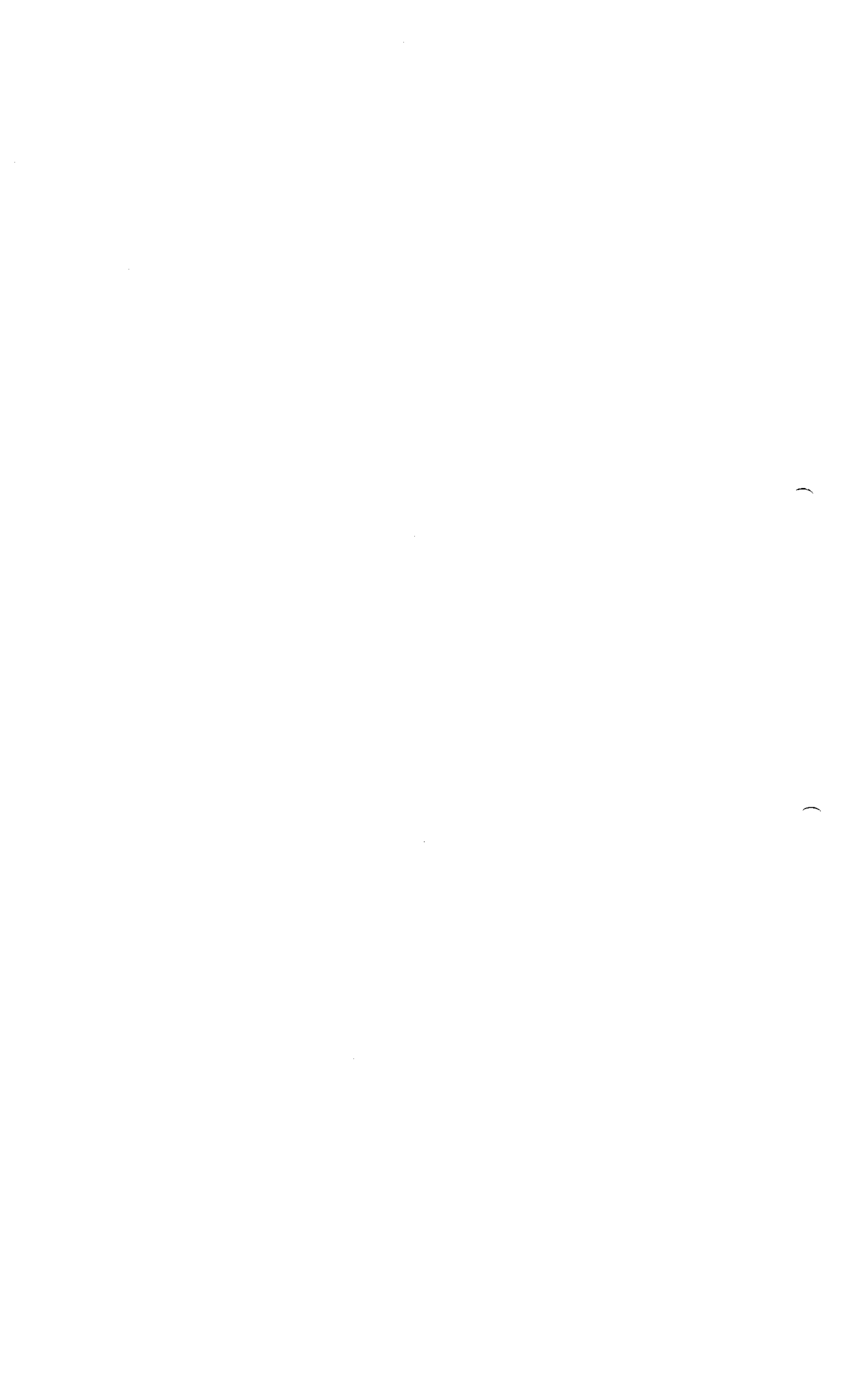
3.2.2.5.1 Resultados analíticos

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

Tabla 34: Precisión: porcentaje de PRP despolimerizado (µg/mL) en el nivel 2

Serie 1	Serie 2	Serie 3
1,7861	1,8898	1,4958
1,7927	1,6765	1,4779
1,8571	1,7002	1,5815
1,7810	1,7732	1,5381
2,2288	1,6691	1,5062
2,1413	1,6655	1,5913

El porcentaje de PRP despolimerizado se calcula con la misma fórmula, con la concentración promedio por serie.





