



Tabla 47: Contenido de antígeno de hepatitis B mediante ELISA, resumen de los resultados de la validación: exactitud y precisión

Características	Criterios de aceptación	resultados
Exactitud	<p>El porcentaje de recuperación promedio calculado debe encontrarse entre:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 80% y 120% para los 4 niveles de concentración teórica prevista de HBsAg total - 70% y 130% para los 6 niveles de concentración teórica prevista de HBsAg no adsorbido 	<p>HBsAg total: El porcentaje de recuperación promedio global y sus límites de confianza del 95 % son los siguientes: 104% [98-111]%</p> <p>HBsAg no adsorbido: El porcentaje de recuperación promedio global y sus límites de confianza del 95 % son los siguientes: 95% [89-102]%</p>
Precisión	<p>El intervalo de confianza del 95% de la precisión intermedia para 1 serie con 1 medición no debe ser superior a $x/\pm 1,3$</p>	<p>HBsAg total: Media general: $\bar{m} = 1,405$, que equivale en forma aritmética a 25,4 $\mu\text{g/mL}$ Las desviaciones estándar relativas de la repetibilidad y de la precisión intermedia son respectivamente: 5,6% y 7,0%. Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 serie con 1 medición: $\pm 0,064$, que equivale a $x/\pm 1,16$ en forma aritmética</p> <p>IVRP (Potencia relativa <i>in vitro</i>): Media general: $\bar{m} = 0,104$ que equivale en forma aritmética a 1,27 Las desviaciones estándar relativas de la repetibilidad y de la precisión intermedia son respectivamente: 5,6% y 7,0% Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 serie con 1 medición: $\pm 0,064$, que equivale a $x/\pm 1,16$ en forma aritmética</p>



Tabla 48: Contenido de antígeno de hepatitis B mediante ELISA, resumen de los resultados de la validación: precisión y límite de cuantificación para HBsAg no adsorbido

Características	Criterios de aceptación	resultados
Precisión	El intervalo de confianza del 95% de la precisión intermedia para 1 serie con 1 medición no debe ser superior a $x/\pm 1,3$	<p>HBsAg no adsorbido:</p> <p>Media general: $\bar{m} = 0,469$ que equivale en forma aritmética a $2,9 \mu\text{g/mL}$</p> <p>Las desviaciones estándar relativas de la repetibilidad y de la precisión intermedia son respectivamente: $7,2\%$ y 10%</p> <p>Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 serie con 1 medición: $\pm 0,094$ que equivale a $x/\pm 1,24$ en forma aritmética</p>
	Para información	<p>Porcentaje de adsorción:</p> <p>Media general: $\bar{m} = 88,4\%$</p> <p>Las desviaciones estándar relativas de la repetibilidad y de la precisión intermedia son respectivamente: $0,87\%$ y $0,91\%$</p> <p>Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 serie con 1 medición: $\pm 1,7\%$</p>
Límite de cuantificación	El límite de cuantificación debe ser: - Exacto (la recuperación se debe encontrar entre el 70% y el 130%) - Preciso (el intervalo de confianza del 95% de la precisión intermedia para 1 serie con 1 medición no debe ser superior a $x/\pm 1,5$)	El límite de cuantificación es: $LC = 0,6 \mu\text{g/mL}$ Porcentaje de recuperación promedio en el límite de cuantificación: 101% Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 serie con 1 medición: $\pm 0,134$ que equivale a $x/\pm 1,36$ en forma aritmética

El método es específico, lineal, exacto y preciso y el límite de cuantificación del HBsAg no adsorbido de $0,6 \mu\text{g/mL}$ es exacto y preciso.

3.4.2 Resultados

3.4.2.1 Especificidad

La especificidad de los antígenos de HBsAg se estudia gracias al análisis de la matriz de Hexaxim (lote n° BBO09081) sin HBsAg.





3.4.2.1.1 Resultados analíticos

Los resultados se presentan en la Tabla 49 siguiente:

Tabla 49: Especificidad: resultados

Densidad óptica del primer punto de la curva de calibración	Densidad óptica de la matriz de Hexaxim
0,104	-0,017
0,118	-0,019

3.4.2.1.2 Análisis

Puesto que la densidad óptica de la matriz de Hexaxim es inferior a la del primer punto de referencia, no hay interferencia y, por consiguiente, el método es específico.

3.4.2.2 Linealidad

3.4.2.2.1 HBsAg total

El diseño experimental aplicado al lote nº FDV01416 fue: 2 operadores realizaron 3 series separadas en días diferentes. Cada serie incluía el ensayo de un rango de 5 concentraciones de HBsAg total (2 vacunas diluidas gracias a la matriz de Hexaxim del lote nº BBO09-081 sin HBsAg, 1 vacuna sin diluir y 2 vacunas con agregado gracias a la vacuna contra la hepatitis B en la etapa de granel purificado del lote AC011).

3.4.2.2.1.1 Resultados analíticos

El dato sometido a análisis es la concentración de HBsAg total, expresada en µg/mL.

En la Tabla 50, se resumen los resultados del estudio.

La concentración media de HBsAg total en la vacuna sin diluir es igual a 26,208 µg/mL (media geométrica de las 3 series). Por lo tanto, la concentración teórica prevista de HBsAg total de la muestra se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Theoretical expected concentration} = \frac{(\text{concentration of vaccine} \times \text{volume of vaccine}) + (\text{concentration of spike} \times \text{volume of spike})}{\text{volume of Hexaxim matrix} + \text{volume of vaccine} + \text{volume of spike}}$$

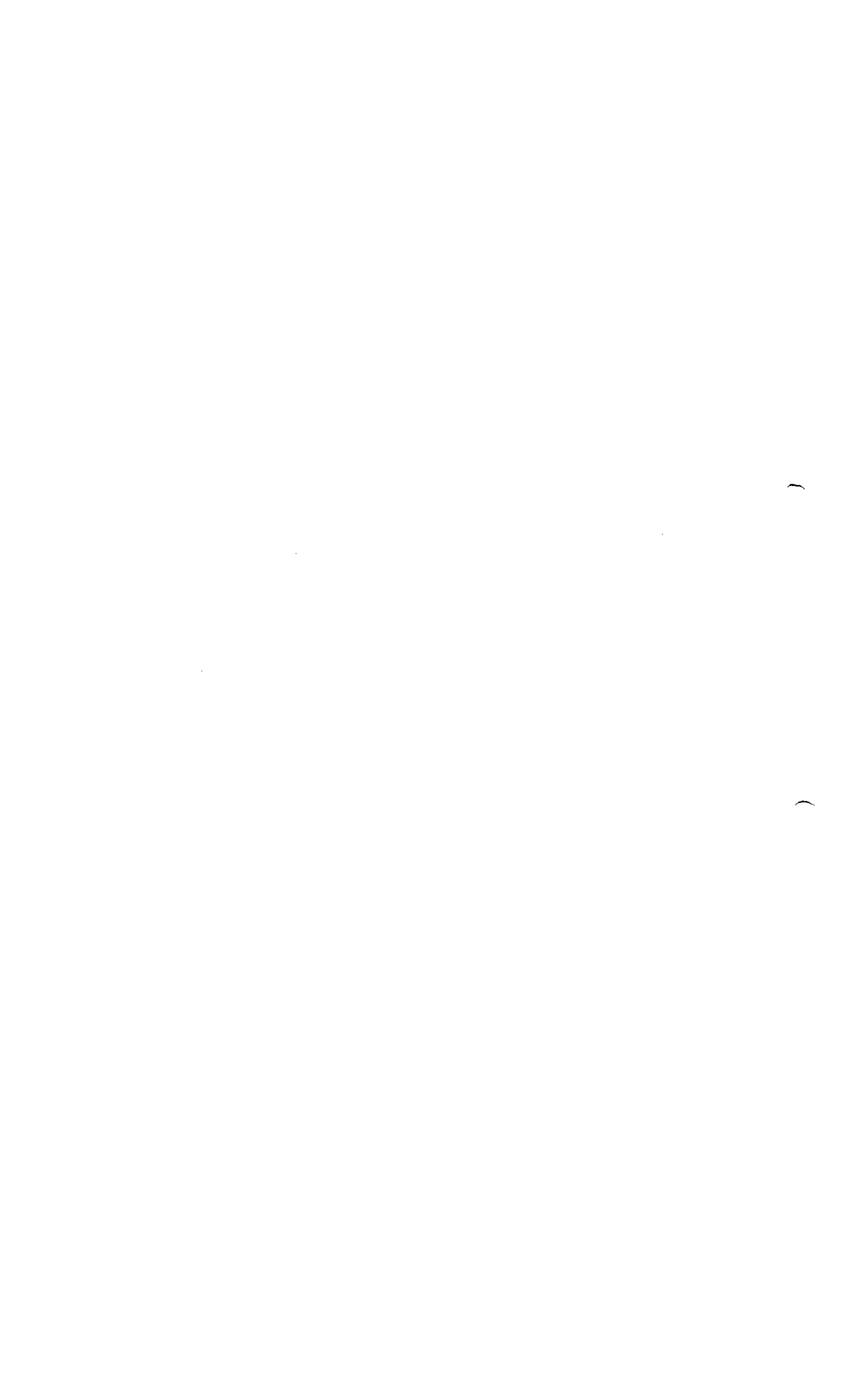
Donde:

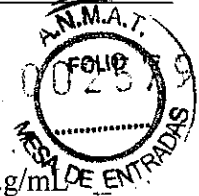
- Concentración del agregado de hepatitis B = 180,27 µg/mL (media geométrica de las 3 mediciones).