Ejemplos:

- Para el primer ensayo de la serie 1:

$$\text{Porcentaje de PRP despolimerizado} = \frac{1.7861}{26.2752} \times 100 = 6,80\%$$

Así pues, los porcentajes de PRP despolimerizado obtenidos son:

Tabla 35: Precisión: porcentaje de PRP despolimerizado (%) en el nivel -2

Serie 1	Serie 2	Serie 3
6,80	7,56	6,83
6,82	6,70	6,74
7,07	6,80	7,22
6,78	7,09	7,02
8,48	6,68	6,87
8,15	6,66	7,26

3.2.2.5.2 Análisis

El objetivo de este estudio es demostrar la exactitud y la precisión en el nivel del límite de cuantificación.

La precisión del límite de cuantificación en este nivel se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la Tabla 34:

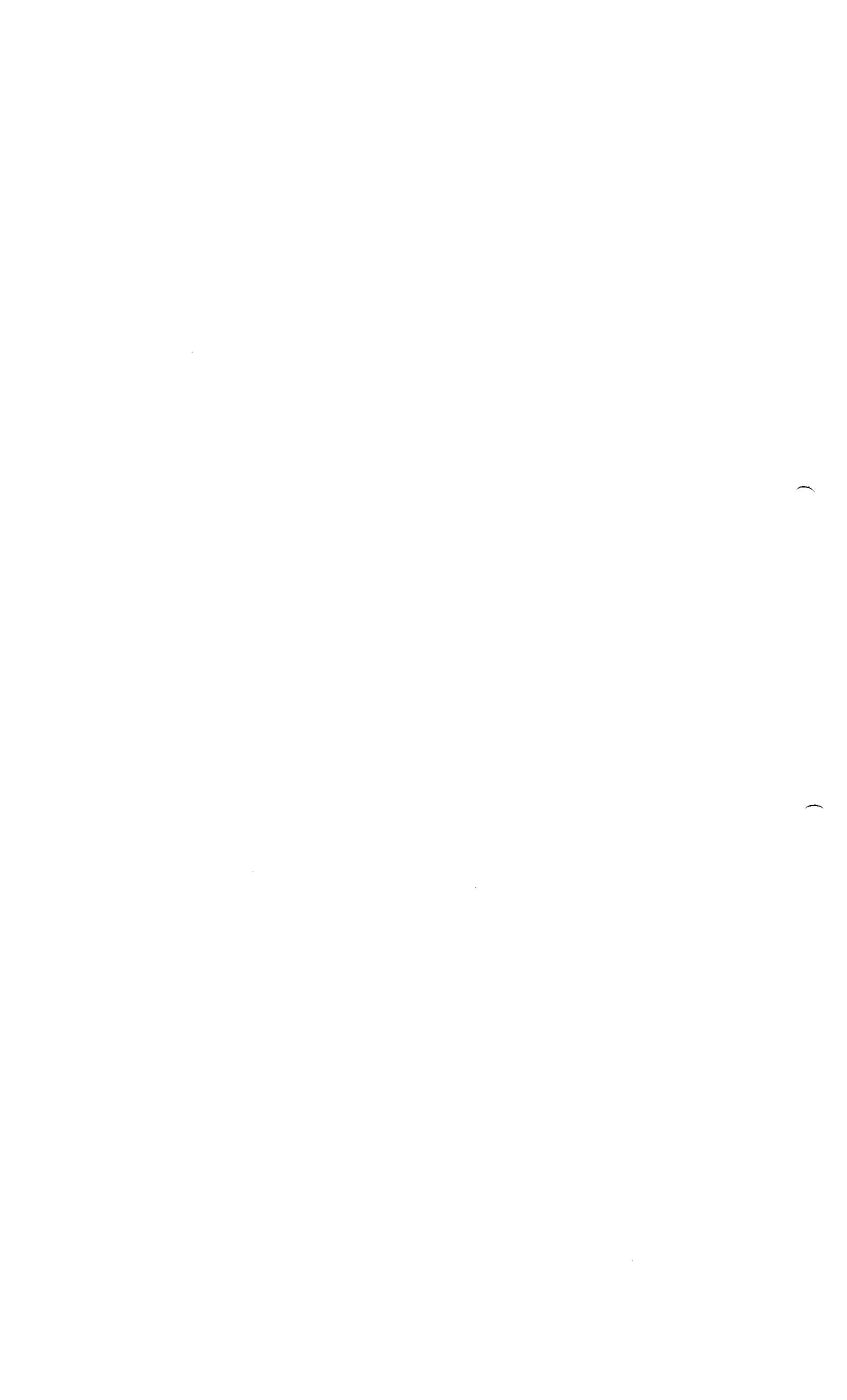
- La homogeneidad de las varianzas intragrupos se verifica mediante la prueba de Cochran;
- Al adquirir la homogeneidad, se calculan los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia.

La exactitud se ha demostrado en el apartado relativo a la exactitud: $\bar{R} = 118\%$

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

Tabla 36: Límite de cuantificación de la matriz para el PRP despolimerizado: características de repetibilidad y precisión intermedia (%)

Características	Media general	Desviación estándar relativa	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95 %
Características de repetibilidad	7,1%	7,1%	0,50	≥ 1,1%
Características de precisión intermedia		7,2%	0,51	con k = 1 y n = 1 ± 1,1%
				con k = 2 y n = 1 ± 0,8%





Puesto que el intervalo de confianza del 95% de la repetibilidad es inferior a $\pm 1,5\%$ y el intervalo de confianza del 95% de la precisión intermedia para 1 serie con 1 medición que se realiza de manera habitual es inferior o igual a $\pm 2\%$, el método es preciso para el PRP despolimerizado en el límite de cuantificación de 7,1% para 1 serie con 1 medición. Asimismo, el método es preciso para el PRP despolimerizado en el límite de cuantificación de 7,1% para 2 series con 1 medición.

Por consiguiente, para garantizar la homogeneidad con el PRP no adsorbido total, en el nivel de rutina se realizarán para el PRP despolimerizado 2 series con 1 medición realizada de la manera habitual

En el nivel de porcentaje 7,1%, el método es preciso y exacto.

3.2.3 Conclusión

3.2.3.1 Determinación del PRP no adsorbido total

Se cumplen todos los criterios de aceptación:

El método es específico.

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

En función del nivel de concentración, el porcentaje de recuperación promedio se sitúa entre 101% y 105%.

El método es preciso en el nivel de rutina:

- El intervalo de confianza de la repetibilidad es de $\pm 0,9 \mu\text{g/mL}$ y el intervalo de confianza de la precisión intermedia es de $\pm 2,8 \mu\text{g/mL}$ para 2 series con 1 medición;
- La media general es de 24,2 $\mu\text{g/mL}$.

3.2.3.2 Determinación del porcentaje de PRP despolimerizado

Se cumplen todos los criterios de aceptación:

El método es específico.

El método es lineal en el rango: [7,1-71,2] %.

En función del nivel de concentración, el porcentaje de recuperación promedio se sitúa entre el 96% y el 118%.

El método es preciso en el nivel de rutina:

- El intervalo de confianza de la repetibilidad es de $\pm 1,8\%$ y el intervalo de confianza de la precisión intermedia es de $\pm 1,2\%$ para 2 series con 1 medición;
- La media general es de 17,9 %.

El límite de cuantificación se establece a esta concentración, es decir, en $LC = 7,1\%$.

- Exacto, con un porcentaje de recuperación igual a $\bar{R} = 118\%$;





- Preciso con un intervalo de confianza de la repetibilidad de $\pm 1,1\%$ y un intervalo de confianza de la precisión intermedia de $\pm 0,8\%$ para 2 series con 1 medición.

Como conclusión, el método es específico, lineal, exacto y preciso para 2 series con 1 medición que se realiza de manera habitual y el límite de cuantificación de 7,1% de PRP despolimerizado es exacto y preciso.

El método con HPAEC-PAD es válido para determinar el PRP no adsorbido total y el porcentaje de PRP despolimerizado en la etapa de producto final a granel.

La validación en la etapa de producto final a granel cubre la etapa de producto llenado.

3.3 Porcentaje de adsorción del toxoide diftérico (Electroforesis en cohete)

3.3.1 Panorama

Este estudio describe la validación de la cuantificación del toxoide diftérico purificado no adsorbido mediante el método de inmunoelectroforesis en la vacuna Hexaxim, en la etapa de producto final a granel, de conformidad con la guía de la ICH.

El método de inmunoelectroforesis permite determinar la concentración de toxoide diftérico purificado no adsorbido en las vacunas. La concentración de antígenos de la muestra se determina mediante electroforesis en un gel de agarosa que contiene anticuerpos específicos para antígenos. El inmunoprecipitado con forma de cohete se revela mediante coloración con azul de Coomassie. La altura del cohete expresada como valor \log_{10} guarda una correlación lineal con la cantidad de toxoide diftérico presente en la muestra.