Ejemplos:

- En el nivel -2:

$$\text{Concentración teórica prevista} = \frac{(26.208 \times 100) + (180.27 \times 0)}{300 + 100 + 0} = 6,552 \mu\text{g/mL}$$





- En el nivel +2:

$$\text{Concentración teórica prevista} = \frac{(26.208 \times 900) + (180.27 \times 100)}{0 + 900 + 100} = 41,615 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 50.

Tabla 50: HBsAg total - Linealidad: concentraciones medidas frente a concentraciones teóricas previstas ($\mu\text{g/mL}$)

Nivel	Sobrenadante de la vacuna Hexaxim		Agregado de hepatitis B		Sobrenadante de la matriz Hexaxim	Concentración teórica prevista ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración medida ($\mu\text{g/mL}$)		
	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen (μL)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen (μL)	Volumen (μL)		Serie 1	Serie 2	Serie 3
-2	26,208	100	180,27*	0	300	6,552	5,531	6,790	6,384
-1		200		0	200	13,104	12,811	12,877	14,185
0		400		0	0	26,208	27,086	25,988	25,573
+1		900		50	0	34,317	38,724	35,396	34,269
+2		900		100	0	41,615	50,501	45,887	47,494

* Media geométrica de estas 3 mediciones: 180,31; 171,12; 189,88 $\mu\text{g/mL}$.

Nota: Todos los cálculos se realizan con logaritmos, dado que los datos siguen una distribución logarítmica normal.

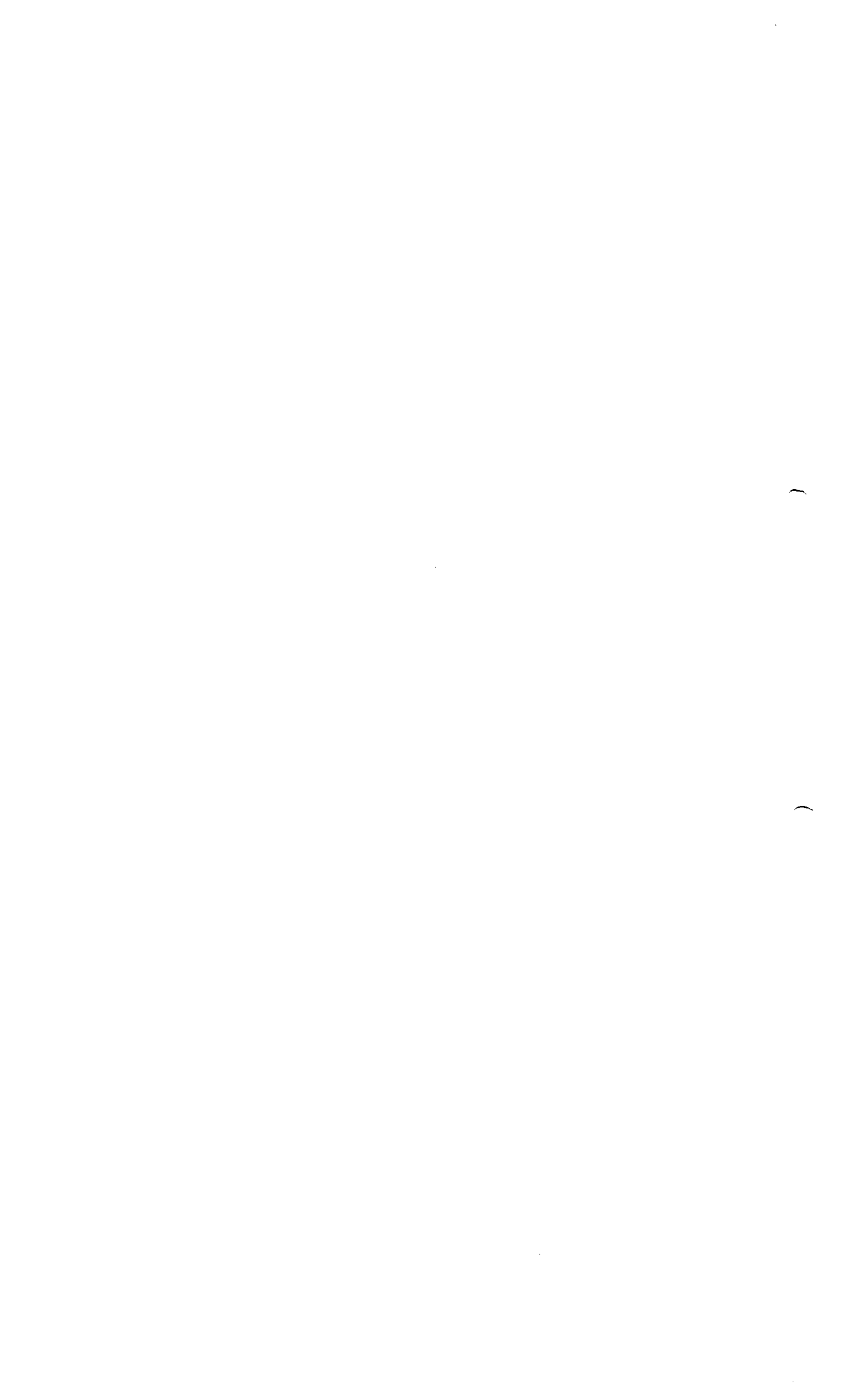
3.4.2.2.1.2 Análisis

La linealidad en el rango seleccionado se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la Tabla 50:

- La homogeneidad de las varianzas vinculadas se verifica mediante la prueba de Cochran;
- La dependencia entre la concentración teórica prevista de HBsAg total y la concentración medida de HBsAg total, 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.

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.



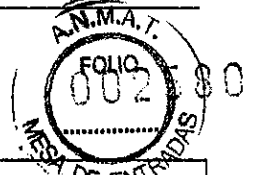


Tabla 51: HBsAg total - Linealidad: Ecuación de la recta de regresión

Ecuación de la recta de regresión	Coefficiente de determinación (R ²)	Rango de linealidad en µg/mL
$Y = (-0,090 \pm 0,075) + (1,079 \pm 0,057) \cdot X$	0,9924	[5,02-55,92]
donde: X= concentración teórica (log(µg/mL)) Y = concentración medida (log(µg/mL))		