Dado que el método es un ensayo cuantitativo, las características estudiadas son la especificidad, la linealidad, la exactitud y la precisión.

No se establece el límite de cuantificación ya que los valores de porcentaje de adsorción que se obtienen normalmente se encuentran en el dominio de la curva de referencia.

Los resultados de la validación se resumen en la Tabla 37 y la Tabla 38:

Tabla 37: Resultados de la validación: especificidad y linealidad

Características	Criterios de aceptación	Resultados
Especificidad	Formulación sin toxoide diftérico purificado: ausencia de respuesta significativa. Vacuna Hexaxim ajustada con 5% de matriz de sobrenadantes: la recuperación promedio entre la cantidad medida y la media de los resultados de precisión debe hallarse entre el 80 % y el 120 %.	Formulación sin toxoide diftérico purificado: ausencia de respuesta significativa. Hexaxim ajustada con 5% de matriz de sobrenadantes: la recuperación promedio entre la cantidad medida y la media de los resultados de precisión es igual a 100%.
Linealidad	$P_{\text{linealidad}} \leq 0,01$ $P_{\text{Falta de ajuste}} > 0,05$ (de lo contrario, la curvatura debe ser insignificante)	$P_{\text{linealidad}} < 0,0001$ $P_{\text{Falta de ajuste}} = 0,95$ $Y = 0,005 + 0,994 \cdot X$ Donde X = concentración teórica de toxoide diftérico

002566
FOJO
MESA DE ENDE

Características	Criterios de aceptación	Resultados
		purificado (log Lf/mL) e Y = concentración medida de toxoide diftérico purificado (log Lf/mL). R ² = 0,9901 Rango de linealidad: [5,9-75,4] Lf/mL





Tabla 38: Resultados de la validación: exactitud y precisión

Características	Criterios de aceptación	Resultados
Exactitud	El porcentaje de recuperación promedio calculado para los 5 niveles de concentración teórica debe hallarse entre el 80% y el 120%.	El porcentaje de recuperación promedio y sus límites de confianza del 95 % son los siguientes: 99% [95-104]%
Precisión (Lf/mL)	El intervalo de confianza del 95 % de la repetibilidad debe ser menor o igual que $x \pm 1,4$ El intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia debe ser menor o igual que $x \pm 1,4$	Media general: $\bar{m} = 1,40$, que equivale a 25,1 Lf/mL en forma aritmética. La desviación estándar relativa de la repetibilidad y de la precisión intermedia es respectivamente: 3,3% y 3,8% . Intervalo de confianza del 95% de la repetibilidad para 1 medición : $\pm 0,031$, que equivale a $x \pm 1,07$ en forma aritmética Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 serie con 1 medición : $\pm 0,035$ que equivale a $x \pm 1,08$ en forma aritmética
Precisión (% de adsorción)	Para información	Media general: $\bar{m} = 58,1\%$ La desviación estándar relativa de la repetibilidad y de la precisión intermedia es respectivamente: 2,4% y 2,8% Intervalo de confianza del 95% de la repetibilidad para 1 medición : $\pm 3,0\%$ Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 serie con 1 medición : $\pm 3,4\%$

El método es específico, lineal y exacto en el rango [5,9-75,4] Lf/mL, y preciso.

3.3.2 Resultados

3.3.2.1 Especificidad

El diseño experimental fue el siguiente: se realizó 1 ensayo (lote n° IND09014 de producto final a granel de Hexaxim, lote n° FA293607 de sobrenadante y lote n° BBO09-080 de matriz sin toxoide diftérico purificado).

Los lotes utilizados para el estudio son representativos de la producción.

La especificidad consiste en los pasos siguientes:

- Para una formulación sin toxoide diftérico purificado (matriz), debe demostrarse la ausencia de respuesta significativa;
- Para la muestra compuesta de una vacuna Hexaxim ajustada con sobrenadante de la matriz sin toxoide diftérico purificado (el volumen de la matriz de sobrenadante añadido se corresponde con un 5% (v/v) de la vacuna Hexaxim), la recuperación promedio entre la cantidad medida y la media de los resultados de precisión debe hallarse entre el 80% y el 120%.





3.3.2.1.1 Resultados analíticos

Los resultados se presentan en la Tabla 39.