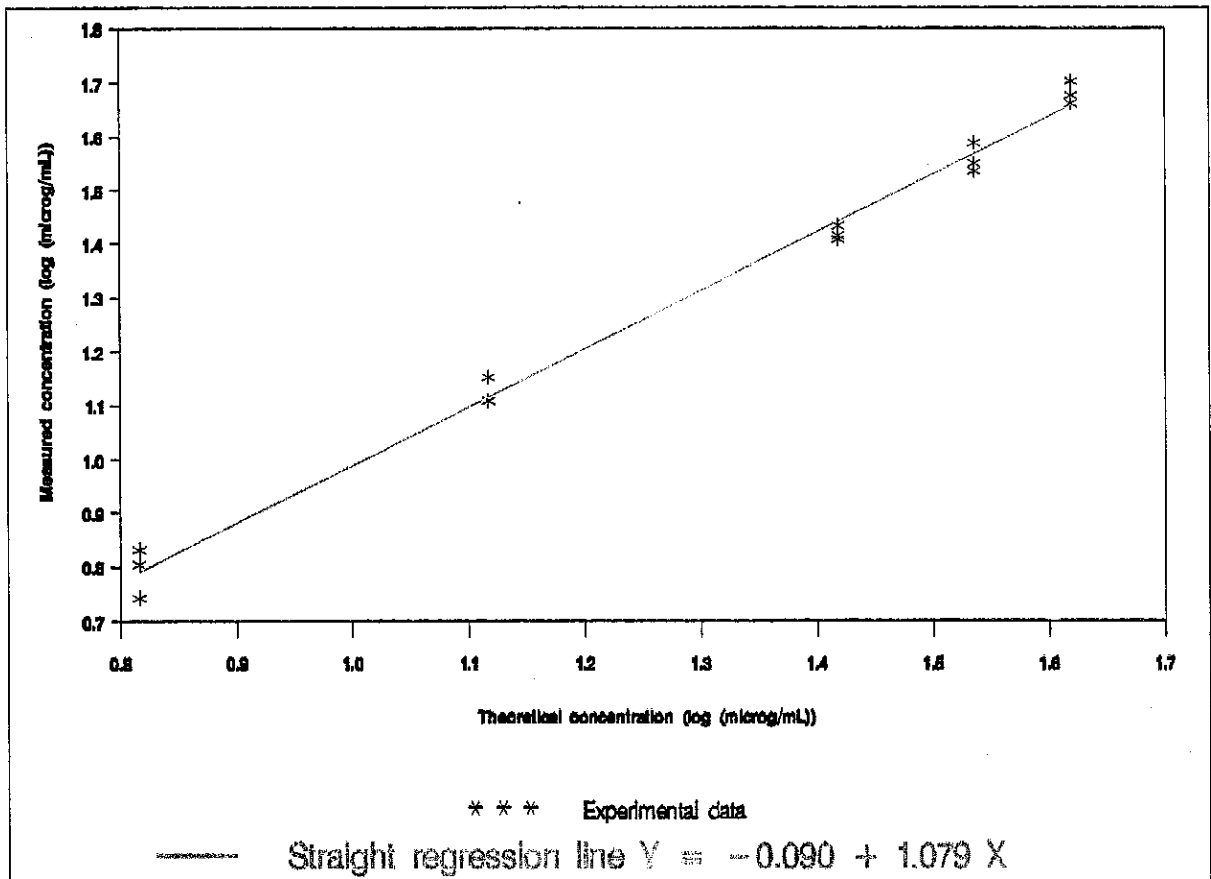
$P_{\text{linealidad}} < 0,0001$

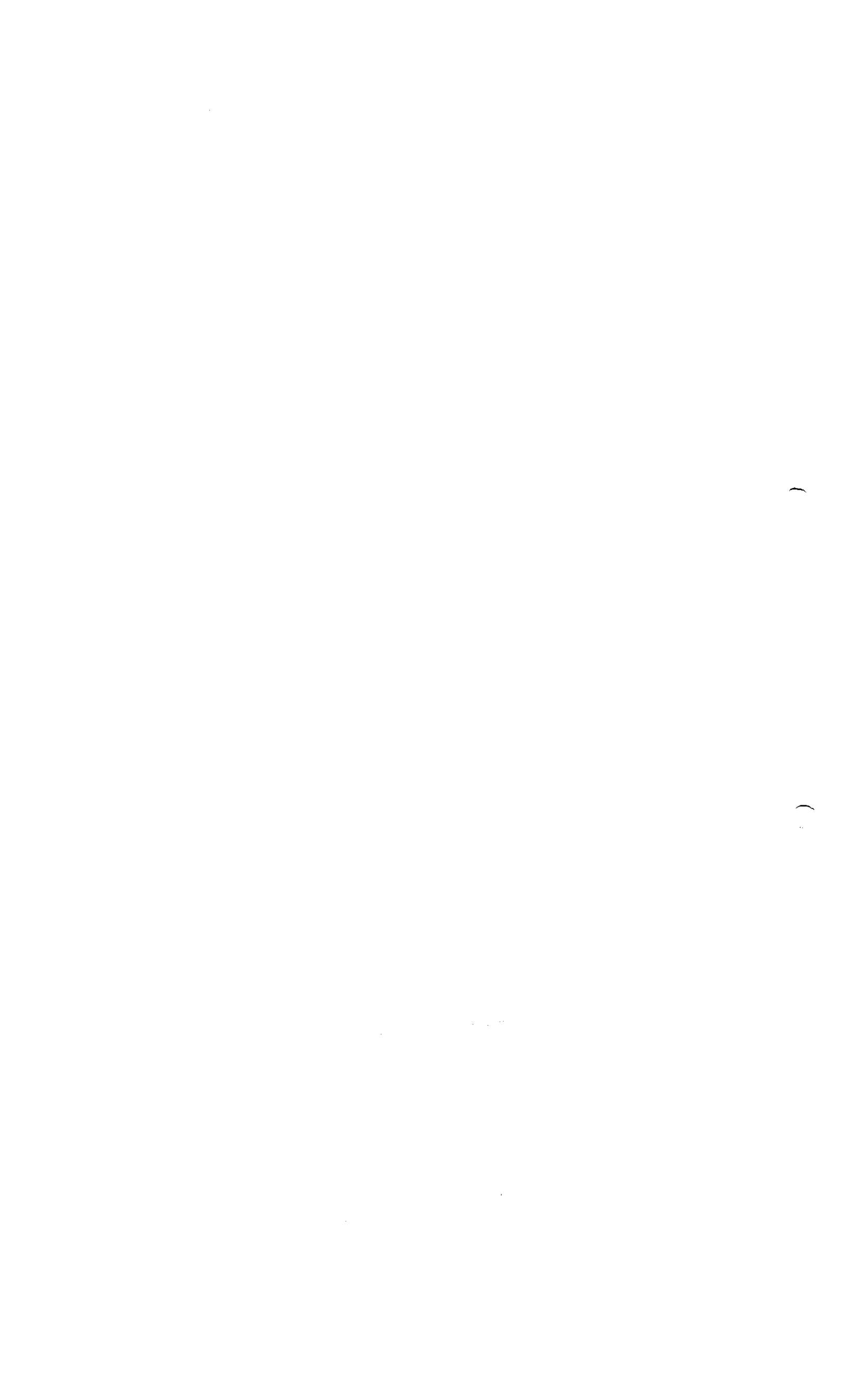
$P_{\text{Falta de ajuste}} = 0,29$

El método es lineal en el rango [5,02-55,92] µg/mL.

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

Figura 5: HBsAg total - Gráfico de linealidad







3.4.2.2.2 HBsAg no adsorbido

El diseño experimental aplicado al lote n° FDV01416 fue: 2 operadores realizaron 3 series separadas en días diferentes. Cada serie incluía el ensayo de un rango de 8 concentraciones de HBsAg no adsorbido (3 vacunas diluidas gracias a la matriz de Hexaxim del lote n° BBO09-081 sin HBsAg y tras centrifugación, 1 vacuna sin diluir tras centrifugación y 4 vacunas con agregado gracias a la vacuna contra la hepatitis B en la etapa de granel purificado del lote AC011).

3.4.2.2.2.1 Resultados analíticos

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

En la Tabla 52 se resumen los resultados del estudio.

La concentración media de HBsAg no adsorbido en la vacuna sin diluir es igual a 2,594 µg/mL (media geométrica de las 3 series). Por lo tanto, la concentración teórica prevista de HBsAg no adsorbido de la muestra se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Theoretical expected concentration} = \frac{(\text{concentration of vaccine} \times \text{volume of vaccine}) + (\text{concentration of spike} \times \text{volume of spike})}{\text{volume of Hexaxim matrix} + \text{volume of vaccine} + \text{volume of spike}}$$

Donde:

- Concentración del agregado en el nivel +4 = 180,27 µg/mL (media geométrica de las 3 mediciones);
- Concentración del agregado en los niveles +1, +2, +3 = 23,401 µg/mL (media geométrica de las 3 mediciones en el nivel +4);

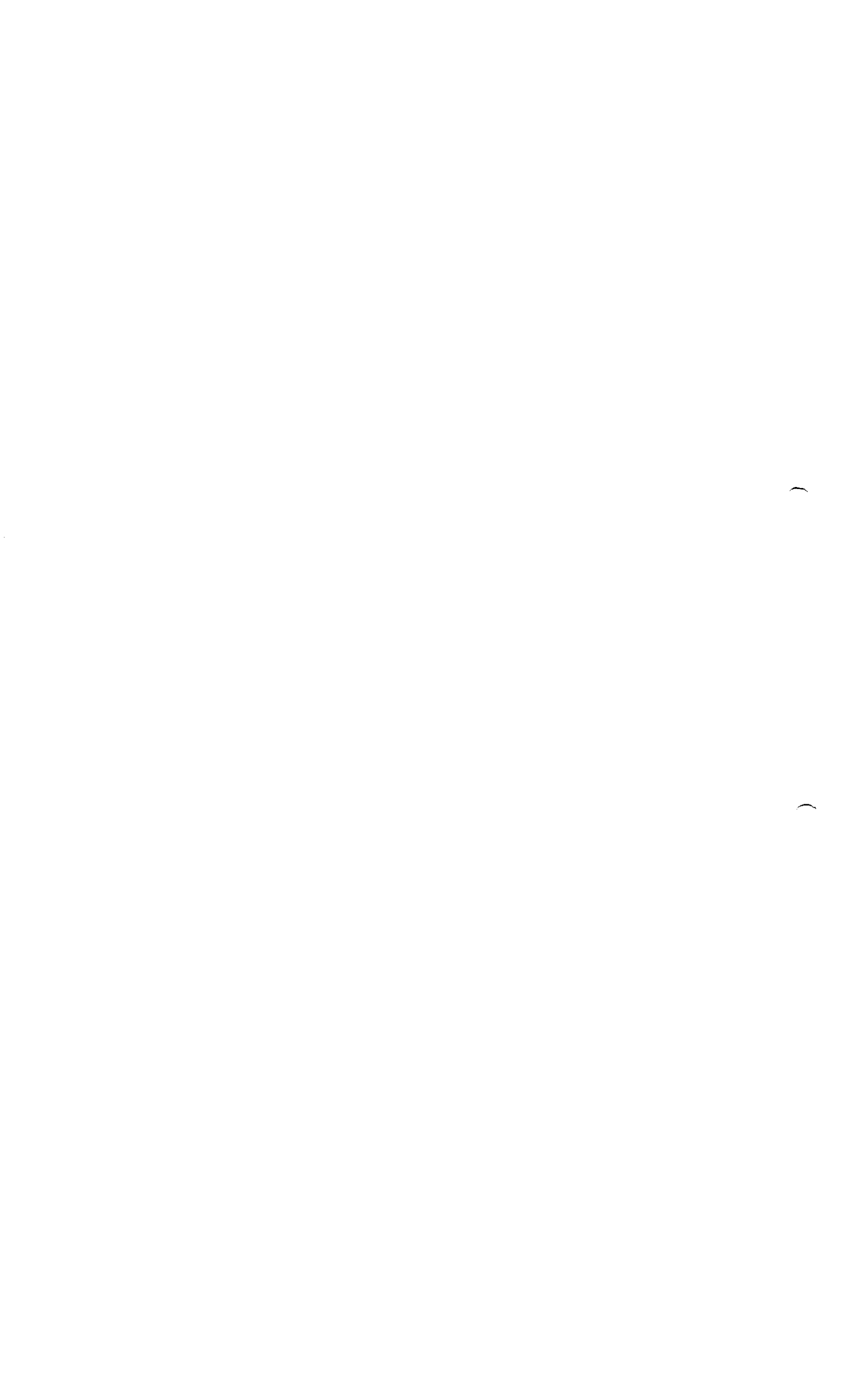
Ejemplos:

- En el nivel -3:

$$\text{Concentración teórica prevista} = \frac{(2.594 \times 75) + (23.401 \times 0)}{525 + 75 + 0} = 0,324 \mu\text{g/mL}$$

- En el nivel +3:

$$\text{Concentración teórica prevista} = \frac{(2.594 \times 0) + (23.401 \times 200)}{200 + 0 + 200} = 11,700 \mu\text{g/mL}$$





Se obtienen los siguientes resultados:

Tabla 52: HBsAg no adsorbido - Linealidad: concentraciones medidas frente a concentraciones teóricas previstas (µg/mL)

Nivel	Sobrenadante de la vacuna Hexaxim		Agregado de hepatitis B		Sobrenadante de la matriz de Hexaxim	Concentración teórica prevista (µg/mL)	Concentración medida (µg/mL)		
	Concentración (µg/mL)	Volumen (µL)	Concentración (µg/mL)	Volumen (µL)	Volumen (µL)		Serie 1	Serie 2	Serie 3
-3	2,594	75	23,401	0	525	0,324	0,247	0,317	0,314
-2		150		0	450	0,648	0,568	0,687	0,702
-1		300		0	300	1,297	1,188	1,583	1,520
0		400		0	0	2,594	2,650	2,544	2,589
+1		0		50	350	2,925	2,941	2,241	2,591
+2		0		100	300	5,850	5,758	5,390	4,926
+3		0		200	200	11,700	9,759	10,978	11,274
+4		1800		180,27	200	0	23,401	24,388	22,989

Nota: Todos los cálculos se realizan con logaritmos, dado que los datos siguen una distribución logarítmica normal.

3.4.2.2.2 Análisis

La linealidad en el rango seleccionado se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la Tabla 52:

- La homogeneidad de las varianzas vinculadas se verifica mediante la prueba de Cochran;
- La dependencia entre la concentración teórica prevista de HBsAg no adsorbido y la concentración medida de HBsAg no adsorbido, 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.

En la Tabla 53 se presentan los análisis estadísticos detallados.

La prueba de Cochran muestra que las varianzas de las 3 series 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 la concentración teórica y la concentración medida.





Tabla 53: HBsAg no adsorbido - Linealidad: ecuación de la recta de regresión

Ecuación de la recta de regresión	Coefficiente de determinación (R ²)	Rango de linealidad en µg/mL
$Y = (-0,016 \pm 0,027) + (0,997 \pm 0,037) \cdot X$	0,9931	[0,22-31,62]
donde: X= concentración teórica (log(µg/mL)) Y = concentración medida (log(µg/mL))		