Tabla 39: Especificidad: resultados

Matriz sin toxoide diftérico purificado (altura del cohete)	Lote de Hexaxim +5% de sobrenadante (Lf/mL)
0	24,98

3.3.2.1.2 Análisis

- Para la formulación sin toxoide diftérico purificado: ausencia de respuesta significativa.
- Para la vacuna Hexaxim ajustada con sobrenadantes de la matriz: la recuperación promedio entre la cantidad medida (24,98 Lf/mL) y la media de los resultados de precisión (25,10 Lf/mL - Vea el apartado 3.3.2.4) es igual a 100%.

No hay interferencia de la matriz, por lo que el método es específico.

3.3.2.2 Linealidad

El diseño experimental fue el siguiente: 2 operadores realizaron 3 series separadas, en días diferentes. Cada serie incluía el ensayo de 5 concentraciones de toxoide diftérico purificado en la vacuna Hexaxim (5 agregados de toxoide diftérico purificado - lote n° FA293607 en sobrenadantes de la matriz sin toxoide diftérico purificado - lote n° BBO09-080)

Los lotes utilizados para el estudio son representativos de la producción.

3.3.2.2.1 Resultados analíticos

El dato sometido a análisis es la concentración de toxoide diftérico purificado en el sobrenadante de la vacuna, expresada en Lf/mL.

En la Tabla 40 se resumen los resultados del estudio.

Tabla 40: Linealidad: concentraciones medidas frente a concentraciones teóricas (Lf/mL)

Nivel	Concentración teórica (Lf/mL)	Concentración medida (Lf/mL)		
		Serie 1	Serie 2	Serie 3
+5	60,00	60,36	62,71	55,87
+4	45,00	44,98	45,61	40,85
+3	30,00	31,65	31,06	28,26
+3	15,00	17,10	14,61	12,70
+1	7,50	8,27	7,49	6,92





3.3.2.2.2 Análisis

La linealidad en el rango seleccionado se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la Tabla 40:

- La homogeneidad de las varianzas vinculadas se verifica mediante la prueba de Cochran;
- La dependencia entre la concentración teórica del toxoide diftérico purificado y la concentración medida del toxoide diftérico purificado, y la linealidad de esta relación se prueban 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.

La prueba de Cochran muestra que las varianzas de las 3 series son homogéneas.

Existe una dependencia lineal entre la concentración teórica y la concentración medida.

Tabla 41: Linealidad - Ecuación de la recta de regresión

Ecuación de la recta de regresión	Coefficiente de determinación	Rango de linealidad en Lf/mL
$Y = (0,005 \pm 0,085) + (0,994 \pm 0,060) \cdot X$	$r^2 = 0,9901$	[5,88-75,40]
donde: X = concentración teórica de toxoide diftérico purificado no adsorbido (log(Lf/mL)) Y = concentración medida de toxoide diftérico purificado no adsorbido (log(Lf/mL))		

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

$P_{\text{Falta de ajuste}} = 0,95$

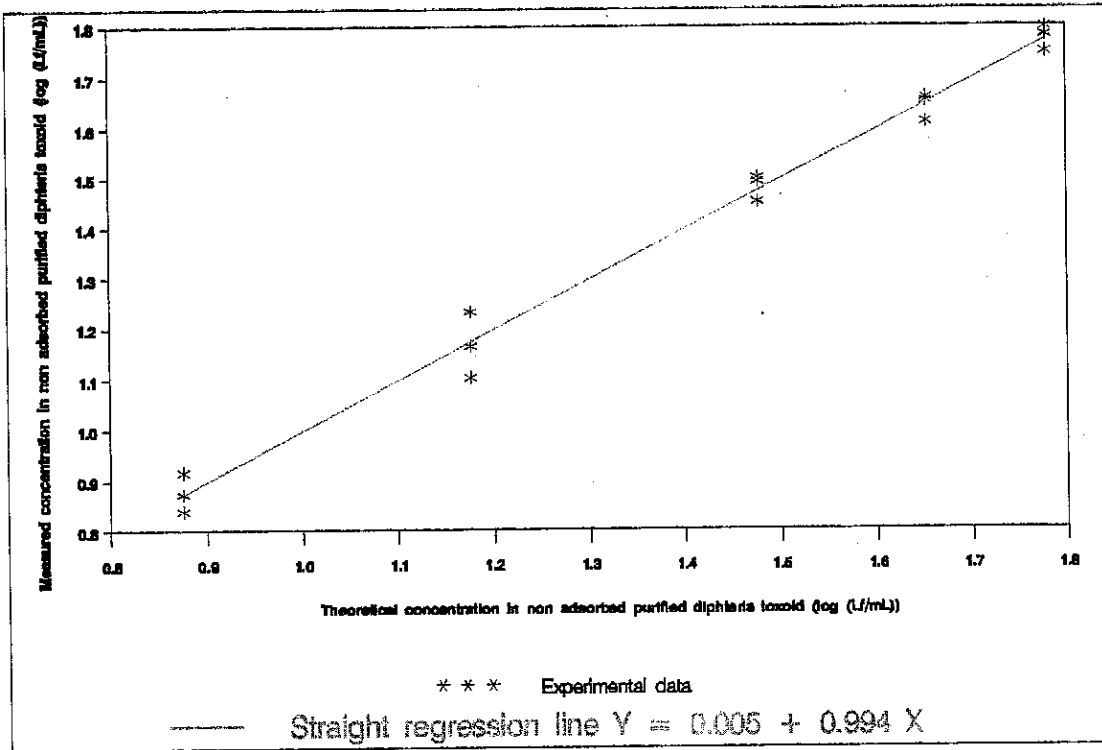
El método es lineal en el rango [5,88-75,40] Lf/mL.