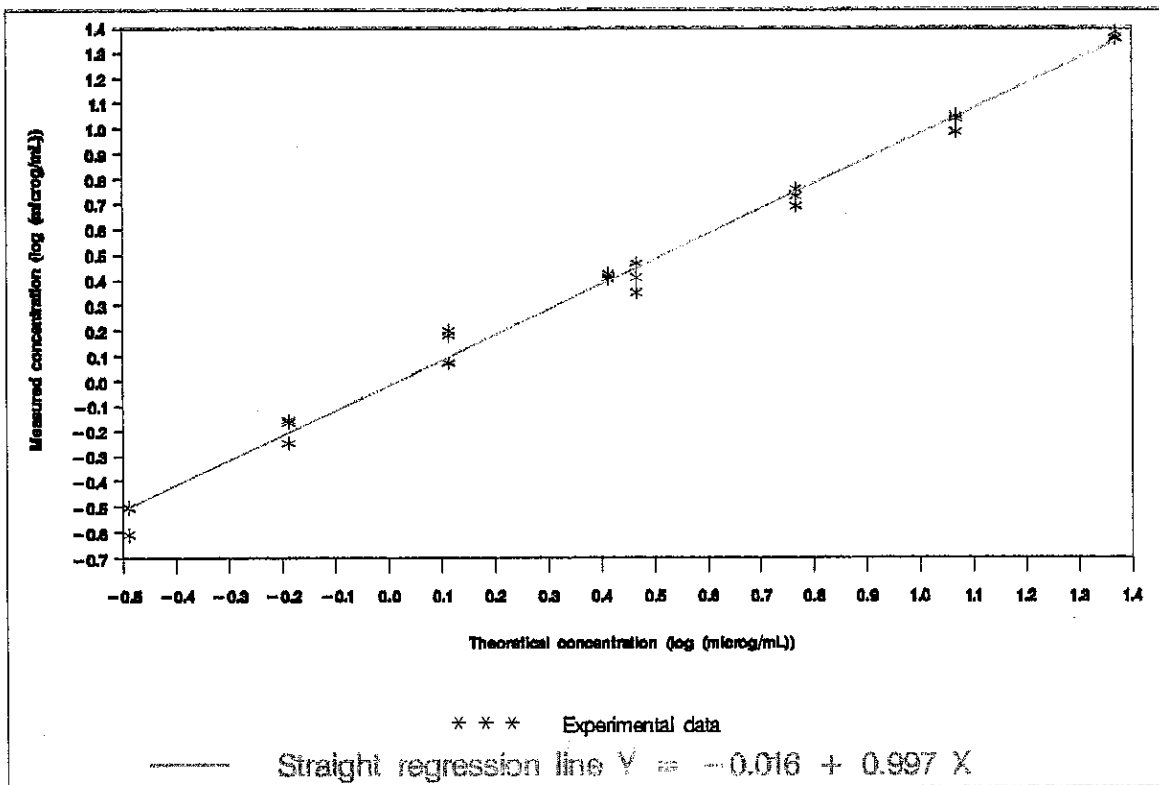
P_{linealidad} < 0,0001

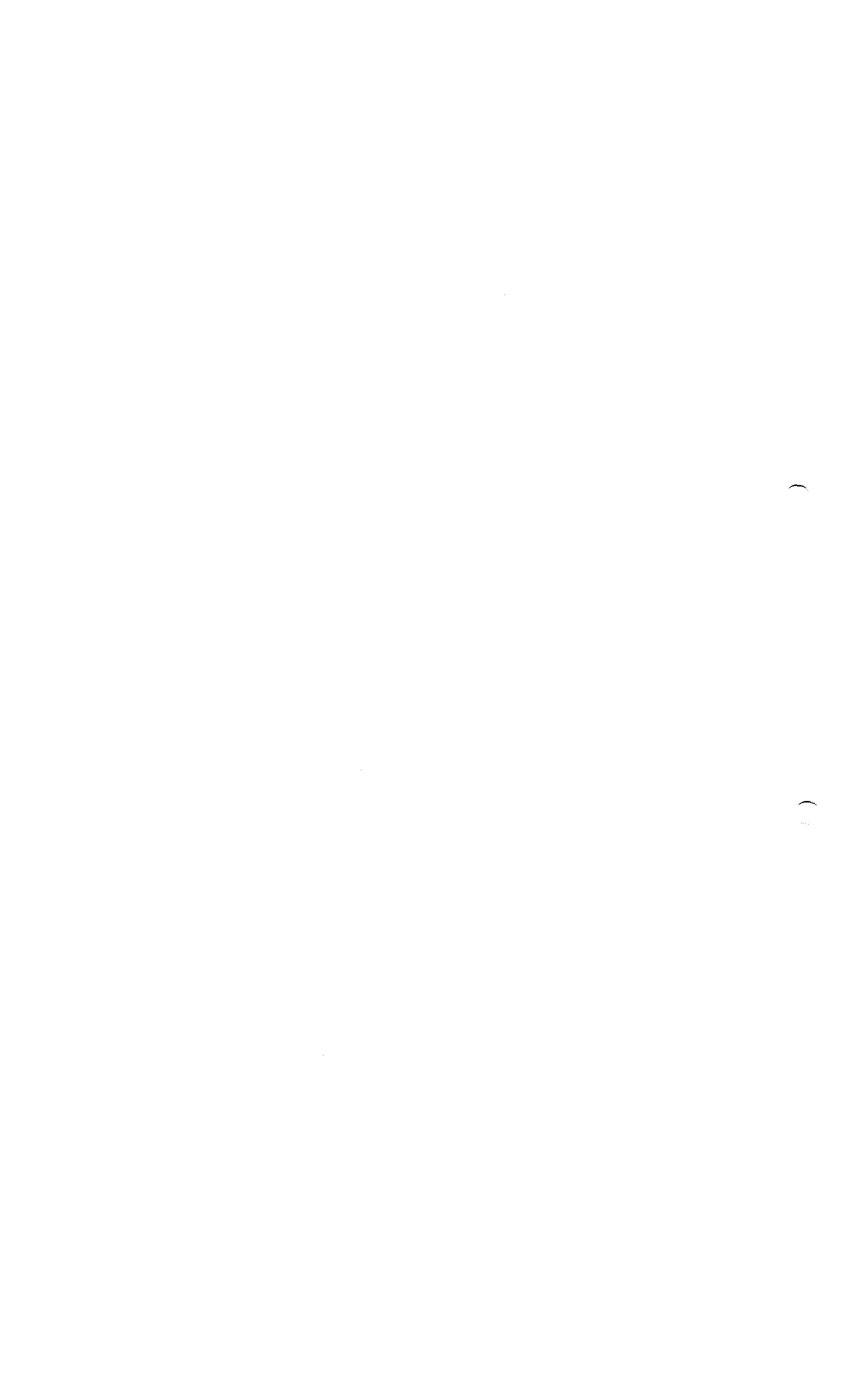
P_{Falta de ajuste} = 0,17

El método es lineal en el rango [0,22-31,62] µg/mL, con un rango de aplicación de [0,65-31,62] µg/mL (vea apartado 3.4.2.5, Límite de cuantificación)

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

Figura 6: HBsAg no adsorbido - Gráfico de linealidad







3.4.2.2.3 IVRP

Puesto que $Total\ HBsAg = IVRP \cdot reference\ titer\ (20\ \mu g / mL)$ ($IVRP = TotalHBsAg / 20$), el rango de linealidad de IVRP se calcula a partir de los resultados obtenidos para el HBsAg total.

El rango de linealidad del HBsAg total es: [5,0-55,9] $\mu g/mL$.

Así pues, el rango de linealidad de la IVRP es: [0,25-2,80] $\mu g/mL$.

3.4.2.3 Exactitud

3.4.2.3.1 HBsAg total

El diseño experimental aplicado al lote n° FDV01416 fue: 2 operadores realizaron 3 series separadas en días diferentes. Cada serie incluía el ensayo de un rango de 5 concentraciones de HBsAg total (2 vacunas diluidas gracias a la matriz de Hexaxim del lote n° BBO09-081 sin HBsAg, 1 vacuna sin diluir y 2 vacunas con agregado gracias a la vacuna contra la hepatitis B en la etapa de granel purificado del lote AC011).

3.4.2.3.1.1 Resultados analíticos

El dato sometido a análisis es la concentración de HBsAg total, expresada en $\mu g/mL$.

En la Tabla 50 del apartado 3.4.2.2.1.1 se resumen los resultados del estudio.

Puesto que la concentración teórica en la muestra de rutina (nivel 0) (media geométrica de las 3 concentraciones medidas) se utiliza para calcular la concentración teórica prevista, este nivel no se incluye en los cálculos de la exactitud. Por lo tanto, la exactitud se estudia en 4 niveles de concentración.

3.4.2.3.1.2 Análisis

La exactitud se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la Tabla 50.

- 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 %.

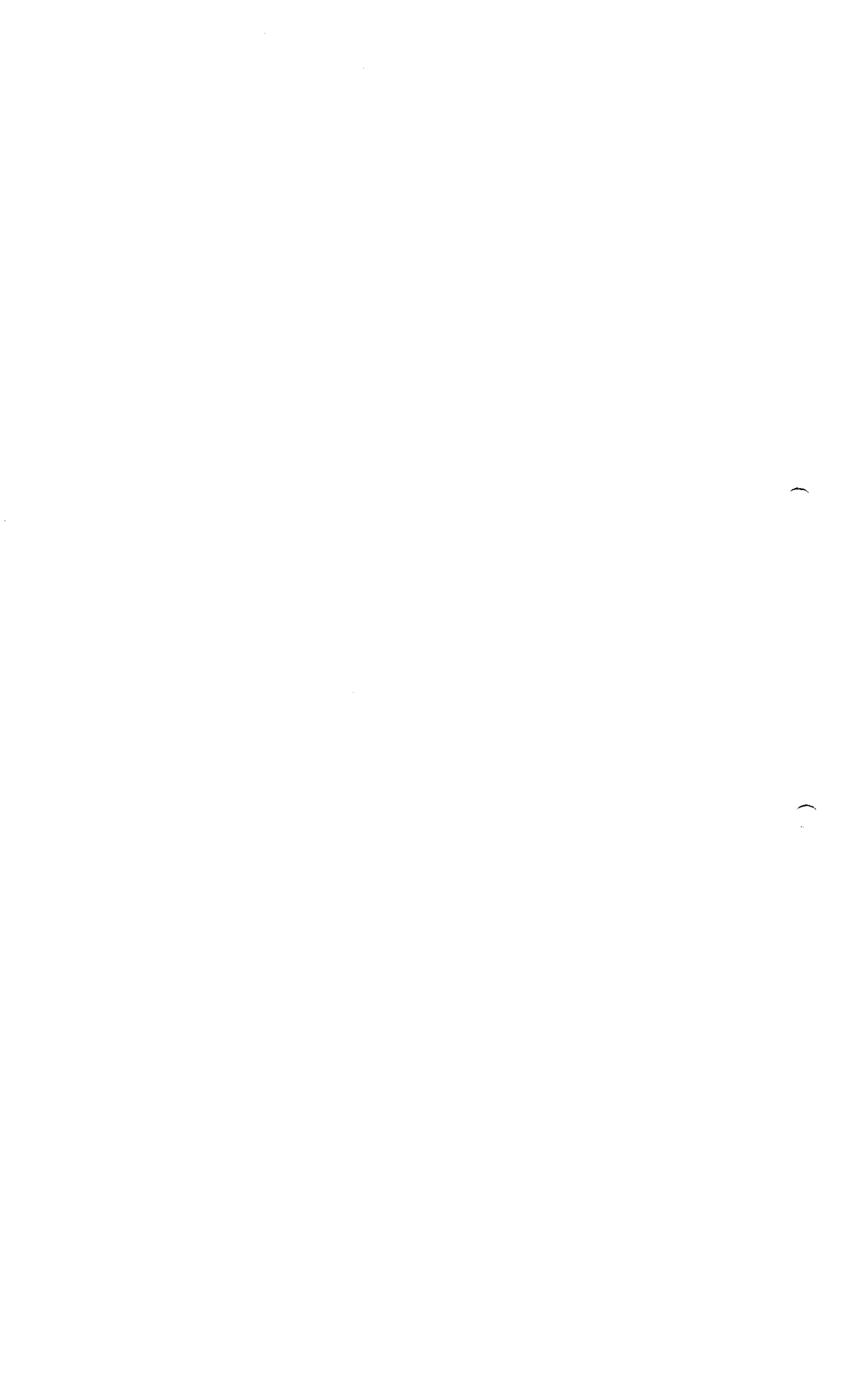




Tabla 54: HBsAg total - Exactitud: porcentaje de recuperación promedio por concentración

Cálculo de recuperación:	
Nivel de concentración teórica (µg/mL)	Media
6,552	95%
13,104	101%
34,317	105%
41,615	115%

La prueba de Cochran muestra que las varianzas de los niveles de titulación teórica prevista son homogéneas.

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

Tabla 55: HBsAg total - Exactitud: porcentaje de recuperación promedio global y límite de confianza del 95 %

Porcentaje de recuperación	Límites de confianza del 95 %
104%	[98-111]%

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

3.4.2.3.2 HBsAg no adsorbido

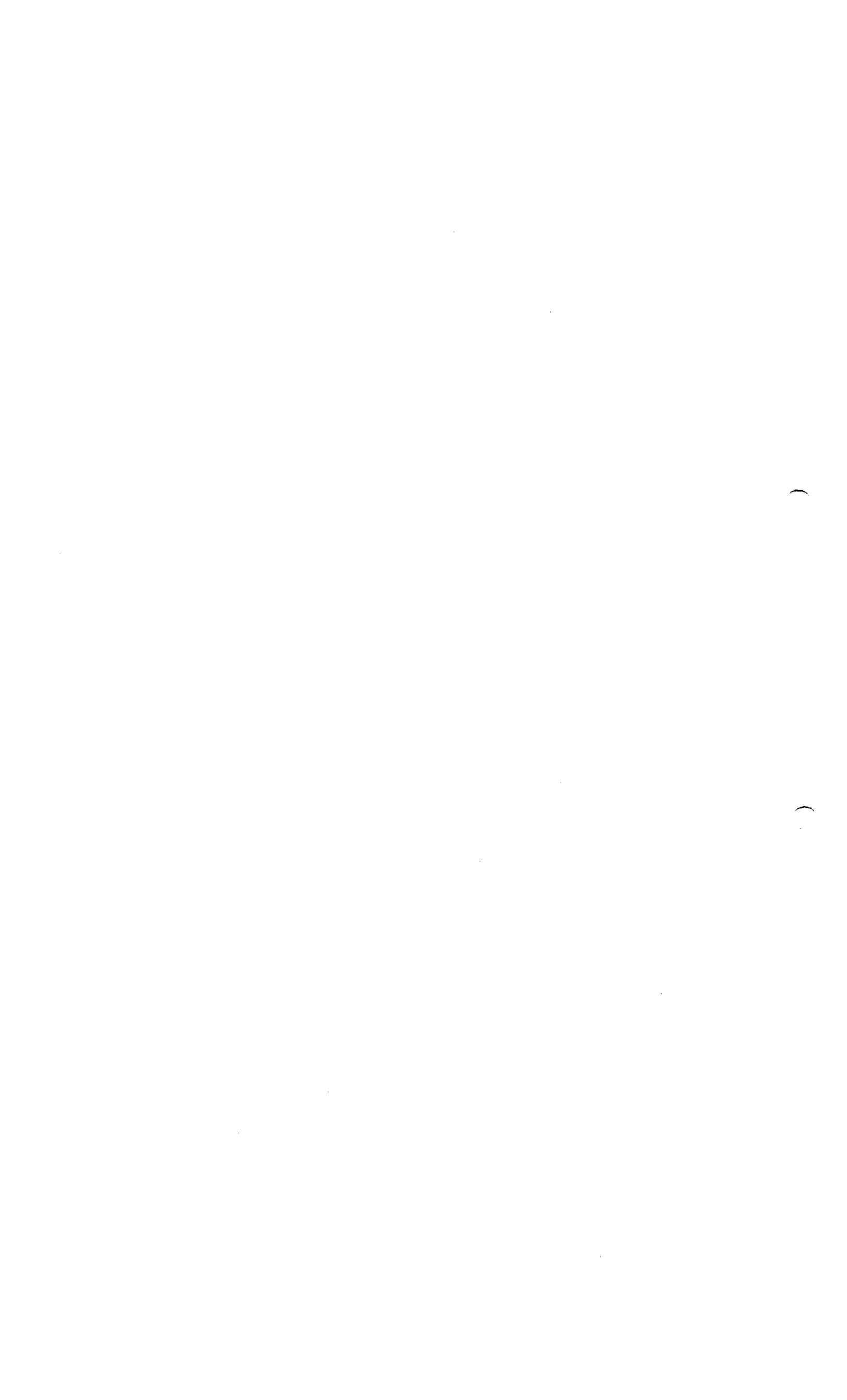
El diseño experimental aplicado al lote n° FDV01416 fue: 2 operadores realizaron 3 series separadas en días diferentes. Cada serie incluía el ensayo de un rango de 8 concentraciones de HBsAg no adsorbido (3 vacunas diluidas gracias a la matriz de Hexaxim del lote n° BBO09-081 sin HBsAg, 1 vacuna sin diluir y 4 vacunas con agregado gracias a la vacuna contra la hepatitis B en la etapa de granel purificado del lote AC011).

3.4.2.3.2.1 Resultados analíticos

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

En la Tabla 52 del apartado 3.4.2.2.2.1 se resumen los resultados del estudio.

Puesto que la concentración teórica en la muestra de rutina (nivel 0) y el nivel con el mayor agregado (nivel +4) (media geométrica de las 3 concentraciones medidas) se utilizan para calcular la concentración teórica prevista, estos niveles no se incluyen en los cálculos de la exactitud. Por lo tanto, la exactitud se estudia en 6 niveles de concentración.





3.4.2.3.2.2 Análisis

La exactitud se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la Tabla 52.

- El porcentaje de recuperación se calcula para cada nivel de concentración teórica prevista y para cada nivel de concentración medida;
- 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 %.

Tabla 56: HBsAg no adsorbido - Exactitud: porcentaje de recuperación promedio por concentración

Cálculo de recuperación:	
Nivel de concentración teórica (µg/mL)	Media
0,324	90%
0,648	101%
1,297	110%
2,925	89%
5,850	92%
11,700	91%

La prueba de Cochran muestra que las varianzas de los niveles de titulación teórica prevista son homogéneas.

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

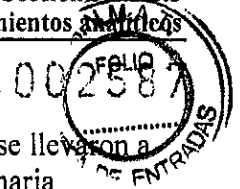
Tabla 57: HBsAg no adsorbido - Exactitud: porcentaje de recuperación promedio global y límite de confianza del 95 %

Porcentaje de recuperación	Límite de confianza del 95 %
95%	[89-102]%

Puesto que el porcentaje de recuperación promedio global se encuentra entre el 70% y el 130%, el método es exacto.

3.4.2.4 Precisión

El diseño experimental aplicado al lote n° FDV01416 fue:



- 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.

3.4.2.4.1 HBsAg total

3.4.2.4.1.1 Resultados analíticos

El dato sometido a análisis es la concentración de HBsAg total, expresada en $\mu\text{g/mL}$.

Los resultados se presentan en la Tabla 58.

Tabla 58: Precisión: concentraciones de HBsAg total ($\mu\text{g/mL}$)

Serie 1	Serie 2	Serie 3
24,417	23,871	25,204
27,353	25,484	25,609
24,278	26,667	27,654
24,627	26,434	27,985
23,232	24,828	28,468
22,274	24,460	25,683

Nota: Todos los cálculos se realizan con logaritmos, dado que los datos siguen una distribución logarítmica normal.

3.4.2.4.1.2 Análisis

La precisión del método se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la Tabla 58:

- 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.



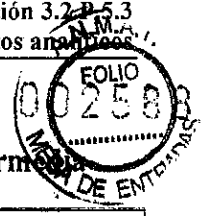


Tabla 59: HBsAg total - Precisión: características de repetibilidad y precisión intermedia

Características	Media general	Desviación estándar relativa	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95 %
Características de repetibilidad	1,405; en forma aritmética: 25,421 µg/mL.	5,6%	0,024	± 0,052; que equivale a x/± 1,13 en forma aritmética
Características de precisión intermedia con k=1 y n=1		7,0%	0,030	± 0,064; que equivale a x/± 1,16 en forma aritmética

Puesto que el intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia es inferior a x/± 1,3, el método es preciso.

3.4.2.4.2 Potencia relativa *in vitro* (IVRP)

3.4.2.4.2.1 Resultados analíticos

El dato sometido a análisis es la medición de la potencia relativa *in vitro* (IVRP).

Tabla 60: Precisión: mediciones de la potencia relativa *in vitro*

Serie 1	Serie 2	Serie 3
1,221	1,194	1,260
1,368	1,274	1,280
1,214	1,333	1,383
1,231	1,322	1,399
1,162	1,241	1,423
1,114	1,223	1,284

Nota: Todos los cálculos se realizan con logaritmos, dado que los datos siguen una distribución logarítmica normal.

3.4.2.4.2.2 Análisis

La precisión del método se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la Tabla 60:

- 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 61: Potencia relativa *in vitro*, precisión: características de repetibilidad y precisión intermedia

Características	Media general	Desviación estándar relativa	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95 %
Características de repetibilidad	0,104;	5,6%	0,024	± 0,052; que equivale a x/± 1,13 en forma aritmética
Características de precisión intermedia con k=1 y n=1	en forma aritmética: 1,271	7,0%	0,030	± 0,064; que equivale a x/± 1,16 en forma aritmética

Puesto que el intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia no es superior a x/± 1,3, el método es preciso.

3.4.2.4.3 HBsAg no adsorbido

3.4.2.4.3.1 Resultados analíticos

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

Tabla 62: Precisión: concentraciones de HBsAg no adsorbido (µg/mL)

Serie 1	Serie 2	Serie 3
3,078	2,766	3,354
2,964	2,836	3,397
2,595	3,115	2,963
2,787	3,168	3,208
2,735	2,773	3,311
2,399	2,712	3,072

Nota: Todos los cálculos se realizan con logaritmos, dado que los datos siguen una distribución logarítmica normal.