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





Figura 4: Gráfico de linealidad



3.3.2.3 Exactitud

El diseño experimental fue el siguiente: 2 operadores realizaron 3 series separadas, en días diferentes.

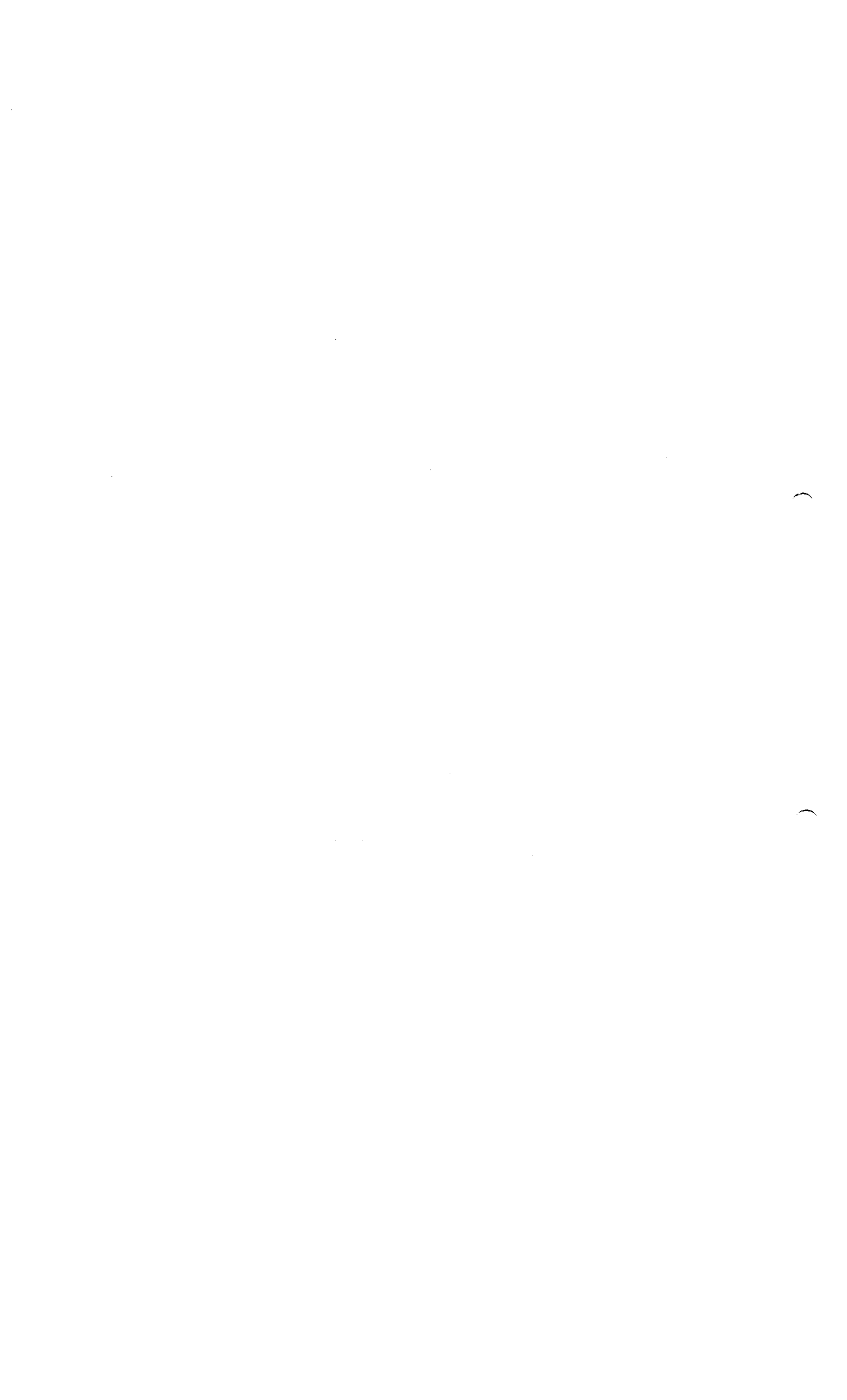
Cada serie incluía el ensayo de 5 concentraciones de toxoide diftérico purificado en la vacuna Hexaxim (5 agregados de toxoide diftérico purificado - lote nº FA293607 en sobrenadantes de la matriz sin toxoide diftérico purificado - lote nº BBO09-080)

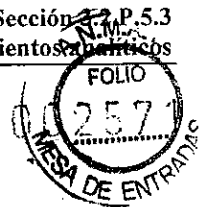
Los lotes utilizados para el estudio son representativos de la producción.

3.3.2.3.1 Resultados analíticos

El dato sometido a análisis es la concentración de toxoide diftérico purificado en la vacuna Hexaxim, expresada en Lf/mL.

En la Tabla 40 del apartado 3.3.2.2.1, se resumen los resultados del estudio.





3.3.2.3.2 Análisis

La exactitud se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la Tabla 40.

- 1) Los porcentajes de recuperación se calculan para cada nivel de concentración teórica prevista y para cada grupo (media de las series);
- 2) La homogeneidad de las varianzas intraniveles se verifica mediante la prueba de Cochran;
- 3) La no significancia de las diferencias entre los niveles de concentración teórica prevista se demuestra mediante un análisis de varianza si la prueba de Cochran no es significativa o mediante el análisis de varianza Anova con ponderación de Welch si la prueba de Cochran es significativa;
- 4) Cuando se comprueba la igualdad de las medias interniveles, se calcula el porcentaje de recuperación promedio con unos límites de confianza del 95 %.

La prueba de Cochran demuestra que las varianzas de los niveles de concentración teórica son homogéneas.

El análisis de varianza permite concluir la igualdad de las medias interniveles.

La recuperación promedio y sus límites de confianza del 95 % son los siguientes:

Tabla 42: Exactitud: porcentaje de recuperación promedio global y límite de confianza del 95 %

Porcentaje de recuperación	Límites de confianza del 95 %
99%	[95-104]%

Puesto que el porcentaje de recuperación promedio global se encuentra entre el 80% y el 120%, el método es exacto.

3.3.2.4 Precisión

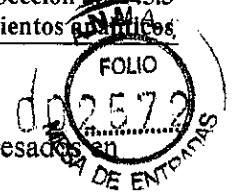
El diseño experimental fue el siguiente:

- 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 3 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.

La precisión se estudia con el lote n° IND09014 de producto final a granel de Hexaxim, representativo de la producción.

La precisión se estudia en los resultados expresados en Lf/mL (expresado en concentración de toxoide diftérico purificado no adsorbido).





Para información, el estudio de la precisión también se realiza en los resultados expresados en porcentaje de adsorción.

El resultado en porcentaje se obtiene mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Resultado (\%)} = 100 - \frac{\text{measured_Diphtheria_concentration_in_supernatant (Lf/mL)}}{\text{theoretical_Diphtheria_concentration_in_vaccine}} \times 100$$

donde: concentración teórica de toxoide diftérico en la vacuna = 30 Lf/dosis, es decir 60 Lf/mL.

Los resultados se resumen en la Tabla 43.