3.4.2.4.3.2 Análisis

La precisión del método se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la Tabla 62:

- 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.



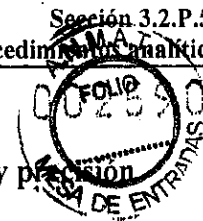


Tabla 63: HBsAg no adsorbido. Precisión: características de repetibilidad y precisión intermedia

Características	Media general	Desviación estándar relativa	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95 %
Características de repetibilidad	0,469;	7,2%	0,031	± 0,066; que equivale a x/± 1,17 en forma aritmética
Características de precisión intermedia con k=1 y n=1	en forma aritmética: 2,945 µg/mL.	10%	0,045	± 0,094; que equivale a x/± 1,24 en forma aritmética

Puesto que el intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia no es superior a x/± 1,3, el método es preciso.

3.4.2.4.4 Porcentaje de adsorción

3.4.2.4.4.1 Resultados analíticos

El dato sometido a análisis es el porcentaje de adsorción, expresado en %. El porcentaje de adsorción se calcula a partir del HBsAg total y el HBsAg no adsorbido con la fórmula:

$$\text{Porcentaje de adsorción} = \left(1 - \frac{\text{non-adsorbed HBsAg}}{\text{total HBsAg}} \right) * 100$$

Tabla 64: Precisión: porcentaje de adsorción (%)

Serie 1	Serie 2	Serie 3
87,394	88,413	86,693
89,164	88,871	86,735
89,311	88,319	89,285
88,683	88,015	88,537
88,227	88,831	88,369
89,230	88,913	88,039

3.4.2.4.4.2 Análisis

La precisión del método se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la Tabla 64:

- 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.



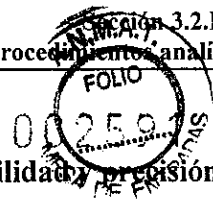


Tabla 65: Porcentaje de adsorción - Precisión: características de repetibilidad y precisión intermedia

Características	Media general	Desviación estándar relativa	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95 %
Características de repetibilidad	88,391%	0,87%	0,767	± 1,635%
Características de precisión intermedia con k=1 y n=1		0,91%	0,802	± 1,693%





3.4.2.5 Límite de cuantificación del HBsAg no adsorbido

Aplicado al lote nº FDV01416, se llevó a cabo el diseño siguiente en 2 niveles: en los niveles -2 y -1, ya que se estima que el límite de cuantificación se encuentra entre 0,5 y 1 µg/mL.

- 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.

3.4.2.5.1 Resultados analíticos

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

Tabla 66: Límite de cuantificación en el nivel -2: concentraciones de HBsAg no adsorbido (µg/mL)

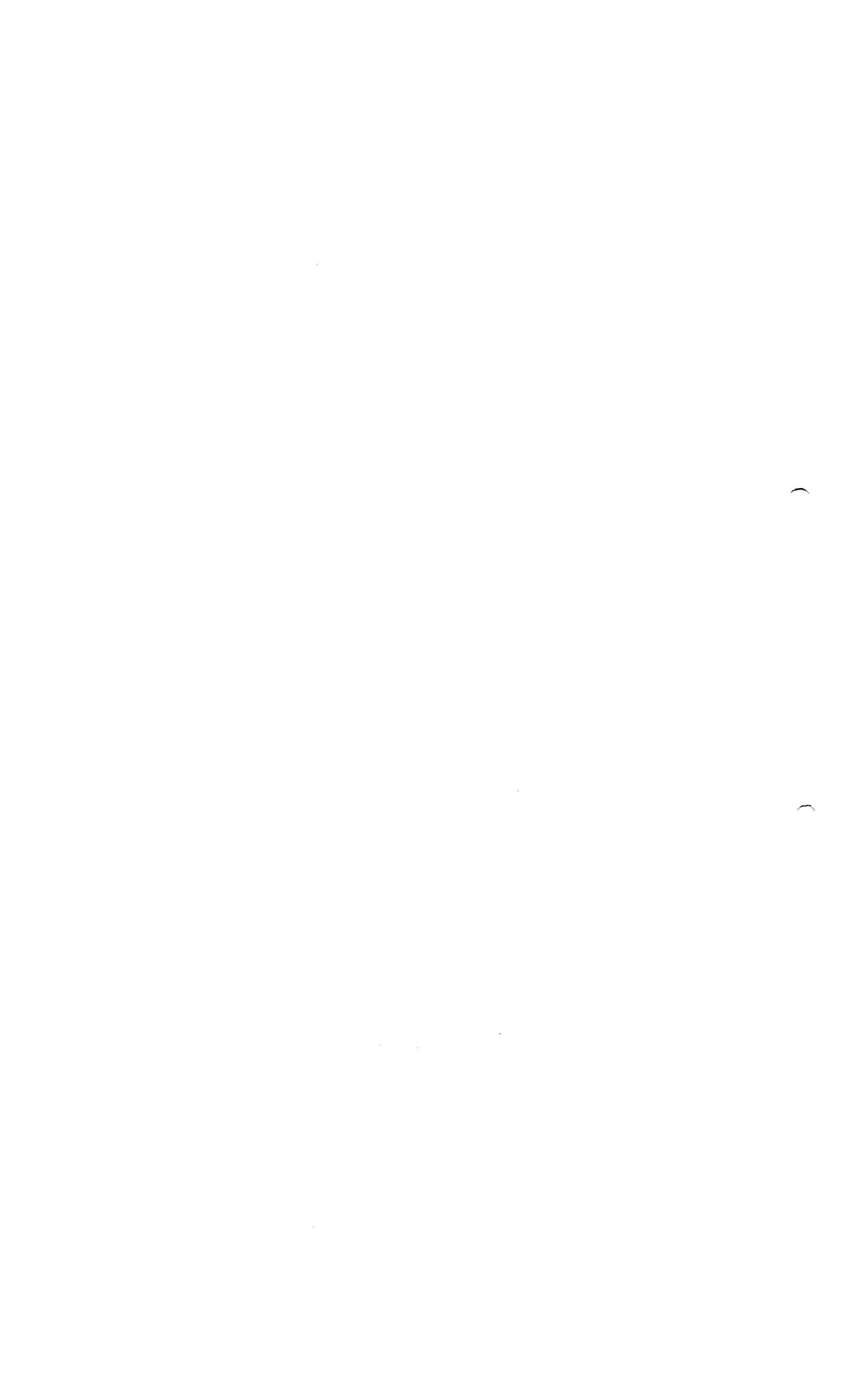
Serie 1	Serie 2	Serie 3
0,676	0,648	0,726
0,644	0,683	INV*
0,641	0,689	0,643
INV*	0,700	0,663
0,494	0,661	0,658
0,590	0,651	0,659

* INV: valor no válido

Tabla 67: Límite de cuantificación en el nivel -1: concentraciones de HBsAg no adsorbido (µg/mL)

Serie 1	Serie 2	Serie 3
1,406	1,528	1,409
1,514	1,450	1,425
1,314	1,488	1,306
1,224	1,337	1,303
1,137	1,343	1,397
1,137	1,342	1,462

Nota: Todos los cálculos se realizan con logaritmos, dado que los datos siguen una distribución logarítmica normal.





3.4.2.5.2 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 estos niveles se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la Tabla 66 y la Tabla 67:

- 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.

3.4.2.5.2.1 Nivel -2

La exactitud se ha demostrado en el apartado relativo a la exactitud (vea el apartado 3.4.2.3.2.2):
 $\bar{R} = 101\%$.

La prueba de Cochran se halla en el límite de significancia. La prueba de Dixon muestra un valor aberrante que no fue confirmado por el laboratorio. Los cálculos se han realizado según el peor de los casos (se ha elegido la varianza más alta como varianza de la repetibilidad)

Tabla 68: Límite de cuantificación de la matriz en el nivel 2: características de repetibilidad y precisión intermedia

Características	Media general	Desviación estándar relativa	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95 %
Características de repetibilidad	-0,187;	12%	0,054	± 0,149; que equivale a x/+ 1,41 en forma aritmética
Características de precisión intermedia con k=1 y n=1	en forma aritmética: 0,649 µg/mL	13%	0,055	± 0,134; que equivale a x/+ 1,36 en forma aritmética

Puesto que el intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia no es superior a x/+ 1,5, el método es preciso.

3.4.2.5.2.2 Nivel -1

La exactitud se ha demostrado en el apartado relativo a la exactitud (vea el apartado 3.4.2.3.2.2):
 $\bar{R} = 110\%$.

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

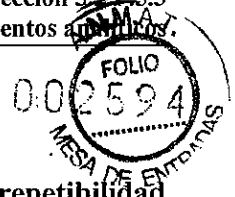


Tabla 69: Límite de cuantificación de la matriz en el nivel -1: características de repetibilidad y precisión intermedia

Características	Media general	Desviación estándar relativa	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95 %
Características de repetibilidad	0,133; en forma aritmética:	8,0%	0,035	± 0,074; que equivale a $x/\pm 1,19$ en forma aritmética
Características de precisión intermedia con $k=1$ y $n=1$	1,358 $\mu\text{g/mL}$	9,0%	0,039	± 0,082; que equivale a $x/\pm 1,21$ en forma aritmética

Puesto que el intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia no es superior a $x/\pm 1,5$, el método es preciso.

En el nivel -2, el método es preciso y exacto, por lo que el límite de cuantificación es $LC = 0,649 \mu\text{g/mL}$.

3.4.3 Conclusión

Se cumplen todos los criterios de aceptación:

El método es específico.

1) Para el HBsAg total:

El método es lineal en el rango: $[5,0-55,9] \mu\text{g/mL}$, en una escala logarítmica-logarítmica.

Se demuestra la exactitud en el mismo rango, con una recuperación promedio del 104%.

El método es preciso:

- El intervalo de confianza de la precisión intermedia es de $\pm 0,064$, lo que equivale en forma aritmética a $x/\pm 1,16$, para 1 serie con 1 medición;
- La media general es de 1,405, que en forma aritmética equivale a 25,4.

2) Para IVRS (potencia relativa *in vitro*):

Puesto que la IVRP se calcula con las mediciones del HBsAg total, el rango de linealidad es: $[0,25-2,80]$.

El método es preciso:

- El intervalo de confianza de la precisión intermedia es de $\pm 0,064$, lo que equivale en forma aritmética a $x/\pm 1,16$, para 1 serie con 1 medición;
- La media general es de 0,104, que en forma aritmética equivale a 1,27.

3) Para el HBsAg no adsorbido:

El método es lineal en el rango: $[0,6-31,6] \mu\text{g/mL}$, en una escala logarítmica-logarítmica.

Se demuestra la exactitud en el mismo rango, con una recuperación promedio del 95%.





El método es preciso:

- El intervalo de confianza de la precisión intermedia es de $\pm 0,094$, lo que equivale en forma aritmética a $x/\pm 1,24$, para 1 serie con 1 medición;
- La media general es de 0,469, que en forma aritmética equivale a 2,9.

El límite de cuantificación del HBsAg no adsorbido, definido a 0,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, es:

- Exacto, con un porcentaje de recuperación igual a 101%;
- Preciso, puesto que el intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 serie con una medición es de $\pm 0,134$, lo que equivale en forma aritmética a $x/\pm 1,36$.

4) Para el porcentaje de adsorción:

Para información, la media general es de 88,4% y el intervalo de confianza de la precisión intermedia es de $\pm 1,7\%$ para 1 serie con 1 medición.

Como conclusión, el método es específico, lineal, exacto y preciso y el límite de cuantificación del HBsAg no adsorbido a 0,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ es exacto y preciso.

El contenido de antígeno de hepatitis B por el método ELISA es válido para medir los antígenos de hepatitis B en las etapas de producto final a granel y producto llenado en la vacuna.

3.5 Contenido de antígeno D

3.5.1 Panorama

Como parte de la guía de la ICH, este estudio describe la validación del ensayo del antígeno D mediante el método de líneas paralelas en la vacuna Hexaxim en la etapa de producto final a granel.

El título del antígeno D de las suspensiones de poliovirus se determina mediante ELISA específicamente para cada tipo de poliovirus en relación con un estándar de referencia de título conocido.

Hemos seleccionado un método cuantitativo en el que se utiliza peroxidasa de rábano picante como marcador enzimático y ABTS como sustrato.

El método se llama "indirecto", porque los anticuerpos para cada tipo de poliovirus pertenecen a 2 especies animales distintas, y el conjugado, que es común para los 3 tipos, se une a las gammaglobulinas de una de las especies animales.

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

Los resultados de la validación se resumen de la Tabla 70 a la Tabla 73:

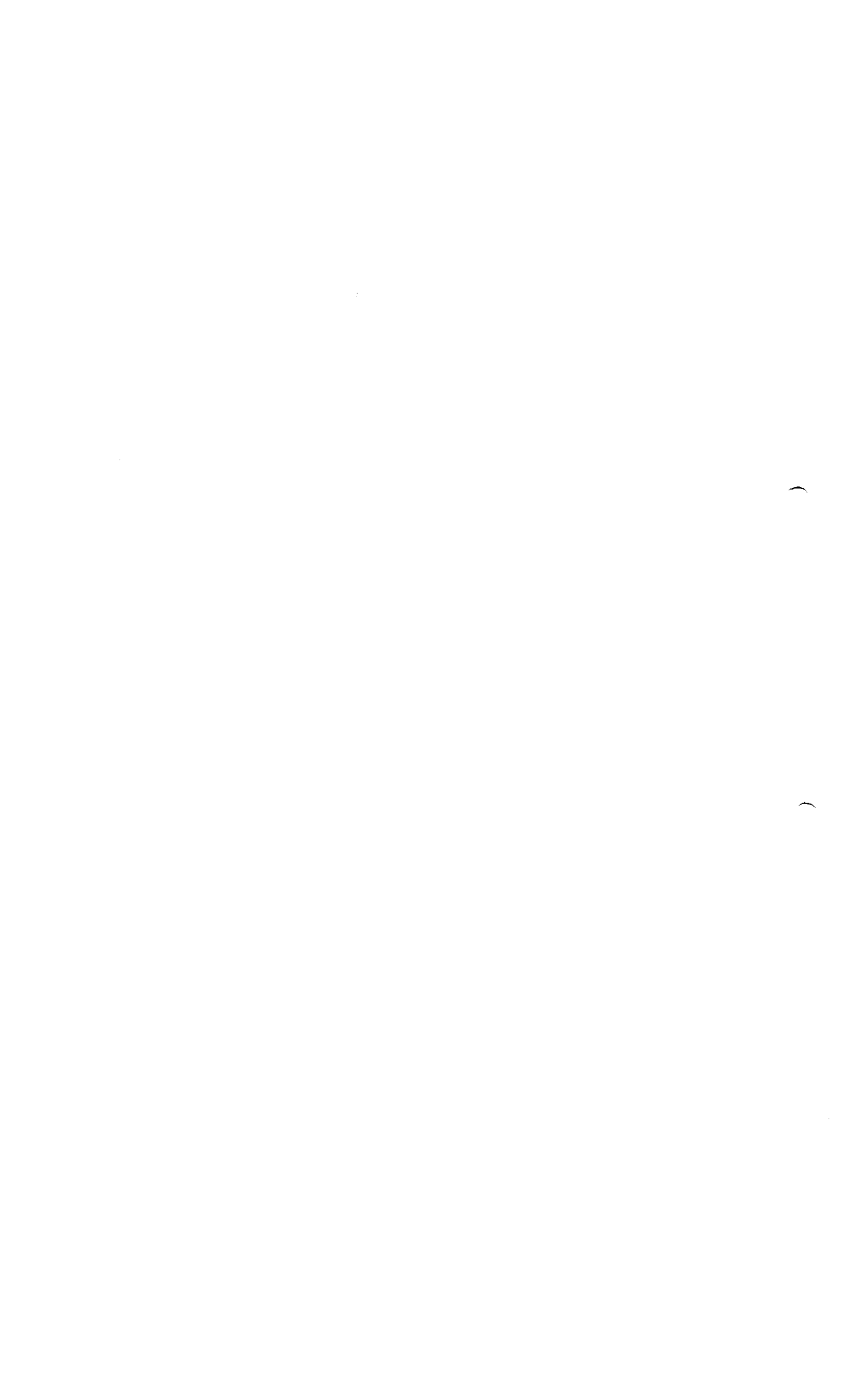




Tabla 70: Resultados de la validación: especificidad

Características	Criterios de aceptación	Resultados
Especificidad	<ul style="list-style-type: none">- Para la matriz de Hexaxim sin IPV, la densidad óptica debe ser menor que los testigos- Para el lote de PFAG de Hexaxim y el trivalente de control de validez, la densidad óptica debe ser equivalente	<p>Intertipo:</p> <ul style="list-style-type: none">- Verificación por densidades ópticas positivas de que para la cosecha sin procesar del tipo 1: señal positiva en la placa del tipo 1 y ausencia de señal en las placas del tipo 2 y del tipo 3.- Verificación por densidades ópticas positivas de que para la cosecha bruta del tipo 2: señal positiva en la placa del tipo 2 y ausencia de señal en las placas del tipo 1 y del tipo 3.- Verificación por densidades ópticas positivas de que para la cosecha bruta del tipo 3: señal positiva en la placa del tipo 3 y ausencia de señal en la placa del tipo 1 y en la placa del tipo 2. <p>Intervalencia</p> <ul style="list-style-type: none">- Para la matriz de Hexaxim sin IPV, la densidad óptica es menor o equivalente a los testigos- Para el lote de PFAG de Hexaxim y el trivalente de control de validez, las densidades ópticas son equivalentes