Tabla 43: Precisión: concentración de toxoide diftérico purificado no adsorbido (Lf/mL) y porcentaje de adsorción

Serie 1		Serie 2		Serie 3	
Lf/mL	%	Lf/mL	%	Lf/mL	%
26,76	55,4	24,97	58,4	25,36	57,7
25,76	57,1	26,78	55,4	INV*	INV*
25,49	57,5	25,40	57,7	24,68	58,9
24,10	59,8	25,50	57,5	24,22	59,6
25,76	57,1	25,73	57,1	23,58	60,7
24,67	58,9	24,30	59,5	23,99	60,0

* INV: valor no válido

3.3.2.4.1 Precisión en los resultados expresados en Lf/mL

La precisión del método se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la Tabla 43:

- 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.

Media general = 1,400, lo que equivale a 25,10 Lf/mL en forma aritmética

La prueba de Cochran muestra que las varianzas de las 3 series son homogéneas.

Tabla 44: Precisión: características de repetibilidad y precisión intermedia

Características	Desviación estándar relativa	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95 %
Características de repetibilidad (n=1)	3,28%	0,014	± 0,031; que equivale a x/± 1,07 Lf/mL en forma aritmética





Características	Desviación estándar relativa	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95 %
Características de precisión intermedia (k=1 y n=1)	3,82%	0,017	± 0,035; que equivale a x/± 1,08 Lf/mL en forma aritmética

Los intervalos de confianza del 95 % de la repetibilidad y precisión intermedia son inferiores o iguales que x/± 1,4. Por lo tanto, el método es preciso.

3.3.2.4.2 Precisión en los resultados expresados en porcentaje de adsorción

La precisión del método se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la Tabla 43:

- 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.

Media general = 58,1%.

La prueba de Cochran muestra que las varianzas de las 3 series son homogéneas.

Tabla 45: Precisión: características de repetibilidad y precisión intermedia

Características	Desviación estándar relativa	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95 %
Características de repetibilidad (n=1)	2,38%	1,381	± 2,961%
Características de precisión intermedia (k=1 y n=1)	2,75%	1,600	± 3,393%

3.3.3 Conclusión

El método es específico.

El método es lineal en el rango [5,9-75,4] Lf/mL.

Se demuestra la exactitud en el mismo rango, con una recuperación promedio del 99%.

El método es preciso dado que:

- El intervalo de confianza del 95% de la repetibilidad es x/± 1,07;
- El intervalo de confianza del 95% de la precisión intermedia es x/± 1,08.

Para los datos analizados expresados en porcentaje de adsorción, la desviación estándar relativa de la repetibilidad y precisión intermedia es respectivamente de 2,4% y 2,8%, y el intervalo de confianza de la precisión intermedia es de ± 3,4% para 1 serie con 1 medición que se realiza de manera habitual.

El método de inmunoelectroforesis es válido para cuantificar el toxoide diftérico purificado no adsorbido en la vacuna Hexaxim en las etapas de producto final a granel y producto llenado.



3.4 Porcentaje de adsorción de hepatitis B (ELISA) y potencia relativa *in vitro* (IVRP)

3.4.1 Panorama

De conformidad con la guía de la ICH y como parte de las BPM, este estudio describe la validación del contenido de antígeno de hepatitis B por el método ELISA en la formulación de la vacuna Hexaxim en la etapa de producto final a granel.

El antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) es capturado en primer lugar por un anticuerpo de ratón anti-hepatitis B que recubre los pocillos. Luego, el antígeno unido es reconocido por un segundo anticuerpo anti-hepatitis B que es detectado por un anticuerpo de ratón anti-inmunoglobulina conjugado con peroxidasa. Al agregar tetrametilbenzidina (TMB, sustrato de peroxidasa), se produce un color cuya intensidad es proporcional a la cantidad de antígeno capturada en el pocillo.

La potencia relativa *in vitro* (IVRP) de cada vacuna Hexaxim se obtiene mediante comparación con la referencia utilizando un análisis de líneas paralelas como exige la Farmacopea Europea. El contenido de HBsAg de cada muestra también se determina a partir de la IVRP y se expresa en µg/mL.

El contenido de HBsAg total se cuantifica tras el paso de desorción. El HBsAg no adsorbido se cuantifica en el sobrenadante obtenido tras la centrifugación de la vacuna.

El porcentaje de HBsAg adsorbido se obtiene de las concentraciones de HBsAg total y no adsorbido.

Dado que el método es un ensayo cuantitativo, las características estudiadas son la especificidad, la linealidad, la exactitud y la precisión.

Se documenta el límite de cuantificación para el porcentaje de adsorción.

También se documenta la precisión para el porcentaje de adsorción.

Los resultados de la validación se resumen en la Tabla 46, Tabla 47 y Tabla 48.

